

**Institut für Biochemie und Biologie**  
Arbeitsgruppe Zoophysiologie

---

**Klonierung und Charakterisierung aminergerezeptoren der  
Amerikanischen Schabe *Periplaneta americana***

**- Dissertation -**

zur Erlangung des akademischen Grades

"doctor rerum naturalium"

(Dr. rer. nat.)

in der Wissenschaftsdisziplin

**"Molekulare Zoophysologie"**

eingereicht an der  
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät  
der Universität Potsdam

von

BRITTA TROPFMANN

Potsdam, den 25.06.2009

Online veröffentlicht auf dem  
Publikationsserver der Universität Potsdam:  
URL <http://opus.kobv.de/ubp/volltexte/2009/3661/>  
URN urn:nbn:de:kobv:517-opus-36619  
[<http://nbn-resolving.org/urn:nbn:de:kobv:517-opus-36619>]

## Zusammenfassung

Biogene Amine sind kleine organische Verbindungen, die sowohl bei Vertebraten als auch bei Invertebraten als Neurotransmitter, Neuromodulatoren und/oder Neurohormone wirken. Sie bilden eine bedeutende Gruppe von Botenstoffen und entfalten ihre Wirkungen vornehmlich über die Bindung an G-Protein-gekoppelte Rezeptoren.

Bei Insekten wurde eine Vielzahl von Wirkungen biogener Amine beschrieben. Das führte schon frühzeitig zur Vermutung, dass Insekten (u. a. Invertebraten) wie die Wirbeltiere ein diverses Repertoire an aminergen Rezeptoren besitzen. Für ein umfassendes Verständnis der komplexen physiologischen Wirkungen biogener Amine fehlten jedoch wichtige Informationen über die molekulare Identität der entsprechenden Rezeptorproteine und ihrer pharmakologischen Eigenschaften, ihre Lokalisation und ihre intrazellulären Reaktionspartner. Viele bei Schaben gut untersuchte (neuro)physiologische Prozesse sowie Verhaltensweisen werden durch Serotonin und Dopamin gesteuert bzw. moduliert. Über die beteiligten Rezeptoren ist jedoch bisher vergleichsweise wenig bekannt. Die Klonierung und Charakterisierung von Serotonin- und Dopaminrezeptoren der Amerikanischen Schabe *P. americana* ist damit ein längst überfälliger Schritt auf dem Weg zu einem umfassenden Verständnis der vielfältigen Wirkungen biogener Amine bei Insekten.

Durch die Anwendung verschiedener Klonierungsstrategien konnten cDNAs isoliert werden, die für potentielle Serotoninrezeptoren und einen Dopaminrezeptor kodieren. Die Sequenzen weisen die größte Ähnlichkeit zu Mitgliedern der 5-HT<sub>1</sub>- und 5-HT<sub>7</sub>-Rezeptorklassen bzw. den Invertebratentyp-Dopaminrezeptoren auf. Die isolierten Rezeptoren der Amerikanischen Schabe wurden dementsprechend *Pea*(*Periplaneta americana*)5-HT<sub>1</sub>, *Pea*5-HT<sub>7</sub> und *Pea*Dop2 benannt. Das Hydropathieprofil dieser Rezeptoren postuliert das Vorhandensein der charakteristischen heptahelikalen Architektur G-Protein-gekoppelter Rezeptoren. Die abgeleiteten Aminosäuresequenzen zeigen typische Merkmale aminergerezeptoren. So sind Aminosäuren, die bedeutend für die Ligandenbindung, die Rezeptoraktivierung und die Kopplung an G-Proteine sind, in den Rezeptoren konserviert.

Expressionsstudien zeigten eine auffallend hohe Expression aller drei Rezeptor-mRNAs im Gehirn sowie in den Speicheldrüsen. Im Rahmen dieser Arbeit wurden polyklonale Antikörper gegen den *Pea*5-HT<sub>1</sub>-Rezeptor sowie den *Pea*Dop2-Rezeptor hergestellt. Der anti-*Pea*5-HT<sub>1</sub>-Antikörper detektiert im Homogenat von Schabengehirnen, Speicheldrüsen und *Pea*5-HT<sub>1</sub>-exprimierenden HEK 293-Zellen die glykosylierte Form des Rezeptors. In Gehirnschnitten markiert der anti-*Pea*5-HT<sub>1</sub>-Antikörper spezifisch einige Zellkörper in der Pars intercerebralis und deren Axone, welche in den Corpora cardiaca Nerv I projizieren. Der *Pea*Dop2-Rezeptor wurde durch den spezifischen anti-*Pea*Dop2-Antikörper in

Neuronen mit Somata im anterioren Randbereich der Medulla nachgewiesen. Diese Neurone innervieren die optischen Loben und projizieren in das ventrolaterale Protocerebrum.

Die intrazellulären Signalwege der heterolog exprimierten Pea5-HT<sub>1</sub>- und PeaDop2-Rezeptoren wurden in HEK 293-Zellen untersucht. Die Aktivierung des Pea5-HT<sub>1</sub>-Rezeptors durch Serotonin führt zur Hemmung der cAMP-Synthese. Des Weiteren wurde gezeigt, dass der Rezeptor konstitutive Aktivität besitzt. WAY 100635, ein hoch selektiver 5-HT<sub>1A</sub>-Rezeptorantagonist, wurde als wirksamer inverser Agonist am Pea5-HT<sub>1</sub>-Rezeptor identifiziert. Der stabil exprimierte PeaDop2-Rezeptor antwortet auf eine Aktivierung durch Dopamin mit einer Erhöhung der cAMP-Konzentration. Eine C-terminal trunke Variante dieses Rezeptors ist eigenständig nicht funktional.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit indizieren, dass die untersuchten aminergen Rezeptoren im zentralen Nervensystem der Schabe an der Informationsverarbeitung beteiligt sind und verschiedene physiologische Prozesse in peripheren Organen regulieren. Mit der Klonierung und funktionellen Charakterisierung der ersten Serotoninrezeptoren und eines Dopaminrezeptors ist damit eine wichtige Grundlage für die Untersuchung ihrer Funktionen geschaffen worden.

## Abstract

Biogenic amines are small organic compounds that act as neurotransmitters, neuromodulators and/or neurohormones in vertebrates and in invertebrates. They form an important group of messenger substances and mediate their diverse effects primarily by binding to G protein-coupled receptors. The molecular identification as well as the functional and pharmacological characterization of these receptors is crucial for the comprehension of the intracellular signaling pathways activated by biogenic amines.

This work describes the molecular and functional characterization of the first serotonin receptors and an invertebrate-type dopamine receptor of the American cockroach, *Periplaneta americana*.

Using a PCR-strategy based on degenerate primers and RACE-PCR three cDNAs encoding for putative biogenic amine receptors were isolated from *P. americana* brain cDNA (*Pea5-ht1*, *Pea5-ht7*, *PeaDop2*). The deduced amino acid sequences display major characteristics common to all G protein-coupled receptors.

Primarily Distribution of receptor mRNA was investigated by RT-PCR. The analysis revealed a high mRNA expression level for all three receptors in the brain and salivary glands. The distribution of the *Pea5-HT<sub>1</sub>* and *PeaDop2* receptor proteins was analyzed by immunohistochemistry with specific affinity-purified polyclonal antibodies. Both receptor proteins are expressed in brain and salivary glands. Furthermore the cellular distribution of the receptors was investigated by immunocytochemistry on brain sections. The anti-*Pea5-HT<sub>1</sub>* receptor antibody specifically labelled some large somata in the *pars intercerebralis*. Labeled axons of these neurons pass down the anterior surface of the brain and cross over in the chiasma region of the *corpora cardiaca nerve 1*. The *PeaDop2* receptor was detected in neurons with somata at the anterior edge of the medulla bilaterally innervating the optic lobes and projecting to the ventro-lateral protocerebrum.

In order to clarify the functional and pharmacological properties of the cloned receptors, we studied HEK 293 cell lines stably expressing *Pea5-HT<sub>1</sub>* or *PeaDop2*. Activation of *Pea5-HT<sub>1</sub>* expressing cells by serotonin reduced adenylyl cyclase activity in a dose-dependent manner. The *Pea5-HT<sub>1</sub>* receptor was expressed as a constitutively active receptor with methiothepin acting as a neutral antagonist and WAY 100635 as an inverse agonist. The activation of the *PeaDop2* receptor by dopamine induced an increase in intracellular cAMP level, whereas a C-terminally truncated splice variant of this receptor does not exhibit any functional property by itself.

The results of this work suggest important roles of the investigated receptors in various areas of the cockroach brain. The molecular and pharmacological characterization of the first serotonin receptors and a dopamine receptor of the cockroach now provides the basis for forthcoming studies regarding the significance of these particular receptors for cockroach behavior and physiology.



## Inhaltsverzeichnis

<i>Inhaltsverzeichnis</i> .....	<i>i</i>
<i>Abbildungsverzeichnis</i> .....	<i>iv</i>
<i>Tabellenverzeichnis</i> .....	<i>v</i>
<b>1 EINLEITUNG</b> .....	<b>1</b>
1.1 SIGNALTRANSDUKTION .....	1
1.2 G-PROTEIN-GEKOPPELTE REZEPTOREN (GPCRs) .....	2
1.2.1 Struktur und Klassifizierung von GPCRs.....	3
1.2.2 Signaltransduktion G-Protein-gekoppelter Rezeptoren.....	4
1.2.3 Konstitutive Aktivität G-Protein-gekoppelter Rezeptoren.....	7
1.3 BIOGENE AMINE.....	8
1.3.1 Funktion der biogenen Amine Serotonin (5-Hydroxytryptamin, 5-HT) und Dopamin bei Insekten.....	9
1.3.2 Serotoninrezeptoren.....	10
1.3.3 Dopaminrezeptoren.....	12
1.4 PERIPLANETA AMERICANA ALS MODELLORGANISMUS.....	13
1.5 ZIELSETZUNG DER ARBEIT .....	14
<b>2 MATERIAL UND METHODEN</b> .....	<b>15</b>
2.1 CHEMIKALIEN UND MATERIAL .....	15
2.2 VERSUCHSTIERE UND PRÄPARATION DER GEWEBE .....	15
2.2.1 Haltung der Versuchstiere.....	15
2.2.2 Präparation der Gewebe.....	15
2.3 MOLEKULARBIOLOGISCHE METHODEN .....	16
2.3.1 RNA-Isolierung.....	16
2.3.2 Extraktion von poly(A) <sup>+</sup> -RNA.....	17
2.3.3 cDNA-Synthese.....	17
2.3.4 Polymerase-Kettenreaktion (polymerase chain reaction, PCR).....	17
2.3.4.1 PCR.....	18
2.3.4.2 PCR mit degenerierten Primern.....	18
2.3.4.3 SMART-RACE-PCR (switching mechanism at 5' end of RNA transcript rapid amplification of cDNA ends-PCR).....	18
2.3.4.4 RT-PCR (reverse transcription PCR).....	20
2.3.5 Restriktion.....	20
2.3.6 Agarose-Gelelektrophorese.....	21
2.3.7 DNA-Isolierung aus Agarose-Gelen.....	21
2.3.8 Ligation.....	21
2.3.9 Transformation kompetenter <i>E. coli</i> -Zellen.....	22
2.3.10 Isolierung von Plasmid-DNA.....	22
2.4 BIOCHEMISCHE METHODEN.....	23
2.4.1 Proteinbestimmung .....	23
2.4.2 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese .....	23
2.4.3 Western-Blot und Immundetektion.....	24
2.4.4 Herstellung und Immuncytochemie von Schnittpräparaten.....	25
2.4.4.1 Anfertigung von Gefrierschnitten .....	25
2.4.4.2 Anfertigung von Vibratomschnitten.....	26
2.4.5 Präabsorption.....	26

2.4.6 Expression von Fusionsproteinen.....	26
2.4.7 Reinigung von Fusionsproteinen mittels Amylose-Säulenchromatographie....	27
2.4.8 Reinigung von Fusionsproteinen mit Metallionen-Affinitätschromatographie...	27
2.4.9 Gewinnung polyklonaler Antiseren .....	27
2.4.10 Affinitätschromatographie polyklonaler Antikörper.....	28
2.5 HETEROLOGE EXPRESSION DER REZEPTOREN IN HEK 293 ZELLEN.....	29
2.5.1 Konstruktion der Expressionsvektoren.....	29
2.5.2 Herstellung stabiler Zelllinien.....	29
2.5.3 Immuncytochemie an transfizierten Zellen.....	30
2.5.4 Präparation von Membranproteinen .....	30
2.5.5 Deglykosylierung von Membranproteinen .....	31
2.5.6 cAMP Assay.....	31
2.6 STATISTISCHE ANALYSEN UND BIOINFORMATISCHE METHODEN.....	32
<b>3 ERGEBNISSE.....</b>	<b>33</b>
3.1 SEROTONINREZEPTOREN DER SCHABE <i>PERIPLANETA AMERICANA</i> .....	34
3.1.1 Der <i>Pea5HT<sub>1</sub></i> -Rezeptor.....	34
3.1.1.1 Generelle Struktur von <i>Pea5-ht1</i> .....	34
3.1.1.2 Strukturelle Eigenschaften der abgeleiteten Aminosäuresequenz .....	34
3.1.1.3 Phylogenetische Analyse.....	38
3.1.1.4. Expressionsmuster des <i>Pea5-ht1</i> -Gens.....	38
3.1.1.5 Immundetektion des <i>Pea5-HT<sub>1</sub></i> -Rezeptors auf Western-Blots.....	40
3.1.1.6 Immunhistologische Lokalisation des <i>Pea5-HT<sub>1</sub></i> -Rezeptors im Gehirn .....	42
3.1.1.7 Funktionelle Charakterisierung des <i>Pea5-HT<sub>1</sub></i> -Rezeptors .....	46
3.1.2 Der <i>Pea5-HT<sub>7</sub></i> -Rezeptor.....	55
3.1.2.1 Isolierung einer partiellen cDNA des <i>Pea5-ht7</i> -Rezeptors.....	55
3.1.2.2 Strukturelle Eigenschaften der abgeleiteten, partiellen Aminosäuresequenz.....	55
3.1.2.3 Phylogenetische Analyse.....	57
3.1.2.4. Expressionsmuster des putativen <i>Pea5-ht7</i> -Gens.....	59
3.2 DER <i>PEADOP2</i> -REZEPTOR .....	60
3.2.1 Generelle Struktur von <i>PeaDop2</i> .....	60
3.2.2 Strukturelle Eigenschaften der abgeleiteten Aminosäuresequenzen .....	61
3.2.3 Phylogenetische Analyse.....	66
3.2.4 Expressionsmuster des <i>Peadop2</i> -Gens.....	67
3.2.5 Immundetektion des <i>PeaDop2</i> -Rezeptors in Western-Blot-Analysen .....	68
3.2.6 Immunhistologische Lokalisation des <i>PeaDop2</i> -Rezeptors im Gehirn.....	69
3.2.7 Funktionelle Expression des <i>PeaDop2</i> -Rezeptorproteins in HEK 293-Zellen..	71
<b>4 DISKUSSION .....</b>	<b>79</b>
4.1 STRUKTURELLE EIGENSCHAFTEN DER AMINERGEN REZEPTOREN.....	81
4.1.1 Alternative Spleißvarianten von GPCRs.....	81
4.1.2 Eigenschaften der Aminosäuresequenz.....	83
4.1.2.1 Charakteristisch für GPCRs: die heptahelikale Architektur.....	83
4.1.2.2 Posttranslationale Modifikationen.....	84
4.1.2.3 Die Liganden-Bindungstasche und Aktivierung von aminergen Rezeptoren .....	86
4.1.3 Phylogenetische Einteilung.....	87
4.2 DIE FUNKTIONELLE CHARAKTERISIERUNG DES <i>PEA5-HT<sub>1</sub></i> - UND DER <i>PEADOP2</i> -REZEPTOREN .....	89
4.2.1 Der <i>Pea5-HT<sub>1</sub></i> -Rezeptor ist ein funktioneller Serotoninrezeptor .....	89
4.2.1.1 Pharmakologie des <i>Pea5-HT<sub>1</sub></i> -Rezeptors.....	90
4.2.1.2 Der <i>Pea5-HT<sub>1</sub></i> -Rezeptor ist konstitutiv aktiv .....	91
4.2.2 Der <i>PeaDop2A</i> -Rezeptor ist ein funktioneller Dopaminrezeptor.....	93



---

4.2.2.1 <i>Pharmakologie des PeaDop2A-Rezeptors</i> .....	95
4.3 LOKALISATION DES PE5-HT <sub>1</sub> -, PEa5-HT <sub>7</sub> - UND PEADOP2-REZEPTORS UND MÖGLICHE FUNKTIONEN DER REZEPTOREN <i>IN VIVO</i> .....	96
4.3.1 <i>Verteilungsmuster der serotonergen Rezeptoren</i> .....	96
4.3.1.1 <i>Verteilungsmuster der serotonergen Rezeptoren im ZNS</i> .....	96
4.3.1.2 <i>Mögliche Funktionen der serotonergen Rezeptoren</i> .....	98
4.3.1.4 <i>Mögliche Funktionen der serotonergen Rezeptoren in peripheren Geweben</i> .....	100
4.3.2 <i>Verteilungsmuster des Peadop2-Rezeptors</i> .....	100
4.3.2.1 <i>Verteilung des PeaDop2-Rezeptors im Nervensystem</i> .....	100
4.3.2.2 <i>Mögliche Funktionen des PeaDop2-Rezeptors</i> .....	101
4.3.2.3 <i>Verteilung des PeaDop2-Rezeptors in peripheren Organen</i> .....	102
4.3.2.4 <i>Mögliche Funktionen der Pea5-HT<sub>1</sub>-, Pea5-HT<sub>7</sub>- und PeaDop2A-Rezeptoren bei der Speichelbildung und -sekretion bei P. americana</i> .....	103
4.4 AUSBLICK.....	106
<b>5 LITERATUR</b> .....	<b>108</b>
<b>6 ANHANG</b> .....	<b>125</b>
6.1 ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS .....	125
6.2 GERÄTE UND KOMMERZIELLE KITS .....	126
6.3 PRIMER.....	127
6.4 NUKLEINSÄURESEQUENZEN DER REZEPTOREN.....	128
6.5 ANTIKÖRPER.....	131
<b>LEBENS LAUF</b> .....	<b>II</b>
<b>PUBLIKATIONEN</b> .....	<b>III</b>
<b>EIDESSTATTLICHE ERKLÄRUNG</b> .....	<b>IV</b>

## Abbildungsverzeichnis

1.1	Schematische Darstellung wichtiger Signalwege G-Protein-gekoppelter Rezeptoren . . .	6
1.2	Biosynthese von Serotonin (5-HT) und Dopamin . . . . .	9
3.1	Sequenzvergleich der Rezeptorfragmente von <i>P. americana</i> (Pea) und <i>D. melanogaster</i> (Dm) . . . . .	34
3.2	Vergleich der Aminosäuresequenz des Pea5-HT <sub>1</sub> -Rezeptors mit orthologen 5-HT <sub>1</sub> -Rezeptoren. . . . .	37
3.3	Phylogenetische Analyse von Pea5-HT <sub>1</sub> und verschiedenen 5-HT-Rezeptoren. . . . .	39
3.4	Expression von <i>Pea5-ht1</i> und <i>Peaactin</i> in verschiedenen Geweben von <i>P. americana</i>	40
3.5	Western-Blot-Analyse von Gehirnhomogenaten der Schabe ( <i>P. americana</i> ) . . . . .	40
3.6	Western-Blot-Analyse zur Überprüfung der Glykosylierung des Pea5-HT <sub>1</sub> -Rezeptorproteins. . . . .	41
3.7	Western-Blot-Analyse zur Verteilung des Pea5-HT <sub>1</sub> -Rezeptors im Nervensystem. . . . .	42
3.8	Immunohistochemische Lokalisation von Pea5-HT <sub>1</sub> an Gehirnschnitten. . . . .	44
3.9	Immuncytochemischer Nachweis des Pea5-HT <sub>1</sub> -Rezeptors in stabil transfizierten HEK 293-Zellen. . . . .	46
3.10	Western-Blot-Analyse mit Membranproteinen von Pea5-HT <sub>1</sub> -transfizierten HEK 293-Zellen. . . . .	47
3.11	Messung der basalen und NKH-477-induzierten cAMP-Konzentrationen. . . . .	48
3.12	Einfluss verschiedener biogener Amine auf die NKH-477-stimulierte [cAMP] <sub>i</sub> . . . . .	49
3.13	Messung der [cAMP] <sub>i</sub> in Abhängigkeit der 5-HT-Konzentration. . . . .	50
3.14	Einfluss von 5-HT-Rezeptoragonisten auf die NKH-477-stimulierte cAMP-Produktion. .	51
3.15	Einfluss von 5-HT-Rezeptorantagonisten auf die 5-HT-modulierte cAMP Produktion. . .	52
3.16	Modulation der [cAMP] <sub>i</sub> in Abhängigkeit von Methiothepin und WAY 100635. . . . .	53
3.17	Einfluss von Methiothepin und WAY 100635 auf die NKH-477-stimulierte cAMP-Produktion in Pea5-HT <sub>1</sub> -exprimierenden HEK 293-Zellen. . . . .	54
3.18	Klonierung von <i>Pea5-ht7</i> -cDNA-Fragmenten. . . . .	56
3.19	Phylogenetische Analyse des Pea5-HT <sub>7</sub> -Rezeptors. . . . .	58
3.20	Expression von <i>Pea5-ht7</i> und <i>Peaactin</i> in verschiedenen Geweben von <i>P. americana</i>	59
3.21	Spezifische Amplifikation der beiden Spleißvarianten des <i>Peadop2</i> -Rezeptors. . . . .	60
3.22	Nukleotidsequenz und abgeleitete Aminosäuresequenz des <i>PeaDop2A</i> -Rezeptors. . .	62
3.23	Transmembrantopologie des <i>PeaDop2A</i> -Rezeptors. . . . .	63
3.24	Vergleich der Aminosäuresequenz des <i>PeaDop2A</i> -Rezeptors mit orthologen Rezeptoren weiterer Insekten. . . . .	65
3.25	Phylogenetische Analyse des <i>PeaDop2A</i> -Rezeptors. . . . .	66
3.26	Expression von <i>Peadop2A</i> , <i>Peadop2B</i> und <i>Peaactin</i> in verschiedenen Geweben von <i>P. americana</i> . . . . .	67
3.27	Western-Blot-Analyse mit dem anti- <i>PeaDop2</i> -Antikörper. . . . .	69

3.28	Immunohistochemische Lokalisation des PeaDop2-Rezeptors in Gefrierschnitten des Gehirns. ....	70
3.29	Western-Blot-Analyse von Membranproteinen von PeaDop2A/B-transfizierten HEK 293-Zellen. ....	72
3.30	Immunhistochemischer Nachweis des PeaDop2A/B-Rezeptors in stabil transfizierten HEK 293-Zellen. ....	72
3.31	Einfluss biogener Amine auf die $[cAMP]_i$ PeaDop2A/B-exprimierenden HEK 293-Zellen. ....	74
3.32	Messung der $[cAMP]_i$ in Abhängigkeit von der Dopamin-Konzentration. ....	75
3.33	Einfluss von Dopaminrezeptoragonisten auf die cAMP-Produktion in pcPeaDop2A-transfizierten Zellen. ....	76
3.34	Einfluss von Dopaminrezeptorantagonisten auf die Dopamin-induzierte cAMP-Produktion. ....	78
6.1	Nukleinsäuresequenz des Pea5- <i>ht1</i> -Rezeptors. ....	128
6.2	Nukleinsäuresequenz des PeaDop2A-Rezeptors. ....	129
6.3	Nukleinsäuresequenz des PeaDop2B-Rezeptors. ....	130

## Tabellenverzeichnis

1.1	Serotoninrezeptoren der Insekten. ....	12
1.2	Dopaminrezeptoren der Insekten. ....	13
2.1	Verwendete Vektoren. ....	22
2.2	Verwendete Liganden. ....	32
6.1	Geräte. ....	126
6.2	Kommerzielle Kits. ....	126
6.3	Verwendete Primer. ....	127
6.4	Primäre Antikörper. ....	131
6.5	Sekundäre Antikörper. ....	131



# 1 EINLEITUNG

## 1.1 Signaltransduktion

Alle Lebewesen werden mit verschiedensten Umweltreizen konfrontiert und müssen darauf reagieren können. Die fortdauernde Existenz eines multizellulären Organismus ist nur möglich, wenn die Aufnahme von Informationen aus seiner Umwelt sowie die Kommunikation zwischen einzelnen Zellen innerhalb des Organismus gewährleistet ist. Im Laufe der Evolution entwickelten sich bei Eukaryoten komplexe Mechanismen für die Aufnahme physikalischer und chemischer Reize. Der interzelluläre Informationsaustausch basiert auf Signalmolekülen, die von der signalisierenden Zelle abgegeben und von der Zielzelle erkannt werden, oder auf direktem Kontakt zwischen Strukturen benachbarter Zellen. Nur wenige unpolare Moleküle sind in der Lage, in die Zelle zu diffundieren und regulierend auf intrazelluläre Reaktionen einzuwirken. Die Signalübertragung der meist polaren Botenstoffe erfolgt über Rezeptormoleküle, bei denen es sich in erster Linie um Transmembranproteinkomplexe handelt. Die Bindung eines extrazellulären Signalmoleküls (Ligand) bewirkt die Aktivierung des Rezeptors, welche letztlich eine Kaskade intrazellulärer Signale auslöst und schließlich zu einer elektrischen oder biochemischen Veränderung in der Empfängerzelle führt.

Rezeptoren erfüllen allgemein zwei Hauptfunktionen: Zum einen die Erkennung spezifischer Botenstoffe und zum anderen die Aktivierung von Effektoren. Trotz der enormen Zahl biologisch wirksamer Signale und der ausgelösten Reaktionen können die bisher identifizierten Rezeptoren in zwei Gruppen eingeordnet werden (KANDEL ET AL. 1996): Rezeptoren der ersten Gruppe beeinflussen Ionenkanäle auf direkte Weise (ionotrope Rezeptoren). Die Bindung eines Liganden an seinen Rezeptor induziert die Öffnung eines intrinsischen Ionenkanals, die Rezeptor- und Effektorfunktion wird somit von unterschiedlichen Domänen eines Rezeptorproteinkomplexes ausgeübt. Bei der zweiten Gruppe von Rezeptoren liegt demgegenüber eine indirekte Steuerung vor: Die Bindung des Liganden und die Aktivierung von Effektoren ist voneinander getrennt. Diese Gruppe zerfällt wiederum in zwei Familien: In der Familie der metabotropen Rezeptoren sind die Rezeptormoleküle über Proteine, die ein Guaninnukleotid binden (G-Proteine), mit den Effektormolekülen gekoppelt. Entsprechend werden Mitglieder dieser Familie auch G-Protein-gekoppelte Rezeptoren (GPCRs) genannt. Diese bilden die deutlich größte Gruppe von membranständigen Rezeptoren (siehe 1.2). Die Effektoren werden in dieser Rezeptorfamilie nur unter Beteiligung spezifischer weiterer Proteine aktiviert. Bei

den Effektoren handelt es sich meist um Enzyme, die einen intrazellulären sekundären Botenstoff (*second messenger*) erzeugen oder abbauen. Diese sekundären Botenstoffe lösen dann ihrerseits eine Kaskade biochemischer Folgereaktionen aus. Zu den wichtigsten Signalwegen gehören die Veränderung der intrazellulären cAMP-Konzentration ( $[cAMP]_i$ ) sowie die Mobilisierung von  $Ca^{2+}$  aus intrazellulären Speichern. In manchen Fällen kann ein G-Protein oder ein *second messenger* allerdings auch direkt auf einen plasmamembranständigen Ionenkanal wirken. Die zweite Gruppe von indirekt wirkenden Rezeptoren beinhaltet membranständige Rezeptoren mit intrinsischer Enzymaktivität (katalytische Rezeptoren), die die Zellmembran einmal durchspannen, extrazellulär eine Ligandenbindungstelle und intrazellulär eine katalytische Domäne besitzen. Diese Rezeptoren sind meist Proteinkinasen, Proteinphosphatasen oder aber Guanylylcyclasen.

## 1.2 G-Protein-gekoppelte Rezeptoren (GPCRs)

GPCRs stellen, wie bereits erwähnt, die umfangreichste Familie der membranständigen Rezeptoren dar. Ihre elementare Funktion besteht in der Transduktion extrazellulärer Reize in intrazelluläre Signale. Die Signalübertragung erfolgt in der Regel über die Kopplung der GPCRs an heterotrimere G-Proteine. Nach der Bindung eines Liganden kommt es zu Konformationsänderungen innerhalb des G-Proteins und verschiedene Effektorsysteme können aktiviert werden.

Gene für GPCRs repräsentieren 1-5 % aller Gene innerhalb der Genome von Vertebraten und Invertebraten (BOCKAERT & PIN 1999). Die Anwesenheit von GPCRs in den Genomen von Einzellern wie Bakterien und Hefen über einfache Mehrzeller wie *Dictyostelium discoideum* bis hin zu Säugern spricht für einen sehr frühen evolutionären Ursprung dieser Moleküle (DOHLMAN ET AL. 1991, NEW & WONG 1998, STEFAN ET AL. 1998, KROEZE ET AL. 2003, RÖMPLER ET AL. 2007). Die Diversität der GPCRs spiegelt sich sowohl in der strukturellen Vielfalt der Reize als auch der beteiligten intrazellulären Signalwege wider. Sie sind an der Aufnahme und Transduktion einer großen Vielfalt von Signalen beteiligt. Dazu zählen Photonen, Ionen, Duftstoffe, Proteine und kleine Moleküle wie Aminosäuren, Peptide und Nucleotide (BOCKAERT & PIN 1999, JACOBY ET AL. 2006). GPCRs haben eine wichtige Funktion bei Prozessen wie Neurotransmission, direkte neuroendocrine Kontrolle der physiologischen Homeostase und Reproduktion. Sie regulieren Stoffwechselprozesse und beeinflussen Wachstum, Proliferation, Differenzierung und Absterben von verschiedenen Zelltypen (LUTTRELL 2008). Eine Vielzahl von Krankheiten wird mit Mutationen in Genen für GPCRs und damit verbundenen Funktionsstörungen dieser Rezeptoren assoziiert. GPCRs fungieren

entsprechend als Angriffsstelle für zahlreiche lebenswichtige Medikamente und etwa 50 % aller klinisch eingesetzten Medikamente entfalten ihre Wirkung über GPCRs, indem sie endogene Liganden nachahmen, den Zugang des endogenen Liganden zum Rezeptor blockieren oder die Ligandensynthese modulieren (FLOWER 1999, HOPKINS & GROOM 2002, BOND & IJZERMAN 2006). Daher sind Untersuchungen zur Struktur und Funktion dieser Rezeptoren und deren Wechselwirkungen mit den natürlichen Liganden eine wichtige Voraussetzung für die Entwicklung neuer therapeutischen Arzneimittel. Des Weiteren gelten GPCRs als interessanter Ansatzpunkt für die Entwicklung spezifischer Insektizide und Akarizide.

### 1.2.1 Struktur und Klassifizierung von GPCRs

Ungeachtet der chemischen und funktionellen Vielfalt der gebundenen Signalmoleküle weisen alle G-Protein-gekoppelten Rezeptoren hinsichtlich ihrer Struktur eine sehr ähnliche Architektur auf (STRADER ET AL. 1995, GETHER 2000, KROEZE ET AL. 2002, JACOBY ET AL. 2006): Sie bestehen aus einer Polypeptidkette mit sieben  $\alpha$ -helikalen Transmembransegmenten (TMs). Diese hydrophoben TMs werden alternierend durch hydrophile intrazelluläre und extrazelluläre Schleifen verbunden. Der Aminoterminus (N-Terminus) der Polypeptidkette liegt dabei stets extrazellulär. Charakteristischerweise besitzt der N-Terminus von GPCRs eine oder mehrere potentielle N-Glykosylierungsstellen für die posttranslationale Addition von Zuckerresten. Der Carboxylterminus (C-Terminus) befindet sich dagegen auf der cytoplasmatischen Seite der Zellmembran. Durch Palmitoylierung von Cystein-Resten in der C-terminalen Region und Insertion dieser Fettsäure in der Membran kann es zur Ausbildung einer vierten intrazellulären Schleife kommen (O'DOWD ET AL. 1989, JIN ET AL. 1999, CHINI & PARENTI 2009). Die TMs zeigen den höchsten Grad an Konservierung bezüglich der Sequenz und Länge (20-27 Aminosäuren). Dagegen weisen die intra- und extrazellulären Domänen eine sehr große Variabilität bezüglich ihrer Länge und Komplexität auf (LUTTRELL 2008). GPCRs zeigen insgesamt eine weitaus konsequentere Konservierung in Bezug auf ihre dreidimensionale Struktur als auf ihre Aminosäuresequenz (DAVIES ET AL. 2007). Als Grundlage für die Modellierung der dreidimensionalen Struktur und der regulatorischen Mechanismen von GPCRs dienen unter anderem die kristallographischen Analysen des Rhodopsins (PALCZEWSKI ET AL. 2000, SCHEERER ET AL. 2008) sowie die kürzlich aufgeklärten Kristallstrukturen  $\beta$ -adrenerger Rezeptoren und eines Adenosinrezeptors (RASMUSSEN ET AL. 2007, ROSENBAUM ET AL. 2007, 2009; CHEREZOV ET AL. 2007, JAAKOLA ET AL. 2008, WARNE ET AL. 2008).

Basierend auf einer aktuellen phylogenetische Studie zur Einteilung der humanen GPCRs wurde das sogenannte GRAFS-Klassifikationssystem (FREDRIKSSON ET AL. 2003) proklamiert: Dieses System teilt die GPCRs in fünf Hauptfamilien ein: Glutamat-, Rhodopsin-, Adhäsions-, Frizzled/Taste2- und Secretin-Familie. Es gibt Hinweise, dass die Familien des GRAFS-Klassifizierungssystems von einem gemeinsamen Vorfahren abstammen und durch Genduplikation und Exon-Shuffling entstanden sein könnten. (SCHIÖTH & FREDRIKSSON 2005). Aufgrund der geringen Sequenzhomologien der Glutamat-, Rhodopsin- und Secretin-Familie ist der evolutionäre Ursprung dieser Rezeptorfamilien jedoch nach wie vor umstritten und Gegenstand der aktuellen Forschung (RÖMPLER ET AL. 2007).

Die Glutamat-Familie enthält neben den metabotropen Glutamatrezeptoren unter anderem auch Rezeptoren für  $\gamma$ -Aminobuttersäure und eine Gruppe von Geschmacksrezeptoren (TAS1). Die größte (90 % aller GPCRs) und am besten untersuchte Rezeptorfamilie stellt die Familie der Rhodopsin-Rezeptoren dar. Sie beinhaltet Rezeptoren, die durch eine Vielzahl sehr unterschiedlicher Liganden wie biogene Amine, Peptide, Glykoproteine, Lipide, Purine, Eicosanoide, Proteasen oder Chemokine stimuliert werden. Weiterhin fungieren GPCRs der Rhodopsin-Familie als Sensoren für exogene Reize wie Licht (Photonen), Geschmacks- und Duftstoffe. Die Adhäsions-Rezeptoren besitzen eine ausgeprägte N-terminale Region, die Adhäsions-ähnliche Motive enthält. Die Frizzled/Taste2-Gruppe enthält neben Geschmacksrezeptoren auch Rezeptoren für verschiedene Glycoproteine. Vergleichsweise große Peptide sind die Liganden für Mitglieder der Familie der Secretin-Rezeptoren (FREDRIKSSON ET AL. 2003, SCHIÖTH & FREDRIKSSON 2005).

### **1.2.2 Signaltransduktion G-Protein-gekoppelter Rezeptoren**

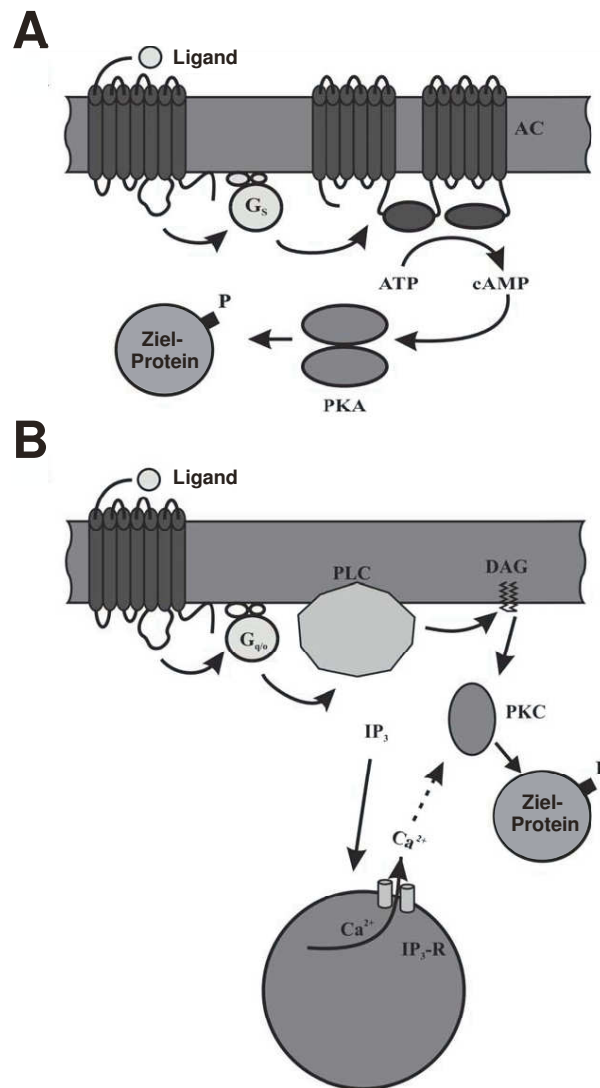
Bei der Bindung eines Liganden an einen GPCR, kommt es zu Konformationsänderungen des Rezeptors. Dabei führt die Störung starker ionischer Wechselwirkungen zu Veränderungen der relativen Orientierung einzelner Transmembransegmente zueinander (BALLESTEROS ET AL. 2001, SHAPIRO ET AL. 2002), so dass eine Aktivierung von intrazellulären trimeren G-Proteinen möglich ist. G-Proteine stellen das Verbindungsglied zwischen den membranständigen Rezeptoren und den Effektoren dar und transferieren die Information über das Vorhandensein eines externen Reizes ins Zellinnere. Die Effektivität und Spezifität der G-Protein-Aktivierung wird durch die Sequenz und Struktur spezifischer Regionen der intrazellulären Schleifen 2, 3 und 4 der Rezeptoren bestimmt (WESS 1997).



Im Grundzustand liegen G-Proteine als membranassoziierte Heterotrimeren ( $\alpha$ -,  $\beta$ - und  $\gamma$ -Untereinheit) in einem Komplex mit einem G-Protein-gekoppelten Rezeptor vor. Die  $\alpha$ -Untereinheit besitzt eine intrinsische GTPase-Aktivität und ist in der Lage, die Nucleotide Guanosintriphosphat (GTP) oder Guanosindiphosphat (GDP) zu binden. Die  $\alpha$ -Untereinheit hat im Grundzustand in ihrem katalytischen Zentrum GDP gebunden. Der  $\beta\gamma$ -Komplex verringert die spontane GDP-Dissoziation und wirkt als Guaninnukleotid-Dissoziations-Inhibitor (BRANDT & ROSS 1985, HIGASHIJIMA ET AL. 1987). Die Konformationsänderungen des Rezeptors durch die Bindung eines Liganden stimulieren die Aktivierung von G-Proteinen über die Katalyse des Austausches von GDP durch GTP. Dadurch kommt es zur Dissoziation des G-Proteins in die  $\alpha$ -Untereinheit und den  $\beta\gamma$ -Komplex (JACOBY ET AL. 2006, MILLIGAN & KOSTENIS 2006). Die Untereinheiten des aktivierten G-Proteins können einerseits direkt die Öffnungswahrscheinlichkeiten von Ionenkanälen verändern, andererseits die Aktivität bestimmter Enzyme [z. B. Adenylylcyclase (AC), Phospholipase C (PLC)] und somit die Konzentrationen intrazellulärer *second messenger* beeinflussen (WESS 1997, LUTRELL 2008).

Zu den wichtigsten GPCR-vermittelten Signalwegen gehören PLC-vermittelte Veränderungen in den Konzentrationen der Signalmoleküle Inositol-1,4,5-trisphosphat ( $IP_3$ ) und Diacylglycerol (DAG) sowie die AC-vermittelte Änderung der  $[cAMP]_i$  (Abb. 1.1). Die Änderungen der Konzentrationen dieser Signalmoleküle führen u. a. zu veränderten Aktivitätsmustern von Proteinkinasen und damit zu transienten Änderungen der Phosphorylierungsmuster ausgewählter Proteine.

Von jeder der drei Untereinheiten eines G-Proteins gibt es mehrere unterschiedliche Typen, die sich in verschiedenen Kombinationen zusammenlagern können (DOWNES & GAUTAM 1999, HERMANS 2003, WONG 2003). So werden bei der  $\alpha$ -Untereinheit aufgrund von Sequenzähnlichkeiten vier Familien unterschieden:  $G\alpha_s$ ,  $G\alpha_i$ ,  $G\alpha_q$  und  $G\alpha_{12/13}$  (SIMON ET AL. 1991). Im Fall einer Aktivierung des GPCRs führen diese  $\alpha$ -Untereinheiten zu unterschiedlichen intrazellulären Reaktionen.  $G\alpha_i$  wirkt inhibierend auf die AC und verursacht eine Reduzierung der cAMP-Konzentration. Demgegenüber wirkt  $G\alpha_s$  stimulatorisch auf dieses Enzym und führt zu einem Anstieg der cAMP-Konzentration (Abb. 1.1A).  $G\alpha_q$ -Proteine bewirken die Erhöhung der intrazellulären  $Ca^{2+}$ -Konzentration  $[Ca^{2+}]_i$  (Abb. 1.1B). Darüber hinaus hat die gesamte Zusammensetzung des Heterotrimeren Einfluss auf die Spezifität und Effizienz der Signaltransduktion hinsichtlich seiner Interaktion mit Rezeptoren und Effektoren.



**Abbildung 1.1 Schematische Darstellung wichtiger Signalwege G-Protein-gekoppelter Rezeptoren.** (A) Der Rezeptor aktiviert nach der Bindung eines Liganden ein heterotrimeres G-Protein ( $G_s$ ), welches eine Adenylylcyclase (AC) stimuliert. Dieses Enzym katalysiert die Synthese von cAMP aus ATP. Der Anstieg der intrazellulären cAMP-Konzentration aktiviert u. a. die cAMP-abhängige Proteinkinase A (PKA), die daraufhin Zielproteine wie z. B. Ionenkanäle und Transkriptionsfaktoren phosphoryliert. (B) Der Rezeptor aktiviert nach der Bindung eines Liganden ein heterotrimeres G-Protein ( $G_{q/11}$ ). Mitglieder der  $G_{q/11}$ -Proteinfamilie aktivieren die Phospholipase C (PLC). Das Enzym hydrolysiert Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat ( $PIP_2$ ) zu Inositol-1,4,5-trisphosphat ( $IP_3$ ) und Diacylglycerol (DAG).  $IP_3$  bindet an intrazelluläre Rezeptoren ( $IP_3$ -R), die die Freisetzung von  $Ca^{2+}$  aus dem endoplasmatischen Retikulum ins Cytoplasma bewirken. DAG und die erhöhte intrazelluläre  $Ca^{2+}$ -Konzentration führen zu einer Aktivierung der Proteinkinase C (PKC), welche wiederum Zielproteine phosphoryliert (verändert nach BLENAU & BAUMANN 2001).

Die Hydrolyse des gebundenen GTP durch die GTPase-Aktivität der  $\alpha$ -Untereinheit des G-Proteins beendet die Interaktion mit dem Effektor. Die  $\alpha$ -Untereinheit kehrt in ihren Grundzustand zurück und eine Reassoziierung des Heterotrimers wird eingeleitet. Eine Schlüsselrolle bei der Inaktivierung des Rezeptors nehmen neben der GTPase-Aktivität der  $\alpha$ -Untereinheit des G-Proteins Phosphorylierungen an Serinen bzw. Threoninen an

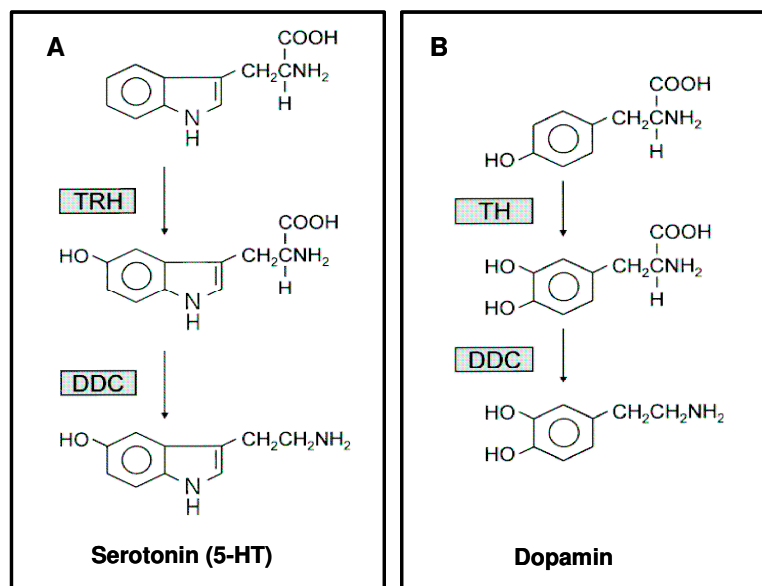
der cytoplasmatischen Seite des Rezeptors durch intrazelluläre Kinasen ein. An den universellen Mechanismen der Inaktivierung von GPCRs sind mehrere Protein-Familien beteiligt: *second messenger*-aktivierte Kinasen, G-Protein-gekoppelte Rezeptorkinasen (GRKs) und  $\beta$ -Arrestine (FERGUSON 2001, TOBIN 2008). Die Bindung eines Agonisten an einen Rezeptor führt zu Konformationsänderungen und resultierend zu Phosphorylierungen an intrazellulären Bereichen des Rezeptorproteins (KOHOUT & LEFKOWITZ 2003). Dies bewirkt eine funktionelle Desensibilisierung des Rezeptors. Andererseits erhöht sich durch die GRK-vermittelte Phosphorylierung die Affinität des Rezeptors für Mitglieder der Arrestin-Proteinfamilie (KOHOUT ET AL. 2001, LUTTRELL & LEFKOWITZ 2002). Die Bindung von  $\beta$ -Arrestin behindert einerseits die Rezeptor-G-Protein-Interaktionen und führt somit zu einer Desensibilisierung des Rezeptors. Andererseits dient  $\beta$ -Arrestin als Adapterprotein und führt zur Internalisierung des Rezeptors über Clathrin-vermittelte Prozesse (CARMAN & BENOVIC 1998, LUTTRELL & LEFKOWITZ 2002). Es zeigte sich, dass die Signalübertragung der GPCRs weit diverser als ursprünglich angenommen ist. Die  $\beta$ -Arrestine spielen nicht nur eine wichtige Rolle bei der Beendigung der G-Protein-abhängigen Signalwege, sondern sind auch an der Aktivierung einer Vielzahl von G-Protein-unabhängigen Signalwegen beteiligt (SMITH & LUTTRELL 2006, DEFEA 2008).

### 1.2.3 Konstitutive Aktivität G-Protein-gekoppelter Rezeptoren

Zahlreiche Modelle bezüglich der Aktivierung von GPCRs implizieren, dass die Rezeptoren in der Abwesenheit von Liganden in einem thermodynamischen Gleichgewicht zwischen dem inaktiven und aktiven Zustand existieren. Somit ist ein GPCR in Abwesenheit eines Agonisten nicht zwingend inaktiv (SAMAMA ET AL. 1993, LEFKOWITZ ET AL. 1993, STRANGE 2002, MILLIGAN 2003). Die Wirksamkeit eines Liganden spiegelt seine Möglichkeit dieses Gleichgewicht zu verändern wider. Die Bindung eines Agonisten verschiebt das Gleichgewicht in Richtung des aktiven Zustands und führt so zur Aktivierung von G-Proteinen. Inverse Agonisten verschieben das Gleichgewicht in Richtung des inaktiven Zustandes des Rezeptors (LEFKOWITZ ET AL. 1993, GETHER & KOBILKA 1998, HUNYADY ET AL. 2003). Im Gegensatz dazu bindet ein neutraler Antagonist an beide Zustände mit einheitlicher Affinität und verhindert sowohl das Andocken von Agonisten als auch von inversen Agonisten. Hinweise für konstitutive, also Agonisten-unabhängige Aktivität wurde für eine Vielzahl von GPCRs - sowohl *in vitro* als auch *in vivo* - nachgewiesen (NEWMAN-TANCREDI ET AL. 1997, CLAEYSEN ET AL. 1999, MORISSET ET AL. 2000, HOBSON ET AL. 2003, MUSTARD ET AL. 2003, MARTEL ET AL. 2007, HSUEH ET AL. 2009) und gilt mittlerweile als ein verbreitetes Phänomen bei GPCRs (SEIFERT & WENZEL-SEIFERT 2002, MILLIGAN 2003).

### 1.3 Biogene Amine

Biogene Amine sind kleine organische Moleküle, die in ihrer Funktion als Neurohormone, Neurotransmitter und Neuromodulatoren eine beeindruckende Vielzahl unterschiedlicher zellulärer und physiologischer Prozesse im zentralen (ZNS) und peripheren Nervensystem sowohl von Vertebraten als auch Invertebraten beeinflussen (EVANS 1980, ROEDER 1994, WEIGER 1997, BLENAU & BAUMANN 2001). Sie werden durch ein- bis mehrstufige biochemische Modifizierungen aus essentiellen Aminosäuren synthetisiert (exemplarisch dargestellt für Serotonin und Dopamin; Abb. 1.2). Die biogenen Amine Histamin, Dopamin und Serotonin kommen sowohl bei Vertebraten als auch bei Invertebraten vor (BLENAU & BAUMANN 2001). Demgegenüber wurden Adrenalin und Noradrenalin funktionell nur bei Vertebraten (adrenerges System) nachgewiesen. Dopamin gilt als einziges Katecholamin mit physiologischer Bedeutung bei Invertebraten (OSBORNE ET AL. 1996, BLENAU & BAUMANN 2001, ROEDER 2005). Bei Invertebraten sind Adrenalin und Noradrenalin vermutlich durch die strukturell verwandten Monoamine Tyramin und Octopamin funktionell ersetzt (EVANS 1985, 1986; ROEDER ET AL. 2003, BLENAU & BAUMANN 2003). Diese beiden biogenen Amine wurden in Spuren auch in Vertebraten nachgewiesen und werden dort zur Gruppe der Spurenamine (*trace amines*) gerechnet (BOROWSKY ET AL. 2001).



**Abbildung 1.2: Biosynthese von Serotonin (5-HT) und Dopamin** (HIRSH & DAVIDSON 1981, LIVINGSTONE & TEMPEL 1983, NECKAMEYER & QUINN 1989, COLEMAN & NECKAMEYER 2005). **(A)** Serotonin entsteht in zwei enzymatischen Schritten aus der Aminosäure L-Tryptophan. Zunächst wird durch die Tryptophan-Hydroxylase (TRH) eine Hydroxylgruppe an den Indolring addiert. Anschließend wird das entstandene 5-Hydroxytryptophan durch die DOPA-Decarboxylase (DDC) zu Serotonin decarboxyliert. **(B)** Dopamin entsteht in zwei enzymatischen Schritten aus der Aminosäure L-Tyrosin. Die Hydroxylierung von Tyrosin wird durch die Tyrosin-Hydroxylase (TH) katalysiert. Im zweiten Schritt wird das entstandene 3,4-Dihydroxy-L-Phenylalanin (L-DOPA) durch die DOPA-Decarboxylase (DDC) zu Dopamin decarboxyliert (nach BLENAU & BAUMANN 2001).

Biogene Amine aktivieren bei Vertebraten und Invertebraten spezifische membranständige Rezeptoren und steuern Signalkaskaden, die zu Konzentrationsänderungen intrazellulärer Botenstoffe führen. Die große Mehrheit der biogenen Amine entfalten ihre Wirkung über GPCRs. Ausnahmen stellen zum einen die ligandengesteuerten Ionenkanäle der 5-HT<sub>3</sub>-Rezeptorklasse der Vertebraten (NICHOLS & NICHOLS 2008), und zum anderen 5-HT-gesteuerte (RANGANATHAN ET AL. 2000) und kürzlich beschriebene Tyramin-gesteuerte Ionenkanäle bei Nematoden dar (PIRRI ET AL. 2009).

Dopamin und Serotonin sind in großen Mengen im Nervensystem von Vertebraten vorhanden und steuern verschiedenste neurologische, kardiovaskuläre, endocrine und renale Funktionen sowie Verhalten wie Schlaf, Appetit, Lernen, Motorik und Aggression. Störungen des serotonergen Systems führen beim Menschen zu Krankheitsbildern wie z. B. Depression, Angstzustände, Schizophrenie, Panikattacken, Migräne, Bluthochdruck, Essstörungen und Übelkeit (JONES & BLACKBURN 2002, MELTZER ET AL. 2003, GEYER & VOLLENWEIDER 2008, SAVITZ ET AL. 2009). Fehlfunktionen des dopaminergen Systems sind ebenfalls bei neurologischen Erkrankungen involviert. Dazu zählen die Parkinson-Krankheit, das Tourette-Syndrom sowie Paranoia und Schizophrenie. Weiterhin spielen sie eine dominante Rolle bei Suchterkrankungen und Depression (GOLDSTEIN & DEUTCH 1992, WICHMANN & DELONG 1993, EMILIEN ET AL. 1999, STRANGE 2001). Diese Krankheitsbilder können durch Medikamente beeinflusst werden, die direkt oder indirekt auf aminerge Rezeptoren wirken, wobei häufig Interaktionen des serotonergen und dopaminergen Systems auftreten. Dies spiegelt sich auch in der Entwicklung von Medikamenten mit kombinierten Wirkungen auf diese beiden Systeme wider (MELTZER & HUANG 2008, WOOD & WREN 2008).

### **1.3.1 Funktion der biogenen Amine Serotonin (5-Hydroxytryptamin, 5-HT) und Dopamin bei Insekten**

Im ZNS aber auch in peripheren Organen von Insekten konnten die biogenen Amine Dopamin und Serotonin in großen Mengen nachgewiesen werden (EVANS 1980, DOWNER 1990). Serotonerge und dopaminerge Neurone konnten u. a. im Gehirn der Amerikanischen Schabe identifiziert werden (BISHOP & O'SHEA 1983, KLEMM ET AL. 1985). Zahlreiche Antiseren gegen Dopamin und Serotonin markieren Interneurone mit Verzweigungen, die große Bereiche des Gehirns innervieren (NÄSSEL & ELEKES 1992, WENDT & HOMBERG 1992, NÄSSEL 1988). Dies spricht dafür, dass beide Substanzen, auch wenn sie nur von wenigen Neuronen freigesetzt werden, die Aktivität großer Gehirnareale beeinflussen können. Serotonin ist beispielsweise an der Regulation der circadianen Rhythmik (PAGE 1987, YUAN ET AL. 2005, NICHOLS 2007), von Entwicklungsprozessen (COLAS et al. 1999), der Herzaktivität (ZORNIK ET AL. 1999), sekretorischer Prozesse

(HOUSE 1980, JUST & WALZ 1996), aggressivem Verhalten (DIERICK & GREENSPAN 2007), Gregarisierung (ANSTEY et al. 2009) sowie von Lernprozessen (TEMPEL ET AL. 1984, MENZEL & MÜLLER 1996, SITARAMAN et al. 2008) beteiligt.

Auch das Katecholamin Dopamin kommt in hohen Konzentrationen im ZNS von Insekten vor und spielt eine wichtige Rolle als neuroaktive Substanz (MERCER ET AL. 1983, HOMBERG 2002). Bei Insekten wurden verschiedene Verhalten beschrieben, die von Dopamin beeinflusst werden: So reguliert Dopamin das Sexualverhalten (NECKAMEYER 1998a/b) sowie die Fruchtbarkeit (NECKAMEYER 1996, PENDLETON ET AL. 1996). Dopamin ist des Weiteren entscheidend für die Regulation motorischer Prozesse (YELLMAN ET AL. 1997, COOPER & NECKAMEYER 1999, DRAPER ET AL. 2007), endo- und exocriener Funktionen (HOUSE 1980, JUST & WALZ 1996) sowie der neuronalen Entwicklung (BUCHNER 1991, TAYLOR ET AL. 1992, NECKAMEYER 1996). Außerdem ist Dopamin ein wichtiger Neurotransmitter und –modulator, der die visuelle und olfaktorische Reizaufnahme moduliert und eine große Bedeutung bei der Gedächtnisbildung spielt (MERCER & MENZEL 1982, MERCER & ERBER 1983, TEMPEL ET AL. 1984, SCHWAERZEL ET AL. 2003). All diese Verhaltensmuster setzen spezifische Rezeptoren für diese biogenen Amine im ZNS und den peripheren Organen der Insekten voraus. Die Existenz einer großen Anzahl von Rezeptoren mit individuellen Signaltransduktionseigenschaften und Verteilungsmustern ermöglicht es einem einzelnen Amin simultan eine breite Palette von Wirkungen in verschiedenen Organen oder Gehirnbereichen zu entfalten.

### 1.3.2 Serotoninrezeptoren

Eine der vielfältigsten und komplexesten Familien der GPCRs stellen die 5-HT-Rezeptoren dar. Serotonin ist einer der ältesten Neurotransmitter und trat vermutlich bereits vor über 800 Millionen Jahren auf, was eine mögliche Erklärung für die große Vielfalt an Serotoninrezeptoren darstellt (PEROUTKA 1994, GERHARDT & VAN HEERIKHUIZEN 1997, HANNON & HOYER 2008).

Zusätzlich zur Gruppe der Serotonin-gesteuerten Ionenkanäle, den 5-HT<sub>3</sub>-Rezeptoren (BARNES & SHARP 1999, NICHOLS & NICHOLS 2008), wurden bei Vertebraten 13 verschiedene 5-HT-Rezeptor-Gene identifiziert, die für GPCRs kodieren (HOYER ET AL. 2002, NICHOLS & NICHOLS 2008). Die Einteilung dieser Rezeptor-Familie in einzelne Klassen basiert auf strukturellen, funktionellen und pharmakologischen Eigenschaften. Bei Vertebraten wurde ein System mit sieben Klassen postuliert: 5-HT<sub>1</sub> – 5-HT<sub>7</sub> (HOYER ET AL. 1994, 2002; RAYMOND ET AL. 2001). Die Klasse der 5-HT<sub>1</sub>-Rezeptoren besitzt fünf Mitglieder, diese sind in erster Linie über G<sub>i</sub>-Proteine negativ an die AC gekoppelt. Alle drei Mitglieder der 5-HT<sub>2</sub>-Rezeptor-Klasse stimulieren die PLC und führen zu einer Erhöhung der intrazellulären Ca<sup>2+</sup>-Konzentration. 5-HT<sub>3</sub>-Rezeptoren sind, wie bereits

erwähnt, keine GPCRs sondern ligandengesteuerte Ionenkanäle. 5-HT<sub>4</sub>-, 5-HT<sub>6</sub>- und 5-HT<sub>7</sub>-Rezeptoren führen über G<sub>s</sub>-Proteine zur Aktivierung der AC, unterscheiden sich jedoch in ihren pharmakologischen Eigenschaften deutlich voneinander (GERHARDT & VAN HEERIKHUIZEN 1997, HANNON & HOYER 2008). Die Rezeptoren der 5-HT<sub>5</sub>-Klasse koppeln an sehr komplexe, bisher noch nicht eindeutig charakterisierte Signalwege und werden vorwiegend im ZNS exprimiert (RAYMOND ET AL. 2001, NODA ET AL. 2004, NICHOLS & NICHOLS 2008).

Bis zum jetzigen Zeitpunkt wurden vier 5-HT-Rezeptoren aus dem genetischen Modellorganismus *Drosophila melanogaster* (WITZ ET AL. 1990, SAUDOU ET AL. 1992, COLAS ET AL. 1995) beschrieben. Auch aus weiteren Insekten sind spezifische 5-HT-Rezeptoren bekannt [*Bombyx mori*, *Heliothis virescens* (NICKISCH-ROSENEGK ET AL. 1996), *Aedes aegypti* (PIETRANTONIO ET AL. 2001), *Papilio xuthus* (ONO & YOSHIKAWA 2004), *Apis mellifera* (SCHLENSTEDT ET AL. 2006), *Manduca sexta* (DACKS ET AL. 2006)]. Tabelle 1.1 zeigt die Rezeptoren der einzelnen Organismen und deren funktionelle Eigenschaften.

**Tabelle 1.1 Serotoninrezeptoren der Insekten**

Serotoninrezeptor (Originalbezeichnung)	Genbank Zugangsnummer	Signaltransduktion (Expressionssystem)	Literatur
Dm5-HT <sub>1A</sub> (5HT-dro2A)	CAA77570	cAMP↓; Ca <sup>2+</sup> ↑	Saudou et al. 1992,
Dm5-HT <sub>1B</sub> (5HT-dro2B)	CAA77571	(COS 7, Sf 9)	Obosi et al. 1996
Hv5-HT <sub>1</sub> (K15Hel)	X95605	nicht untersucht	Nickisch-Rosenegk et al.
Bm5-HT <sub>1</sub> (B150Bom)	CAA64862		1996
Px5HT <sub>1</sub>	BAD72868	nicht untersucht	Ono & Yoshikawa 2004
Ms5-HT <sub>1A</sub>	DQ840515	nicht untersucht	Dacks et al. 2006
Ms5-HT <sub>1B</sub>	DQ840516		
Dm5-HT <sub>2</sub>	CAA57429	Ca <sup>2+</sup> ↑ (COS 1)	Colas et al. 1995
Dm5-HT <sub>7</sub> (5HT-dro1)	A38271	cAMP↑ (NIH 3T3)	Witz et al. 1990
Aa5-HT <sub>7</sub>	AAG49292	cAMP↑ (CHO-K1)	Lee & Pietrantonio 2003
Am5-HT <sub>7</sub>	AM076717	cAMP↑ (HEK 293)	Schlenstedt et al. 2006

Dm *Drosophila melanogaster*, Hv *Heliothis virescens*, Bm *Bombyx mori*, Px *Papilio xuthus*, Ms *Manduca sexta*, Aa *Aedes aegypti*, Am *Apis mellifera*

### 1.3.3 Dopaminrezeptoren

Alle bekannten Rezeptoren für den Neurotransmitter Dopamin sind GPCRs (MISSALE ET AL. 1998, VALLONE ET AL. 2000). Bei Vertebraten gibt es fünf Dopaminrezeptoren (D1 - D5), welche basierend auf strukturellen, pharmakologischen und funktionellen Eigenschaften in zwei Klassen eingeteilt werden (MISSALE ET AL. 1998, NEVE ET AL. 2004). Eines der Hauptunterscheidungsmerkmale ist die unterschiedliche Kopplung an den cAMP-Signalweg. Aktivierung von Mitgliedern der D1-Rezeptorfamilie (D1 und D5), führt zu einer Stimulierung der AC und entsprechend zu einem Anstieg der  $[cAMP]_i$ . Aktivierung von Rezeptoren der D2-Familie (D2 - D4) hemmt die Aktivität der AC und verringert so die  $[cAMP]_i$  (JACKSON & WESTLIND-DANIELSSON 1994). Grundlegende strukturelle Unterschiede zeigen sich in der vergleichsweise kürzeren C-terminalen Region und längeren dritten cytoplasmatischen Schleife der D2-Rezeptorfamilie im Vergleich zu D1-ähnlichen Rezeptoren (MISSALE ET AL. 1998).

Insgesamt drei Dopaminrezeptoren, zwei D1-ähnliche und ein D2-ähnlicher Rezeptor, sind aus *D. melanogaster* (GOTZES ET AL. 1994, SUGAMORI ET AL. 1995, FENG ET AL. 1996, HAN ET AL. 1996, HEARN ET AL. 2002) sowie *A. mellifera* (BLENAU ET AL. 1998, HUMPHRIES ET AL. 2003, BEGGS ET AL. 2005) charakterisiert worden. Weiterhin sind D1-ähnliche Rezeptoren aus *P. xuthus* (ONO & YOSHIKAWA 2004), *Ctenocephalides felis* (GERBER ET AL. 2006) und *B. mori* (MITSUMASU ET AL. 2008) kloniert und charakterisiert. Bei Invertebraten wurde ein vierter Rezeptor, der auf Dopamin mit einem Anstieg der  $[cAMP]_i$  antwortet charakterisiert, jedoch wird dieser Rezeptor vornehmlich durch Steroide aktiviert (SRIVASTAVA ET AL. 2005), so dass eine genaue Einordnung in eine Rezeptorfamilie noch aussteht. Tabelle 1.2 zeigt die klonierten Dopaminrezeptoren der Insekten und gibt an, in welchen Systemen die Rezeptoren funktionell exprimiert wurden.

Anhand von phylogenetischen Analysen und ausführlichen Vergleichen von Dopaminrezeptoren von Vertebraten und Invertebraten zeigte MUSTARD ET AL. 2005, dass die Dopaminrezeptoren der Invertebraten drei Klassen bilden. Die Klasse der Dop1-Rezeptoren ist nahe verwandt mit den D1-ähnlichen Rezeptoren der Vertebraten und zeigt neben der Konservierung bezüglich der Aminosäuresequenz auch funktionelle Übereinstimmung. Eine zweite Gruppe (Dop2-Rezeptoren) scheint eine den Invertebraten eigene Klasse von Dopaminrezeptoren zu sein, die näher mit Octopaminrezeptoren der Insekten als mit D1-ähnlichen Rezeptoren verwandt ist. Diese werden als Invertebratentyp-Dopaminrezeptoren bezeichnet. Die dritte Klasse (Dop3-Rezeptoren) zeigt die größte Homologie zu den D2-ähnlichen Rezeptoren der Vertebraten. Dopaminrezeptoren der Klassen 1 und 2 der Insekten wurden als funktionell D1-ähnliche Rezeptoren klassifiziert und aktivieren die AC, wogegen Dopaminrezeptoren der Klasse 3 bei den D2-ähnlichen-Rezeptoren eingeordnet werden und die AC inhibieren.



**Tabelle 1.2 Dopaminrezeptoren der Insekten**

Dopaminrezeptor (Originalbezeichnung)	Genbank Zugangsnummer	Signaltransduktion (Expressionssystem)	Literatur
DmDop1	AAA85716	cAMP↑ (COS 7, Sf 9)	Gotzes et al. 1994, Sugamori et al. 1995
AmDop1	CAA73841	cAMP↑ (HEK 293, Sf 9, Sf 21)	Blenau et al. 1998, Mustard et al. 2003
BmDop1	AB362162	cAMP↑ (HEK 293)	Mitsumasu et al. 2008
DmDop2 (DAMB/ DopR99B)	NP_733299	cAMP↑ ( <i>Xenopus</i> -Oozyten, HEK 293)	Feng et al. 1996, Han et al. 1996
AmDop2	AAM19330	cAMP↑ (Sf 9, Sf 21)	Humphries et al. 2003, Mustard et al. 2003
BmDop2	AB162716	cAMP↑ (HEK 293)	Mitsumasu et al. 2008
PxDop2	BAD72870	nicht untersucht	Ono & Yoshikawa 2004
CfDop2	DQ459405	cAMP↑ ( <i>Xenopus</i> -Oozyten, HEK 293)	Gerber et al. 2006
DmDop3 (DDR2)	AAN15955	cAMP↓ (HEK 293)	Hearn et al. 2002
AmDop3	AY921573	cAMP↓ (HEK 293)	Beggs et al. 2005

Dm *Drosophila melanogaster*, Cf *Ctenocephalides felis*, Bm *Bombyx mori*, Px *Papilio xuthus*, Am *Apis mellifera*

#### 1.4 *Periplaneta americana* als Modellorganismus

Die Schaben (Blattodea) gehören zu den ältesten, heute noch lebenden Insektenordnungen und gelten als etablierte neurobiologische und physiologische Modellorganismen (HUBER ET AL. 1990/II). *Periplaneta americana* und nah verwandte Schabenarten wurden aufgrund ihrer Größe und einfachen Haltung früh für morphologische Analysen des Nervensystems von Insekten genutzt. Diese umfassenden Kenntnisse bezüglich neuronaler Systeme und die Größe und gute Zugänglichkeit sowie reproduzierbare Identifizierung der einzelnen Neurone ermöglichte weitreichende morphologische und neurobiologische Studien, die unter anderem zur Aufklärung circadianer Vorgänge (z. B. PAGE 1987, HELFRICH-FÖRSTER 2004, TOMIOKA & ABDELSALAM 2004), neuronaler Zusammenhänge des Fluchtverhaltens (z. B. GOLDSTEIN & CAMHI 1991, LEVI & CAMHI 2000, LIBERSAT ET AL. 2005) sowie der Verteilung und Wirkung von Neuropeptiden (z. B. WEGENER ET AL. 1999, PREDEL & ECKERT 2000) bei Insekten führten. Die Amerikanische Schabe ist aber nicht nur auf dem Gebiet der Neurobiologie ein etabliertes Modell, sondern aufgrund der guten Zugänglichkeit intakter Kleinorgane für zahlreiche physiologische - im speziellen opto- und elektrophysiologische - Methoden auch auf dem Gebiet der Epithelphysiologie und der zellulären Wirkung biogener Amine (HOUSE 1980, JUST & WALZ 1996, WALZ ET AL. 2006). Weiterhin entwickelten mehrere Arbeitsgruppen in den letzten Jahren Techniken zur Untersuchung von Konditionierungsprozessen sowie Lernen und Gedächtnisbildung für *P. americana* (WATANABE ET AL. 2003, LENT & KWON 2004, WATANABE & MIZUNAMI 2007).

## 1.5 Zielsetzung der Arbeit

Biogene Amine wirken sowohl bei Vertebraten als auch Invertebraten als Neurotransmitter, Neuromodulatoren und/oder Neurohormone. Sie aktivieren spezifische membranständige Rezeptoren. Aufgrund der großen Bedeutung der Rezeptoren sind sie zum Gegenstand intensiver Forschung geworden. Das Verständnis molekularer und funktioneller Eigenschaften aminergere Rezeptoren von Invertebraten ist im Vergleich zum Kenntnisstand bei Vertebraten jedoch begrenzt.

Die Schabe *Periplaneta americana* gilt seit langem als Modellsystem für neurobiologische und physiologische Untersuchungen und viele bei Schaben gut untersuchte physiologische und neurobiologische Prozesse sowie Verhaltensweisen werden durch biogene Amine reguliert bzw. moduliert. Erstaunlicherweise ist jedoch über den Beitrag von spezifischen aminergen Rezeptoren an all diesen Prozessen verhältnismäßig wenig bekannt. Bis zum jetzigen Zeitpunkt wurden lediglich ein Octopaminrezeptor (BISCHOF & ENAN 2004) sowie kürzlich ein Tyraminrezeptor (ROTTE ET AL. 2009b) der Schabe kloniert und molekular sowie funktionell charakterisiert. Über Serotoninrezeptoren oder Dopaminrezeptoren liegen bisher keine molekularen Informationen vor. Dies steht in einem deutlichen Missverhältnis zur großen Bedeutung des serotonergen und dopaminergen Systems bei Insekten. Die Klonierung und Charakterisierung von Serotonin- und Dopaminrezeptoren der Amerikanischen Großschabe *P. americana* ist damit ein längst überfälliger Schritt auf dem Weg zu einem umfassenden Verständnis der physiologischen und neurobiologischen Wirkungen biogener Amine bei Insekten.

Ziel der vorliegenden Arbeit ist die Klonierung und Charakterisierung von serotonergen und dopaminergen Rezeptoren der Schabe *Periplaneta americana*. Ein wichtiger Aspekt war die Aufklärung des Expressionsmusters der Rezeptor-mRNAs in verschiedenen Geweben. Ebenso sollte durch die Herstellung polyklonaler Antikörper die Verteilung der Rezeptorproteine aufgeklärt werden, um Hinweise auf mögliche physiologische Funktionen der Rezeptoren zu erhalten. Weiterhin sollte die funktionelle Kopplung der Rezeptoren an intrazelluläre Signalwege und die pharmakologischen Eigenschaften nach heterologer Expression in Säugerzellen (HEK 293) untersucht werden.

Die Kenntnis über spezifische Eigenschaften dieser Rezeptoren soll eine Einsicht in die aminerge Signaltransduktion speziell bei dieser Spezies vermitteln und zur Aufklärung verschiedener durch Serotonin und Dopamin regulierter physiologischer Prozessen bei der Schabe und vergleichend in der Klasse der Insekten beitragen.

## 2 MATERIAL UND METHODEN

### 2.1 Chemikalien und Material

Chemikalien (*pro analysis* Qualität) und Verbrauchsmaterial wurden von den Firmen Roth (Karlsruhe), Sigma (Taufkirchen) und VWR (Darmstadt) bezogen. Die Restriktionsenzyme wurden bei Roche (Mannheim) sowie New England Biolabs (Frankfurt a. M.) erworben. Die Oligonukleotidprimer wurden durch TIB-Molbiol (Berlin) synthetisiert. Sequenzierungen wurden durch die Firmen Agowa (Berlin) und GATC Biotech (Konstanz) durchgeführt. Das Ansetzen von Lösungen erfolgte in sterilem Reinstwasser (Millipore-Qualität). Lösungen, Medien und H<sub>2</sub>O wurden in einem Varioklav Dampfsterilisator (Thermo Scientific, Bonn) bei 121 °C für 20 min autoklaviert. Weitere Angaben zu verwendeten Materialien, Geräten und kommerziellen Kits befinden sich im Text und tabellarisch aufgelistet im Anhang (Tab. 6.1 und 6.2).

### 2.2 Versuchstiere und Präparation der Gewebe

#### 2.2.1 Haltung der Versuchstiere

Als Versuchstiere wurden Amerikanische Schaben, *Periplaneta americana* (Linnaeus 1758), aus der institutseigenen Zucht verwendet. Die Haltung erfolgte bei 27 °C, einer relativen Luftfeuchtigkeit von 60 % und einem Hell-Dunkel-Rhythmus von 12:12 Stunden. Die Tiere hatten freien Zugang zu Wasser und Futter. Das Futter bestand aus Trockenfutter-Pellets (Ssniff, Soest). Die Nymphen erhielten zusätzlich zerkleinerte Äpfel. Für die Experimente wurden ausschließlich männliche Imagines im Alter von vier bis sechs Wochen verwendet.

#### 2.2.2 Präparation der Gewebe

Alle für molekularbiologische Versuche eingesetzten Gewebe wurden in Ringerlösung präpariert und direkt im Anschluss in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80 °C gelagert. Gewebe, die für immunhistochemische Versuche vorgesehen waren, wurden im Anschluss an die Präparation direkt fixiert (2.4.4).

Für die Durchführung verschiedener Experimente wurden Gewebeproben von Gehirn, Ganglien, Speicheldrüse, Malpighischen Gefäßen, Darm und Muskel benötigt. Die Präparation der Gewebe wurde wie folgt durchgeführt: Nach Dekapitation wurde der Kopf mittels Insektennadeln in einer mit eiskaltem Ringer gefüllten Präparierschale befestigt und mit Schnitten unterhalb der Komplexaugen und entlang der Kopfperipherie geöffnet.

Das freigelegte Gehirn wurde mit einer gebogenen Pinzette entnommen und von Tracheen gereinigt. Zur Entnahme der Speicheldrüse wurden die Flügel und Beine entfernt, der Körper mithilfe von Insektennadeln fixiert und dorsal mit einem Medianschnitt geöffnet. Anschließend konnte die Speicheldrüse mit einer gebogenen Pinzette umfasst und aus dem Versuchstier entfernt werden. Im Anschluss wurde vorsichtig der Darm freigelegt. Die am Übergang vom Mitteldarm zum Enddarm gelegenen Malpighischen Gefäße wurden mit einer Pinzettenschere abgetrennt. Im nächsten Schritt wurde der Darm vor dem Übergang zum Enddarm durchtrennt. Der Inhalt des Mitteldarms wurde mit einer Pinzette vorsichtig entfernt. Die in der Peripherie des Thorax liegenden Beinmuskeln wurden mit einer feinen Pinzettenschere herausgetrennt. Abschließend wurde die Ganglienkette freigelegt, vorsichtig entnommen und in das Unterschlundganglion, die Thorakalganglien, die Abdominalganglien und das Terminalganglion unterteilt.

Ringer: 160 mM NaCl, 10 mM KCl, 2 mM CaCl<sub>2</sub>, 2 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM Tris Ultra, 10 mM Glucose, pH 7,4

## 2.3 Molekularbiologische Methoden

Molekularbiologische Standardmethoden wurden nach SAMBROOK & RUSSELL (2001) durchgeführt.

### 2.3.1 RNA-Isolierung

Zur Extraktion der Gesamt-RNA wurde die TRIzol-Methode verwendet (nach CHOMCZYNSKI & SACCHI 1987). Dabei handelt es sich um eine Methode zur Isolierung von RNA basierend auf Phenol- und Guanidin-Isothiocyanat-Lösungen, gefolgt von organischer Extraktion und Alkoholpräzipitation. Die einzelnen Gewebe wurden in je 0,75 ml *Trizol LS-Reagenz* (Invitrogen, Karlsruhe) mithilfe eines Glas-Teflon-Homogenisators homogenisiert (1000 Upm, 10 Streiche von je 5 s). Nach einer Inkubation von 5 min bei Raumtemperatur (RT) erfolgte die Zugabe von 200 µl Chloroform. Nach kurzem Schütteln wurde die Probe erneut bei RT für 10 min inkubiert. Die anschließende Zentrifugation (12.000 Upm für 10 min bei 4 °C) der Lösung führte zur Trennung der Phasen. Die wässrige Phase wurde in ein frisches Reaktionsgefäß überführt und zur Präzipitation der RNA mit 500 µl 2-Propanol versetzt. Nach einer Inkubation von 10 min bei RT und anschließender Zentrifugation wurde der Überstand entfernt und das Pellet mit 1 ml 75 % Ethanol gewaschen, luftgetrocknet und in DEPC-behandeltem Wasser gelöst. Die Konzentration der extrahierten RNA wurde mit dem Spektralphotometer GenQuant 1300 (GE Healthcare, München) bestimmt. Die Gesamt-RNA wurde mit 1/10 Vol. 4 M LiCl und 2,5 Vol. 100 % EtOH gefällt und bis zur weiteren Verwendung bei -80 °C gelagert.

DEPC-behandeltes Wasser: 0,1 % Diethylpyrocarbonat, über Nacht rühren, autoklavieren

### 2.3.2 Extraktion von poly(A)<sup>+</sup>-RNA

Zur Extraktion der poly(A)<sup>+</sup>-RNA aus der Gesamt-RNA (2.3.1) wurde das *Micro-FastTrack 2.0 Kit* (Invitrogen) nach dem Protokoll des Herstellers verwendet. Die Gesamt-RNA wurde mit eiskaltem Ethanol (75 %) gewaschen und in 10 µl Elutionspuffer resuspendiert. Nach der Zugabe von 1 ml Lysepuffer wurde der Ansatz für 5 min bei 65 °C erhitzt und anschließend für 30 min mit der oligo(dT)-Zellulose schüttelnd inkubiert. Die Zellulose wurde in 2,6 ml Bindungspuffer aufgenommen und auf eine Filtersäule überführt. Es folgten mehrere Waschschriffe, bevor die poly(A)<sup>+</sup>-RNA mit 200 µl Elutionspuffer eluiert wurde. Von dieser Lösung wurde ein Aliquot zur Konzentrationsbestimmung abgenommen, die übrige Probe wurde zur Präzipitation mit 10 µl Glycogen-Carrier (2 mg/ml), 30 µl Natrium-Acetat (2 M) und 2,5 Vol. 100 % EtOH versetzt.

Lysepuffer:	20 µl Protein/RNase Degradier, 1 ml Stammpuffer
Stammpuffer:	200 mM NaCl, 1,5 mM MgCl <sub>2</sub> , 2 % SDS, 200 mM Tris HCl, pH 7,5
Bindungspuffer:	500 mM NaCl, 10 mM Tris HCl, pH 7,5
Waschpuffer:	250 mM NaCl, 10 mM Tris HCl, pH 7,5
Elutionspuffer:	10 mM Tris HCl, pH 7,5

### 2.3.3 cDNA-Synthese

Für die Synthese von cDNA aus der gewonnenen mRNA (2.3.2) wurde das *Superscript First-Strand Synthesis System for RT-PCR* (Invitrogen) benutzt. Für die cDNA-Synthese wurden 0,5 µg mRNA nach der Zugabe von 1 mM dNTP-Mix und 50 ng der *Random Hexamere* in einem Gesamtvolumen von 10 µl für 5 min bei 65 °C inkubiert und anschließend für 1 min auf Eis gekühlt. Der Ansatz wurde mit 1x Reaktionspuffer, 2,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 5 mM DTT, 40 U *RNase Inhibitor* und 50 U *SuperScript Reverse Transkriptase* komplettiert. Die Inkubation des Ansatzes erfolgte für 10 min bei 25 °C und anschließend für 50 min bei 50 °C. Die Reaktion wurde durch eine Inkubation bei 85 °C für 5 min terminiert. Der abschließende RNase-Verdau wurde mit 2 U RNase H aus *Escherichia coli* für 20 min bei 37 °C durchgeführt. Die synthetisierte cDNA wurde bei -20 °C gelagert und als Matrize in PCR-Reaktionen eingesetzt.

10x Reaktionspuffer (Invitrogen):	200 mM Tris-HCl, 500 mM KCl, pH 8,4
-----------------------------------	-------------------------------------

### 2.3.4 Polymerase-Kettenreaktion (*polymerase chain reaction, PCR*)

Alle aufgeführten PCR-Experimente wurde in einem *T3-Thermocycler* der Firma Biometra (Göttingen) durchgeführt. Tabellen mit den Sequenzen der verwendeten Primer befinden sich im Anhang (Tab. 6.3).

### 2.3.4.1 PCR

Mithilfe von PCR-Reaktionen wurden ausgewählte Sequenzabschnitte spezifisch amplifiziert. Ein PCR-Ansatz (50 µl) bestand aus Matrizen-DNA, 1× Reaktionspuffer B (Roboklon, Berlin) bzw. 1× *Phusion HF Buffer* (Finnzymes, Finnland), 2,5 U Taq DNA Polymerase (Roboklon) bzw. 1 U *Phusion High-Fidelity DNA Polymerase* (Finnzymes), den beiden spezifischen Primern (je 200 nM) und 200 µM jedes dNTPs (*peqGOLD dNTP-Set*, Peqlab, Erlangen). Bei einer PCR folgten auf einen Denaturierungsschritt (2,5 min bei 94 °C bzw. 30 s bei 98 °C) 35 Zyklen bestehend aus einem Denaturierungsschritt (40 s bei 94 °C bzw. 10 s bei 98 °C), der Anlagerung (40 s bei 55-67 °C bzw. entfällt) und der Elongation (40 s bis 1,5 min bei 72 °C bzw. 1 min bei 72 °C). Abschließend erfolgte immer eine finale Elongation (10 min bei 72 °C). Die PCR-Produkte wurden zur Analyse elektrophoretisch aufgetrennt (2.3.6) und mit 1/10 Vol. Natriumacetat und 2,5 Vol. 100 % EtOH gefällt.

- 10× Reaktionspuffer B (Roboklon): 500 mM KCl, 100 mM Tris-HCl, 0,1 % Triton X100, 15 mM MgCl<sub>2</sub>, pH 9,1
- 5× *Phusion HF Buffer* (Finnzymes): Der Puffer enthält 7,5 mM MgCl<sub>2</sub>. Des Weiteren macht der Hersteller keine genauen Angaben zur Zusammensetzung des Puffers.

### 2.3.4.2 PCR mit degenerierten Primern

Durch den Einsatz von degenerierten Primern wurden Sequenzinformationen von bislang unbekanntem aminergen Rezeptoren amplifiziert. Der PCR-Reaktionsansatz umfasste 50 µl und enthielt folgende Komponenten: 2 µl cDNA (2.3.3), 1× Reaktionspuffer B (Roboklon), 200 µM jedes dNTPs (Peqlab), 2 µM der degenerierten Primer und 2,5 U Taq DNA Polymerase (Roboklon). Die Amplifikation verlief nach folgendem Programm: 1 Zyklus: 2,5 min bei 94 °C, 35 Zyklen: 40 s bei 94 °C, 1 min bei 45-60 °C, 1 min bei 72 °C; 1 Zyklus: 10 min bei 72 °C.

### 2.3.4.3 SMART-RACE-PCR (*switching mechanism at 5' end of RNA transcript rapid amplification of cDNA ends-PCR*)

Die RACE-PCR ermöglicht ausgehend von einem kurzen bekannten Sequenzabschnitt im Transkript der aufzuklärenden Sequenz das Amplifizieren vollständiger cDNA-Enden zum 5'-Ende (5'-RACE-PCR) oder zum 3'-Ende (3'-RACE-PCR). Zur Durchführung dieser Experimente wurde das *BD SMART RACE cDNA Amplification Kit* von BD Bioscience (Clontech, Frankreich) verwendet.

Für die Erststrang-cDNA-Synthese bei 5'-RACE-PCR-Reaktionen, die durch die Reverse-Transkriptase katalysiert wird, wurde ein oligo(dT)-Primer (5'-CDS Primer) verwendet. Wenn die Reverse-Transkriptase das 5'-Ende der mRNA erreicht, fügt die Terminale-Transferase-Aktivität des Enzyms drei bis fünf Cytosin(C)-Desoxyribonukleotide an das

3'-Ende der cDNA an. Das SMART-Oligonukleotid lagert sich an diese C-reiche Region der cDNA an und dient so als erweiterte Matrize. Die Reverse-Transkriptase wechselt die Matrize und repliziert das Oligonukleotid. Die synthetisierte einzelsträngige cDNA besitzt somit ein 3'-Ende, das komplementär zum SMART-Oligonukleotid ist und als Primer-Bindungsstelle in den sich anschließenden PCR-Reaktionen dient.

Die cDNA für die 3'-RACE-PCR wurde ebenfalls mit einem klassischen oligo(dT)Primer (3'-CDS Primer) synthetisiert. Dieser besaß in seiner 5'-Region die SMART-Sequenz, die als Bindungsstelle für den reversen Primer in den folgenden PCR-Reaktionen diente.

In einem Gesamtvolumen von 5 µl wurde zur Synthese der 5'-cDNA bzw. der 3'-cDNA je 1 µg poly(A)<sup>+</sup>-RNA mit 2,4 µM 5'-CDS-Primer und 2,4 µM SMART-Oligonukleotid bzw. mit 2,4 µM 3'-CDS-Primer für 2 min bei 70 °C inkubiert. Die Ansätze wurde auf Eis gekühlt und anschließend mit 1x Erststrang-Puffer, 2 mM Dithiothreitol, 1 mM dNTP Mix und 1 µl *PowerScript Reverse Transcriptase* ergänzt. Die Synthese erfolgte bei 42 °C für 1,5 h. Das Produkt wurde in 250 µl Tricin-EDTA-Puffer verdünnt, für 7 min bei 72 °C inkubiert und anschließend bei -20 °C gelagert.

Zur Amplifizierung der gesuchten cDNA wurde ein spezifischer Primer verwendet, der zum einen im Bereich der bereits bekannten Sequenz liegt und zum anderen eine relativ hohe *Annealing*-Temperatur ermöglicht. Als zweiter Primer diente der Universal-Primer-Mix. Dieser weist eine Sequenzüberlappung mit dem SMART-Oligonukleotid auf und kann sich so an der synthetisierten cDNA anlagern.

Ein PCR-Ansatz (50 µl) bestand aus 1x *Advantage*-PCR-Puffer, 200 µM dNTP-Mix, 1x *Advantage*-Polymerase-Mix, 2,5 µl der synthetisierten cDNA, 1x Universal-Primer-Mix und dem spezifischen Primer (200 nM). Die PCR verlief nach folgendem Programm: 5 Zyklen: 30 s bei 94 °C, 3 min bei 72 °C; 5 Zyklen: 30 s bei 94 °C, 30 s bei 70 °C, 3 min bei 72 °C; 25 Zyklen: 30 s bei 94 °C, 30 s bei 68 °C, 3 min bei 72 °C. Die PCR-Produkte wurden anschließend durch eine Ethanolfällung präzipitiert.

Die Spezifität der PCR wurde durch eine nachfolgende PCR mit *genesteten* Primern erhöht. Bei der *nested* PCR liegen die ausgewählten Primer innerhalb der Sequenz des ersten PCR-Produkts. Dazu wurden die PCR-Produkte in 15 µl Tricin-EDTA-Puffer gelöst. Der PCR-Ansatz (2.3.4.1) enthielt ein zum spezifischen Primer *genesteten* Primer (200 nM) sowie den *Nested*-Universal-Primer (200 nM). Die PCR wurde unter folgenden Bedingungen durchgeführt: 20 Zyklen: Denaturierung 30 s bei 94 °C, Anlagerung 30 s bei 68 °C, Elongation 3 min bei 72 °C.

Alle durch RACE-PCR-Experimente und anschließende *nested* PCR-Experimente erhaltenen Produkte wurden mittels Agarose-Gelelektrophorese aufgetrennt (2.3.6). Die relevanten DNA-Fragmente wurden aus dem Gel isoliert und für Sequenzanalysen in den pGEM-T-Vektor ligiert (2.3.8).

5× Erststrang-Puffer:	375 mM KCl, 30 mM MgCl <sub>2</sub> , 250 mM Tris HCl, pH 8,3
Tricin-EDTA-Puffer:	1 mM EDTA, 10 mM Tricin-KOH, pH 8,5
10× BD- <i>Advantage</i> -PCR-Puffer:	150 mM KOAc, 35 mM Mg(OAc) <sub>2</sub> , 37,5 µg/ml BSA, 0,05 % Tween 20, 0,05 % Nonidet-P40, 400 mM Tricin-KOH, pH 8,7

#### 2.3.4.4 RT-PCR (*reverse transcription PCR*)

Mithilfe der RT-PCR wurde das Vorkommen der spezifischen Rezeptor-mRNA in verschiedenen Geweben semiquantitativ untersucht. Diese PCR-Experimente wurden je dreimal auf unabhängigen Gewebeproben durchgeführt. Für die RT-PCR wurden 1,1 µg isolierte Gesamt-RNA (2.3.1) aus verschiedenen Geweben für 30 min mit 2 U DNase I in DNase I-Puffer (Ambion) bei 37 °C verdaut, um eine Kontamination mit genomischer DNA auszuschließen. Als negative Kontrolle wurde die gleiche Menge RNA zusätzlich einem RNase-Verdau (1 µl RNase Cocktail, Ambion) unterzogen. Die Reaktion wurde durch die Zugabe von 1 µl DNase *Inactivation Reagent* (Ambion) und eine zweiminütige Inkubation bei RT beendet. Nach einer abschließenden Zentrifugation wurden die RNA-Proben bei -80 °C bis zu ihrer weiteren Verwendung gelagert. Weitere Schritte erfolgten entsprechend der Anleitung des *SuperScript One-Step RT-PCR mit Platinum Taq Systems* (Invitrogen). Von der vorbehandelten Gesamt-RNA-Präparation wurden je 100 ng der einzelnen Gewebe bzw. der entsprechenden negativen Kontrollen für den jeweiligen PCR-Ansatz eingesetzt. Ein PCR-Ansatz (50 µl) setzte sich zusammen aus: 1× Reaktions-Mix, den beiden spezifischen Primern (je 200 nM), 1 µl *RT/Platinum-Taq-Mix* und 100 ng der Matrizen-RNA. Die PCR wurde unter folgenden Bedingungen durchgeführt: 1 Zyklus: DNA-Synthese und Denaturierung 30 min bei 50 °C, 2 min bei 94 °C; 35 Zyklen: 40 s bei 94 °C, 40 s bei 60 °C, 40 s bei 72 °C; 1 Zyklus: 10 min bei 72 °C.

DNase I-Puffer:	25 mM MgCl <sub>2</sub> , 5 mM CaCl <sub>2</sub> , 100 mM Tris, pH 7,5
Reaktions-Mix:	Puffer mit 0,4 mM jedes dNTPs und 2,4 mM MgSO <sub>4</sub> ; des Weiteren macht der Hersteller keine genauen Angaben zur Zusammensetzung des Puffers.

#### 2.3.5 Restriktion

Restriktionen wurden zum einen durchgeführt, um Fragmente mit geeigneten kohäsiven Enden zu erhalten. Für diese präparative Restriktionsansätze wurden isolierte Plasmide bzw. PCR-Produkte (500-1000 ng) mit 5 U Restriktionsenzym und dem jeweils zugehörigen Restriktionspuffer bei der vom Hersteller angegebenen optimalen Temperatur für 2 h inkubiert.

Zum anderen wurden Restriktionsanalysen durchgeführt, um die erfolgreiche Klonierung der Fragmente in Plasmid-Vektoren zu überprüfen. Dazu wurde die zu untersuchende DNA (300-500 ng) mit 3 U Restriktionsenzym und dem jeweils zugehörigen Restriktionspuffer 2 h inkubiert. Die entstandenen Fragmente wurden anschließend in einem Agarosegel separiert und isoliert (2.3.6).



### 2.3.6 Agarose-Gelelektrophorese

Die Agarose-Gelelektrophorese zur Auftrennung von DNA-Proben wurde mit dem *System Hoefer HE 33 Mini Submarine Electrophoresis Unit* (Amersham Bioscience, Freiburg) durchgeführt. Für die Auftrennung und Identifizierung von DNA-Fragmenten wurden Gele mit 1,0-1,2 % Agarose (SeaKem Le Agarose, Biozym, Oldendorf) in Tris-Acetat-EDTA-Puffer (TAE-Puffer) verwendet. Um die DNA sichtbar zu machen, wurde dem TAE-Puffer Ethidiumbromid zugegeben (Endkonzentration: 1 µg/ml). Die Proben wurden mit 1/4 Vol. DNA-Gelladepuffer versetzt und auf das Gel aufgetragen. Die elektrophoretische Auftrennung der Fragmente erfolgte bei einer konstanten Spannung von 75 V. Als Größenstandard dienten Marker-DNAs (1 kb DNA Ladder, 100 bp Ladder, New England Biolabs). Die Gele wurden anschließend mit dem Gel-Dokumentationssystem *GelSystem 8 Entry* (Biostep, Jahnsdorf) dokumentiert.

50× TAE Puffer: 1,5 M Tris Base, 60 mM EDTA, 5,71 % Essigsäure  
DNA-Gelladepuffer: 0,25 % Bromphenolblau, 0,25 % Xylencyanol, 30 % Glycerol

### 2.3.7 DNA-Isolierung aus Agarose-Gelen

DNA wurde unter Verwendung eines Molekularsiebes durch Zentrifugation aus einem Stück Agarose-Gel eluiert. Für die Herstellung des Molekularsiebes wurde ein Reaktionsgefäß halbiert, der Boden mit einer heißen Kanüle durchstoßen und das entstandene Loch mit silanisierter Glaswolle (Serva, Heidelberg) bedeckt. Diese Konstruktion wurde in ein intaktes Reaktionsgefäß gesteckt. Die DNA-Fragmente wurden mithilfe eines UV-Tisches (Vilber Lourmat, Eberhardzell) unter Fluoreszenzanregung im Agarosegel identifiziert und die entsprechenden Bereiche mit einem Skalpell ausgeschnitten. Das isolierte Gelstück wurde auf das Molekularsieb überführt und für 2 min bei 6.000 Upm zentrifugiert. Die DNA befand sich anschließend im intakten Reaktionsgefäß und wurde durch eine Ethanolfällung konzentriert.

### 2.3.8 Ligation

Aufgereinigte, ungeschnittene DNA-Fragmente wurden nach dem Protokoll des Herstellers in den pGEM-T-Vektor (*pGEM-T Vector Systems*, Promega, Mannheim) eingefügt.

Vektoren und Fragmente mit passenden kohäsiven Enden für präparative Ansätze wurden durch Restriktion (2.3.5) erhalten. Ein Ligationsansatz mit einem Gesamtvolumen von 15 µl enthielt 300 ng des DNA-Fragments, 100 ng Vektor-DNA, 1× Ligationspuffer und 5 U T4-DNA-Ligase (Fermentas, Mannheim). Es erfolgte eine Inkubation bei 4 °C über Nacht und anschließend die Transformationen des Vektors in kompetente *E. coli*-Zellen (2.3.9). Die verwendeten Vektoren sind nachfolgend aufgeführt (Tab. 2.1).

10× Ligationspuffer: 400 mM Tris HCl, 100 mM MgCl<sub>2</sub>, 100 mM DTT, 5 mM ATP, pH 7,8

**Tabelle 2.1 Verwendete Vektoren**

Vektor	Herkunft	Anwendung
pBluescript SK(-)	Stratagene (Amsterdam)	Klonierung
pcDNA 3.1	Invitrogen (Karlsruhe)	eukaryotische Expression
pET-30a	Novagen (Darmstadt)	prokaryotische Expression
pGEM-T	Promega (Mannheim)	T/A-Klonierung
pMal-c2X	New England Biolabs (Frankfurt a. M.)	prokaryotische Expression

### 2.3.9 Transformation kompetenter *E. coli*-Zellen

Zwei unterschiedliche Typen von *E. coli*-Zellen wurden für Transformationen eingesetzt. Zur Vermehrung von Plasmiden erfolgte die Transformation kompetenter *E. coli*-Zellen des Typs JM109 (Stratagene, Amsterdam). Für die Expression rekombinanter Proteine wurden *E. coli*-Zellen des Typs BL21(DE3)pLysS (Novagen, Darmstadt) verwendet. Transformationskompetente *E. coli*-Bakterienzellen (10 Vol.) wurden mit dem Ligationsansatz (2.3.8) 30 min auf Eis inkubiert. Nach einem Hitzeschock bei einer Temperatur von 42 °C für 40 s wurde der Ansatz 2 min auf Eis gekühlt, anschließend mit 900 µl LB-Medium (Luria/Miller, Roth) ergänzt und 45 min bei 37 °C schüttelnd inkubiert (Thermomixer comfort, Eppendorf, Hamburg). Nach Sedimentation (2 min, 6.000 Upm) wurde das Zellpellet in 100 µl LB-Medium resuspendiert und auf LB-Agar-Platten (Luria/Miller, Roth) mit entsprechend selektierenden Antibiotikazusätzen ausplattiert. Die Inkubation erfolgte über Nacht bei 37 °C. Zur Selektion erfolgreich transformierter Klone nach der Blau-Weiß-Methode wurde den LB-Agar-Platten vor der Transformation 0,1 mM IPTG (Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid) als Induktor und 75 µg/ml des Farbstoffes X-Gal (5-bromo-4-chloro-3-indolyl-beta-D-galactopyranosid) zugesetzt.

LB-Medium:	10 g/l Trypton, 5 g/l Hefe-Extrakt, 10 g/l NaCl
LB-Agar:	10 g/l Trypton, 5 g/l Hefe-Extrakt, 10 g/l NaCl, 15 g/l Agar
Antibiotika Zusätze:	Carbenicillin 100 µg/ml; Chloramphenicol 100 µg/ml; Kanamycin 50 µg/ml

### 2.3.10 Isolierung von Plasmid-DNA

Für die Vermehrung transformierter *E. coli*-Zellen wurden 5 ml LB-Medium, versetzt mit dem entsprechenden Antibiotikum (2.3.9), mit einer einzelnen Kolonie beimpft und über Nacht bei 37 °C im Warmluftschüttler (Shaker ES-70, Peqlab) inkubiert. Die Isolierung und Reinigung der Plasmid-DNA erfolgte mit dem *peqGOLD Plasmid Miniprep Kit I* (Peqlab) entsprechend dem Protokoll des Herstellers. Die Plasmid-DNA wurde mit 70 µl DEPC-Wasser eluiert und bis zur weiteren Verwendung bei 4 °C aufbewahrt.

Für die Isolierung größerer DNA-Mengen wurden 50 ml LB-Medium mit Antibiotikum versetzt und mit einer einzelnen Kolonie beimpft. Die Inkubation erfolgte über Nacht bei 37 °C im Warmluftschüttler (Peqlab). Die Sedimentation der Bakterienzellen erfolgte durch Zentrifugation der Kulturflüssigkeit bei 4 °C für 10 min mit 5.500 UpM (Biofuge 15R,

Heraeus). Das Bakterienpellet wurde in 4 ml Lösung I resuspendiert und mit 8 ml Lösung II vorsichtig vermischt. Nach der anschließenden Zugabe von 8 ml Lösung III wurde die Lösung bei 4 °C für 5 min bei 5.500 UpM zentrifugiert. Der Überstand wurde durch einen Faltenfilter filtriert und zur Präzipitation der Plasmid-DNA mit 25 ml Isopropanol versetzt. Es folgte eine Zentrifugation für 10 min bei 5.500 UpM und 4 °C. Der Überstand wurde dekantiert und das Pellet in 1,45 ml H<sub>2</sub>O 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 mit 5.500 UpM bei 4 °C. Der Überstand wurde mit 2,5 Vol. Ethanol (100 %) versetzt und 10 min bei 5.500 UpM und 4 °C zentrifugiert. Das Pellet wurde in 200-300 µl Tris-EDTA-Puffer (TE-Puffer) resuspendiert, mit 2-3 µl RNase Cocktail (Ambion, UK) versetzt und 30 min bei 37 °C inkubiert. Anschließend erfolgte eine Phenol/Chloroform-Extraktion und eine Präzipitation mit 1/10 Vol. 3 M LiCl und dem dreifachen Vol. 100 % EtOH. Die DNA-Konzentration wurde mit dem Spektralphotometer *GenQuant 1300* (GE Healthcare) bestimmt.

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:	3 M Kaliumacetat, 11,5 % (v/v) Essigsäure, pH 4,8
Phenol/CHCl <sub>3</sub> :	1:1 Mischung, TE gesättigt, 0,1 % 8-Hydroxychinolin
TE-Puffer:	10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 7,4

## 2.4 Biochemische Methoden

### 2.4.1 Proteinbestimmung

Die Proteinbestimmung wurde nach Angaben des Herstellers mit dem Reagenz *Roti-Nanoquant* (Roth), das auf einer Modifikation der Proteinbestimmung nach BRADFORD (1976) beruht, durchgeführt. Für die Kalibrierung wurde eine Rinderserumalbumin-Konzentrationsreihe verwendet und in Dreifachbestimmungen gemessen. Die Ermittlung des Proteingehaltes der einzelnen Proben erfolgte jeweils in Doppelbestimmung. Die Proteinmenge wurde mit dem Spektralphotometer *GenQuant 1300* (GE Healthcare) durch Messung der Extinktion bei 595 nm bestimmt.

### 2.4.2 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Die Auftrennung von Proteinen erfolgte mit einem SDS-Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese-System nach LAEMMLI (1970). Bei den verwendeten Proben handelte es sich zum einen um Gewebeproben, die direkt in reduzierendem Proteinauftragspuffer (Roti-Load, Roth) homogenisiert wurden, wobei große Zellfragmente durch Zentrifugation (Biofuge 15R, Heraeus) abgetrennt wurden. Zum anderen handelte es sich um gereinigte Membranproteine (2.5.4), die vor dem Auftragen mit 1/3 Vol. Proteinauftragspuffer

versetzt wurden. Alle verwendeten Proben wurden vor dem Auftragen durch Erhitzen (60-95 °C) für 5 min denaturiert. Die Durchführung der Gelelektrophorese erfolgte mit dem *System Mini-Protean* von Biorad (München). Die Elektrophorese erfolgte in einem SDS-Puffer, wobei der Lauf im Sammelgel (4,5 %) für 15 min bei einer Spannung von 80 V durchgeführt wurde und anschließend im Trenngel (10-14 %) für 1,5 h bei einer konstanten Spannung von 120 V. Die Proteine wurden abschließend entweder mit Coomassie (Serva) gefärbt oder zur anschließenden Verwendung in der Immundetektion auf eine Polyvinylidenfluorid-Membran (Millipore, USA) transferiert (2.4.3).

Molekulargewichtsstandards:	Low Molecular Weight, Dalton Mark VII-L (Sigma), High Molecular Weight Standard Mixture (Sigma), Protein Ladder 10-250 kDa (New England Biolabs)
Trenngel-Puffer:	15% Rotiphorese Gel 30 (Roth), 375 mM Tris/HCl, 0,2 % SDS, 0,125 % TEMED, 0,07 % APS, pH 8,8
Sammelgel-Puffer:	33,3% bzw. 46,7% Rotiphorese Gel30, 125 mM Tris/HCl, 0,2 % SDS, 0,125% TEMED, 0,07% APS, pH 6,8
SDS-Laufpuffer:	25 mM Tris, 192 mM Glycin, 0,1 % SDS, pH 8,3
Coomassie-Färbelösung:	0,1 % Coomassie G250, 50 % Methanol, 20 % Essigsäure
Entfärbelösung:	10 % Methanol, 7 % Essigsäure

### 2.4.3 Western-Blot und Immundetektion

Die Übertragung der aufgetrennten Proteine aus dem Gel auf eine Polyvinylidenfluorid-Membran (Millipore) erfolgte nach dem Semidry-Verfahren in einem diskontinuierlichen Puffersystem mit einer *Trans-Blot SD Cell* von Biorad. Auf der Anode der Blotkammer wurden sechs in Anodenpuffer I und drei in Anodenpuffer II getränkte Filterpapiere hintereinander angeordnet. Darauf folgten die Membran, das SDS-Gel und neun in Kathodenpuffer getränkte Filterpapiere. Der Proteintransfer erfolgte für 1,5 h bei 54 mA pro Gel. Nach dem Transfer wurde die Membran zur reversiblen Proteinfärbung für 10 min in 0,2 % Ponceau S (Serva) gelegt, danach mit H<sub>2</sub>O gespült und schließlich bei 60 °C getrocknet. Die Aufbewahrung der Membran erfolgte bei 4 °C.

Die Analyse der transferierten Proteine wurde mithilfe von Antikörpern durchgeführt. Die Immundetektion wurde mit einer Inkubation in Blockierlösung (30 min) zur Absättigung von unspezifischen Bindungsstellen eingeleitet. Anschließend wurde der Blot über Nacht bei 4 °C mit dem primären Antikörper (verdünnt in Tween-Puffer) inkubiert. Nach mehreren Waschschritten (3x 5 min Tween-Puffer, 3 min Harnstofflösung, 3x 5 min Tween-Puffer) folgte die Inkubation mit sekundären HRP-gekoppelten Antikörpern für 1 h. Nach erneutem dreimaligen Waschen mit Tween-Puffer erfolgte die Detektion der gebundenen Antikörper durch Chemilumineszenz mit dem *SuperSignal West Pico Chemiluminescent Substrate* (Pierce, USA) auf X-OMAT-AR-Filmen (Kodak, Stuttgart). Alle abgebildeten Experimente wurden dreimal unabhängig durchgeführt. Eine Auflistung aller verwendeten primären und sekundären Antikörper, deren Herkunft und die eingesetzten Verdünnungen befindet sich im Anhang (Tab. 6.4 und 6.5).

Anodenpuffer I	300 mM Tris-Base, 20 % Methanol, pH 10,4
Anodenpuffer II:	25 mM Tris-Base, 20 % Methanol, pH 10,4
Kathodenpuffer:	40 mM 6-Amino-n-Hexansäure, 20 % Methanol, pH 7,6
Tween-Puffer:	0,1 % Tween 20, 150 mM NaCl, 10 mM TRIS, pH 7,5
Blockierlösung:	5 % Trockenmilch (Biorad) in Tween-Puffer
Harnstoff-Lösung:	2 M Harnstoff, 100 mM Glycin, 1 % Triton X100

#### 2.4.4 Herstellung und Immuncytochemie von Schnittpräparaten

Alle dargestellten immuncytochemischen Experimente wurden mindestens zweimal unabhängig mit je vier Gehirnen durchgeführt. Eine Auflistung aller verwendeten primären und sekundären Antikörper befindet sich im Anhang (Tab. 6.4 und 6.5).

##### 2.4.4.1 Anfertigung von Gefrierschnitten

Für die Herstellung von Gefrierschnitten wurden die präparierten Gewebe für 2 h bei RT in Fixierlösung inkubiert und anschließend 3x 10 min mit PBS (Phosphat-gepufferte Salzlösung) gewaschen. Es folgte eine Entwässerung des Gewebes durch Inkubation mit 10%iger Sucrose-Lösung für 1 h bei 4 °C und anschließend mit 25%iger Sucrose-Lösung über Nacht bei 4 °C. Die Drüsen wurden mit *Tissue-Tek* Einbettungsmedium (Sakura Finetek) in ein Stück Leber eingebettet und in 2-Methylbutan eingefroren, das mit flüssigem Stickstoff auf -150 °C abgekühlt wurde. Die gefrorenen Präparate wurden bei -80 °C gelagert. An einem Gefriermikrotom (Kryostat HM 500 OM, Microm, USA) wurden 10-25 µm dicke Gewebeschnitte angefertigt und auf poly-L-Lysin beschichteten Deckgläsern aufgenommen. Die luftgetrockneten Präparate wurden bis zur weiteren Verwendung bei 4 °C aufbewahrt. Für eine immuncytochemische Markierung wurden die Gefrierschnitte nach folgendem Schema behandelt: 5 min NH<sub>4</sub>Cl-Lösung, 5 min Waschen mit PBS, 15 min Inkubation mit Blockierlösung, Inkubation mit primärem Antikörper in Blockierlösung bei 4 °C über Nacht, 3x 5 min Waschen mit PBS, 1 h Inkubation mit sekundärem Antikörper in PBS, 3x 5 min Waschen mit PBS. Nach dem letzten Waschschrift wurden die Schnitte kurz in bidestilliertes Wasser getaucht und in Mowiol eingedeckelt. Die Analyse der Immunfluoreszenz erfolgte mit einem Konfokalmikroskop LSM 510 der Firma Carl Zeiss.

Phosphatpuffer:	130 mM K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> , 70 mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , pH 7,0
Fixierlösung:	3 % Paraformaldehyd, 0,075 M Lysin-HCl, 0,01 M NaIO <sub>4</sub> , 0,2 M Sucrose in 0,1 M Phosphatpuffer, pH 7,0
10 %/ 25 % Sucroselösung:	10 %/ 25 % Sucrose in 0,1 M Phosphatpuffer
PBS:	140 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 8 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> , 1,5 mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , pH 7,4
NH <sub>4</sub> Cl-Lösung:	50 mM NH <sub>4</sub> Cl in PBS
Blockierlösung:	5 % Trockenmilch, 1 % NGS, 0,8 % BSA, 0,1 % Triton X-100 in PBS
Mowiol:	33,3 % Glycerol, 16,7 % Mowiol 4-88, 2 % n-Propyl-Galat in PBS

#### 2.4.4.2 Anfertigung von Vibratomschnitten

Die Gewebe (2.2.2) wurden in gekühltem Puffer A präpariert und über Nacht bei 4 °C in 4 % Paraformaldehyd fixiert. Die fixierten Gewebeproben wurden 3x 15 min in Puffer A gewaschen und anschließend in 17 % Gelatine (250 g Bloom, Fluka, Schweiz) eingebettet. Nach Abkühlen und Aushärten der Gelatine-Blöcke wurden mithilfe eines Vibratoms (Pelco, USA) 50-100 µm dicke Gewebeschnitte angefertigt. Die freischwimmenden Schnitte wurden in vorbereitete Probengefäße überführt und folgenden Behandlungsschritten unterzogen: 2x 15 min Waschen in Puffer A bei 60 °C, 3x 15 min Waschen in Puffer A bei RT, 20 min Inkubation mit 50 mM NH<sub>4</sub>Cl, 3x 15 min Waschen mit Puffer A, 2 h Inkubation in Blockierlösung. Die Inkubation mit dem primären Antikörper erfolgte bei 4 °C über Nacht in Blockierlösung. Nach dreimaligem Waschen (20 min) in Puffer B wurden die Schnitte für 8 h mit dem sekundären Antikörper in Puffer B inkubiert. Abschließend wurden die Schnitte erneut in Puffer B gewaschen und in Mowiol eingedeckelt.

Puffer A:	50 mM Tris HCl, pH 7,5
Blockierlösung:	50 mM Tris HCl, 3 % Natural Goat Serum, 0,5 % Triton X100, pH 7,5
Puffer B:	50 mM Tris HCl, 150 mM NaCl, pH 7,5

#### 2.4.5 Präabsorption

Durch Präabsorptions-Experimente wurde die Spezifität der affinitätsgereinigten Antikörper (2.4.9/10) nachgewiesen. Der primäre Antikörper wurde dazu vor der Zugabe zum Western Blot oder den Gewebeschnitten mit seinem spezifischen Antigen (5-15 µg/ml) für 1 h bei 4 °C inkubiert.

#### 2.4.6 Expression von Fusionsproteinen

Kompetente *E. coli*-Zellen des Typs BL21 wurden mit prokaryotischen Expressionsplasmiden, die ausgewählte cDNA-Fragmente enthielten, transformiert (s. 2.3.9). Ausgehend von einer 5 ml Übernachtskultur (LB-Medium mit dem entsprechenden Antibiotikum) wurde eine 250 ml Großkultur beimpft und für etwa 3 h im Warmluftschüttler (PeqLab) bei 37 °C kultiviert (OD<sub>600</sub> 0,6-0,9). Die Induktion der Proteinexpression erfolgte durch Zugabe von 1 mM IPTG. Die Kulturen wurden anschließend weitere 3 h bei 37 °C schüttelnd inkubiert. Nach einer Sedimentation der Zellen (5.500 UpM für 10 min, Biofuge pico) wurde das Pellet in 1 ml TE-Puffer resuspendiert und mit einem Ultraschallprozessor (Hielscher, Teltow) fünfmal 30 s sonifiziert. Zur Trennung der löslichen und unlöslichen Bestandteile wurde 10 min bei 15.300 UpM zentrifugiert. Mittels SDS-PAGE wurde die Löslichkeit des Proteins analysiert. Bei löslichen Proteinen konnte der Überstand sofort für die folgende Aufreinigung verwendet werden (2.4.7).

#### 2.4.7 Reinigung von Fusionsproteinen mittels Amylose-Säulenchromatographie

Die Verwendung des pMal-c2X Vektors ermöglicht die Synthese von Fusionsproteinen aus einem spezifischen Teil des Rezeptors und dem Maltosebindeprotein. Das Fusionsprotein wurde durch eine Affinitätschromatographie mit einer Amylose-Matrix (New England Biolabs) aufgereinigt. Eine Leersäule (Biorad) wurde mit 6 ml Amylosematerial befüllt, und anschließend wurde das Säulenmaterial mit 15 ml Säulenpuffer äquilibriert. Die Proteinlösung (s. 2.4.6) wurde im Verhältnis 1:5 mit Säulenpuffer versetzt und auf die Säule aufgetragen. Nachdem die Säule mit zehn Säulenvolumen Säulenpuffer gewaschen wurde, folgte die Elution des Fusionsproteins in 4 ml Elutionspuffer. Die Proteinreinigung wurde auf einem SDS-Gel überprüft.

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

Elutionspuffer: 20 mM Maltose in Säulenpuffer

#### 2.4.8 Reinigung von Fusionsproteinen mit Metallionen-Affinitätschromatographie

Die Integration ausgewählter Abschnitte von Rezeptoren in den Vektor pET-30a führt zur Expression eines Fusionsproteins, das terminal sechs Histidinreste besitzt. Dies ermöglichte eine Reinigung des exprimierten His-Tag-Fusionsproteins mittels Metallionen-Affinitätschromatographie mit dem *HIS-Select HF Nickel Affinity Gel System* von Sigma. Dazu wurde das Protein in 4 ml Bindungspuffer aufgenommen, mit 2 ml des Affinitätsgels ergänzt und für 45 min auf einem Kippschüttler (Cat, Staufen) inkubiert. Anschließend wurden die Proben 3 min bei 15.000 UpM (Biofuge 15R) zentrifugiert. Das entstandene Pellet wurde dreimal in Waschpuffer resuspendiert und zentrifugiert. Nach erneutem Resuspendieren in Waschpuffer wurde die Lösung in eine Leersäule (Biorad) überführt. Die Elution des gebundenen Fusionsproteins erfolgte mit 2 ml Elutionspuffer. Für nachfolgende Methoden wurde die eluierte Proteinlösung für mehrere Stunden bei 4 °C gegen Kopplungspuffer dialysiert (ZelluTrans 3,5; Roth). Die Proteinreinigung wurde auf einem SDS-Gel überprüft.

Bindungspuffer: 10 mM Imidazol, 50 mM  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , 300 mM NaCl, pH 8,0

Waschpuffer: 20 mM Imidazol, 50 mM  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , 300 mM NaCl, pH 8,0

Elutionspuffer: 250 mM Imidazol, 50 mM  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , 300 mM NaCl, pH 8,0

#### 2.4.9 Gewinnung polyklonaler Antiseren

Für die Herstellung und Aufreinigung eines polyklonalen Antiserums gegen den Dopaminrezeptor (PeaDop2) wurden zwei Fusionsproteine benötigt. Ein charakteristischer Teil der Rezeptorsequenz der dritten cytoplasmatischen Schleife wurde durch eine PCR mit spezifischen Primern amplifiziert (2.3.4.1). Die Primer verfügten über Restriktionsstellen, die eine Ligation der erhaltenen Fragmente in die Vektoren pET-30a und pMal-c2X Vektor ermöglichten. Es erfolgte eine Überexpression der Fusionsproteine

(2.4.6) und deren anschließende Aufreinigung (2.4.7/8). Das durch die Expression des pMalc2X-Konstrukts entstandene Fusionsprotein wurde als Antigen für die Immunisierung verwendet. Das pET-30a-Konstrukt diente zur Expression des Fusionsproteins für die spätere Affinitätsreinigung des polyklonalen Antiserums.

Für die Herstellung eines polyklonalen Antiserums gegen den Serotoninrezeptor (Pea5-HT<sub>1</sub>) wurde ein Rezeptor-spezifisches synthetisches Peptid, welches an KLH (*keyhole limpet hemocyanine*) konjugiert war, verwendet.

Die Herstellung der polyklonalen Antikörper wurde bei der Firma Pineda (Berlin) in Auftrag gegeben. Zur Optimierung der Auswahl geeigneter Tiere wurden Präimmunsereen von insgesamt vier Kaninchen auf ihre Kreuzreaktivität mit dem Fusionsprotein und Gehirnproteinen der Schabe im Western-Blot untersucht. Die zwei Tiere, deren Seren die geringste Kreuzreaktion zeigten, wurden für die Immunisierung nach dem Standardprotokoll der Firma Pineda ausgewählt.

#### **2.4.10 Affinitätschromatographie polyklonaler Antikörper**

Die Affinitätsreinigung von polyklonalen Antikörpern wurde mit *HiTrap NHS-activated-Säulen* der Firma Amersham Bioscience durchgeführt. Das His-Tag-Fusionsprotein (2.4.8) diente als Antigen, davon wurden 1,2 mg auf die Säule überführt. Die Kopplung des Antigens und die weiteren Waschschrirte wurden entsprechend dem Protokoll des Herstellers mit Hilfe einer Flüssigkeits-Chromatographie-Anlage durchgeführt. Das Antiserum wurde 1:10 in Bindungspuffer verdünnt und in einem Kreislauf über Nacht auf die Säule geladen. Nach dreimaligem Waschen mit Bindungspuffer, wurden die gebundenen Antikörper durch einen pH-Gradienten mit 2 ml Elutionspuffer eluiert und durch Zugabe von Neutralisierungspuffer neutralisiert.

Bindungspuffer:	10 mM Tris-HCl, pH 7,5
Elutionspuffer:	100 mM Glycin-HCl, 0,5 M NaCl, pH 2,7
Neutralisierungspuffer:	1 M Tris-HCl, pH 9,0



## 2.5 Heterologe Expression der Rezeptoren in HEK 293 Zellen

### 2.5.1 Konstruktion der Expressionsvektoren

Für eine effektive heterologe Expression des Rezeptorproteins in eukaryotischen Zellen ist es erforderlich, die Rezeptor-kodierende DNA zu modifizieren. Dies wurde durch PCR-Reaktionen (2.3.4.1) mit entsprechend konstruierten Primern erreicht. Zum einen wurde die optimale Kozak-Konsensussequenz (KOZAK 1984) direkt vor dem ATG-Start-Kodon integriert. Des Weiteren wurde vor dem Stopp-Kodon am 3'-Ende eine Haemagglutinin A (HA)-Tag-kodierende Sequenz (YPYDVPDYA) eingefügt. Dies ermöglichte den Nachweis der heterologen Expression des Proteins mit Hilfe eines kommerziell erhältlichen anti-HA-Antikörpers. Die Ligation der modifizierten cDNA in den eukaryotischen Expressionsvektor pcDNA 3.1(+) erfolgte über die durch Primer eingefügten Schnittstellen.

### 2.5.2 Herstellung stabiler Zelllinien

Exponentiell wachsende HEK 293-Zellen ( $2 \times 10^5$  Zellen, 5 cm-Petrischale) wurden durch Calciumphosphatpräzipitation (CHEN & OKAYAMA 1987) mit 8 µg des konstruierten Expressionsvektor pcDNA 3.1(+) (2.5.1) transfiziert. Nach einer Inkubation bei 37 °C über Nacht wurde das Präzipitat entfernt und  $2 \times 10^4$  Zellen erneut ausgesät. Am nächsten Tag erfolgte ein Wechsel gegen frisches Medium (M10), das zur Selektion transfizierter Zellen das Antibiotikum Gentamycinsulfat G418 (1 mg/ml) enthält. Nach einer Inkubation über Nacht wurde das Medium erneut gewechselt, wobei G418 in einer Konzentration von 1,2 mg/ml eingesetzt wurde. Nach einem weiteren Mediumwechsel am nächsten Tag (G418, 1 mg/ml) erfolgte die Selektion der Zellklone über etwa 14 Tage mit Mediumwechsel im Abstand von drei Tagen. Einzelne Zellklone wurden abgelöst und in Multiwellschalen vermehrt. Bei eindeutig stabil transfizierten Linien wurde das Antibiotikum G418 auf 0,8 mg/ml reduziert. Die stabile Expression der Proteine wurde immunocytochemisch nachgewiesen (2.5.3).

M10-Medium: MEM GlutaMAX I (Invitrogen), 10 %, fötales Rinderserum, 1 %  
Antibiotic/Antimycotic, 1 % MEM nicht essentielle Aminosäuren, G418

### 2.5.3 Immuncytochemie an transfizierten Zellen

Der Nachweis der Rezeptorproteine nach der Expression in eukaryontischen Wirtszellen erfolgte mithilfe von Antikörpern. Die Zellen wurden dazu in die Vertiefungen von 24er Multiwell-Platten auf Glasplättchen ausgesät. Nach dreimaligem Waschen für je 10 min in PBS wurden die Zellen mit 4 % Paraformaldehyd in PBS für 15 min fixiert. Die fixierten Zellen wurden erneut dreimal mit PBS gewaschen und anschließend für 1 h in Präinkubationslösung inkubiert. Der primäre Antikörper wurde in Antikörper-Puffer verdünnt und für 1 h auf die Zellen gegeben. Die Zellen wurden danach wiederum dreimal mit PBS gewaschen, bevor die Inkubation mit dem sekundären Antikörper erfolgte. Die Zellen wurden abschließend dreimal gewaschen und in Mowiol (Hoechst) eingedeckelt.

PBS: 140 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 8 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1,5 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 7,4  
Präinkubationslösung: 1 % normales Ziegen Serum (NGS), 0,05 % Triton X100 in PBS  
Antikörper-Puffer: 0,5 % NGS, 0,05 % Triton X100 in PBS

### 2.5.4 Präparation von Membranproteinen

Aus den Anzucht-Petrischalen wurde das Kulturmedium abgesaugt und die Zellen zweimal mit PBS gewaschen. Anschließend wurden die Zellen in 1 ml PBS mit einem Zellschaber abgelöst, in ein Reaktionsgefäß überführt und 5 min bei 2.000 UpM zentrifugiert (Biofuge pico, Heraeus). Das entstandene Pellet wurde in Puffer I resuspendiert und anschließend mit einem Pistill homogenisiert. Die Probe wurde für 10 min auf Eis inkubiert und danach bei 4 °C für 30 min bei 13.000 UpM zentrifugiert. Der Überstand mit den cytosolischen Proteinen wurde abgenommen und das Membran-Pellet in Puffer II resuspendiert. Nach Zugabe von 2 % CHAPS (3-[(3-Cholamidopropyl)-dimethylammonio]-1-propansulfonat) wurden die Membranproteine zur Solubilisierung 10 min auf Eis inkubiert. Es folgte eine Zentrifugation für 5 min bei 12.000 UpM. Der Überstand enthielt die Membranproteine. Deren Konzentration wurde durch eine Proteinbestimmung (2.4.1) ermittelt.

PBS: 140 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 8 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1,5 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 7,4  
Puffer I: 10 mM NaCl, 25 mM HEPES, 2 mM EDTA, pH 7,5, Protease-Inhibitor-Cocktail 1:500 (Sigma)  
Puffer II: 200 mM NaCl, 50 mM HEPES, pH 7,5, Protease-Inhibitor-Cocktail 1:500 (Sigma)

### 2.5.5 Deglykosylierung von Membranproteinen

Für die Deglykosylierung der gewonnenen Membranproteine wurden 20 µg der Membranproteine aus transfizierten HEK 293-Zellen eingesetzt und mit H<sub>2</sub>O auf ein Volumen von 22,5 µl aufgefüllt. Nach der Zugabe von 1x Denaturierungspuffer (New England Biolabs) erfolgte eine Inkubation von 20 min bei RT. Zu dem Ansatz wurden 1/10 Vol. 0,5 M Natriumphosphat (pH 7,5) und 1/10 Vol. 10 % Nonident-P-40 gegeben. Anschließend wurde der Ansatz mit 500 U PNGase F (New England Biolabs) versetzt und 2 h bei 37 °C inkubiert. In einem vergleichenden Parallelansatz erfolgte anstelle der Enzymzugabe eine Zugabe von H<sub>2</sub>O.

10x Denaturierungspuffer: 5 % SDS, 0,4 M Dithiothreitol

### 2.5.6 cAMP Assay

Die stabil transfizierten Zellen (2.5.2) wurden in 24er Multiwell-Platten mit einer Dichte von  $0,9 \times 10^5$ /Well ausgesät. Nach zwei Tagen wurde den Zellen über Nacht 2,5 mM Butyrat zugesetzt. Nach dem Absaugen des Mediums wurde zweimal mit PBS/IBMX (Isobutylmethylxanthin) gewaschen. Anschließend erfolgte eine Inkubation für 30 min bei 37 °C in PBS/IBMX und verschiedenen Konzentrationen der Test-Liganden (Tab. 2.2). Die Zellen wurden durch die Zugabe von 500 µl eiskaltem Ethanol lysiert und zur Freisetzung des gebildeten cAMPs für 2 h bei 4 °C auf einem Taumler inkubiert. Die Zelllysate wurden in Reaktionsgefäße überführt und in einer Vakuumzentrifuge 2 h lyophilisiert. Die Bestimmung der cAMP-Konzentration erfolgte mit dem *TRK 432 Amersham Cyclic AMP [<sup>3</sup>H] Assay System* (GE Healthcare). Zu jeder Probe wurden 50 µl TE-Puffer pipettiert und anschließend 50 µl [<sup>3</sup>H]cAMP (1 kBq/pmol) und 100 µl Bindeprotein. Die Proben wurden 10 s gevortext und anschließend für 1 h bei 4 °C inkubiert. Nach der Zugabe von 100 µl Aktivkohle wurden die Proben kurz gevortext und für 3 min bei 15.300 UpM und 4 °C zentrifugiert. Von dem Überstand wurden 200 µl abgenommen und in ein Gläschen mit Szintillationsflüssigkeit (*Instant Scint Gel Plus*, Perkin Elmer, USA) überführt. Die Bestimmung der Radioaktivität erfolgte im *Scintillation Counter* (Beckman, Krefeld). Für jeden Messwert wurden Vierfachbestimmungen durchgeführt. Die intrazellulären cAMP-Konzentrationen der Lysate wurden anhand einer Kalibrierung, die parallel aus cAMP-Standardkonzentrationen erstellt wurde, ermittelt.

PBS: 140 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 8 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1,5 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 7,4

PBS/IBMX: 100 µM IBMX in PBS

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

Tabelle 2.2 Verwendete Liganden

Biogene Amine	Abkürzung	Bezugsquelle	Stammlösung
Dopamin Hydrochlorid	Dopamin	Sigma-Aldrich	10 mM
Histamin Dihydrochlorid	Histamin	Sigma-Aldrich	10 mM
5-Hydroxytryptamin	Serotonin, 5-HT	Sigma-Aldrich	100 mM
(±)-Octopamin Hydrochlorid	Octopamin	Sigma-Aldrich	10 mM
Tyramin Hydrochlorid	Tyramin	Sigma-Aldrich	10 mM

5-HT-Rezeptor-Liganden	Abkürzung	Bezugsquelle	Stammlösung
Buspiron Hydrochlorid	Buspiron	Sigma-Aldrich	10 mM
(+)-Butaclamol Hydrochlorid	Butaclamol	Sigma-Aldrich	100 µM
5-Carboxamidotryptamin Maleat	5-CT	Sigma-Aldrich	10 mM
(±)-8-OH-DPAT Hydrobromid	8-OH-DPAT	Sigma-Aldrich	10 mM
D-(+)-Lysergsäurediethylamid	LSD	Sigma-Aldrich	10 mM
5-Methoxytryptamin	5-MeOT	Sigma-Aldrich	10 mM
Methiothepin Mesylat	Methiothepin	Sigma-Aldrich	10 mM
Mianserin Hydrochlorid	Mianserin	Sigma-Aldrich	10 mM
Spiperon	Spiperon	Sigma-Aldrich	100 µM
Sumatriptan Succinat	Sumatriptan	Sigma-Aldrich	10 mM
WAY-100635 Maleat	WAY 100635	Sigma-Aldrich	10 mM

Dopaminrezeptor-Liganden	Abkürzung	Bezugsquelle	Stammlösung
6,7-ADTN Hydrobromid	6,7-ADTN	Sigma-Aldrich	10 mM
R-(-)-Apomorphin Hydrochlorid-Hemihydrat	Apomorphin	Sigma-Aldrich	10 mM
Bromocriptin Mesylat	Bromocriptin	Alexis	50 mM (in DMSO)
(+)-Butaclamol Hydrochlorid	Butaclamol	Sigma-Aldrich	100 µM
6-Chloro-APB Hydrobromid	6-Chloro-APB	Sigma-Aldrich	100 µM
Chlorpromazin Hydrochlorid	Chlorpromazin	Alexis	10 mM
cis-(Z)-Flupenthixol Dihydrochlorid	Flupenthixol	Sigma-Aldrich	10 mM
R-(+)-SCH-23390 Hydrochlorid	SCH 23390	Sigma-Aldrich	10 mM
R-(+)-SKF-38393 Hydrochlorid	SKF 38393	Sigma-Aldrich	10 mM
Spiperon	Spiperon	Sigma-Aldrich	100 µM

## 2.6 Statistische Analysen und bioinformatische Methoden

Die Auswertung sowie statistische Analyse erhobener Daten wurde mit der Software *PRISM* (Version 4.01; GraphPad, San Diego, USA) durchgeführt.

Für die Suche nach Datenbankeinträgen und *Basic Local Alignment Search Tool*-Analysen (ALTSCHUL ET AL. 1997) wurden die *online* verfügbaren Datenbanken des *National Center of Biotechnology Information* (NCBI, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>) genutzt. Analysen und Darstellungen von Sequenzinformationen wurden mit dem Programm *BioEdit* (Version 5.0.9.; HALL 1999) durchgeführt. Sequenzvergleiche wurden mithilfe der Funktion *ClustalW* des Programms *BioEdit* vorgenommen (THOMPSON ET AL. 1994) und die genetische Distanz mit *MEGA4* (TAMURA ET AL. 2007) ermittelt.

### 3 ERGEBNISSE

Für die molekulare Identifizierung und Charakterisierung von aminergen Rezeptoren des physiologischen und neurobiologischen Modellorganismus *Periplaneta americana* sollten in einem ersten Schritt die cDNAs verschiedener Rezeptoren dieser Unterfamilie der GPCRs kloniert werden. Für die Isolierung dieser cDNAs wurden bereits vor Beginn dieser Arbeit erste PCR-Experimente mit degenerierten Oligonukleotid-Primern durchgeführt (WALZ ET AL. 2006, ROTTE ET AL. 2009b). Die Identifizierung hoch konservierter Sequenzbereiche zur Konstruktion der degenerierten Primer erfolgte durch den Sequenzvergleich zahlreicher bereits bekannter aminerger Rezeptoren verschiedener Arthropoden. Die Sequenzen der Primer wurden so gewählt, dass sie in den am stärksten konservierten Bereichen der Rezeptoren lagen. Die Vorwärts-Primer deckten den Bereich der TM 6 ab. Die Rückwärts-Primer lagen im Bereich der TM 7. Als Matrize für diese Experimente wurde eine Schabengehirn-cDNA-Bibliothek verwendet. Die PCR-Experimente führten zur Amplifikation mehrerer Fragmente, die nach einem Vergleich mit den Sequenzen bekannter Rezeptoren vorläufig verschiedenen Rezeptorfamilien zugeordnet werden konnten (Abb. 3.1). Ein 97 Basenpaar (bp) langes Fragment wies große Sequenzähnlichkeit mit 5-HT<sub>1</sub>-Rezeptoren von *Drosophila melanogaster* auf (SAUDOU ET AL. 1992), ein 74 bp langes Fragment hatte große Sequenzähnlichkeit zu einem Dopaminrezeptor der INDR-Klasse (FENG ET AL. 1996, HAN ET AL. 1996) und ein 100 bp langes Fragment, zeigte große Ähnlichkeit zu einem  $\beta$ -adrenerg-ähnlichen Octopaminrezeptor von *D. melanogaster* (MAQUEIRA ET AL. 2005). Zwei isolierte Fragmente zeigten große Sequenzähnlichkeiten zu den Tyraminrezeptoren von *D. melanogaster* und *Apis mellifera* (SAUDOU ET AL. 1990, BLENAU ET AL. 2000): Das 71 bp lange Fragment führte zur Klonierung und Charakterisierung des PeaTyr1-Rezeptors (ROTTE ET AL. 2009b). Das zweite Tyraminrezeptor-ähnliche Fragment umfasste 113 bp und besitzt Sequenzunterschiede zu dem bereits klonierten PeaTyr1-Rezeptor. Der Pea5-HT<sub>1</sub>- und der PeaDop2-Rezeptor sind Gegenstand der vorliegenden Arbeit.

Dm5-HT1A	V <small>MA</small> L <small>T</small> M <small>P</small> L <small>C</small> A <small>A</small> C <small>Q</small> I <small>S</small> D <small>S</small> V <small>A</small> S <small>L</small> F <small>L</small> W <small>L</small> G <small>Y</small> F <small>N</small> S <small>T</small> L
Pea5-HT1	I <small>M</small> A <small>L</small> L <small>M</small> P <small>L</small> C <small>E</small> A <small>C</small> Y <small>I</small> N <small>D</small> Y <small>M</small> E <small>S</small> F <small>F</small> L <small>W</small> L <small>G</small> Y <small>F</small> N <small>S</small> T <small>L</small>
DmDop2	V <small>V</small> N <small>L</small> L <small>S</small> G <small>F</small> C <small>L</small> E <small>C</small> T <small>E</small> H <small>E</small> E <small>I</small> V <small>S</small> A <small>I</small> V <small>T</small>
PeaDop2	V <small>V</small> N <small>L</small> L <small>S</small> G <small>F</small> C <small>L</small> R <small>C</small> I <small>W</small> N <small>E</small> E <small>L</small> V <small>S</small> A <small>V</small> V <small>T</small>
DmOctβ3R	L <small>W</small> Y <small>V</small> I <small>T</small> S <small>L</small> C <small>G</small> P <small>A</small> C <small>P</small> C <small>P</small> D <small>V</small> L <small>V</small> V <small>L</small> F <small>W</small> I <small>G</small> Y <small>F</small> N <small>S</small> T <small>L</small>
PeaOctβ3	L <small>W</small> Y <small>V</small> S <small>T</small> I <small>L</small> C <small>G</small> E <small>A</small> C <small>P</small> C <small>P</small> D <small>I</small> V <small>V</small> A <small>V</small> F <small>W</small> I <small>G</small> Y <small>F</small> N <small>S</small> T <small>L</small>
DmTyrR1	W <small>L</small> P <small>F</small> F <small>L</small> M <small>Y</small> V <small>I</small> L <small>P</small> F <small>C</small> Q <small>I</small> C <small>C</small> P <small>T</small> N <small>K</small> F <small>K</small> N <small>F</small> I <small>T</small> W <small>L</small> G <small>Y</small> I <small>N</small> S <small>G</small> L
PeaTyr1	-----L <small>H</small> Y <small>V</small> I <small>E</small> P <small>F</small> C <small>D</small> S <small>C</small> C <small>S</small> T <small>P</small> R <small>L</small> V <small>Y</small> F <small>I</small> T-----
PeaTyr2	W <small>V</small> P <small>F</small> F <small>L</small> M <small>Y</small> V <small>I</small> V <small>P</small> F <small>C</small> D <small>S</small> C <small>C</small> P <small>S</small> D <small>K</small> M <small>I</small> H <small>F</small> I <small>T</small> W <small>L</small> G <small>Y</small> I <small>N</small> S <small>A</small> L

**Abbildung 3.1: Sequenzvergleich der Rezeptorfragmente von *P. americana* (Pea) und *D. melanogaster* (Dm).** Dm5-HT1A: Serotonin 1A-Rezeptor (CAA77570), DmDop2: Dopaminrezeptor 2 (AAQ23530), DmOctβ3R: β-adrenerg-ähnlicher Octopaminrezeptor (AJ884591), DmTyrR1: Tyraminrezeptor 1 (NP\_524419). Identische Aminosäurereste sind schwarz hinterlegt, konservativ ausgetauschte Reste sind grau hinterlegt (verändert nach WALZ ET AL. 2006).

### 3.1 Serotoninrezeptoren der Schabe *Periplaneta americana*

#### 3.1.1 Der Pea5HT<sub>1</sub>-Rezeptor

Eines der Ziele der vorliegenden Arbeit war die detaillierte molekularbiologische Charakterisierung, pharmakologische Analyse und immunhistologische Lokalisierung des im Rahmen meiner Diplomarbeit klonierten, G-Protein-gekoppelten Rezeptors Pea5-HT<sub>1</sub> (TROPFMANN 2006).

##### 3.1.1.1 Generelle Struktur von *Pea5-ht1*

Die gesamte *Pea5-ht1*-cDNA besteht aus 2.564 Nukleotiden (Sequenz siehe Anhang Abb. 6.1). Eingeleitet wird der längste offene Leserahmen von einem Start-Kodon (ATG; Position 193-195), vor welchem Stopp-Kodons in mehreren Leserahmen auftreten. Für eukaryotische Gene wurde im Bereich des Translationsstarts eine charakteristische Nukleotidabfolge beobachtet, diese Konsensussequenz lautet bei Wirbeltieren CCACCATGG (KOZAK 1984, 1996). Im Vergleich zu dieser Sequenz ist die Basenfolge, die das ATG-Triplett von *Pea5-ht1* umgibt (CCACCATGG), vollständig konserviert. Das Stopp-Kodon (TAG) des offenen Leserahmens liegt an Position 2.242-2.244. Somit wird der offene Leserahmen von einer 319 bp langen 5'- und einer 192 bp langen 3'-nichtkodierenden Region eingerahmt. Die *Pea5-ht1*-cDNA besitzt ein Polyadenylierungssignal (AATAAA, Position 2.525-2.531) und einen poly-(dA)-Schwanz.

##### 3.1.1.2 Strukturelle Eigenschaften der abgeleiteten Aminosäuresequenz

Die abgeleitete Aminosäuresequenz der *Pea5-ht1*-cDNA besteht aus 683 Aminosäuren und wird als Pea5-HT<sub>1</sub> bezeichnet. Das errechnete Molekulargewicht des Proteins beträgt 74,0 kDa. Das Hydropathieprofil (nach KYTE & DOOLITTLE 1982) sowie die erweiterte Charakterisierung der Struktur basierend auf dem Topologievorhersage-Programm

*Phobius* (<http://phobius.sbc.su.se/>; KÄLL ET AL. 2004) fordern eine extrazelluläre Lokalisation des N-Terminus des Rezeptorproteins. Im Anschluss werden sieben hydrophobe transmembranale Segmente mit abwechselnden intra- und extrazellulären Schleifen vorausgesagt. Der C-terminale Bereich hinter der siebten Transmembrandomäne (TM) liegt intrazellulär. Diese strukturelle Grundanordnung ist bei allen GPCRs konserviert (KROEZE ET AL. 2002, KOBILKA 2007).

Der N- und C-Terminus sowie die dritte cytoplasmatische Schleife von Rezeptoren der Rhodopsin-Familie sind auf der Ebene der Aminosäuresequenz gering konserviert. Jedoch sind strukturelle Gemeinsamkeiten vorhanden, die die Grundlagen für posttranslationale Modifikationen betreffen. Die N-terminale Region des Pea5-HT<sub>1</sub>-Rezeptors besteht aus 152 Aminosäureresten und besitzt sieben Konsensusstellen (N-x-S/T) für potentielle N-Glykosylierungen: N<sub>76</sub>NT, N<sub>82</sub>LS, N<sub>98</sub>TT, N<sub>102</sub>GS, N<sub>116</sub>ST, N<sub>126</sub>AS, N<sub>130</sub>GS (Abb. 3.2). Die vergleichsweise lange dritte intrazelluläre Schleife besteht aus 265 Aminosäureresten und umfasst vier Konsensusstellen (S/T-x-R/K) für die Phosphorylierung durch die Proteinkinase C: T<sub>335</sub>AR, T<sub>376</sub>SK, T<sub>381</sub>KR, S<sub>390</sub>NK. Der C-Terminus von Pea5-HT<sub>1</sub> besteht aus 30 Aminosäureresten und enthält einen Cystein-Rest (C<sub>666</sub>), der potentiell palmitoyliert werden kann. Durch die Verankerung dieser Fettsäure in der Plasmamembran entsteht möglicherweise eine zusätzliche intrazelluläre Schleife (JIN ET AL. 1999, CHINI & PARENTI 2009).

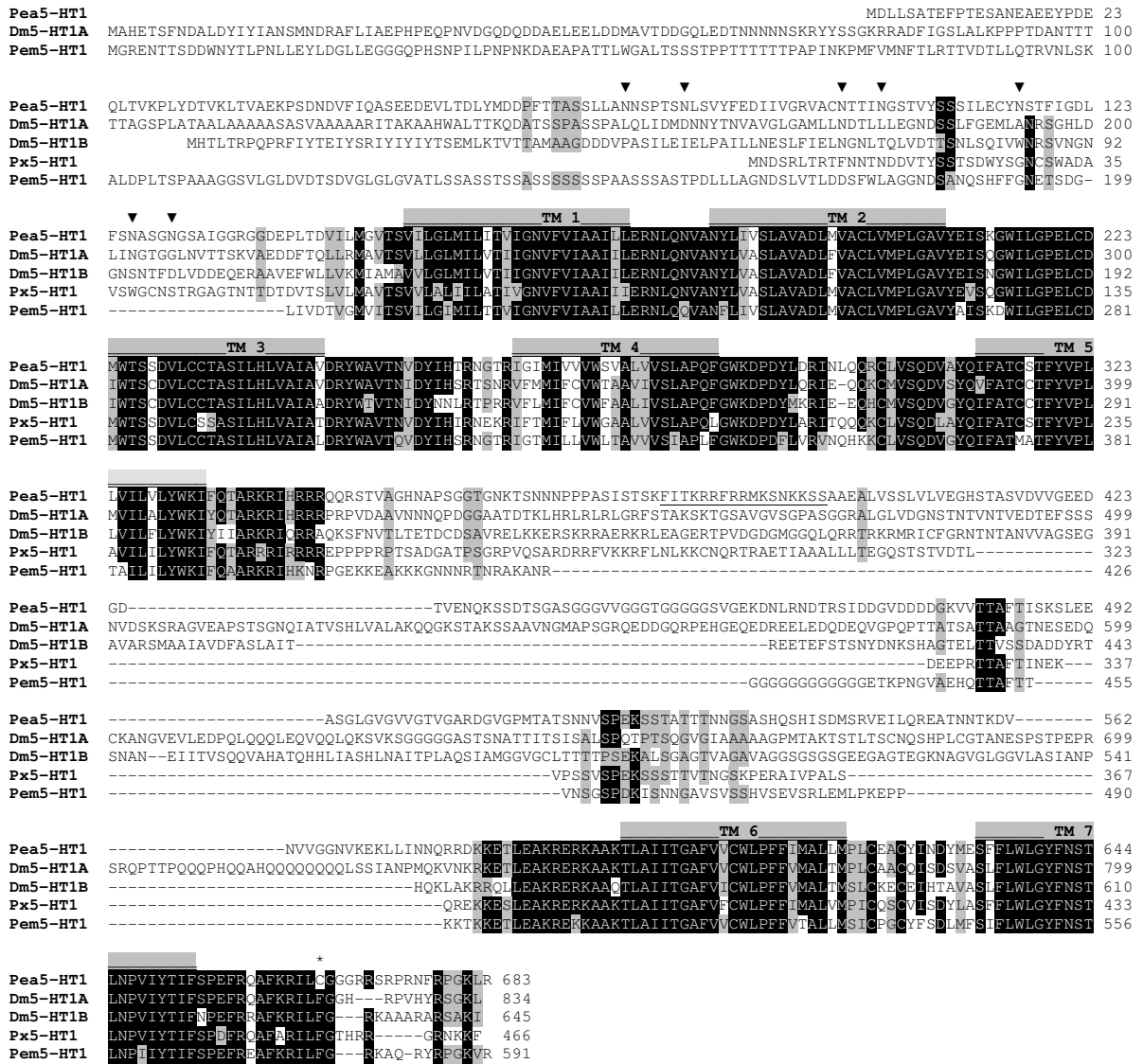
Die Sequenz des Pea5-HT<sub>1</sub>-Rezeptors enthält eine Vielzahl von Aminosäureresten, die in GPCRs und speziell in der Familie der Rezeptoren für biogene Amine hoch konserviert sind (Abb. 3.2). Um eine allgemein vergleichbare Identifizierung einzelner Aminosäurereste (AS) zu ermöglichen, wurde die BALLESTEROS-WEINSTEIN-Nummerierung verwendet (BALLESTEROS & WEINSTEIN 1995). Bei diesem Nummerierungssystem wird dem am stärksten konservierten AS jeder TM der Wert 50 zugeordnet. Die Nummerierung der übrigen Reste erfolgt bezüglich ihrer relativen Position zum definierten AS 50. Diese Angabe wird der jeweils konkreten (tiefgestellten) Position der Aminosäure des Pea5-HT<sub>1</sub>-Rezeptors nachgestellt.

Im Anschluss an den gering konservierten N-Terminus, befinden sich in der TM 1 und der TM 2 hoch konservierte AS, welche an einem ausgedehnten Netzwerk aus Wasserstoffbrückenbindungen beteiligt sind: Glycin<sub>166</sub> 1.49, Asparagin<sub>167</sub> 1.50, Asparaginsäure<sub>195</sub> 2.50 (NICHOLS & NICHOLS 2008). In der TM 2 gibt es unter den 5-HT-Rezeptoren weitere hoch konservierte Positionen, so den Serin<sub>190</sub>-Rest 2.45 nahe der intrazellulären Seite und den Valin<sub>202</sub>- 2.57 und Prolin<sub>204</sub>-Rest 2.59 am extrazellulären Ende der Helix (KROEZE ET AL. 2002). Die erste extrazelluläre Schleife ist relativ schwach konserviert, jedoch ist allen 5-HT-Rezeptoren ein Tryptophan<sub>215</sub>-Rest gemeinsam, der sich etwa in der Mitte der Schleife befindet. Die TM 3 weist mehrere vollständig

konservierte AS auf. Es befindet sich ein Cystein<sub>222</sub>-Rest C3.25 nahe des extrazellulären Endes, welchem in aminergen Rezeptoren eine saure Aminosäure folgt (MIRZADEGAN ET AL. 2003). Des Weiteren ist ein Asparaginsäure<sub>229</sub>-Rest D3.32 bei allen aminergen Rezeptoren konserviert, dieser spielt eine wichtige Rolle bei der Bindung des Liganden (HO ET AL. 1992). Am Ende der TM 3 befindet sich das D<sub>245</sub>RY-Motiv (D3.49), das in nahezu allen GPCRs konserviert ist (SCHEER ET AL. 2000, FLANAGAN 2005, NICHOLS & NICHOLS 2008). In der Mitte der TM 4 befindet sich ein hoch konservierter Tryptophan<sub>273</sub>-Rest W4.50, der in aminergen Rezeptoren vermutlich ein Bestandteil der Liganden-Bindungstasche ist (BALLESTEROS ET AL. 2001). In der nur geringfügig konservierten zweiten extrazellulären Schleife befindet sich häufig am N-terminalen Ende ein Cystein<sub>302</sub>-Rest. Dieser bildet eine Disulfidbrücke mit dem konservierten Cystein-Rest innerhalb der TM 3 (MIRZADEGAN ET AL. 2003). In der TM 5 befindet sich ein unter den aminergen Rezeptoren hoch konservierter Prolin<sub>322</sub>-Rest P5.50, der für die Winkelung der Helix verantwortlich ist. Die dritte intrazelluläre Schleife ist sowohl in ihrer Länge als auch in ihrer Aminosäuresequenz hoch variabel. Gegen Ende der Schleife treten meist eine Reihe von positiv geladenen Aminosäureresten auf (KROEZE ET AL. 2002). So häufen sich auch in der Sequenz des Pea-5-HT<sub>1</sub>-Rezeptors am Ende dieser Schleife Lysin- und Arginin-Reste. In der TM 6 tritt das hoch konservierte Motiv F<sub>605</sub>XXXWxPFF (W 6.48) auf. Der Prolin<sub>611</sub>-Rest P6.50 führt zu einer gewinkelten Stellung der Helix, die vermutlich bei der Aktivierung des Rezeptors eine Art Gelenkfunktion bei der Verschiebung der Helix erfüllt (BALLESTEROS ET AL. 2001). Innerhalb der dritten extrazellulären Schleife sind, wie bei einer Vielzahl von 5-HT-Rezeptoren, zwei Cystein<sub>622/625</sub>-Reste vorhanden, die eine Disulfidbrücke ausbilden können. In der TM 7 gibt es eine hoch konservierte Folge W<sub>636</sub>XGYxxSxxNPxxY (N 7.49), die für die Rezeptoraktivierung entscheidend ist (KROEZE ET AL. 2002).

Vergleicht man die Pea5-HT<sub>1</sub>-Aminosäuresequenz mit Sequenzen anderer bekannter aminergere Rezeptoren, so besteht große Sequenzähnlichkeit mit 5-HT<sub>1</sub>-Rezeptoren von holometabolen Insekten und Krebstieren (Abb. 3.2/3.3): *Papilio xuthus* (Px5-HT<sub>1</sub>; Identität (ID) 44 %; Ähnlichkeit (S) 53 %), *Drosophila melanogaster* (Dm5-HT<sub>1A</sub>; ID 39 %; S 50 %; Dm5-HT<sub>1B</sub>; ID 39 %; S 52 %), *Penaeus monodon* (Pem5-HT<sub>1</sub>; ID 42 %; S 52 %), *Procambarus clarkii* (Pro5-HT<sub>1</sub>; ID 45 %; S 54 %), *Panulirus interruptus* (Pan5-HT<sub>1</sub>; ID 43 %; S 51 %).





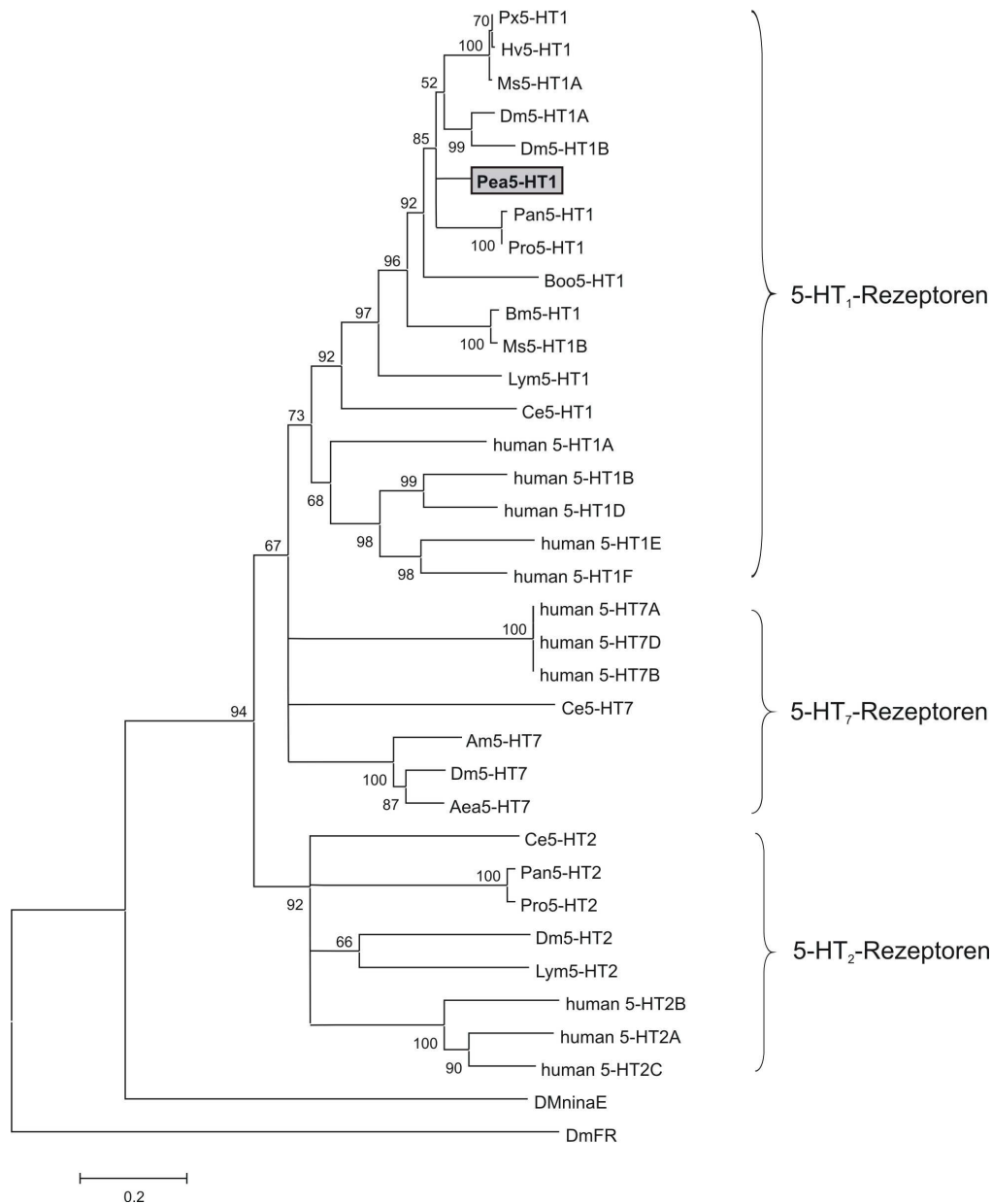
**Abbildung 3.2: Vergleich der Aminosäuresequenz des Pea5-HT<sub>1</sub>-Rezeptors mit orthologen 5-HT<sub>1</sub>-Rezeptoren von Arthropoden.** Vergleich der abgeleiteten Aminosäuresequenz des Pea5-HT<sub>1</sub>-Rezeptors mit 5-HT<sub>1</sub>-Rezeptoren von *D. melanogaster* (Dm5-HT<sub>1A</sub>, CAA77570; Dm5-HT<sub>1B</sub>, CAA77571), *Papilio xuthus* (Px5-HT<sub>1</sub>, BAD72868) und *Penaeus monodon* (Pem5-HT<sub>1</sub>, AAV48573). Aminosäurereste, die bei mindestens vier Rezeptoren identisch sind, wurden schwarz hinterlegt, konservativ ausgetauschte Reste wurden grau hinterlegt. Die sieben Transmembrandomänen (TM) sind durch graue Balken oberhalb der Sequenz gekennzeichnet. Die Position des letzten Aminosäurerestes jeder Zeile entspricht der rechts angegebenen Zahl. Lücken, die zur Maximierung der Homologien eingeführt wurden, sind durch Bindestriche gekennzeichnet. Potentielle N-Glykosylierungs-Stellen (▼) und die putative Palmitoylierungsstelle (\*) des Pea5-HT<sub>1</sub>-Rezeptors sind markiert. Der unterstrichene Sequenzabschnitt repräsentiert die Region innerhalb der dritten cytoplasmatischen Schleife, von welcher das spezifische Peptid-Antigen zur Herstellung des Antikörpers abgeleitet wurde (s. 2.4.9).

### 3.1.1.3 Phylogenetische Analyse

Die stammesgeschichtliche Verwandtschaft des Pea5-HT<sub>1</sub>-Rezeptors, weiterer Invertebraten und menschlicher 5-HT-Rezeptoren wurde untersucht und durch ein Dendrogramm dargestellt (Abb. 3.3). Dazu wurde die Kernaminosäuresequenz der einzelnen Rezeptoren verwendet, welche die Transmembrandomänen sowie konservierte Linkerregionen umfasst. Sequenzvergleiche wurden mit dem Programm *BioEdit* durchgeführt (Version 7.0.5; HALL 1999) und die genetische Distanz mit *MEGA4* (TAMURA ET AL. 2007) ermittelt. Die Sequenz des Pea-5HT<sub>1</sub>-Rezeptors wird eindeutig in die große Klasse der 5-HT<sub>1</sub>-Rezeptoren eingegliedert und ordnet sich dort bei den zahlreichen 5-HT<sub>1</sub>-Rezeptoren der Invertebraten ein.

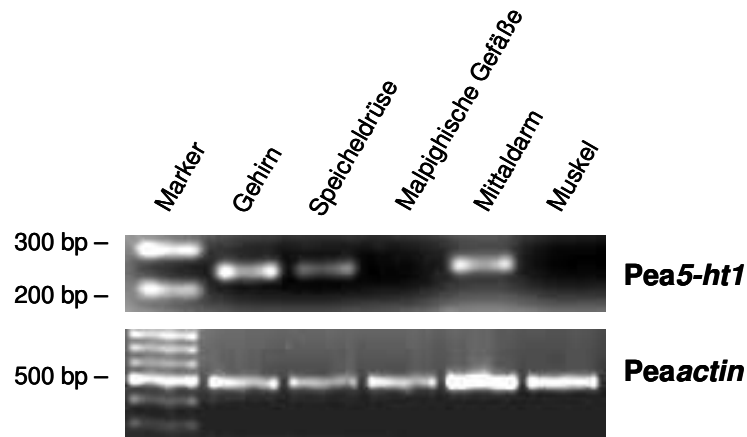
### 3.1.1.4. Expressionsmuster des Pea5-ht1-Gens

Mithilfe von RT-PCR Experimenten wurde das gewebsspezifische Expressionsmuster von Pea5-ht1 semiquantitativ untersucht. Es wurden Primer verwendet, mit denen Teile der dritten intrazellulären Schleife des Rezeptors amplifiziert werden, da diese hochgradig variable Region nur sehr geringe Homologien zu anderen aminergen Rezeptoren aufweist und somit Spezifität gewährleistet ist. Weiterhin wurde die Sequenz des amplifizierten Fragments durch Sequenzierungen bestätigt. Das Transkript des Pea5-ht1-Gens wird im Gehirn und im Mitteldarm stark und in der Speicheldrüse etwas schwächer exprimiert. Hingegen konnte in den Proben der Malpighischen Gefäße und der Muskulatur das Transkript des Pea5-ht1-Gens nicht detektiert werden (Abb. 3.4). Die Intaktheit der verwendeten RNA-Proben wurde durch Kontroll-Experimente mit dem konstitutiv exprimierten Gen Peaactin bestätigt. Für negative Kontroll-Experimente wurden die RNA-Proben mit RNase behandelt. Erwartungsgemäß konnte danach kein Transkript nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt).



**Abbildung 3.3: Phylogenetische Analyse von Pea5-HT<sub>1</sub> und verschiedenen 5-HT-Rezeptoren.**

Die verwendeten Rezeptoren sind in der Reihenfolge der Abbildung mit den zugehörigen Zugangsnummern aufgeführt: *Papilio xuthus* Px5-HT1 (BAD72868), *Heliothis virescens* Hv5-HT1 (X95605), *Manduca sexta* Ms5-HT1A (DQ840515), *Drosophila melanogaster* Dm5-HT1A (CAA77570), Dm5-HT1B (CAA77571), *Periplaneta americana* Pea5-HT1 (FN298392), *Panulirus interruptus* Pan5-HT1 (AY528822); *Procamburus clarkii* Pro5-HT1 (ABX10973), *Boophilus microplus* Boo5-HT1 (AAQ89933), *Bombyx mori* Bm5-HT1 (CAA64862), Ms5-HT1B (DQ840516), *Lymnaea stagnalis* Lym5-HT1 (L06803), *Caenorhabditis elegans* Ce5-HT1 (AAB66360), human 5-HT1A (NP\_000515), human 5-HT1B (NP\_000854), human 5-HT1D (NP\_000855), human 5-HT1E (NP\_000856), human 5-HT1F (NP\_000857), human 5-HT7 isoform A (NP\_000863), human 5-HT7 isoform D (NP\_062873), human 5-HT7 isoform B (NP\_062874), Ce5-HT7 (NP\_741730), *Apis mellifera* Am5-HT7 (AM076717), Dm5-HT7 (A38271), *Aedes aegypti* Aae5-HT7 (AAG49292), Ce5-HT2 (AAC15827), Pan5-HT2 (AY550910), Pro5-HT2 (ABX10972), Dm5-HT2 (CAA57429), Lym5-HT2 (U50080), human 5-HT2B (NP\_000858), human 5-HT2A (NP\_000612), human 5-HT2C (NP\_000859), *Drosophila melanogaster* ninaE-encoded rhodopsin 1 DmninaE (NM\_079683) und *Drosophila melanogaster* FMRFamid-Rezeptor DmFR (AAF47700).

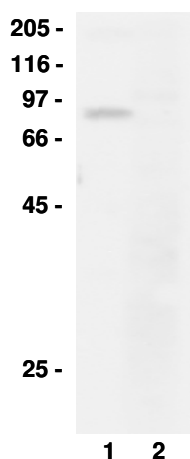


**Abbildung 3.4: Expression von *Pea5-ht1* und *Peaactin* in verschiedenen Geweben von *P. americana*.** Der 100 bp-DNA-Marker ist jeweils in der linken Bahn zu sehen. Die weiteren Bahnen zeigen die RT-PCR-Produkte, die mit RNA-Präparationen aus verschiedenen Geweben erhalten wurden: Gehirn, Speicheldrüse, Malpighische Gefäße, Mitteldarm, Muskel. Die amplifizierten Fragmente haben die erwartete Größe von 241 bp für *Pea5-ht1* und 488 bp für *Peaactin*. Das hier abgebildete Expressionsmuster wurde in drei unabhängigen Experimenten bestätigt.

### 3.1.1.5 Immundetektion des *Pea5-HT<sub>1</sub>*-Rezeptors auf Western-Blots

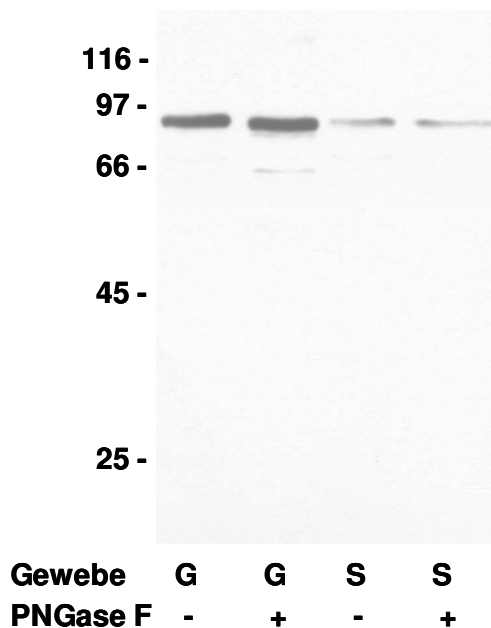
Für die Immundetektion des *Pea5-HT<sub>1</sub>*-Rezeptorproteins auf Western-Blots sowie zur späteren immunhistochemischen Lokalisierung des Rezeptorproteins im Gewebe wurden polyklonale Antikörper (anti-*Pea5-HT<sub>1</sub>*) gegen ein synthetisches Peptid, welches einem Bereich der dritten cytoplasmatischen Schleife entspricht (Abb. 3.2), generiert und affinitätschromatographisch aufgereinigt.

Auf Western-Blots mit homogenisierten Schabengehirnen detektierte der Antikörper eine einzelne Bande im Bereich von 80 kDa (Abb. 3.5). Die Spezifität des Antikörpers wurde durch ein parallel durchgeführtes Präabsorptions-Experiment mit dem gereinigten Antikörper und dem zur Immunisierung verwendeten synthetischen Peptid überprüft. Nach der Inkubation des Antikörpers (1:20.000) mit dem Antigen (15 µg/ml) wurde auf dem Western-Blot keine Bande markiert (Abb. 3.5).



**Abbildung 3.5: Western-Blot-Analyse von Gehirnhomogenaten der Schabe (*P. americana*).** Auf jede Bahn wurden 10 µl Gehirnhomogenat aufgetragen. Die Angabe des Markers befindet sich links (in kDa). Bahn 1: Die Inkubation des Western-Blots erfolgte mit dem anti-*Pea5-HT<sub>1</sub>*-Antikörper (1:20.000). Bahn 2: Die Inkubation mit dem anti-*Pea5-HT<sub>1</sub>*-Antikörper (1:20.000) erfolgte nach der Präabsorption mit 15 µg/ml Peptid. Als sekundärer Antikörper wurde *goat-anti-rabbit*-HRP in einer Verdünnung von 1:20.000 eingesetzt.

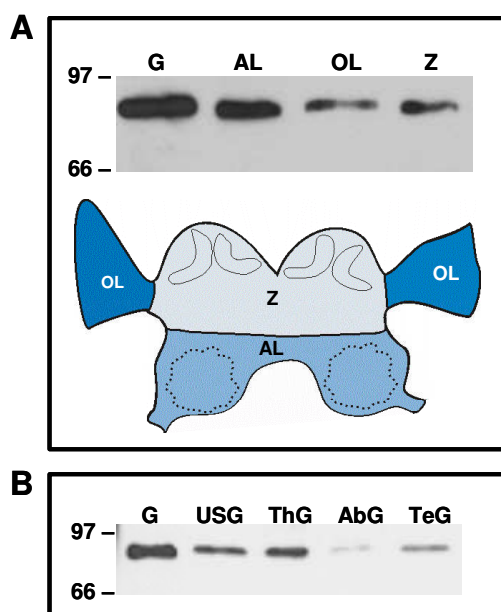
Die berechnete Größe des Pea5-HT<sub>1</sub>-Rezeptorproteins beträgt 74,0 kDa. Der Unterschied zwischen dem berechneten und dem apparenten Molekulargewicht des Pea5-HT<sub>1</sub>-Rezeptorproteins könnte auf die Glykosylierung des nativen Rezeptors zurückzuführen sein, wodurch sich das Laufverhalten des Proteins im Gel-System verlangsamen könnte. Um diese Annahme zu prüfen, wurden Experimente mit dem deglykosylierenden Enzym PNGase F durchgeführt. Dazu wurden isolierte Membranproteine des Gehirns und der Speicheldrüse mit PNGase F versetzt und in Western-Blot-Analysen untersucht (Abb. 3.6). Zum einen zeigte sich, dass in der Speicheldrüse ebenfalls eine Bande von etwa 80 kDa detektiert wird und dass das Pea5-HT<sub>1</sub>-Rezeptorprotein in der Speicheldrüse in deutlich geringerem Maße als im Gehirn exprimiert wird. Zum anderen konnte bezüglich der Deglykosylierung beobachtet werden, dass nach der Inkubation mit PNGase F in beiden Gewebeprobe eine Bande detektiert wurde, die etwa im Molekulargewichtsbereich von 75 kDa liegt. Das Rezeptorprotein liegt somit in beiden Geweben in einer leicht glykosylierten Form vor. Weiterhin ist dieses ermittelte Molekulargewicht in guter Übereinstimmung mit dem anhand der Aminosäuresequenz berechneten von 74 kDa.



**Abbildung 3.6: Western-Blot-Analyse zur Überprüfung der Glykosylierung des Pea5-HT<sub>1</sub>-Rezeptorproteins.** Auf jede Bahn wurden 10 µg Membranproteine aus dem Gehirn (G) bzw. den Speicheldrüsen (S) aufgetragen. Jeweils eine Probe wurde mit PNGase F (+) versetzt, während die andere zur Kontrolle ohne PNGase F (-) inkubiert wurde. Die Angabe des Markers befindet sich links (in kDa). Die Inkubation des Western-Blots erfolgte mit dem primären Antikörper anti-Pea5-HT<sub>1</sub> (1:20.000) und dem sekundären Antikörper *goat-anti-rabbit*-HRP (1:20.000).

Die Verteilung des Pea5-HT<sub>1</sub>-Rezeptorproteins im Nervensystem wurde zunächst mit einem Western-Blot von Membranproteinen verschiedener Areale des Gehirns und des Bauchmarks untersucht (Abb. 3.7). Das Gehirn von *P. americana* wurde dafür in drei Regionen unterteilt, die optischen Loben, das zentrale Gehirn und die Antennalloben. Weiterhin wurden Membranproteine aus dem Unterschlundganglion, den Thorakalganglien, den Abdominalganglien sowie des Terminalganglions mit den zugehörigen Konnektiven untersucht. In den Membranpräparationen der drei

Gehirnareale sowie aller Ganglien konnte eine Bande im Molekulargewichtsbereich von 80 kDa markiert werden (Abb. 3.7). Die stärkste Expression des Proteins konnte im Gehirn und dort insbesondere im Areal der Antennalloben gezeigt werden. Im zentralen Bereich des Gehirns und in den optischen Loben war eine deutlich schwächere Bande zu beobachten. In den Membranfraktionen des Unterschlundganglions sowie der Thorakalganglien wurde der Pea5-HT<sub>1</sub>-Rezeptor deutlich nachgewiesen, demgegenüber konnte in den Proben der Abdominalganglien sowie des Terminalganglions lediglich jeweils eine äußerst schwache Bande detektiert werden.



**Abbildung 3.7: Western-Blot-Analyse zur Verteilung des Pea5-HT<sub>1</sub>-Rezeptors im Nervensystem.** (A) Auf jede Bahn wurden 8 µg Membranproteine des Gehirns (G) bzw. von bestimmten Gehirnarealen aufgetragen. Zur Übersicht der Einteilung der Areale siehe nebenstehende Skizze: Antennalloben (AL), optische Loben (OL), zentrales Gehirn (Z). (B) Auf jede Bahn wurden 10 µg Membranproteine des Gehirns (G) bzw. der Ganglien aufgetragen: Gehirn (G), Unterschlundganglion (USG), Thorakalganglion (ThG), Abdominalganglien (AbG), Terminalganglion (TeG). Die Angabe des Markers befindet sich links (in kDa). Die Inkubation des Western-Blots erfolgte mit dem primären Antikörper anti-Pea5-HT<sub>1</sub> (1:20.000) und dem sekundären Antikörper *goat-anti-rabbit*-HRP (1:20.000).

### 3.1.1.6 Immunhistologische Lokalisation des Pea5-HT<sub>1</sub>-Rezeptors im Gehirn

Die Verteilung des Pea5-HT<sub>1</sub>-Rezeptors im Gehirn von *P. americana* wurde an Vibratomschnitten untersucht. Zur Detektion des Rezeptors wurde der spezifische polyklonale anti-Pea5-HT<sub>1</sub>-Antikörper eingesetzt. Der Nachweis der gebundenen primären Antikörper erfolgte über einen Alexa488-konjugierten *goat-anti-rabbit* Sekundärantikörper. Die Gewebeschnitte wurden parallel mit einem gegen Serotonin gerichteten Antikörper (anti-5-HT-Antikörper) markiert, um zum einen mögliche Kollokationen des Rezeptorproteins und des Liganden zu detektieren und zum anderen zur erleichterten Orientierung in den Gehirnschnitten.

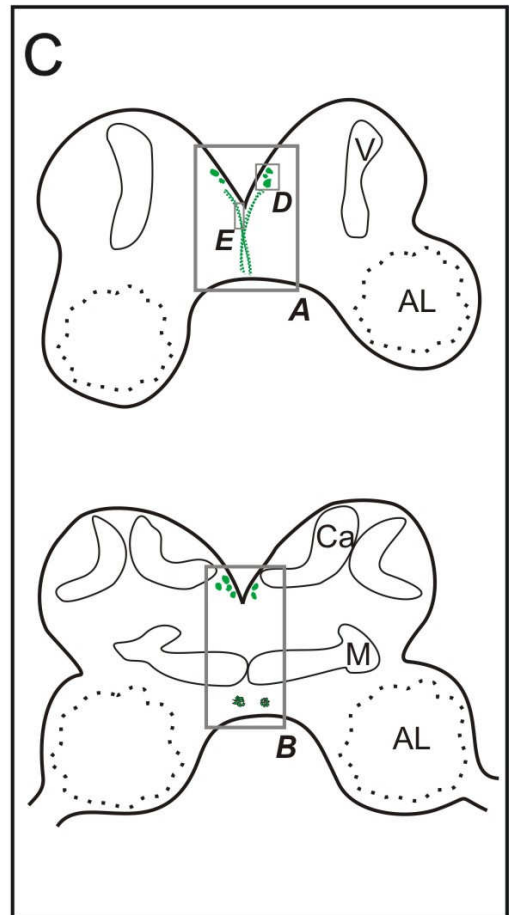
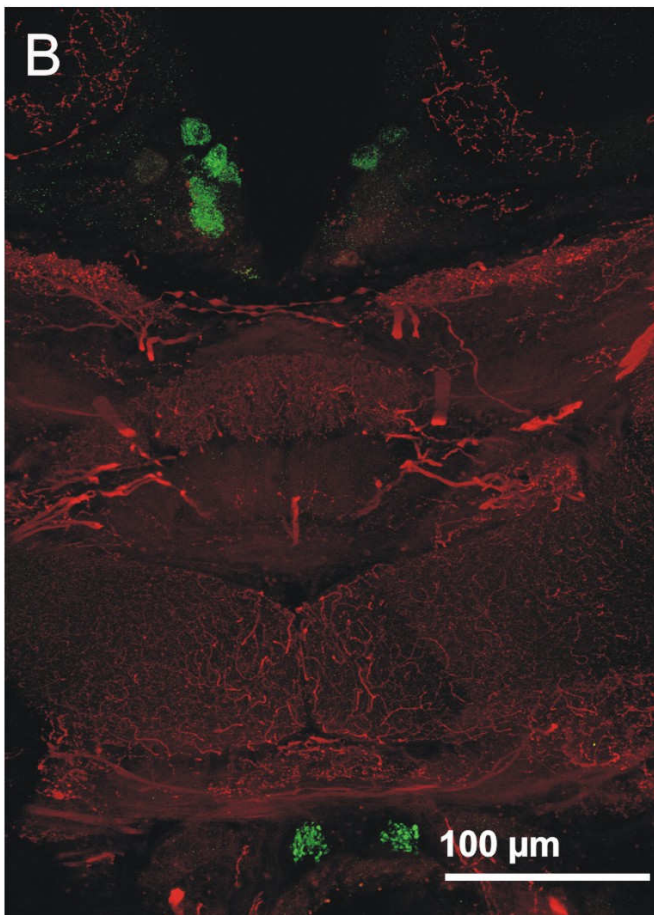
Der Rezeptorantikörper markierte eine Subpopulation von großen Zellkörpern im anterioren Teil der Pars intercerebralis (Abb. 3.8A/B/D). Starke Immunreaktivität wurde auch in deren Axonen detektiert (Abb. 3.8A/E). Diese ziehen entlang der anterioren Oberfläche des Gehirns, drehen nach posterior und ziehen entlang der ventralen Oberfläche des Gehirns über die *Nervi corporis cardiaca* zum *Corpora cardiaca/Corpora allata*-Komplex. In weiter posterior gelegenen Schnitten sind ebenfalls markierte

Zellkörper der Pars intercerebralis sowie im ventralen Bereich des Gehirnschnitts quergeschnittene Profile der Axone zu sehen (Abb. 3.8B).

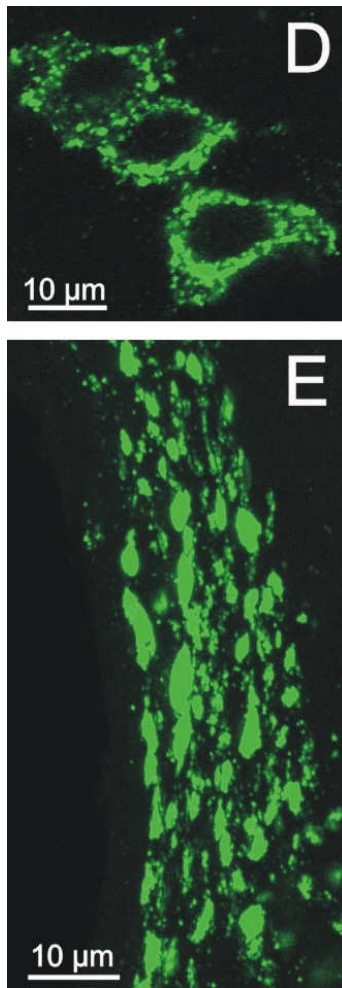
Schwach markierte Zellkörper und vereinzelte Fasern im Bereich der Basis der optischen Loben konnten in einzelnen Schnitten beobachtet werden (Daten nicht gezeigt). Dies ist in Übereinstimmung mit der im Western-Blot gezeigten schwachen Expression des Pea5-HT<sub>1</sub>-Rezeptors im Areal der optischen Loben.

Sowohl Kontrollfärbungen von Gehirnschnitten mit dem anti-Pea5-HT<sub>1</sub>-Antikörper nach Präabsorption mit dem zur Immunisierung verwendeten Peptid als auch Kontrollfärbungen mit dem Präimmunserum zeigten keine spezifischen Fluoreszenzsignale (Daten nicht gezeigt).

Immuncytochemische Experimente sowohl an *whole mount*- als auch an Schnitt-Präparaten des Speicheldrüsenkomplexes zeigten eine diffus verteilte punktförmige Immunfluoreszenz, deren Spezifität nicht eindeutig belegt werden konnte. Die unspezifische Bindung von Antikörpern an Strukturen des Speicheldrüsenkomplexes aus *P. americana* scheint ein verbreitetes Phänomen zu sein (O. BAUMANN, persönliche Mitteilung).







**Abbildung 3.8: Immunhistochemische Lokalisation von Pea5-HT<sub>1</sub> an Gehirnschnitten.** Vibratomschnitte (70 µm) des Gehirns wurden mit den primären Antikörpern anti-5-HT (1:200; rot) und dem Rezeptor-spezifischen Antikörper anti-Pea5-HT<sub>1</sub> (1:1.000; grün) doppelmarkiert. Die Bilder repräsentieren eine Projektion von Bildstapeln und entsprechen etwa 20 µm (A/B) bzw. 5 µm (D/E). **(A)** Zentraler Ausschnitt eines anterioren Frontalschnitts des Schabengehirns (schematische Skizze siehe Abbildung C; vergrößerte Details siehe Abbildung D/E). **(B)** Zentraler Ausschnitt eines Frontalschnitts des Schabengehirns (schematische Skizze siehe Abbildung C). **(C)** Schematische Skizze der in A/B gezeigten Gehirnschnitte. Durch graue Rahmen werden die in A/B/D und E gezeigten Bereiche hervorgehoben. Abkürzungen: V, Vertikaler Lobus; AL, Antennallobus; Ca, Calyx; M, Medialer Lobus. **(D)** Detailaufnahme der markierten Zellkörper der Pars intercerebralis. **(E)** Detailaufnahme der Markierung des neuronalen Trakts.

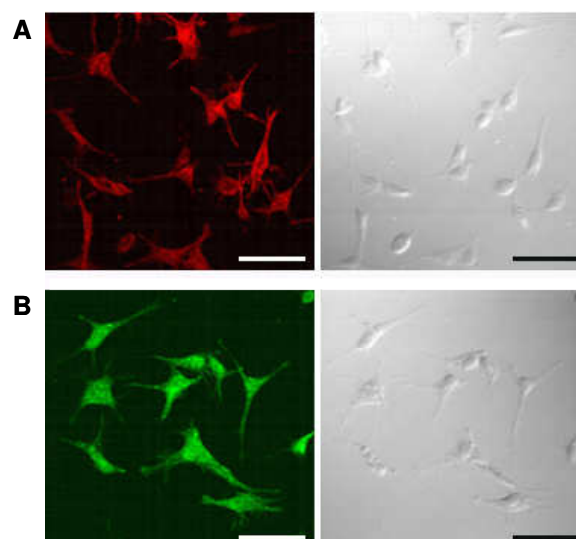
### 3.1.1.7 Funktionelle Charakterisierung des Pea5-HT<sub>1</sub>-Rezeptors

Die Aktivierung G-Protein-gekoppelter Rezeptoren führt in Zellen zu Konzentrationsänderungen intrazellulärer Botenstoffe (*second messenger*). Von 5-HT<sub>1</sub>-Rezeptoren ist bekannt, dass sie vorwiegend an inhibitorische G-Proteine koppeln und meist eine Verminderung der [cAMP]<sub>i</sub> bewirken (siehe Einleitung 1.3.2).

Für eine umfassende funktionelle und pharmakologische Charakterisierung des Pea5-HT<sub>1</sub>-Rezeptors wurden HEK 293-Zellen mit dem Expressionsvektor pcPea5-*ht1* transfiziert.

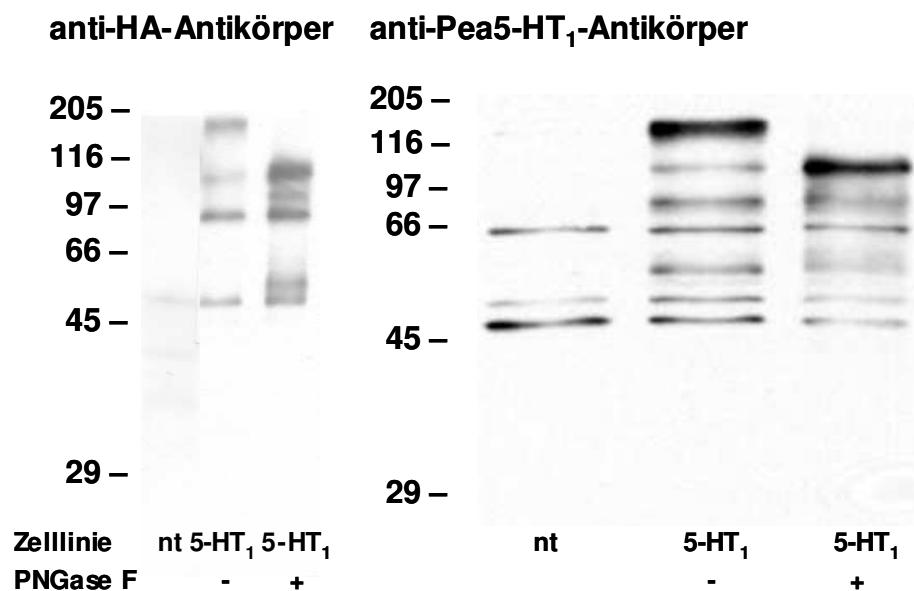
### Immunologischer Nachweis des heterolog exprimierten Pea5-HT<sub>1</sub>-Rezeptors

Die Expression des Pea5-HT<sub>1</sub>-Rezeptorproteins wurde sowohl immunocytochemisch an fixierten Zellen als auch an präparierten Membranproteinen der verwendeten stabilen Zelllinie im Western-Blot nachgewiesen. Für den Nachweis der Expression und der Verteilung des Pea5-HT<sub>1</sub>-Rezeptors wurde sowohl ein anti-HA-Antikörper als auch der spezifische anti-Pea5-HT<sub>1</sub>-Antikörper verwendet. Begleitend zum Prozess der Herstellung stabiler Zelllinien wurden transient transfizierte Zellen immunocytochemisch analysiert (nicht gezeigt) und abschließend der Expressionsnachweis an stabil transfizierten HEK 293-Zellen durchgeführt (Abb. 3.9). Das Rezeptorprotein konnte in der stabilen Zelllinie sowohl durch den anti-HA-Antikörper als auch durch den anti-Pea5-HT<sub>1</sub>-Antikörper eindeutig nachgewiesen werden. In Kontrollexperimenten an nicht transfizierten Zellen war bei beiden Antikörpern keine Färbung sichtbar (nicht gezeigt).



**Abbildung 3.9: Immunocytochemischer Nachweis des Pea5-HT<sub>1</sub>-Rezeptorproteins in stabil transfizierten HEK 293-Zellen.** Der Maßstabsbalken entspricht jeweils 50 µm. **(A)** Inkubation der transfizierten HEK 293-Zellen mit dem anti-HA-Antikörper (1:1.000). Der Cy3-konjugierte sekundäre anti-*rat* Antikörper wurde durch Grünlichtanregung sichtbar gemacht. **(B)** Die Inkubation der Zellen erfolgte mit dem anti-Pea5-HT<sub>1</sub>-Antikörper (1:1.000). Der Cy2-konjugierte sekundäre anti-*rabbit* Antikörper wurde durch Blaulichtanregung sichtbar gemacht.

Die Membranproteine stabil transfizierter Pea5-HT<sub>1</sub>-Zellen sowie nicht transfizierter HEK 293-Zellen wurden präpariert und ein Teil der Proteine mit dem Enzym PNGase F inkubiert. Dieses Enzym entfernt alle N-glykosidisch gebundenen Zuckerreste von einem modifizierten Protein. Die Detektion des Proteins mit dem anti-HA-Antikörper zeigte neben schwächeren Banden im Bereich von 110 kDa, 75 kDa und 50 kDa eine prominente Bande bei etwa 150 kDa (Abb. 3.10). Diese trat nach Behandlung der Probe mit dem Enzym PNGase F nicht mehr auf. Nach der Deglykosylierung wurde eine prominente Bande bei 110 kDa detektiert, weitere Banden bei etwa 75 kDa und in einem Molekulargewichtsbereich von 50 kDa. Diese Bande wurde jedoch etwas schwächer auch in den Fraktionen der nicht transfizierten Zellen detektiert. Der anti-Pea5-HT<sub>1</sub>-Antikörper zeigte ein vergleichbares Detektionsmuster mit einer prominenten Bande bei 110 kDa nach erfolgter Deglykosylierung (Abb. 3.10).



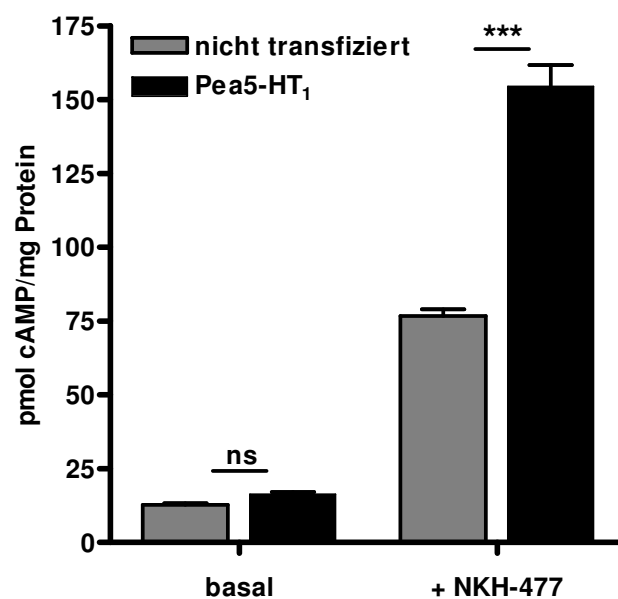
**Abbildung 3.10: Western-Blot-Analyse mit Membranproteinen von Pea5-HT<sub>1</sub>-transfizierten HEK 293-Zellen (5-HT<sub>1</sub>) und nicht transfizierten HEK 293-Zellen (nt).** Auf jede Bahn wurden 10 µg der entsprechenden Membranproteinfraktion aufgetragen, wobei je eine der Proben der Pea5-HT<sub>1</sub>-Zelllinie mit PNGase F (+) behandelt wurde. Die Inkubation des Western-Blots erfolgte mit dem anti-HA-Antikörper (1:10.000) und dem Sekundärantikörper *goat-anti-rat* HRP (1:10.000) bzw. mit dem anti-Pea5-HT<sub>1</sub>-Antikörper (1:20.000) und dem sekundären Antikörper *goat-anti-rabbit* HRP (1:20.000). Der Molekulargewichtsstandard (kDa) ist jeweils links angegeben.

### Funktionelle Untersuchung des Pea5-HT<sub>1</sub>-Rezeptors

Aufgrund der Aminosäuresequenz- und Strukturähnlichkeit zu bekannten homologen 5-HT<sub>1</sub>-Rezeptoren wurde angenommen, dass der Pea5-HT<sub>1</sub>-Rezeptor sich auf funktioneller Ebene kongruent zu diesen verhält. Die Aktivierung dieser Klasse von Rezeptoren führt zur Inhibierung der AC und bewirkt so eine verminderte cAMP-

Produktion. Typischerweise enthalten funktionelle Untersuchungen solcher Rezeptoren daher die Behandlung der Zellen mit einem Stimulans der AC, so dass eine Inkubation mit Serotonin oder anderen Agonisten zu einer Blockierung der stimulierten cAMP-Produktion führt (NICHOLS & NICHOLS 2008). Als Stimulans der AC wurde in dieser Arbeit das wasserlösliche Forskolin-Derivat NKH-477 verwendet.

Durch die Expression des Rezeptorproteins verändert sich die basale [cAMP]<sub>i</sub> der Zellen nicht (nicht transfiziert:  $12,9 \pm 0,5$  pmol cAMP/mg Protein; Pea5-HT<sub>1</sub>:  $16,3 \pm 0,7$  pmol cAMP/mg Protein). Die Pea5-HT<sub>1</sub>-Zelllinie ( $154,4 \pm 7,3$  pmol cAMP/mg Protein) zeigte jedoch im Vergleich zu nicht transfizierten HEK 293-Zellen ( $76,7 \pm 2,3$  pmol cAMP/mg Protein) eine signifikant erhöhte Sensibilität gegenüber NKH-477, dem verwendeten Stimulans der AC (Abb. 3.11). Das Phänomen der Sensibilisierung gegenüber Stimulatoren der AC wurde bereits für heterolog exprimierte GPCRs beschrieben. Dieses Phänomen ist bei Rezeptoren beobachtet worden, die zum einen negativ an die AC koppeln und zum anderen konstitutive Aktivität zeigen (JOHNSTON & WATTS 2003). Die Sensibilisierung gegenüber NKH-477 ist somit ein erster Hinweis auf eine konstitutive Aktivität des Pea5-HT<sub>1</sub>-Rezeptors in dem gewählten heterologen Expressionssystem.

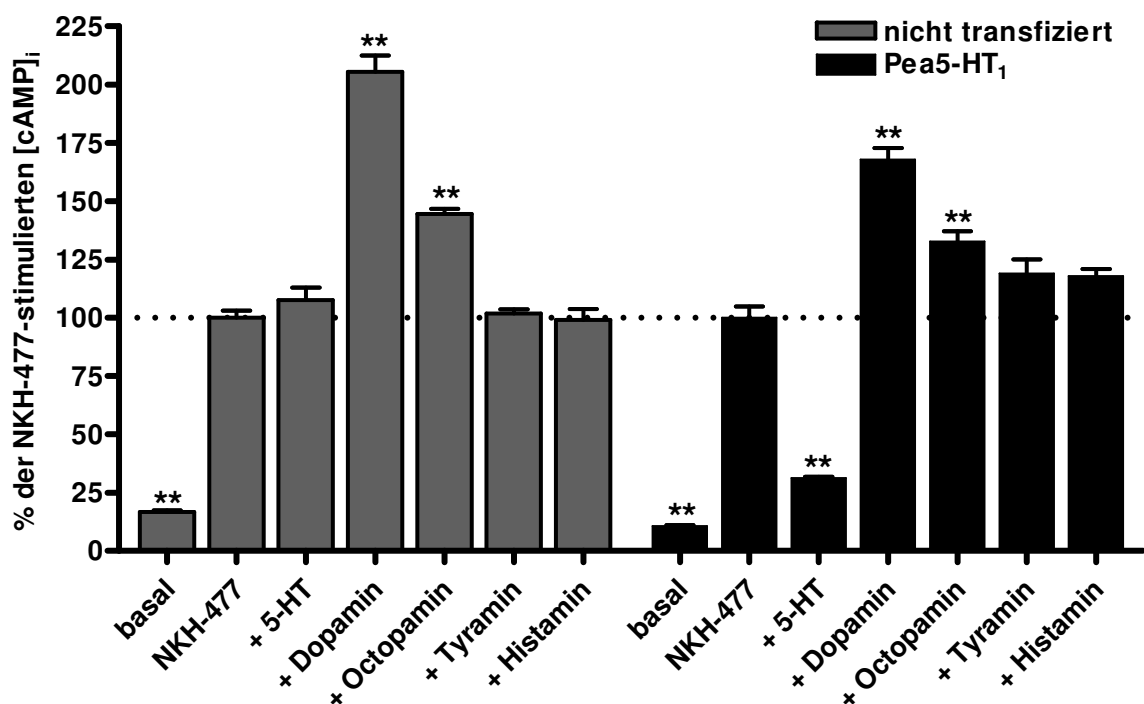


**Abbildung 3.11: Messung der basalen und NKH-477-induzierten cAMP-Konzentrationen.** Um die basale [cAMP]<sub>i</sub> der HEK 293-Zellen, die den Pea5-HT<sub>1</sub>-Rezeptor (Pea5-HT<sub>1</sub>) stabil exprimieren und nicht transfizierter Zellen zu ermitteln, erfolgte eine Inkubation mit 100  $\mu$ M IBMX, einem Phosphodiesterase-Inhibitor, in Abwesenheit weiterer Liganden. Weiterhin wurden beide Zelllinien mit 100  $\mu$ M IBMX in Anwesenheit von NKH-477 inkubiert, um die Sensibilität zu überprüfen. Dargestellt sind die Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler (*one-way ANOVA*,  $n = 4$ , \*\*\*  $p < 0,001$ ).

### Ligandenspezifität des Pea5-HT<sub>1</sub>-Rezeptors

Um die Ligandenspezifität des Pea5-HT<sub>1</sub>-Rezeptors zu testen, wurde die Wirkung verschiedener biogener Amine auf die NKH-477-stimulierte cAMP-Produktion transfizierter und nicht transfizierter Zellen analysiert (Abb. 3.12). In nicht transfizierten Zellen zeigten sowohl Serotonin als auch Tyramin und Histamin keinerlei Wirkung. Demgegenüber verursachten sowohl Dopamin als auch Octopamin einen deutlichen Anstieg der [cAMP]<sub>i</sub> in nicht transfizierten Zellen. Diese Effekte wurden auch bei der Pea5-HT<sub>1</sub>-Zelllinie beobachtet. Diese komplexen Effekte sind wahrscheinlich auf endogene aminerge Rezeptoren zurückzuführen, die bereits in der parentalen Zelllinie vorhanden waren.

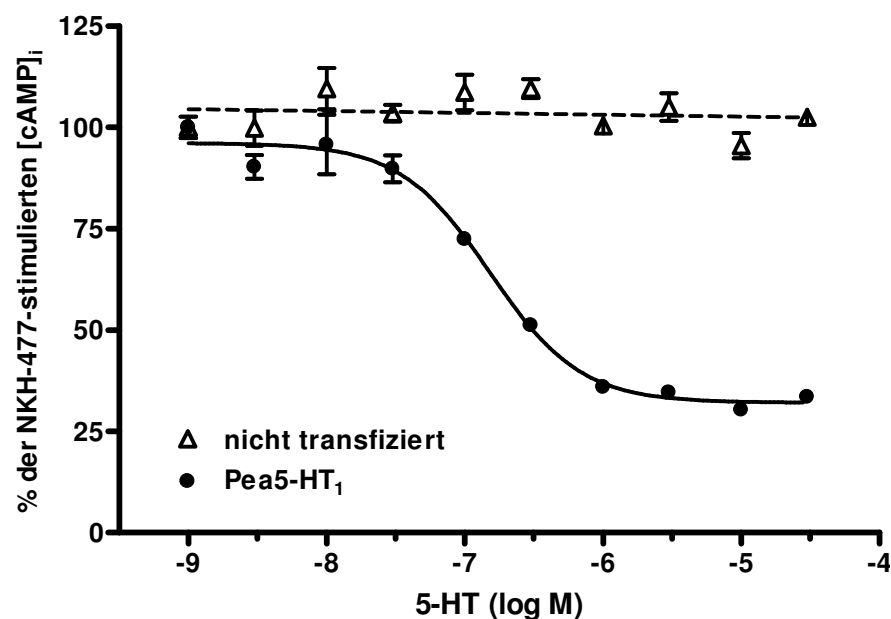
Eine Wirkung von Serotonin war nur in der Pea5-HT<sub>1</sub>-Zelllinie zu beobachten. Bei einer Konzentration von 10 µM löste es eine signifikante Reduzierung der [cAMP]<sub>i</sub> in den pcPea5-*ht1*-transfizierten Zellen aus (Abb.3.12). Die NKH-477-stimulierte [cAMP]<sub>i</sub> wurde auf 33 % reduziert.



**Abbildung 3.12: Einfluss verschiedener biogener Amine auf die NKH-477-stimulierte [cAMP]<sub>i</sub>.** Es wurden HEK 293-Zellen, die den Pea5-HT<sub>1</sub>-Rezeptor stabil exprimieren, und nicht transfizierte Zellen mit den Liganden (10 µM) inkubiert. Die dargestellten Werte sind Mittelwerte aus Vierfachbestimmungen von je zwei unabhängigen Experimenten. Die Fehlerbalken stellen den Standardfehler dar. Alle Messungen erfolgten in Gegenwart von IBMX (100 µM). Um die basale [cAMP]<sub>i</sub> zu ermitteln, erfolgte eine Inkubation mit 100 µM IBMX in Abwesenheit weiterer Liganden. Dargestellt sind die Mittelwerte ± Standardfehler, (\*\*) geben signifikante Unterschiede zur NKH-477-stimulierten [cAMP]<sub>i</sub> der jeweiligen Zelllinie an. Die statistische Auswertung basiert auf einer *one-way* ANOVA gefolgt von *Dunnnett's multiple comparison* Test \*\* p < 0,01.

### Konzentrationsabhängigkeit der 5-HT-Wirkung auf die cAMP-Produktion

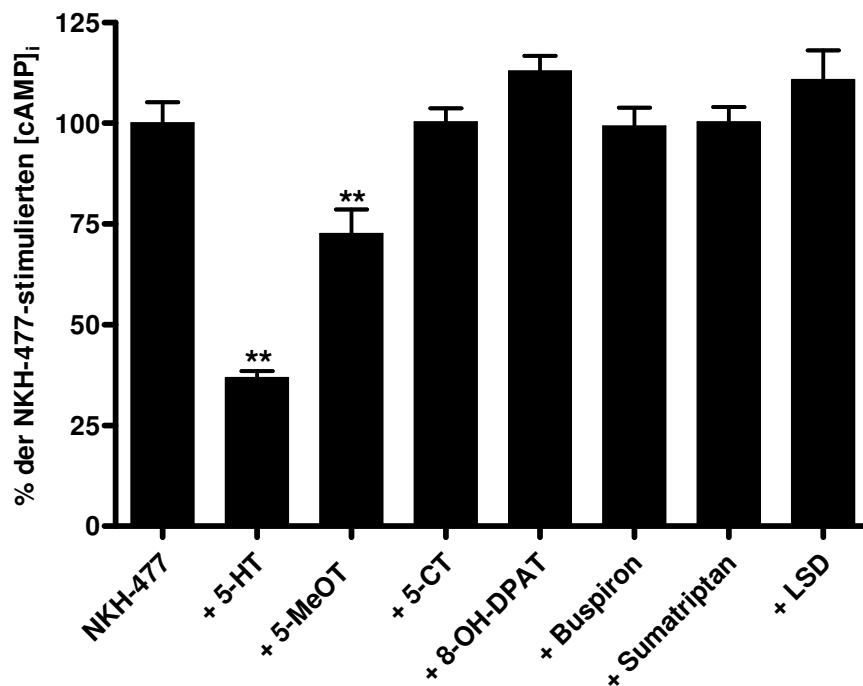
Die Konzentrationsabhängigkeit der 5-HT-Wirkung auf die Reduzierung der  $[cAMP]_i$  wurde mit 5-HT-Konzentrationen in einem Bereich von  $10^{-9}$  bis  $3 \times 10^{-5}$  M untersucht (Abb. 3.13). In den pcPea5-*ht1*-transfizierten HEK 293-Zellen zeigte sich eine sigmoidale Konzentrationsabhängigkeit, wobei die halbmaximale Verminderung der NKH-477-induzierten cAMP-Produktion ( $EC_{50}$ ) mit einer Konzentration von  $\sim 150$  nM Serotonin hervorgerufen wurde ( $\log EC_{50} = -6,82 \pm 0,06$ ; Mittelwert  $\pm$  Standardfehler). Maximale Verminderung der cAMP-Produktion auf etwa 33 % wurde mit 5-HT-Konzentrationen  $\geq 1 \mu\text{M}$  erreicht. Parallel wurde gezeigt, dass keine der getesteten 5-HT-Konzentrationen Einfluss auf die NKH-477-stimulierte  $[cAMP]_i$  nicht transfizierter Zellen hat.



**Abbildung 3.13: Messung der  $[cAMP]_i$  in Abhängigkeit der 5-HT-Konzentration.** Die Pea5-HT<sub>1</sub>-Zelllinien sowie nicht transfizierten HEK 293-Zellen wurden mit steigenden 5-HT-Konzentrationen ( $10^{-9}$  bis  $3 \times 10^{-5}$  M) inkubiert. Dargestellt sind Mittelwerte aus Vierfachbestimmungen von je zwei unabhängigen Experimenten. Die Fehlerbalken stellen die Standardfehler dar, jedoch sind diese zum Teil so gering, dass sie nicht zu sehen sind.

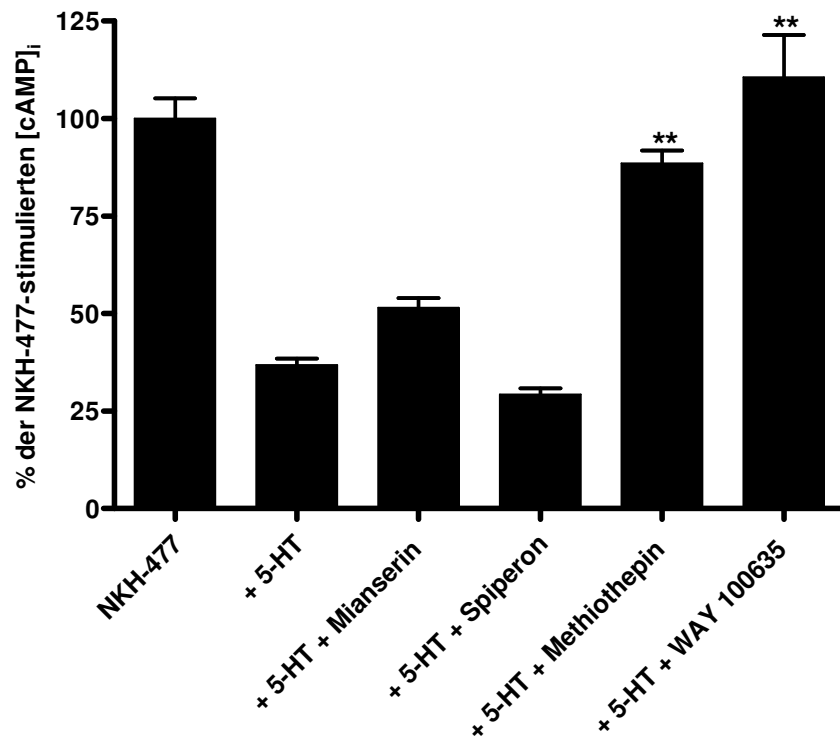
### Wirkungen von Agonisten und Antagonisten

In weiteren Experimenten wurde zur Erstellung eines pharmakologischen Profils des Pea5-HT<sub>1</sub>-Rezeptors die Wirkung verschiedener Agonisten (Abb. 3.14) und Antagonisten (Abb. 3.15) auf die NKH-477-stimulierte  $[cAMP]_i$  untersucht. Das 5-HT-Derivat 5-Methoxytryptamin (5-MeOT), ein nichtselektiver 5-HT-Rezeptoragonist, fungierte als partieller Agonist und verminderte die NKH-477-stimulierte  $[cAMP]_i$  auf etwa 72 %. Zwei selektive Agonisten für 5-HT<sub>1</sub>- und 5-HT<sub>7</sub>-Rezeptoren der Vertebraten, 5-Carboxamidotryptamin (5-CT) und (+/-)-8-Hydroxy-2-(dipropylamino)tetralin (8-OH-DPAT), zeigten keine signifikanten Wirkungen. Weiterhin hatte auch der spezifische 5-HT<sub>1A</sub>-Rezeptoragonist Buspiron, der 5-HT<sub>1B/D/F</sub>-Rezeptoragonist Sumatriptan und D-(+)-Lysergsäurediethylamid (LSD) keine Wirkung auf die  $[cAMP]_i$ .



**Abbildung 3.14: Einfluss von 5-HT-Rezeptoragonisten auf die NKH-477-stimulierte [cAMP]<sub>i</sub>.** Die Agonisten wurden in Konzentrationen von 10  $\mu$ M in Anwesenheit von 10  $\mu$ M NKH-477 eingesetzt. Es sind Mittelwerte aus Vierfachbestimmungen dargestellt. Die Fehlerbalken geben die Standardfehler an. (\*\*) geben signifikante Unterschiede der Agonisten-modulierten [cAMP]<sub>i</sub> zur NKH-477-modulierten [cAMP]<sub>i</sub> an. Die statistische Auswertung basiert auf einer *one-way* ANOVA gefolgt von *Dunnett's multiple comparison* Test \*\*  $p < 0,01$ .

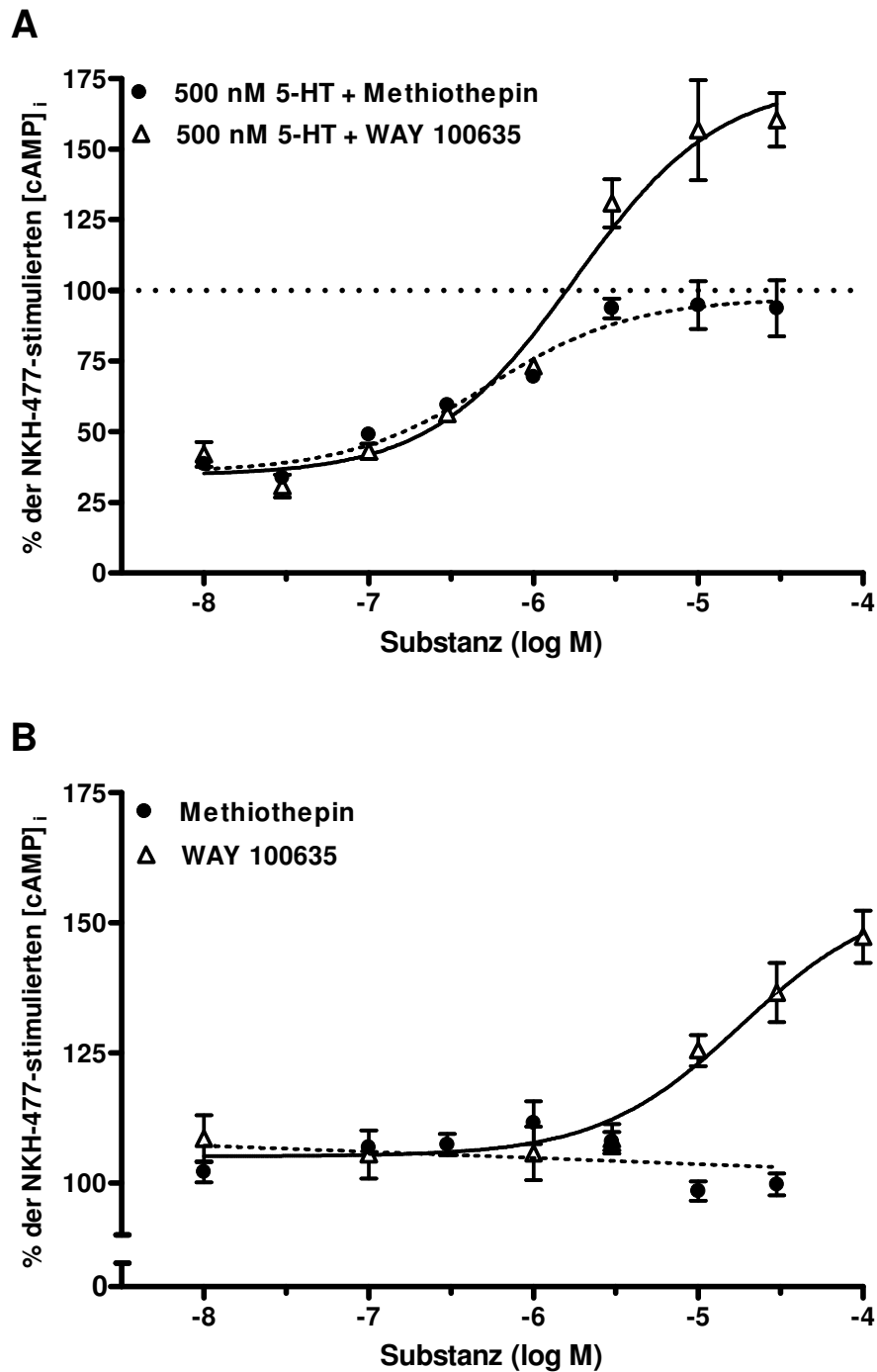
Des Weiteren wurde die Wirkung von Antagonisten (10  $\mu$ M) auf die 5-HT-modulierte (500 nM) NKH-477-stimulierte [cAMP]<sub>i</sub> untersucht (Abb. 3.15). Sowohl Mianserin, ein nichtselektiver 5-HT<sub>2</sub>-Rezeptorantagonist, als auch Spiperon, ein Agonist an 5-HT<sub>2A</sub>- und D<sub>2</sub>-ähnlichen-Rezeptoren, zeigte bei den getesteten Konzentration keine detektierbare Wirkung. Hingegen konnte der durch Serotonin hervorgerufene Effekt zum einen durch Methiothepin, einen nichtselektiven Antagonisten an 5-HT-Rezeptoren, und zum anderen durch WAY 100635, einen hochselektiven 5-HT<sub>1A</sub>-Rezeptorantagonisten, blockiert werden. Die Konzentrationsabhängigkeit dieses Effekts wurde für beide Substanzen in der Gegenwart von 500 nM Serotonin überprüft. Die Wirkung beider Substanzen war konzentrationsabhängig und zeigte einen sigmoidalen Verlauf (Abb. 3.16A). Die Auswertung der Dosis-Wirkungs-Kurve ergab für Methiothepin einen EC<sub>50</sub>-Wert von  $\sim 0,54 \mu$ M ( $\log EC_{50} = -6,27 \pm 0,15$ ; Mittelwert  $\pm$  Standardfehler). Der durch Serotonin induzierte Rückgang der cAMP-Produktion konnte mit einer Konzentration von  $10^{-5}$  M Methiothepin blockiert werden. Durch WAY 100635 konnte der 5-HT-Effekt nicht nur vollständig blockiert werden, sondern die cAMP-Konzentration wurde auf deutlich über 100 % der NKH-477-stimulierten [cAMP]<sub>i</sub> erhöht (Abb. 3.16A).



**Abbildung 3.15: Einfluss von 5-HT-Rezeptorantagonisten auf die 5-HT-modulierte NKH-477-stimulierte [cAMP]<sub>i</sub>.** Die Antagonisten wurden in Konzentrationen von 10  $\mu$ M in Anwesenheit von 500 nM Serotonin und 10  $\mu$ M NKH-477 eingesetzt. Es sind Mittelwerte aus Vierfachbestimmungen dargestellt. Die Fehlerbalken geben die Standardfehler an. (\*\*) geben signifikante Unterschiede der Antagonisten-modulierten [cAMP]<sub>i</sub> zur 5-HT-modulierten [cAMP]<sub>i</sub> an. Die statistische Auswertung basiert auf einer *one-way* ANOVA gefolgt von *Dunnett's multiple comparison* Test \*\*  $p < 0,01$ .

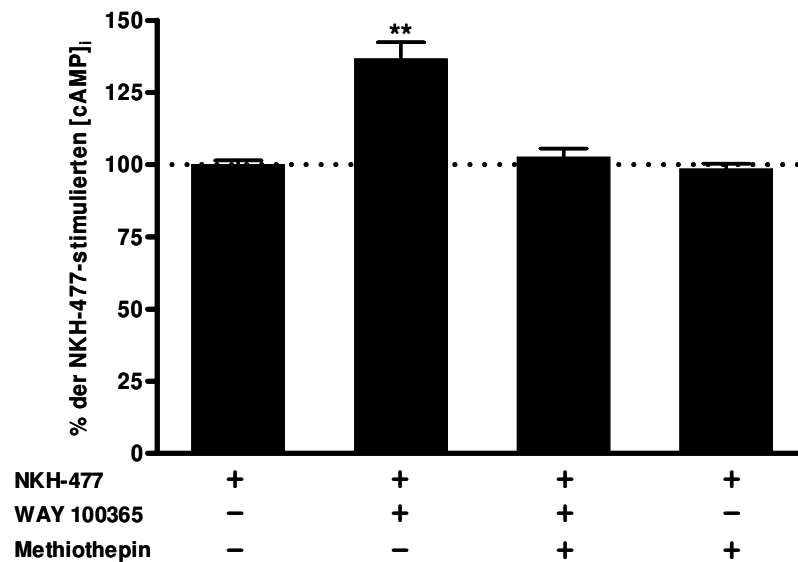
Dieses Ergebnis deutet darauf hin, dass WAY 100635 als inverser Agonist am konstitutiv aktiven  $5\text{-HT}_1$ -Rezeptor wirkt. Zunächst wurde durch vielfältige Kontrollen an nicht transfizierten Zellen unter verschiedensten Bedingungen bestätigt, dass WAY 100635 keinerlei Effekt auf endogene Rezeptoren der Zelllinie hat (Daten nicht gezeigt). Um die Rolle von WAY 100635 als inverser Agonist zu verifizieren, wurde die Wirkung von WAY 100635 und Methiothepin auf die NKH-induzierte [cAMP]<sub>i</sub> in Abwesenheit von Serotonin untersucht (Abb. 3.16B). Während die Zugabe von steigenden Konzentrationen von Methiothepin keinen Effekt auf die [cAMP]<sub>i</sub> zeigte, kam es bei der Zugabe von WAY 100635 ab einer Konzentration von  $10^{-6}$  M zu einem deutlichen, dosisabhängigen Anstieg der [cAMP]<sub>i</sub>.





**Abbildung 3.16: Modulation der [cAMP]<sub>i</sub> in Abhängigkeit von Methiothepin und WAY 100635.** (A) Die Pea5-HT<sub>1</sub>-exprimierenden HEK 293-Zellen wurden auf einem Hintergrund von 500 nM Serotonin mit steigenden Konzentrationen ( $10^{-8}$  bis  $3 \times 10^{-5}$  M) von Methiothepin oder WAY 100635 inkubiert. (B) Die Pea5-HT<sub>1</sub>-Rezeptor-Zelllinien wurden in Abwesenheit von Serotonin (500 nM) mit steigenden Konzentrationen ( $10^{-8}$  bis  $3 \times 10^{-5}$  M/ $10^{-4}$  M) Methiothepin oder WAY 100635 inkubiert. Dargestellt sind Mittelwerte aus Vierfachbestimmungen von je zwei unabhängigen Experimenten. Die Fehlerbalken stellen die Standardfehler dar.

Abschließend wurde die Wirkung von Methiothepin auf die durch WAY 100635 hervorgerufene Erhöhung der  $[cAMP]_i$  untersucht (Abb. 3.17). Die Zugabe von 30  $\mu M$  WAY 100635 führte, wie bereits gezeigt, zu einer Erhöhung der NKH-477-induzierten cAMP-Produktion auf etwa 135 %. Es konnte gezeigt werden, dass die Zugabe von 10  $\mu M$  Methiothepin die Wirkung von WAY 100635 vollständig blockiert, während es in Abwesenheit von WAY 100635 keinen Einfluss auf die NKH-477-induzierte  $[cAMP]_i$  hat.



**Abbildung 3.17:** Einfluss von Methiothepin (10  $\mu M$ ) und WAY 100635 (30  $\mu M$ ) auf die NKH-477-stimulierte (10  $\mu M$ ) cAMP-Produktion in Pea5-HT<sub>1</sub>-exprimierenden HEK 293-Zellen. Es sind Mittelwerte aus Vierfachbestimmungen von drei unabhängigen Experimenten dargestellt. Die Fehlerbalken geben den Standardfehler an. Die statistische Auswertung basiert auf einer *one-way* ANOVA gefolgt von *Dunnett's multiple comparison* Test \*\*  $p < 0,01$ .

### 3.1.2 Der Pea5-HT<sub>7</sub>-Rezeptor

Serotonin beeinflusst bei der Amerikanischen Schabe *P. americana* eine Vielzahl von physiologischen Prozessen. Vor dem Hintergrund der Komplexität des serotonergen Systems war es daher von Interesse, Mitglieder weiterer 5-HT-Rezeptorklassen aus diesem Modellorganismus zu klonieren, um physiologische Effekte mit spezifischen Rezeptoren in Verbindung zu bringen. Es wurden zusätzliche Experimente mit degenerierten Primern durchgeführt. Die Sequenzen von bereits bekannten 5-HT<sub>2</sub>- und 5-HT<sub>7</sub>-Rezeptoren verschiedener Invertebratenspezies wurden verglichen. So konnten hoch konservierte Bereiche der jeweiligen Rezeptorklassen detektiert werden und als Grundlage für die Konstruktion von Rezeptorklassen-spezifischen degenerierten Primern dienen.

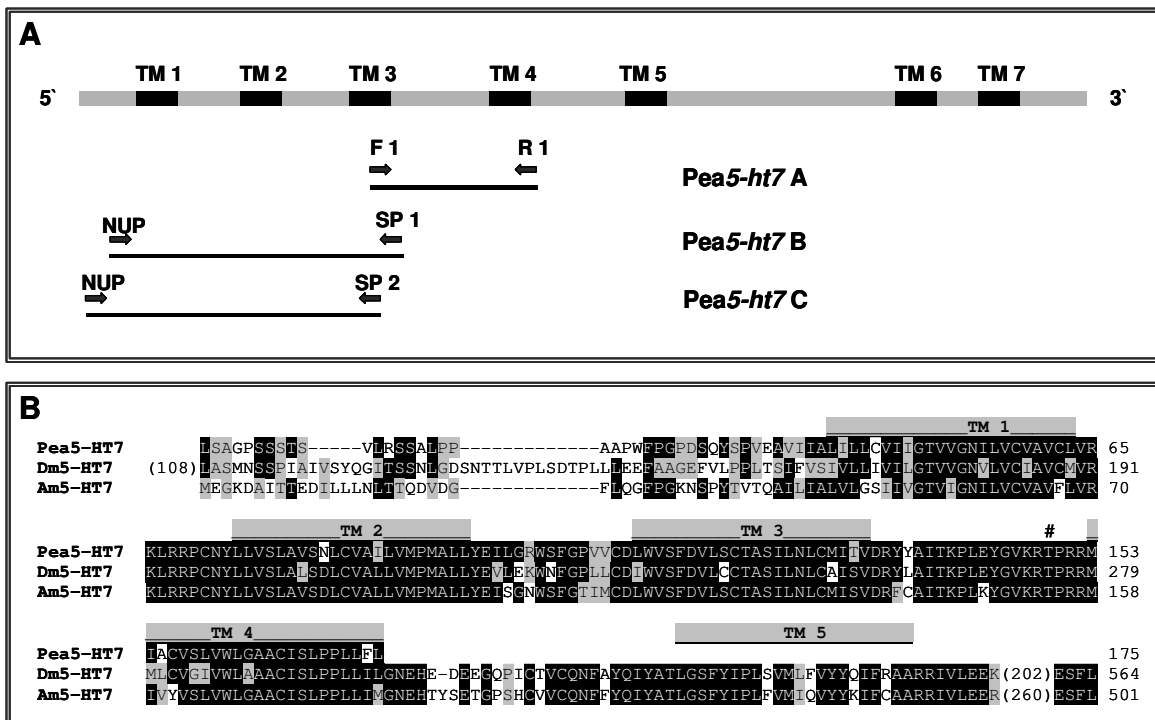
#### 3.1.2.1 Isolierung einer partiellen cDNA des Pea5-ht7-Rezeptors

Die Identifizierung hoch konservierter Sequenzbereiche durch den Vergleich zahlreicher 5-HT<sub>7</sub>-Rezeptoren verschiedener Arthropoden führte zur Konstruktion eines Vorwärts-Primers (5HT-7 F1: 5`-TGCACGGCHWSSATCCTGA-3`), der im Bereich der TM3 anlagert, und eines Rückwärts-Primers (5HT-7 R1: 5`-AARTTCTGGCAMPMRHGCA-3`), der in der terminalen Region der TM4 lag. Als Matrize für die PCR mit diesen degenerierten Primern diente cDNA aus Schabengehirnen. Es wurde ein Fragment mit einer Länge von 180 bp amplifiziert und sequenziert (Pea5-ht7A in Abb. 3.18A). Die abgeleitete Aminosäuresequenz konnte anhand einer *Blast*-Analyse der Klasse der 5-HT<sub>7</sub>-Rezeptoren zugeordnet werden (Abb. 3.18B). Basierend auf der gewonnenen Sequenzinformation wurden spezifische Primer synthetisiert. In zwei konsekutiven 5'-RACE-Experimenten konnten überlappende Fragmente amplifiziert werden, welche die ersten drei transmembranalen Segmente und einen Teil der N-terminalen Region abdeckten (Pea5-ht7B/C in Abb. 3.18A). Weitere RACE-Experimente sind erforderlich, um die Sequenz des putativen Pea5-ht7-Rezeptors zu vervollständigen. Aus zeitlichen Gründen konnten diese Experimente jedoch nicht mehr innerhalb der vorliegenden Arbeit durchgeführt werden.

#### 3.1.2.2 Strukturelle Eigenschaften der abgeleiteten, partiellen Aminosäuresequenz

Ein Vergleich der partiellen Pea5-HT<sub>7</sub>-Aminosäuresequenz mit den Sequenzen anderer Rezeptoren zeigte, dass große Sequenzähnlichkeit zu bereits charakterisierten 5-HT<sub>7</sub>-Rezeptoren von Insekten besteht. Die Klasse der 5-HT<sub>7</sub>-Rezeptoren zeichnet sich durch hohe Sequenzübereinstimmung innerhalb der Klasse und vergleichsweise geringer Ähnlichkeit zu anderen 5-HT-Rezeptorklassen aus (HANNON & HOYER 2008). Im partiell klonierten N-Terminus des Pea5-HT<sub>7</sub>-Rezeptors befinden sich keine Konsensusstellen für die N-Glykosylierung, hingegen konnten solche in den verwandten Rezeptoren detektiert

werden. Eine hoch konservierte Konsensusstelle für die PKC befindet sich in der zweiten cytoplasmatischen Schleife (T<sub>49</sub>PR; Abb. 3.18B). Des Weiteren zeigt der Pea5-HT<sub>7</sub>-Rezeptor in den transmembranalen Segmenten und den extra- und intrazellulären Schleifen sehr große Sequenzübereinstimmungen mit den orthologen Rezeptoren aus *D. melanogaster* (WITZ ET AL. 1990) und *A. mellifera* (SCHLENSTEDT ET AL. 2006) (Abb. 3.18B).

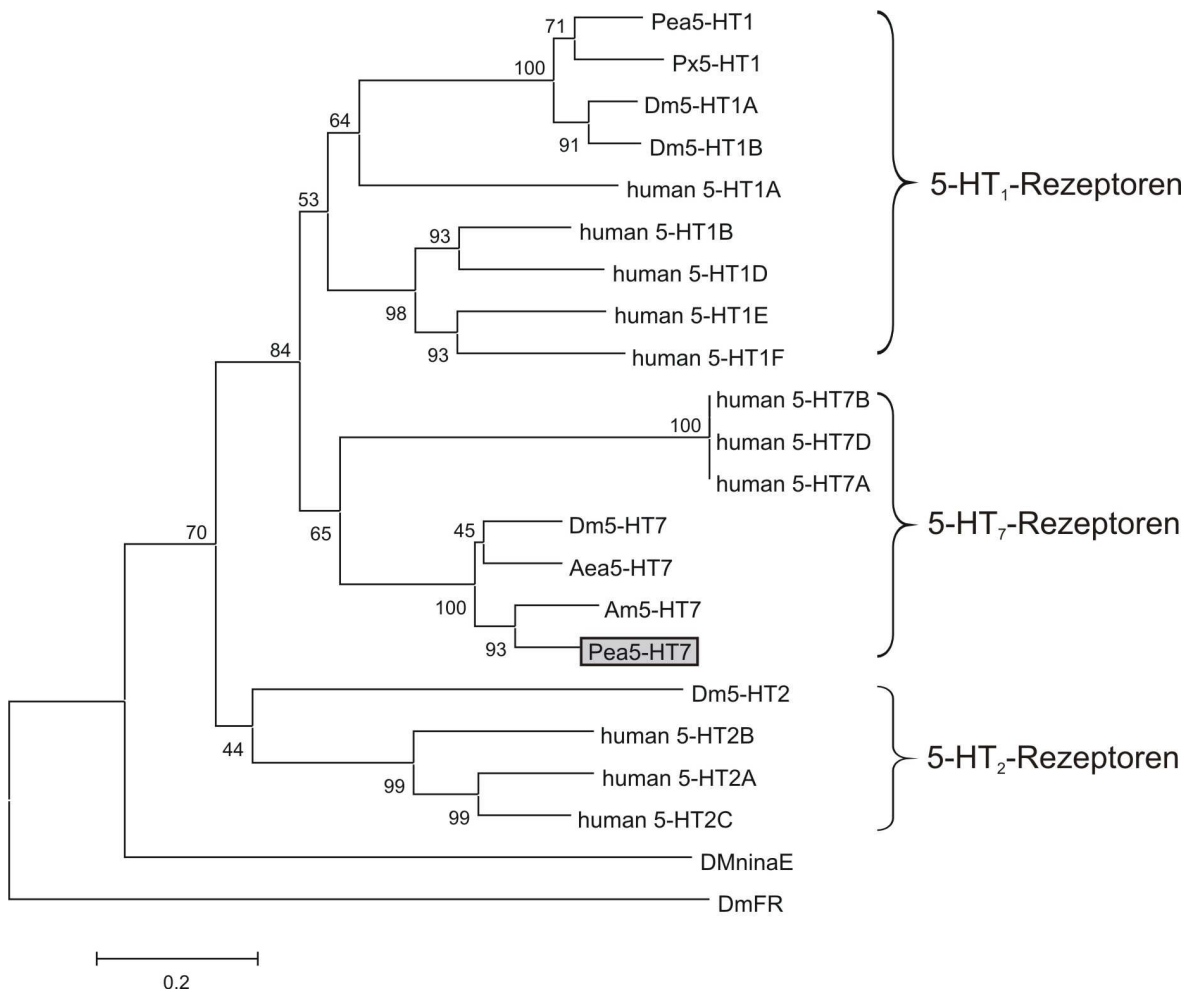


**Abbildung 3.18: Klonierung von Pea5-ht7-cDNA-Fragmenten.** (A) Schematische Übersicht der Teilerfahrungen zur Klonierung des Pea5-ht7-Rezeptors. Das Fragment Pea5-ht7 A wurde mit zwei degenerierten Primern (F 1/R 1) aus Schabengehirn-cDNA isoliert. Pea5-ht7 B und Pea5-ht7 C wurden mittels SMART-RACE-PCR (NUP *nested universal primer*, SP spezifischer Primer) amplifiziert. (B) Vergleich der partiellen Aminosäuresequenz des Pea5-HT<sub>7</sub>-Rezeptors mit orthologen 5-HT<sub>7</sub>-Rezeptoren aus *D. melanogaster* (Dm5-HT7, NM\_079860) und *Apis mellifera* (Am5-HT7, AAM19330). Aminosäurereste, die bei mindestens zwei Rezeptoren identisch sind, wurden schwarz hinterlegt, konservativ ausgetauschte Reste wurden grau hinterlegt. Die Transmembrandomänen (TM) sind durch graue Balken oberhalb der Sequenz gekennzeichnet. Die Position des letzten Aminosäurerestes jeder Zeile entspricht der rechts angegebenen Zahl. In Klammern angegebene Zahlen stehen für die Anzahl der Aminosäurereste, die nicht dargestellt wurden. Lücken, die zur Maximierung der Homologien eingeführt wurden, sind durch schwarze Bindestriche gekennzeichnet. Putative PKC-Phosphorylierungsstellen des Pea5-HT<sub>7</sub>-Rezeptors (#) wurden markiert.

Wie bereits für den Pea5-HT<sub>1</sub>-Rezeptor ausführlich gezeigt wurde, gibt es zahlreiche hoch konservierte Motive und Aminosäurereste innerhalb der Sequenzen von 5-HT-Rezeptoren und GPCRs im Allgemeinen. Diese Strukturen sind auch in der partiellen Pea5-HT<sub>7</sub>-Rezeptorsequenz vorhanden. So tritt zum Beispiel in der TM 1 das hoch konservierte Motiv G<sub>53</sub> 1.49 NxL auf, welches an stabilisierenden Wasserstoffbrückenbindungen beteiligt ist (NICHOLS & NICHOLS 2008). Des Weiteren ist auch der Asparaginsäure<sub>116</sub>-Rest D3.32 konserviert, der bei allen aminergen Rezeptoren eine entscheidende Bedeutung bei der Ligandenbindung hat (HO ET AL. 1992). Am Ende der TM 3 ist das für den Aktivierungsprozess des Rezeptors entscheidende, hoch konservierte D<sub>133</sub>RY-Motiv (D3.49) vorhanden (SCHEER ET AL. 2000, NICHOLS & NICHOLS 2008). In der Mitte der TM 4 befindet sich ein hoch konservierter Tryptophan<sub>161</sub>-Rest W4.50, der bei aminergen Rezeptoren vermutlich ein Bestandteil der Liganden-Bindungstasche ist (BALLESTEROS ET AL. 2001).

### 3.1.2.3 Phylogenetische Analyse

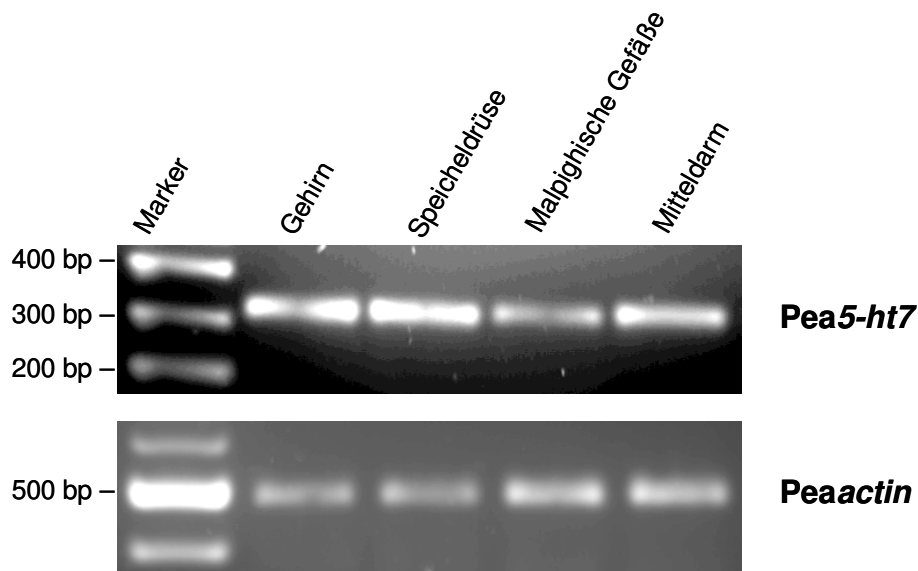
Die stammesgeschichtliche Verwandtschaft des Pea5-HT<sub>7</sub>-Rezeptors mit 5-HT-Rezeptoren weiterer Insekten sowie des Menschen wurde untersucht und durch ein Dendrogramm dargestellt (Abb. 3.19). Aufgrund der teilweise fehlenden Sequenzinformation des Pea5-HT<sub>7</sub>-Rezeptors wurde für alle Rezeptoren lediglich die Aminosäuresequenz der ersten vier TMs und der verbindenden Schleifen verwendet. Es zeigte sich, dass diese Sequenzinformation ausreichte, um die einzelnen Rezeptorklassen zu gliedern und somit eine vorläufige Analyse vorzunehmen. Die partielle Aminosäuresequenz des Pea5-HT<sub>7</sub>-Rezeptors ordnet sich eindeutig in die Klasse der 5-HT<sub>7</sub>-Rezeptoren ein und bildet einen Zweig mit den weiteren 5-HT<sub>7</sub>-Rezeptoren der Insekten.



**Abbildung 3.19: Phylogenetische Analyse des Pea5-HT<sub>7</sub>-Rezeptors.** Die verwendeten Rezeptoren sind in der Reihenfolge der Abbildung mit den zugehörigen Zugangsnummern aufgeführt: *Periplaneta americana* Pea5-HT1 (FN298392), *Papilio xuthus* Px5-HT1 (BAD72868), *Drosophila melanogaster* Dm5-HT1A (CAA77570), Dm5-HT1B (CAA77571), human 5-HT1A (NP\_000515), human 5-HT1B (NP\_000854), human 5-HT1D (NP\_000855), human 5-HT1E (NP\_000856), human 5-HT1F (NP\_000857), human 5-HT7 isoform B (NP\_062874), human 5-HT7 isoform D (NP\_062873), human 5-HT7 isoform A (NP\_000863), Dm5-HT7 (A38271), *Aedes aegypti* Aae5-HT7 (AAG49292); *Apis mellifera* Am5-HT7 (AM076717), Pea5-HT7, Dm5-HT2 (CAA57429), human 5-HT2B (NP\_000858), human 5-HT2A (NP\_000612), human 5-HT2C (NP\_000859), *Drosophila melanogaster* ninaE-encoded rhodopsin 1 DmninaE (NM\_079683) und *Drosophila melanogaster* FMRFamid-Rezeptor DmFR (AAF47700).

### 3.1.2.4. Expressionsmuster des putativen *Pea5-ht7*-Gens

Mithilfe von RT-PCR Experimenten wurde das gewebsspezifische Expressionsmuster von *Pea5-ht7* semiquantitativ untersucht. Die Sequenz des amplifizierten Fragments wurde durch Sequenzierung bestätigt. Die Intaktheit der verwendeten RNA-Proben wurde durch Kontroll-Experimente mit dem konstitutiv exprimierten Gen *Peaactin* überprüft. Das Transkript des *Pea5-ht7*-Gens wird in allen untersuchten Geweben exprimiert. Im Gehirn und in der Speicheldrüse wird das Rezeptortranskript stark exprimiert. Ebenso konnte das Transkript in den Malpighischen Gefäßen und im Mitteldarm deutlich detektiert werden (Abb. 3.20). Für negative Kontroll-Experimente wurden die RNA-Proben mit RNase behandelt. Erwartungsgemäß konnte anschließend kein Transkript nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt).



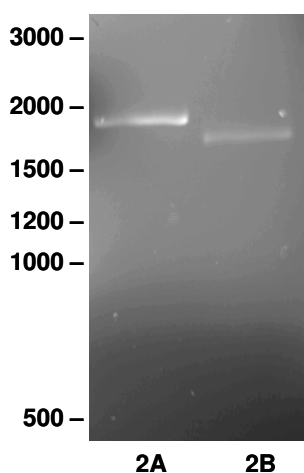
**Abbildung 3.20: Expression von *Pea5-ht7* und *Peaactin* in verschiedenen Geweben von *P. americana*.** Der 100 bp-DNA-Marker ist jeweils in der linken Bahn zu sehen. Die weiteren Bahnen zeigen die RT-PCR-Produkte, die mit RNA-Präparationen aus verschiedenen Geweben als Matrize erhalten wurden: Gehirn, Speicheldrüse, Malpighische Gefäße und Mitteldarm. Die amplifizierten Fragmente haben die erwartete Größe von 319 bp für *Pea5-ht7* und 488 bp für *Peaactin*.

## 3.2 Der PeaDop2-Rezeptor

Im Rahmen der Doktorarbeit von Herrn C. Krach wurde ein Dopaminrezeptor der Schabe *P. americana* kloniert (PeaDop2, KRACH 2007). Ein Teilaspekt der vorliegenden Arbeit war die molekulare, funktionelle und pharmakologische Charakterisierung sowie die Lokalisation dieses Rezeptors.

### 3.2.1 Generelle Struktur von PeaDop2

Aufgrund der von C. Krach gewonnenen Sequenzinformation (Sequenz siehe Anhang Abb. 6.3) wurde der Rezeptor der Familie der Dopaminrezeptoren zugeordnet und in die Klasse der Invertebratentyp-Dopaminrezeptoren (INDRs) eingeordnet. Mitglieder dieser Klasse zeichnen sich neben großen Sequenzhomologien strukturell durch eine kurze dritte intrazelluläre Schleife und einen langen C-terminalen Bereich aus (MUSTARD ET AL. 2005). Die beschriebene Form des PeaDop2-Rezeptors zeigte große Sequenzübereinstimmungen zu den bisher bekannten Rezeptoren der INDRs. Jedoch fiel der PeaDop2-Rezeptor durch einen ungewöhnlich kurzen C-Terminus auf. Dieser umfasste lediglich wenige Aminosäurereste. Für die homologen Rezeptoren aus *Drosophila melanogaster* (FENG ET AL. 1996, HAN ET AL. 1996) und dem Katzenfloh *Ctenocephalides felis* (GERBER ET AL. 2006) wurden mehrere Rezeptorvarianten beschrieben, die sich lediglich in der Länge und Sequenz des C-Terminus unterscheiden. Für den PeaDop2-Rezeptor wurden daher zur Detektion möglicher Spleißvarianten im C-terminalen Sequenzbereich 3'-RACE-Experimente mit spezifischen Primern innerhalb der TM 6 und TM 7 durchgeführt. Diese Experimente führten zur Isolierung einer Isoform des PeaDop2-Rezeptors mit einem längeren C-Terminus. Mithilfe von spezifischen Primern, die den gesamten kodierenden und einen großen Teil des nicht-kodierenden Sequenzbereichs der beiden Varianten des PeaDop2-Rezeptors abdeckten, konnte die Existenz beider Isoformen auf mRNA-Ebene bestätigt werden (Abb. 3.21).



**Abb. 3.21: Spezifische Amplifikation der beiden Spleißvarianten des PeaDop2-Rezeptors.** Mit spezifischen Primern, die den gesamten kodierenden und einen großen Teil des nicht-kodierenden Sequenzbereichs der beiden Varianten des PeaDop2-Rezeptors abdeckten, wurden beiden Isoformen amplifiziert, wobei cDNA aus Schabengehirn als Matrize verwendet wurde. Die PCR-Produkte haben die erwartete Länge von 1.740 bp für PeaDop2A und 1.630 bp für PeaDop2B. Der DNA-Marker ist links angegeben (in bp).



Die von C. Krach beschriebene Form umfasst 1.638 Nukleotide und wurde umbenannt in *Peadop2B*. Die zweite und längere Variante umfasst insgesamt 2.266 Nukleotide und wird als *Peadop2A* bezeichnet (Abb. 3.22A). Die Sequenzen der beiden Rezeptorvarianten sind bis zum Nukleotid G 1.617 vollständig identisch. Während *Peadop2B* anschließend ein Stopp-Kodon aufweist, werden durch die Sequenz von *Peadop2A* weitere Aminosäurereste kodiert (Abb. 3.22B). Eingeleitet wird der längste offene Leserahmen für beide Isoformen von einem Start-Kodon (ATG; Position 249-251), vor welchem Stopp-Kodons in mehreren Leserahmen auftreten. Das Stopp-Kodon (TAG bzw. TAA) des offenen Leserahmens liegt an Position 1.787-1.789 in *Peadop2A* bzw. an Position 1.519-1.521 in *Peadop2B*. Somit wird der offene Leserahmen von einer 256 bp langen 5'- und einer 62 bp bzw. 477 bp langen 3'-nichtkodierenden Region eingerahmt.

### 3.2.2 Strukturelle Eigenschaften der abgeleiteten Aminosäuresequenzen

Die vollständige *Peadop2A*-cDNA besteht aus 2.266 Nukleotiden (Abb. 3.22A). Die abgeleitete Aminosäuresequenz dieses Rezeptors umfasst 512 AS und hat ein Molekulargewicht von 57,7 kDa. Der längste in der cDNA enthaltene offene Leserahmen von *Peadop2B* kodiert für ein 456 AS langes Protein mit einem berechneten Molekulargewicht von 51,1 kDa. Aufgrund der Übereinstimmung beider Rezeptorvarianten in weiten Teilen der Aminosäuresequenz werden die strukturellen Eigenschaften und Sequenzcharakteristika unter der Bezeichnung *PeaDop2* durchgeführt.

Das Hydropathieprofil (nach KYTE & DOOLITTLE 1982) sowie die Charakterisierung der Struktur basierend auf dem Topologievorhersage-Programm *Phobius* (<http://phobius.sbc.su.se/>; KÄLL ET AL. 2004) prognostizieren die strukturelle Grundanordnung, die bei allen GPCRs konserviert ist (KOBILKA 2007): Der N-Terminus ist extrazellulär lokalisiert. Es schließen sich sieben hydrophobe Transmembransegmente mit alternierenden intra- und extrazellulären Schleifen an. Der C-Terminus liegt intrazellulär (Abb. 3.23).

**A**

PeaDop2A GTCGAACTAGAATGTTCAAGATTTGTGACAAATAAATATACGAATGTACGCAAAAATTTATGACTGACTAAAATTTGGGTAGTTGAAAATTTCACTTAT 100  
 PeaDop2A TGTACGAAGTTTGGCAATATTCGTTCTCAATCAGTCAGAGTGACTAGCAAACTGGACAATGATATCTAAAATTTGTTTTCCATAAAAAAGCCGAAGTGGCA 200  
 PeaDop2A GACATTTAACCGATTACATGTTCTAGTTATCTAGATTCTTATCTTACTATGACCGAAGCCTAGCAGATAGCCTTTGGGACGAAAAACAAAGCGCTGGG 300  
M N G S L A D S L W D E K Q A L E G 17

PeaDop2A TGATGGCTCTGCTGATGGAAATCTGCTCCTGGGAGCCAAAACTGGTGCAGCTCAGAAGATACATTCAGTGAAGGCATTACGCTCGACAACAACCTC 400  
D G S A D W N S A P G S H Q N W S T S E D T F T E G I T L D N N F 50

PeaDop2A ACTCTGGATGCCAACGCTTCCGACGAGAAGCATGTGGCCCTGGGAACTGTTGAGAAGCGAGCCCTTGGCCGTTCTACTGCTACTGTTCTCCGTGGCCA 500  
T L D A N A S D E N D V A W E L L Q K R A P L A V L L L F S V A 83

PeaDop2A CCGTTTTCCGCAACATGCTCGTCACTCCGCGTCACTCCGGAGCGGTACCTCCACACAGCCACCAATTACTTCGTCAGTCCCTAGCAGTGGCCGACTG 600  
T V F G N M L 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 117

PeaDop2A TCTTGTGGTCTTGTGCTGATGCCCTTTCAGTCCGCTGTGATGAAGTCTTGAGAACAGGTGGTTTTTTGGGATGGATGGTGGCAGCTGTGGAGTGGTTA 700  
L V G 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 150

PeaDop2A GACGTTCTGTTACGACAGCATCTATCTTGAACCTGTGTGATCTCTGACCGGTACTGGCTATACCAGCCCTTACGTAACCCACCAGAATGA 800  
D V L F S T A S I L N L C V I S L D R Y W A I T D P F T Y P T R M 183

PeaDop2A GTGTGGGAGAGCAGCGCTGCTGATAGCGGCTGTGGGTGTGCTCCGGGCGATCTCCTTCTCGGATTGCTGGTGGAGAGCAGTCAAGTGAAGT 900  
S V R R A A A L L I A A V W V C S G A I S F P A I V W W R A V R T E V 217

PeaDop2A GGTGCCGCCTTTAAATGCCCTTACGGAAAACCTCGGCTACTTGGTTTTCTCCCAACAATATCCTTCTATCTCCCGCTCCTGTGATGGTGTTCAGG 1000  
V P A F K C P F T E N L G Y L V F S S T I S F Y L P L L V M V F T 250

PeaDop2A TACTACAGAATATACAGAGTGCAGTAATCCAGACGAGATCCCTCAAGCTGGGATCGAAGCAGGTGATGATGGCTTCTGGTGAAGTGAATTAACCTCA 1100  
Y Y R I Y R A A V I Q T R S L K L G S K Q V M M A S G E L E L T L 283

PeaDop2A GAATACAGAGGTGGGAATAACAGCAGTTCACACTAATAGTGGGAATACTGTAGTGGATGACAGACATATGTACAGTAGCGGAAGTGGAGAACCTGA 1200  
R I H R G G N N S S T N S G T T V D D R H M Y S S G S G G T P D 317

PeaDop2A TGAACITCCGGTGAAGTCTAGATGCGGCTGATGCTCTCCCTCCACATCACCATCATCACCACCATCACCACCACCATCAAAAACAT 1300  
E L P G E V L D A A D T M S P P H H H H H H H H H H H H H H Q N N 350

PeaDop2A GGACTAACAGACATGCATCAACTAGAATAATGGCCGGAACACGGCAACAGTAAGCGATGTCTAAGAATTTTTCGTTGAGTAGGAACTTGCAAAAT 1400  
G L T R H A S T R I M A G N T A N S K A M S K N F S L S R K L A K 383

PeaDop2A TCGCTAAAGAGAAGAAGCGCGGAAAACACTTGGGATCGTGTGGAGTGTTCATTGTGTGGTGGCTTCTTCTGGTGAATCTTCTCCGCGCTT 1500  
F A K E K K A 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 417

PeaDop2A CTGTCTCGCTGCATCTGGAACGAGGAGCTTGTGCTCGGTTGTGACGTGGTGGGCTGGATCAATCCAGTATGAATCCTGTCATCTATCGCTGCTGG 1600  
C L R 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 450

PeaDop2A AGTCGAGATTTCAAGAAGCTTTCTGTGAGAATTTGTGCGTTTGTGCCACGACGAATGCGAAGCGGTATACCAACCGCGCTACGCTCGAAGCCAGTC 1700  
S R D F R R A F V R I L C V C C P R R M R R R Y Q P A L R S K P S 483

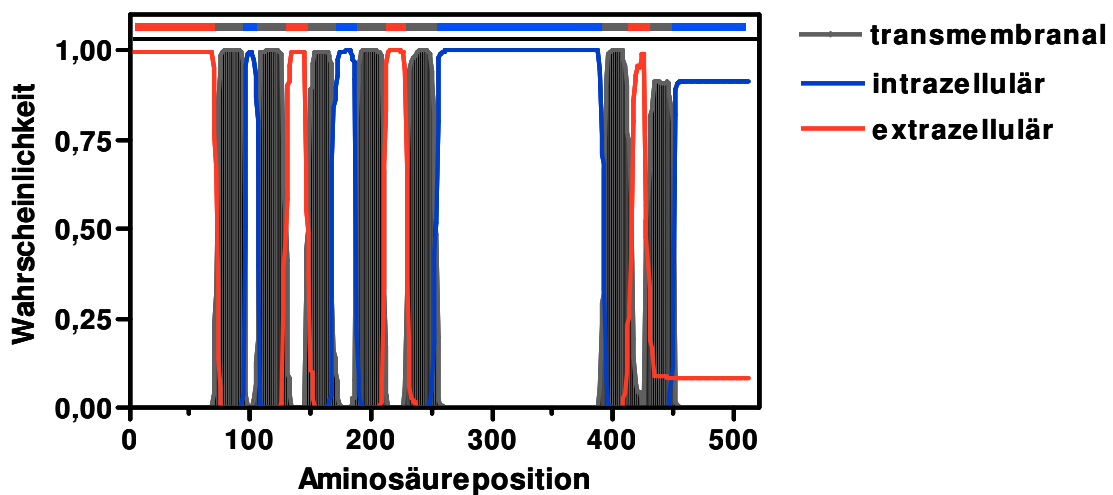
PeaDop2A AATACTATGGAATCCAATGCTGCAATCCAACAACCCCTTAGTGTGACTACTGCTGTGTAACCAACGAACTCTACTCGATGTCAGTCAAGCTGCTG 1800  
Q Y Y G T P M L Q S N N P P S V S Y S S V N Q H E L Y S M \* 512

PeaDop2A ACGAATCCGGCAGCGTGGCCATCCAGGTGCTGTCAGGAGCAGCGTTCAGCCATGACATCTCAGCGCCATTGTCATCTTCCCGTACCATGAAGTCACA 1900  
 PeaDop2A TCTCCCTCCAGTAGGGGACACAGGAGACTGCTGAGCTTACCAACAGTGGAACTGTGAGTTACGACATAAAGATTTCCAGCTGAAGCACCATTAT 2000  
 PeaDop2A TATGATCGAAGCAGAAATGTGTGTAATGAAGAGCGATATTCGTAAGGAGTAATGTTGTGCAAGTATTTGTTATGTTTCAAAATTTCCAGCAGGTA 2100  
 PeaDop2A CATTACTAAATATGTTATCCGCTTGTGTAACAATGGTGAAGAAATGTTGTAAGAAAAATAGTTTGTGCTCAAAATCTATGACGATACTTAAACAGACC 2200  
 PeaDop2A AAAGTAATAATAGTTCAATTTTGGCTTGGCTTCAGAAAAAATAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA 2266

**B**

Isoform	Putative Exon-Konfiguration	Aminosäuresequenz <sup>1</sup>
PeaDop2A	Exon 1 + C-terminales Exon 2 + 3	SRDFRRafvrilcvccprmrtryqpalrskpsq yygtpmlqsnppsvnqhelysm*
PeaDop2B	Exon 1	SRDFRR*

**Abbildung 3.22: (A) Nukleotidsequenz und abgeleitete Aminosäuresequenz des Peadop2A-Rezeptors.** Die Position des letzten Nukleotids bzw. des letzten Aminosäurerestes jeder Zeile ist rechts neben der Sequenz angegeben. Die Positionen der potentiellen Transmembransegmente (TM) sind durch graue Balken gekennzeichnet. Der unterstrichene Sequenzabschnitt repräsentiert die Region innerhalb der dritten cytoplasmatischen Schleife, von welcher das spezifische Antigen zur Herstellung des Antikörpers abgeleitet wurde (s. 2.4.9). Putative Exongrenzen sind mit (▼) gekennzeichnet. (\*) symbolisiert Stopp-Kodons. **(B) Alternatives Spleißen des Peadop2-Rezeptors im Bereich des C-Terminus.** Die hypothetische Exon-Konfiguration der beiden Varianten des PeaDop2-Rezeptors ist hier dargestellt. <sup>(1)</sup> Großbuchstaben stellen Sequenzabschnitte dar, die bei allen Isoformen vorhanden sind; Kleinbuchstaben hingegen zeigen den Sequenzabschnitt, der nur in Isoform A vorhanden ist.



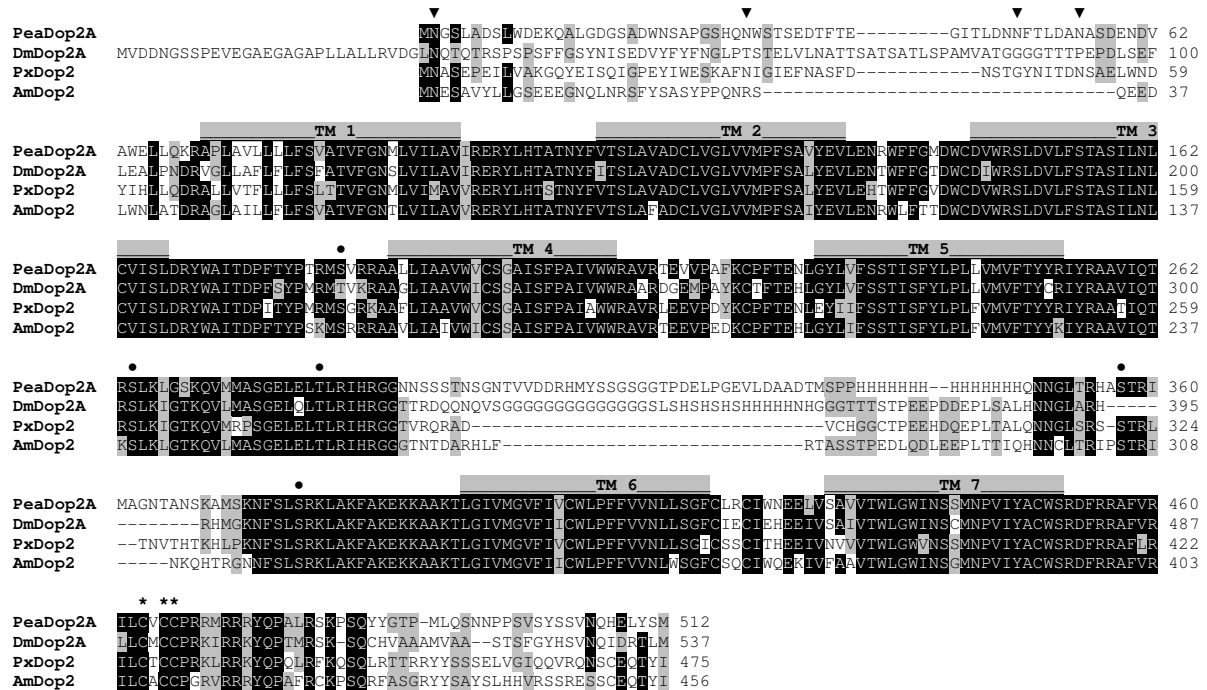
**Abbildung 3.23: Transmembrantopologie des PeaDop2A-Rezeptors.** Mithilfe des Topologievorhersage-Programms *Phobius* (<http://phobius.sbc.su.se/>) wurde die zu erwartende Struktur des Proteins ermittelt. Abgebildet ist die Wahrscheinlichkeit bezüglich der zellulären Lokalisation der entsprechenden Sequenzabschnitte. In grau sind die potentiellen transmembranalen Segmente dargestellt, in rot die extrazellulären Bereiche und in blau die intrazellulären Bereiche.

Der 70 Aminosäurereste lange N-Terminus des PeaDop2-Rezeptors enthält vier Konsensusstellen (N-x-S/T) für N-Glykosylierungen: N<sub>2</sub>GS, N<sub>32</sub>WS, N<sub>49</sub>FT und N<sub>55</sub>AS (Abb. 3.24). Eine Konsensussequenz (S/T-x-R/K) für eine Phosphorylierung durch die PKC befindet sich in der zweiten cytoplasmatischen Schleife und vier weitere befinden sich in der dritten cytoplasmatischen Schleife: S<sub>184</sub>VR, S<sub>264</sub>LK, T<sub>282</sub>LR, S<sub>357</sub>TR und S<sub>378</sub>RK. In der gesamten Aminosäuresequenz des Rezeptors konnten keine Konsensusstellen (R-R-x-S/T) für die Phosphorylierung durch die PKA identifiziert werden. Der C-Terminus unterscheidet sich in den beiden Varianten des PeaDop2-Rezeptors deutlich. Der PeaDop2A-Rezeptor beinhaltet zu Beginn der 61 Aminosäurereste langen C-terminalen Region drei hoch konservierte Cystein-Reste (C<sub>463</sub>VCC; Abb. 3.22), die potentielle Palmitoylierungsstellen darstellen (CHINI & PARENTI 2009). Der C-Terminus von PeaDop2B besteht lediglich aus wenigen Aminosäureresten.

Der PeaDop2-Rezeptor besitzt als Mitglied der Klasse der INDRs Charakteristika, die typisch für aminerge Rezeptoren sind. So tritt in der TM 1 das G<sub>87</sub>NxLVI-Motiv (G1.49) auf. Ein Asparaginsäure<sub>116</sub>-Rest in der TM 2 und die D<sub>268</sub>RY-Sequenz (D3.49) direkt im Anschluss an die TM 3 sind konserviert und für die Aktivierung des Rezeptors von entscheidender Bedeutung (ROVATI ET AL. 2007, BHATTACHARYA ET AL. 2008). Ein Asparaginsäure<sub>151</sub>-Rest (D3.32) innerhalb der TM 3 fungiert als Gegenion zur Bindung der Aminogruppe des Liganden (STRADER ET AL. 1989). Konservierte Cystein-Reste (Cys<sub>144</sub> und Cys<sub>223</sub>) in der ersten und zweiten extrazellulären Schleife bilden Disulfidbrücken und

stabilisieren damit die Rezeptorstruktur (DIXON ET AL. 1987, FRASER 1989). In der TM 5 gelegene Serin<sub>235/236/239</sub>-Reste S5.42, S5.43 und S5.46 bilden Wasserstoffbrückenbindungen mit den Hydroxylgruppen des Katecholrings des Dopamins (STRADER ET AL. 1995). Weiterhin interagiert ein konservierter Phenylalanin<sub>405</sub>-Rest des hoch konservierten Motivs C<sub>404</sub>WLPFF (C6.47) der TM 6 über hydrophobe Wechselwirkungen mit dem Katecholring des Liganden (STRADER ET AL. 1995). Auch das charakteristische Motiv N<sub>443</sub>PxxY (N7.49) innerhalb der TM 7, welches wichtig für die Aktivierung von GPCRs der Familie der Rhodopsin-Rezeptoren ist (BOCKAERT & PIN 1999), ist im PeaDop2-Rezeptor konserviert. Der PeaDop2-Rezeptor besitzt somit die für die Bindung des Liganden Dopamin entscheidenden Aminosäurereste. Weiterhin ist die kurze dritte cytoplasmatische Schleife ein typisches Strukturmerkmal von Rezeptoren, die an G<sub>s</sub> Proteine koppeln (MISSALE ET AL. 1998).

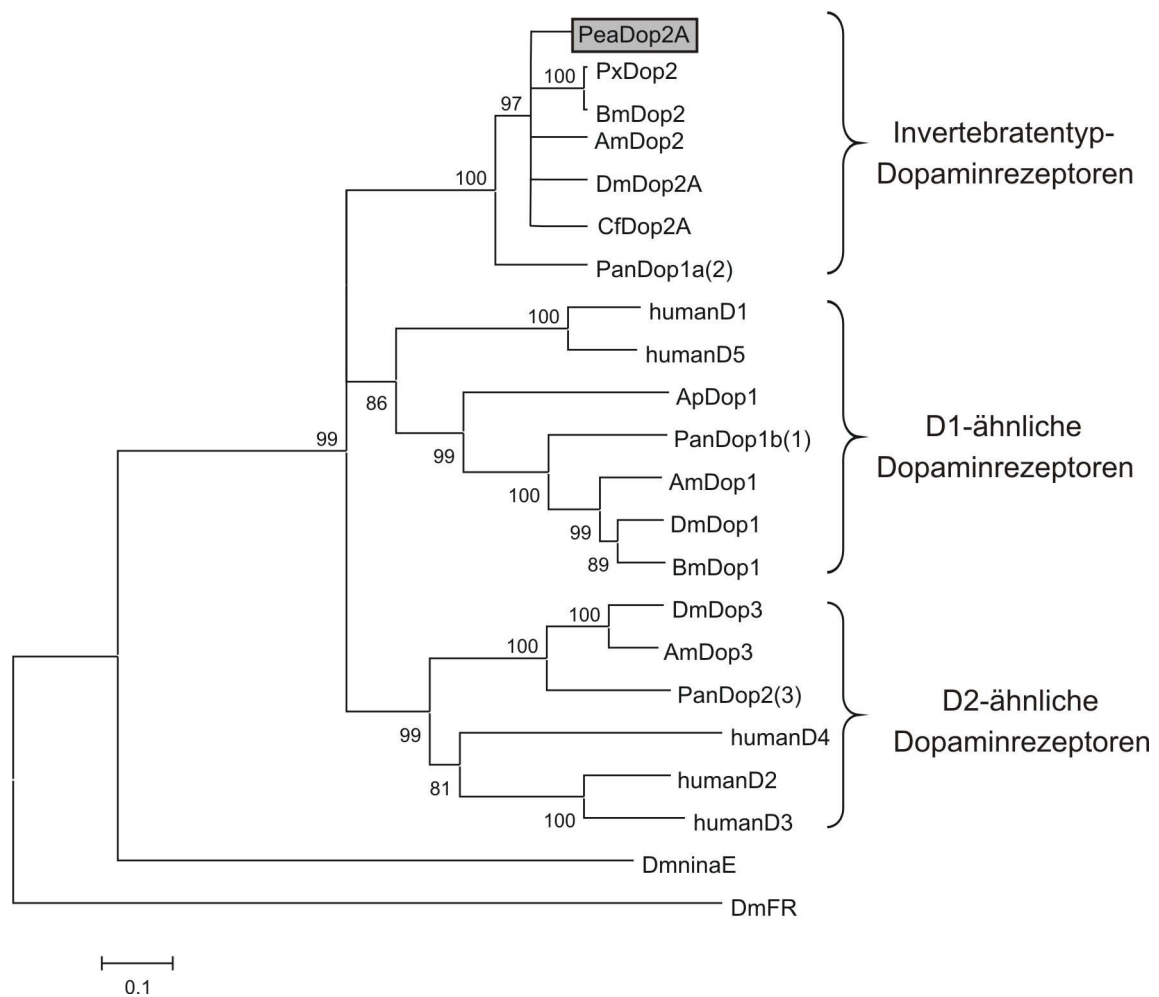
Bei einem Vergleich der PeaDop2A-Aminosäuresequenz mit Sequenzen anderer bekannter aminerger Rezeptoren zeigten sich große Sequenzähnlichkeiten zu bereits charakterisierten Rezeptoren der INDR-Klasse (Abb. 3.24): *Papilio xuthus* (PxDop2: Identität (ID) 63 %; Ähnlichkeit (S) 71 %), *Bombyx mori* (BmDop2: ID 63 %, S 70 %), *D. melanogaster* (DmDop2B: ID 58 %; S 66 %), *A. mellifera* (AmDop2: ID 62 %; S 69 %). Die größten Übereinstimmungen bestehen auch hier innerhalb der Transmembrandomänen und dem Übergangsbereich der TM 4 und der TM 5 zur Cytoplasmaseite, wo die Interaktion des Rezeptors mit dem G-Protein stattfindet.



**Abbildung 3.24: Vergleich der Aminosäuresequenz des PeaDop2A-Rezeptors mit orthologen Rezeptoren weiterer Insekten.** Vergleich der abgeleiteten Aminosäuresequenz des PeaDop2A-Rezeptors mit Rezeptoren der INDR-Klasse aus *D. melanogaster* (DmDop2A, NP\_733299), *Papilio xuthus* (PxDop2, BAD72870) und *Apis mellifera* (AmDop2, AAM19330). Aminosäurereste, die bei mindestens drei Rezeptoren identisch sind, wurden schwarz hinterlegt, konservativ ausgetauschte Reste wurden grau hinterlegt. Die sieben Transmembrandomänen (TM 1 – TM 7) sind durch graue Balken oberhalb der Sequenz gekennzeichnet. Die Position des letzten Aminosäurerestes jeder Zeile entspricht der rechts angegebenen Zahl. Lücken, die zur Maximierung der Homologien eingeführt wurden, sind durch Bindestriche gekennzeichnet. Potentielle N-Glykosylierungs-Stellen (▼), putative Phosphorylierungsstellen durch die PKC (●) und putative Palmitoylierungsstellen (\*) des PeaDop2A-Rezeptors sind markiert.

### 3.2.3 Phylogenetische Analyse

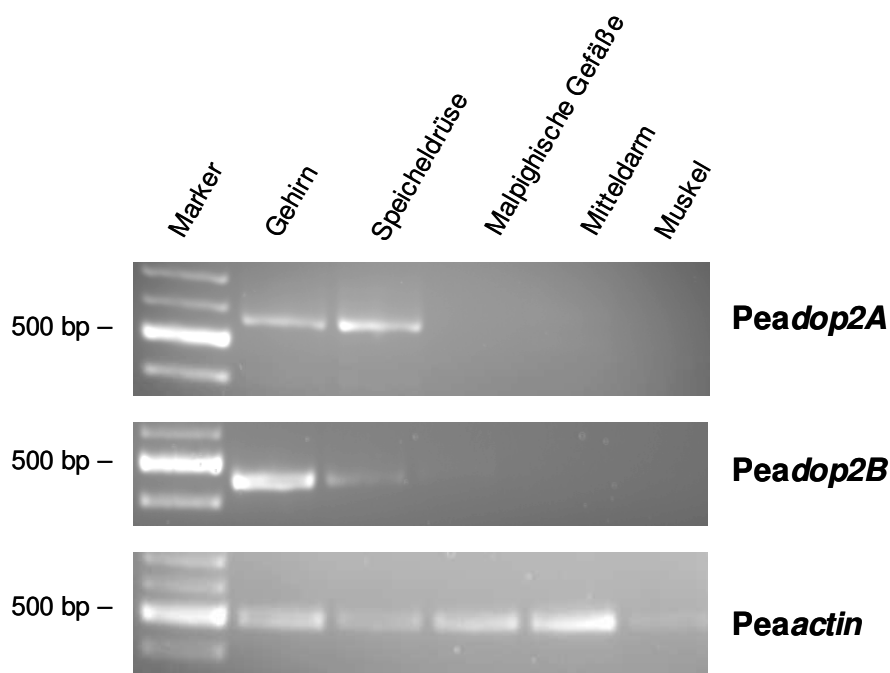
Zur Analyse der stammesgeschichtlichen Verwandtschaft des PeaDop2A-Rezeptors wurde die Kernaminosäuresequenz von Dopaminrezeptoren weiterer Invertebraten und des Menschen verwendet (Abb. 3.25). Die Sequenz des PeaDop2A-Rezeptors ordnet sich eindeutig in den Zweig der INDRs ein und bildet dort mit den INDRs anderer Insekten einen gemeinschaftlichen Ast.



**Abbildung 3.25: Phylogenetische Analyse des PeaDop2A-Rezeptors.** Die verwendeten Rezeptoren sind in der Reihenfolge der Abbildung mit den zugehörigen Zugangsnummern aufgeführt: *Periplaneta americana* PeaDop2A, *Papilio xuthus* PxDop2 (BAD72870), *Bombyx mori* BmDop2 (AB162716), *Apis mellifera* AmDop2 (AAM19330), *Drosophila melanogaster* DmDop2A (NP\_733299), *Ctenocephalides felis* CfDop2A (DQ459405), *Panulirus interruptus* PanDop1a(2) (DQ295790), human D1 (NP\_000785), human D5 (NP\_000789), *Aplysia californica* ApDop1 (AY918891), PanDop1b(1) (DQ295791), AmDop1 (CAA73841), DmDop1 (AAA85716), BmDop1 (AB362162), DmDop3 (AAN15955), AmDop3 (AY921573), PanDop2(3) (DQ900655), human D4 (NP\_000788), human D2 (NP\_000786), human D3 (NP\_000787), *Drosophila melanogaster* ninaE-encoded rhodopsin 1 DmninaE (NM\_079683) und *Drosophila melanogaster* FMRFamid-Rezeptor DmFR (AAF47700).

### 3.2.4 Expressionsmuster des *Peadop2*-Gens

Mithilfe von RT-PCR Experimenten wurde das gewebsspezifische Expressionsmuster der beiden Rezeptorvarianten *Peadop2A* und *Peadop2B* vergleichend untersucht (Abb. 3.26). Beide Isoformen wurden in den Gewebeproben des Gehirns und der Speicheldrüsen nachgewiesen. Hingegen konnte in den Proben der Malpighische Gefäße, des Mitteldarms und der Muskulatur weder das Transkript der einen noch der anderen Variante detektiert werden. Die Intaktheit der verwendeten RNA-Proben wurde durch Kontroll-Experimente mit dem konstitutiv exprimierten Gen *Peaactin* überprüft. In den negativen Kontroll-Experimenten wurden erwartungsgemäß keine Transkripte nachgewiesen (Daten nicht gezeigt).



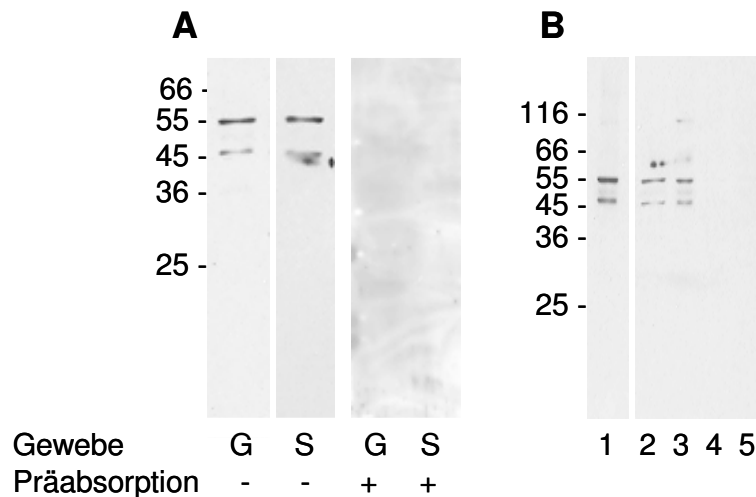
**Abbildung 3.26: Expression von *Peadop2A*, *Peadop2B* und *Peaactin* in verschiedenen Geweben von *P. americana*.** Der 100 bp-DNA-Marker ist in den linken Bahnen zu sehen. Die weiteren Bahnen zeigen die RT-PCR-Produkte, die mit RNA-Präparationen aus verschiedenen Geweben erhalten wurden: Gehirn, Speicheldrüse, Malpighische Gefäße, Mitteldarm, Muskel. Die amplifizierten Fragmente haben die erwartete Größe von 554 bp für *Peadop2A*, 455 bp für *Peadop2b* und 488 bp für *Peaactin*.

### 3.2.5 Immundetektion des PeaDop2-Rezeptors in Western-Blot-Analysen

Für die Immundetektion des PeaDop2-Rezeptorproteins in Homogenaten auf Western-Blots sowie zur späteren immunhistochemischen Lokalisierung des Rezeptorproteins im Gewebe wurden polyklonale Antikörper (anti-PeaDop2) generiert und affinitätschromatographisch aufgereinigt. Diese Antikörper sind gegen eine Proteinsequenz gerichtet, die einem Bereich der dritten cytoplasmatischen Schleife des PeaDop2-Rezeptors entspricht (Abb. 3.22). Dementsprechend sollten beide Rezeptorvarianten des PeaDop2-Rezeptors mittels dieses Antikörpers detektiert werden können.

Auf Western-Blots mit homogenisierten Gehirnen und Speicheldrüsen aus *P. americana* detektierte der Rezeptor-spezifische Antikörper zwei Banden, eine im Bereich von etwa 46 kDa und eine stärkere bei etwa 55 kDa (Abb. 3.27). Die Spezifität des Antikörpers wurde durch ein parallel durchgeführtes Präabsorptions-Experiment mit dem gereinigten Antikörper und dem zur Immunisierung verwendeten Fusionsprotein überprüft. Nach der Inkubation des Antikörpers (1:8.000) mit dem Antigen (15 µg/ml) wurden auf dem Western-Blot keine Banden markiert (Abb. 3.27A). Mögliche posttranslationale Modifikationen der Rezeptorproteine durch N-Glykosylierung wurden durch Inkubation mit der Endoglykosidase PNGase F überprüft, wobei kein Effekte auftraten (Daten nicht gezeigt). Die berechnete molekulare Masse des PeaDop2A-Rezeptors beträgt 57,7 kDa, die des PeaDop2B-Rezeptors 51,1 kDa. Der Unterschied zwischen dem berechneten und dem apparenten Molekulargewicht beträgt für beide Varianten wenige kDa und ist möglicherweise auf eine rasche Prozessierung der Rezeptorproteine *in vivo* oder auf ein verändertes Laufverhalten der Rezeptorproteine aufgrund von strukturellen Besonderheiten zurückzuführen. Es kann jedoch nicht zweifelsfrei ausgeschlossen werden, dass es sich bei dem etwa 46 kDa großen Protein um ein Proteolyseprodukt des PeaDop2A-Rezeptors handelt und die trunkierte Variante PeaDop2B möglicherweise nicht translatiert wird. Weiterhin wurden auch im Unterschlundganglion sowie den Thorakalganglien zwei Banden durch den Rezeptor-spezifischen anti-PeaDop2-Antikörper erkannt, während in den Abdominalganglien und im Terminalganglion keine Banden detektiert wurden (Abb. 3.27B).

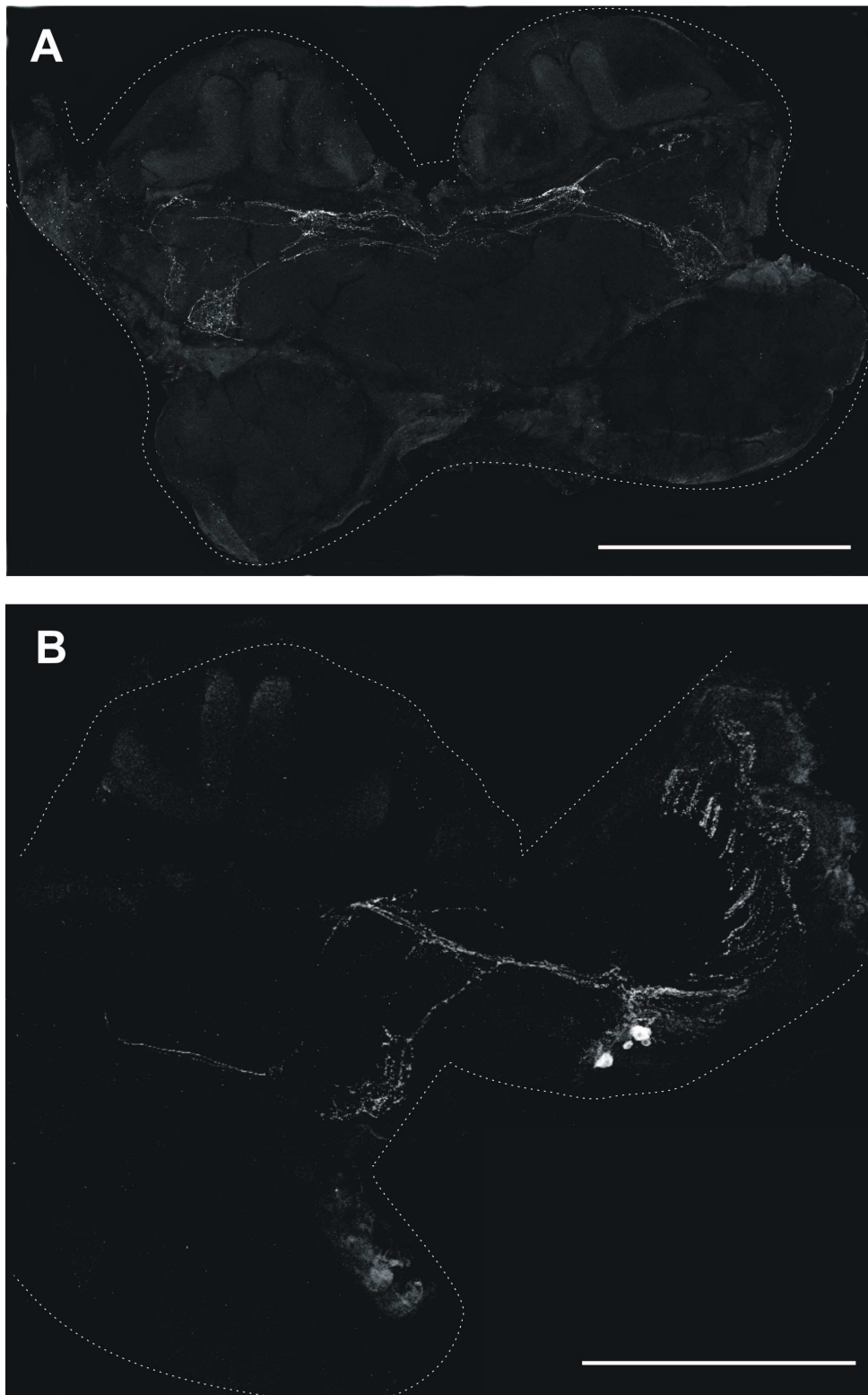




**Abbildung 3.27: Western-Blot-Analyse mit dem anti-PeaDop2-Antikörper.** Die Angabe des Markers befindet sich jeweils links (in kDa). **(A) Western-Blot-Analyse zur Verteilung des PeaDop2-Rezeptors.** Auf jede Bahn wurden 10  $\mu$ l Homogenat des Gehirns (G) bzw. der Speicheldrüse (S) aufgetragen. Die Inkubation des Western-Blots erfolgte mit dem anti-PeaDop2-Antikörper (1:8.000) bzw. mit dem anti-PeaDop2-Antikörper nach Präabsorption (+) mit dem Fusionsprotein (15  $\mu$ g/ml) für 1 h bei 4 °C. Als sekundärer Antikörper wurde *goat-anti-rabbit*-HRP in einer Verdünnung von 1:20.000 eingesetzt. **(B) Western-Blot-Analyse zur Verteilung des PeaDop2-Rezeptors im Nervensystem.** Auf jede Bahn wurden 10  $\mu$ g Membranproteine des Gehirns (G) bzw. der Ganglien aufgetragen: Gehirn (Bahn 1), Unterschlundganglion (Bahn 2), Thorakalganglien (Bahn 3), Abdominalganglien (Bahn 4), Terminalganglion (Bahn 5). Die Inkubation der Western-Blots erfolgte mit dem primären Antikörper anti-PeaDop2 (1:8.000) und dem sekundären Antikörper *goat-anti-rabbit*-HRP (1:20.000).

### 3.2.6 Immunhistologische Lokalisation des PeaDop2-Rezeptors im Gehirn

Die Verteilung des PeaDop2-Rezeptors im Gehirn von *P. americana* wurde an Gefrierschnitten untersucht. Zur Detektion des Rezeptors wurde der spezifische polyklonale anti-PeaDop2-Antikörper eingesetzt. Der Nachweis der gebundenen primären Antikörper erfolgte über einen Alexa488-konjugierten *goat-anti-rabbit* Sekundärantikörper. In anterioren Frontalschnitten des Gehirns von *P. americana* wird ein Netzwerk von Fasern im ventrolateralen Protocerebrum markiert sowie Kommissuren, die unterhalb der Pilzkörper verlaufen (Abb. 3.28A). In zentralen Schnitten werden zusätzlich prominente Markierungen in weiten Teilen der optischen Loben beobachtet. Eine Gruppe von deutlich markierten Zellenkörpern innerhalb der Medulla sendet ihre Ausläufer zum einen strahlenförmig über die Medulla (nicht gezeigt) in die Lamina (Abb. 3.28B) und zum anderen ziehen Fasern in das ventrolaterale Protocerebrum und die optische Kommissur (Abb. 3.28A/B).



**Abbildung 3.28: Immunhistochemische Lokalisation des PeaDop2-Rezeptors in Gefrierschnitten des Gehirns von *P. americana*.** Gefrierschnitte (20  $\mu\text{m}$ ) des Gehirns wurden mit dem Primärantikörper anti-PeaDop2 (1:500) markiert, der Cy2-konjugierte sekundäre anti-*rabbit* Antikörper wurde durch Blaulichtanregung sichtbar gemacht. Die Bilder repräsentieren eine Projektion von Bildstapeln und entsprechen etwa 10  $\mu\text{m}$ . Der Maßstabsbalken entspricht 500  $\mu\text{m}$ . **(A)** In anterioren Frontalschnitten werden Fasernetzwerke im Protocerebrum markiert. **(B)** Zentrale Frontalschnitte zeigen deutlich markierte Zellkörper und Fasern im optischen Lobus sowie Fasern im Protocerebrum.

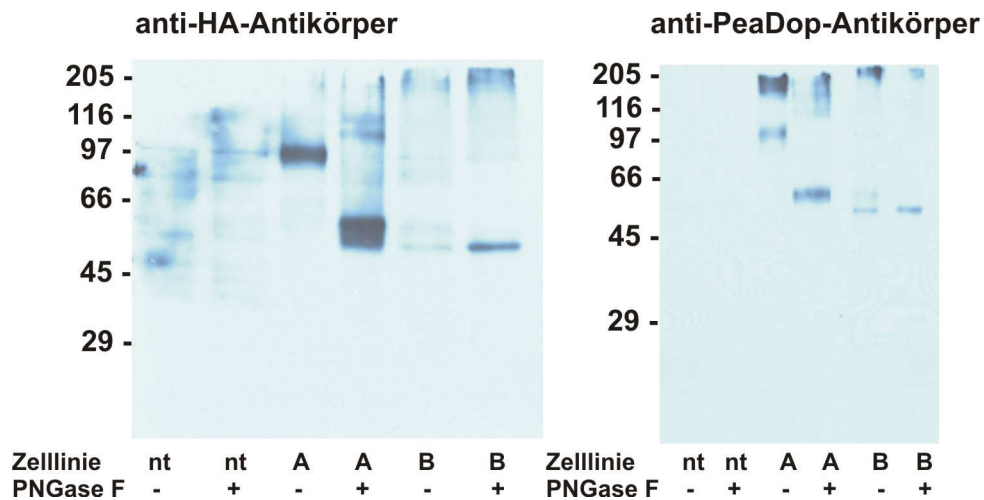
### 3.2.7 Funktionelle Expression des PeaDop2-Rezeptorproteins in HEK 293-Zellen

Die Aktivierung von Dopaminrezeptoren der INDR-Klasse führt über eine Kopplung an  $G_s$  Proteine zu einer Erhöhung der  $[cAMP]_i$  (MUSTARD ET AL. 2005). Für eine umfassende funktionelle und pharmakologische Charakterisierung des PeaDop2A- und des PeaDop2B-Rezeptors wurden HEK 293-Zellen mit den entsprechenden Expressionsvektoren transfiziert und stabile Zelllinien hergestellt.

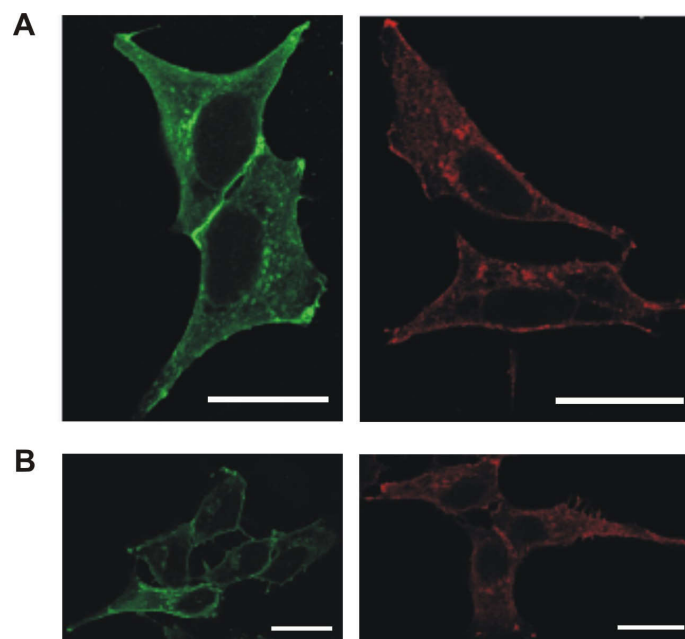
#### Immunologischer Nachweis des heterolog exprimierten PeaDop2-Rezeptors

Zum Nachweis der Expression des PeaDop2A/B-Proteins in HEK 293-Zellen wurde sowohl der anti-PeaDop2-Antikörper als auch ein anti-HA-Antikörper verwendet (Abb. 3.29). Es wurden beide stabil transfizierte Zelllinien (PeaDop2A und PeaDop2B) sowie nicht transfizierte HEK 293-Zellen untersucht. Zum einen erfolgte der Nachweis der Proteinexpression im Western-Blot und zum anderen immunocytochemisch an fixierten Zellen. Für die Western-Blot-Analyse wurden Membranproteine präpariert und ein Teil der Proteine mit PNGase F inkubiert. In Fraktionen der Membranproteine der PeaDop2A-Zelllinien markiert der anti-PeaDop2-Antikörper eine Proteinbanden von etwa 97 kDa und einen breiten diffusen Bereich bei 200 kDa (Abb. 3.29). Im Fall der PeaDop2S-Zelllinie lag eine Bande im Bereich von 50 kDa. Mehrere schwache Banden wurden in höheren Molekulargewichtsbereichen detektiert. Nach Deglykosylierung mit PNGase F detektiert der Antikörper jeweils eine einzelne Bande in einem Molekulargewichtsbereich von ca. 60 kDa in der Fraktion der PeaDop2A-Zelllinie bzw. 50 kDa in der Fraktion der PeaDop2B-Zelllinie. Diese Größe stimmt sowohl für PeaDop2A als auch PeaDop2B gut mit den berechneten Größen der unmodifizierten Rezeptorproteine von 57,7 kDa bzw. 51,1 kDa überein. Offensichtlich werden beide Rezeptorisoformen in HEK 293-Zellen stark glykosyliert. Die Expression des PeaDop2B-Rezeptors ist insgesamt jedoch deutlich geringer als die des PeaDop2A-Rezeptors. In den Spuren des Western-Blots, die Membranproteine nicht transfizierter HEK 293-Zellen enthielten, erkennt der anti-PeaDop2-Antikörper kein Protein. Da die PeaDop2(A/B)-Rezeptoren mit einem HA-Tag modifiziert waren, wurde ein identischer Western-Blot mit einem anti-HA-Antikörper inkubiert (Abb. 3.29). Dieses Experiment lieferte Ergebnisse, die mit denen für den anti-PeaDop2-Antikörper beschriebenen übereinstimmen.

Fixierte stabil transfizierte HEK 293-Zellen wurden mit dem anti-HA-Antikörper sowie dem anti-PeaDop2-Antikörper inkubiert, um die Expression und Verteilung des PeaDop2A/B-Rezeptors in den Zellen zu dokumentieren (Abb. 3.30). In beiden untersuchten Zelllinien konnte das Rezeptorprotein sowohl durch den anti-PeaDop2-Antikörper als auch durch den anti-HA-Antikörper nachgewiesen werden. In nicht transfizierten Zellen führten die entsprechenden Inkubationen mit beiden Antikörpern zu keiner Färbung (nicht gezeigt).



**Abbildung 3.29: Western-Blot-Analyse von Membranproteinen von PeaDop2A/B-transfizierten HEK 293-Zellen und nicht transfizierten HEK 293-Zellen (nt).** Auf jede Bahn wurden 8  $\mu$ g der entsprechenden Membranproteinfraction aufgetragen. Dabei wurde je eine der Proben mit PNGase F behandelt (+), die andere nicht (-). Der Molekulargewichtsstandard (in kDa) ist jeweils links angegeben. Die Inkubation des Western-Blots erfolgte mit dem anti-HA-Antikörper (1:1.000) und dem sekundären Antikörper *goat-anti-rat* HRP (1:10.000) bzw. mit dem anti-PeaDop2-Antikörper (1:8.000) und dem sekundären Antikörper *goat-anti-rabbit* HRP (1:20.000).

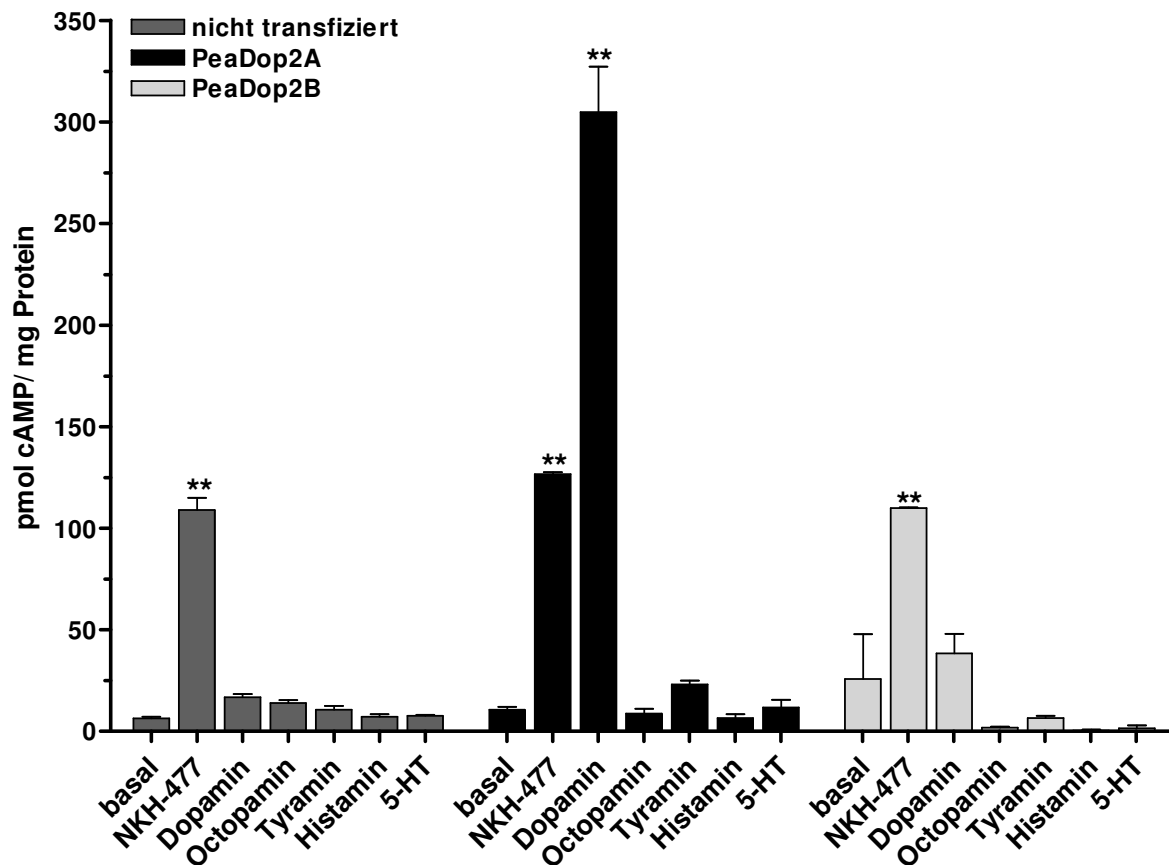


**Abbildung 3.30: Immunhistochemischer Nachweis des PeaDop2A-Rezeptors (A) bzw. des PeaDop2B-Rezeptors (B) in stabil transfizierten HEK 293-Zellen.** Links: Inkubation der Zellen mit dem anti-PeaDop2-Antikörper (1:500). Der Cy2-konjugierte sekundäre *anti-rabbit* Antikörper (1:100) wurde durch Blaulichtanregung sichtbar gemacht. Rechts: Inkubation der Zellen mit dem anti-HA-Antikörper (1:10.000). Der Cy3-konjugierte sekundäre *anti-rat* Antikörper (1:400) wurde durch Grünlichtanregung sichtbar gemacht. Maßstabsbalken entspricht 20  $\mu$ m.

### Ligandenspezifität der PeaDop2A/B-Rezeptoren

Stabil mit pcPeadop2A bzw. pcPeadop2B transfizierte HEK 293-Zellen wurden in Anwesenheit des Phosphodiesterase-Inhibitors IBMX (100  $\mu\text{M}$ ) mit verschiedenen biogenen Aminen inkubiert (Abb. 3.31). Die von den Zellen gebildete cAMP-Menge wurde anschließend bestimmt. Die Inkubation der PeaDop2A-Zelllinie mit 10  $\mu\text{M}$  Dopamin führte zu einem deutlichen Anstieg der cAMP-Produktion auf 300 pmol/mg Protein. Hingegen bewirkte die Inkubation mit 10  $\mu\text{M}$  Octopamin, Tyramin, Histamin oder Serotonin keine oder eine nur sehr geringe Änderung der  $[\text{cAMP}]_i$ . Die PeaDop2B-Zelllinie zeigte bei einer Inkubation mit 10  $\mu\text{M}$  Dopamin nur eine sehr geringe Erhöhung der  $[\text{cAMP}]_i$  auf etwa 38 pmol/mg, die sich nicht signifikant von der vergleichsweise hohen basalen Konzentration unterschied. Auch alle weiteren getesteten biogenen Amine führten zu keinen signifikanten Änderungen der  $[\text{cAMP}]_i$  in pcPeadop2B-transfizierten Zellen. Die prinzipielle Funktionalität des AC-Systems der PeaDop2B-Zelllinie wurde durch die Inkubation mit dem AC-Aktivator NKH-477 (10  $\mu\text{M}$ ) gezeigt. Diese Substanz bewirkte sowohl in der Peadop2B- als auch in PeaDop2A-Zelllinie sowie in nicht transfizierten Zellen einen Anstieg der  $[\text{cAMP}]_i$  auf 100-125 pmol/mg Protein. In parallelen Experimenten wurde gezeigt, dass an nicht transfizierten HEK 293-Zellen keines der getesteten biogenen Amine einen Einfluss auf die  $[\text{cAMP}]_i$  hat (Abb. 3.31).

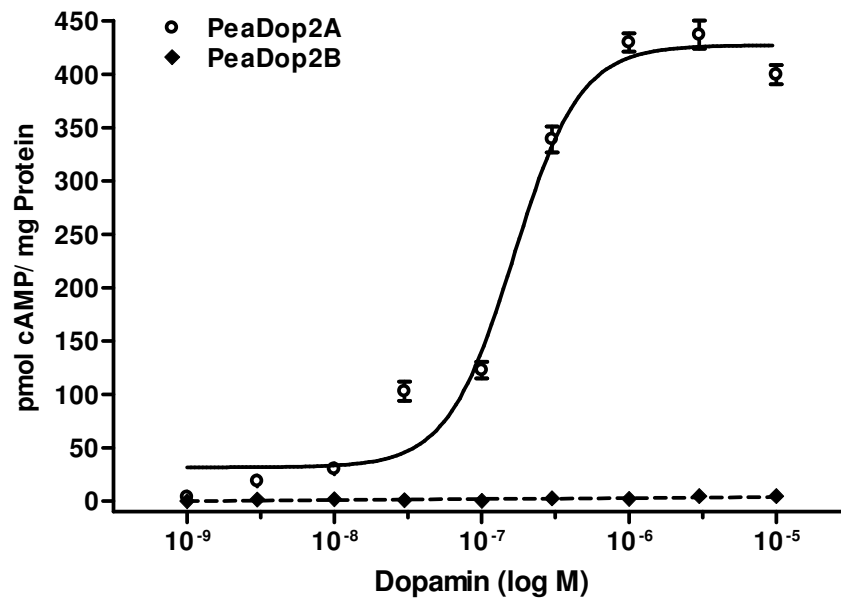
Eine kurze C-terminale Region gilt als Charakteristikum für Rezeptoren, die negativ an die AC koppeln. Daher wurde untersucht, ob Dopamin in PeaDop2B-exprimierenden Zellen nach Stimulation der AC mit NKH-477 eine reduzierende Wirkung ausübt. Jedoch zeigte weder die PeaDop2B-Zelllinie noch die parallel untersuchte PeaDop2A-Zelllinie nach Koinkubation von NKH-477 und Dopamin eine Verminderung der NKH-477-stimulierten cAMP-Produktion (Daten nicht gezeigt).



**Abbildung 3.31: Einfluss biogener Amine auf die  $[cAMP]_i$  PeaDop2A/B-exprimierenden HEK 293-Zellen.** Es wurden HEK 293-Zellen, die den PeaDop2A- bzw. den PeaDop2B-Rezeptor stabil exprimieren, und nicht transfizierte Zellen mit den angegebenen Liganden ( $10 \mu M$ ) inkubiert. Dargestellt ist die ermittelte cAMP-Konzentration im Verhältnis zur Proteinmenge. Alle Messungen erfolgten in Gegenwart von IBMX ( $100 \mu M$ ). Um die basale  $[cAMP]_i$  zu ermitteln, erfolgte eine Inkubation mit  $100 \mu M$  IBMX ohne weitere Liganden. Die dargestellten Werte sind Mittelwerte aus Vierfachbestimmungen. Die Fehlerbalken stellen den Standardfehler dar. (\*\*) zeigt statistisch signifikante Unterschiede zwischen der basalen  $[cAMP]_i$  und der Liganden-induzierten  $[cAMP]_i$  der jeweiligen Zelllinie an. Die statistische Auswertung basiert auf einer *one-way* ANOVA gefolgt von *Dunnett's multiple comparison* Test \*\*  $p < 0,01$ .

### Konzentrationsabhängigkeit der cAMP-Produktion

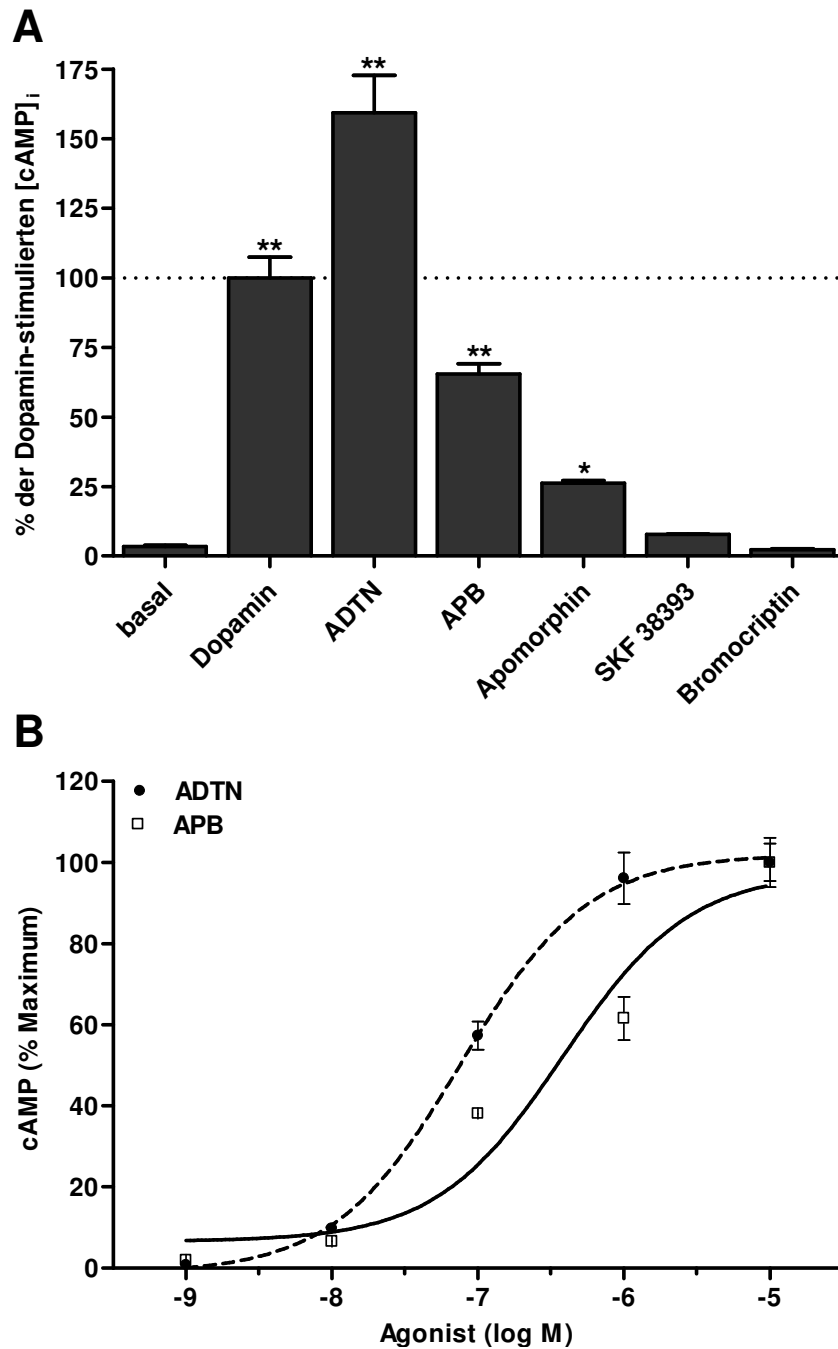
Dosis-Wirkungs-Kurven für die Zelllinien PeaDop2A und PeaDop2B wurden über einen Bereich von  $1 \text{ nM}$  bis  $10 \mu M$  Dopamin ermittelt (Abb. 3.32). Es bestätigte sich, dass die PeaDop2B-Zelllinie auf Dopamin-Stimulation nicht mit einer Erhöhung der  $[cAMP]_i$  reagiert. Hingegen zeigten die PeaDop2A-exprimierenden HEK 293-Zellen als Antwort auf eine Dopamin-Stimulation eine dosisabhängig Erhöhung der  $[cAMP]_i$ . Dabei wurde die halbmaximale Erhöhung der cAMP-Produktion ( $EC_{50}$ ) bei einer Dopamin-Konzentration von  $160 \text{ nM}$  hervorgerufen ( $\log EC_{50} = -6,78 \pm 0,04$ : Mittelwert  $\pm$  Standardfehler). Die maximale Erhöhung der cAMP-Produktion auf etwa  $430 \text{ pmol/mg Protein}$  wurde mit Dopamin-Konzentrationen  $\geq 1 \mu M$  erreicht. Parallel wurde gezeigt, dass keine der getesteten Dopamin-Konzentrationen Einfluss auf die  $[cAMP]_i$  nicht transfizierter Zellen hat (Daten nicht gezeigt).



**Abbildung 3.32: Messung der  $[cAMP]_i$  in Abhängigkeit der Dopamin-Konzentration.** Die PeaDop2A- sowie die PeaDop2B-Rezeptor-Zelllinie wurden mit steigenden Dopamin-Konzentrationen ( $10^{-9}$  bis  $10^{-5}$  M) inkubiert. Dargestellt sind Mittelwerte aus Vierfachbestimmungen. Die Fehlerbalken stellen die Standardfehler dar, jedoch sind diese zum Teil so gering, dass sie nicht zu sehen sind.

### Wirkungen von Agonisten und Antagonisten

Auf eine weitere Charakterisierung der PeaDop2B-Zelllinie wurde aufgrund der vorangegangenen Ergebnisse verzichtet. In den folgenden Experimenten wurde die PeaDop2A-Zelllinie zur Erstellung eines pharmakologischen Profils untersucht. Alle getesteten Substanzen wurden in parallelen Experimenten auf ihre Wirkung an nicht transfizierten HEK 293-Zellen getestet, wobei keinerlei Wirkung auf die  $[cAMP]_i$  der Zellen beobachtet wurde (Daten nicht gezeigt). Hinsichtlich der PeaDop2A-exprimierenden Zellen beziehen sich die folgenden Prozentangaben auf den gemessenen  $[cAMP]_i$ -Maximalwert in Gegenwart von  $10 \mu\text{M}$  Dopamin (Abb. 3.33A). Der Dopaminrezeptoragonist 6,7-ADTN erwies sich als hoch potenter Agonist am PeaDop2A-Rezeptor. 6,7-ADTN bewirkte eine Erhöhung der  $[cAMP]_i$  auf 160 % und ist damit wirksamer als der native Ligand des Rezeptors. Der nicht selektive Dopaminrezeptoragonist Apomorphin und der D1-Rezeptoragonist 6-Chloro-APB wirkten ebenfalls agonistisch und führten zu einer Erhöhung der cAMP-Produktion auf 26 % bzw. 66 %. Hingegen zeigten weder der hoch selektive D1-Rezeptoragonist SKF 38393 noch der D2-Rezeptoragonist Bromocriptin eine stimulierende Wirkung auf die cAMP-Produktion in PeaDop2A-exprimierenden Zellen.

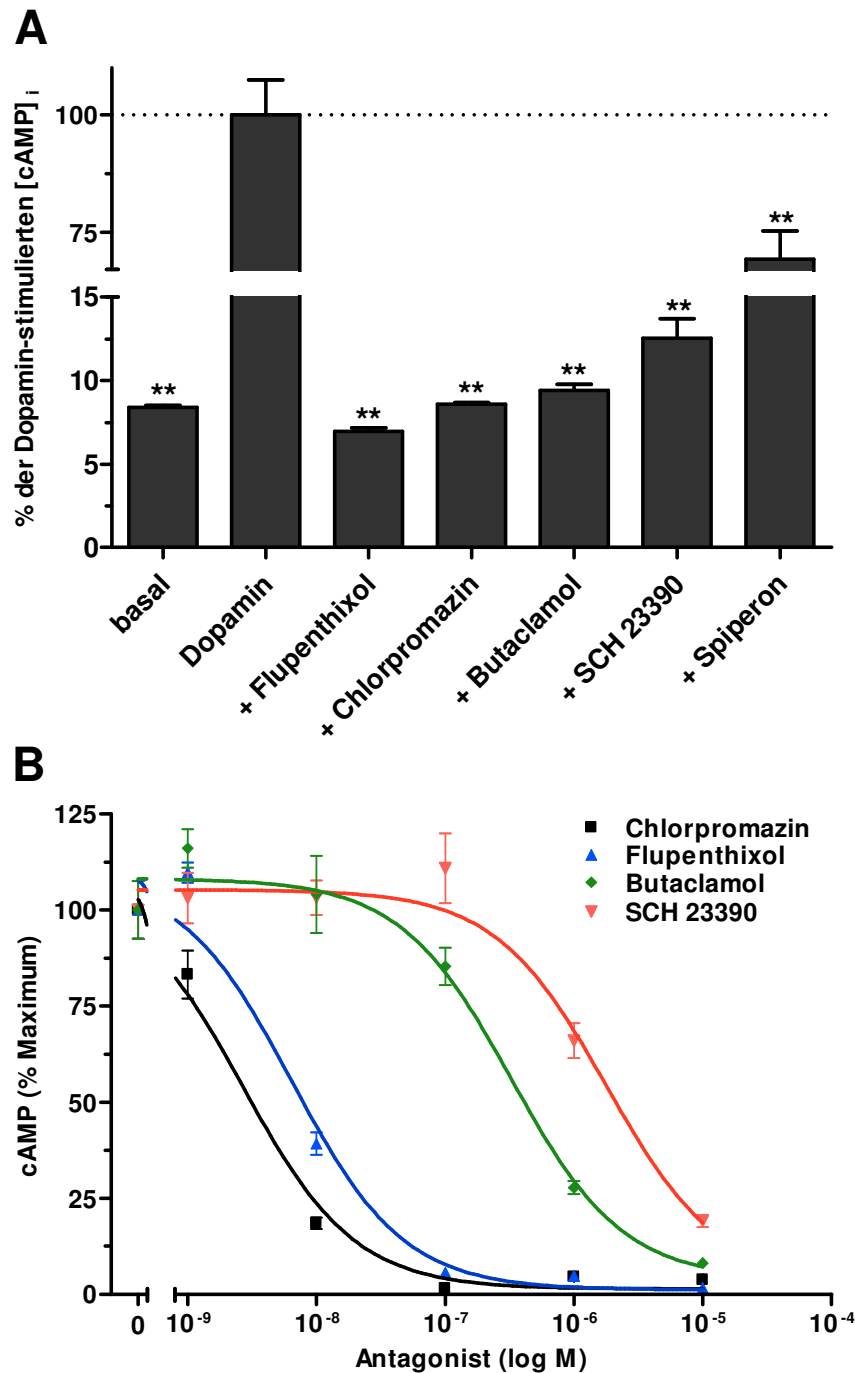


**Abbildung 3.33: Einfluss von Dopaminrezeptoragonisten auf die cAMP-Produktion in pcPeaDop2A-transfizierten HEK 293-Zellen.** Es sind Mittelwerte aus Vierfachbestimmungen dargestellt. Die Fehlerbalken geben die Standardfehler an. **(A)** Die Agonisten wurden in einer Konzentration von 10  $\mu$ M eingesetzt. Die Prozentangaben beziehen sich auf den gemessenen [cAMP]<sub>i</sub>-Maximalwert in Gegenwart von 10  $\mu$ M Dopamin (100 %). (\*\*\*) zeigt statistisch signifikante Unterschiede zwischen der basalen [cAMP]<sub>i</sub> und der Liganden-induzierten [cAMP]<sub>i</sub> an. Die statistische Auswertung basiert auf einer *one-way* ANOVA gefolgt von *Dunnnett's multiple comparison* Test \*\*  $p < 0,01$ ; \*  $p < 0,05$ . **(B)** Die PeaDop2A-Rezeptor-Zelllinien wurden mit steigenden Konzentrationen ( $10^{-9}$  bis  $10^{-5}$  M) der Agonisten 6,7-ADTN bzw. 6-Chloro-APB inkubiert. Die prozentualen Angaben beziehen sich auf die durch 10  $\mu$ M 6,7-ADTN bzw. 6-Chloro-APB erzielte maximale [cAMP]<sub>i</sub>.



Die agonistischen Wirkungen von 6,7-ADTN und des partiellen Agonisten 6-Chloro-APB wurden in einem Konzentrationsbereich von 1 nM bis 10  $\mu$ M untersucht (Abb. 3.33B). Beide Substanzen induzierten eine konzentrationsabhängige Erhöhung der cAMP-Synthese. Während die Wirkung von 6,7-ADTN bei Konzentrationen  $> 1 \mu$ M bereits im Bereich der Sättigung liegt, konnte dies für 6-Chloro-APB nicht eindeutig gezeigt werden.

Antagonisten wurden in Konzentrationen von 10  $\mu$ M in Anwesenheit von 300 nM Dopamin getestet (Abb. 3.34A). Für die Bestimmung der basalen  $[cAMP]_i$  (8,6 %) wurden die Zellen mit 100  $\mu$ M IBMX in Abwesenheit weiterer Liganden inkubiert. Der stimulierende Effekt von Dopamin (100 %) konnte zum einen durch nicht selektive Dopaminrezeptorantagonisten wie Flupenthixol (7,0 %) und Butaclamol (9,4 %) blockiert werden. Zum anderen konnte die durch Dopamin-induzierte cAMP-Produktion auch durch Chlorpromazin (8,6 %), einen Antagonisten an D2-Rezeptoren, und SCH 23390 (12,5 %), einen Antagonisten an D1-Rezeptoren, gehemmt werden. Auch Spiperon, ein Agonist an 5-HT<sub>2A</sub>- und D2-ähnlichen-Rezeptoren, verminderte die Dopamin-induzierte cAMP-Produktion, jedoch lediglich auf etwa 70 % der Gesamtantwort. Für die hochwirksamen Antagonisten wurden Dosis-Wirkungs-Kurven aufgenommen (Abb. 3.34B). Die prozentualen Angaben beziehen sich auf die maximale  $[cAMP]_i$ , welche durch 300 nM Dopamin in Abwesenheit von Antagonisten induziert wurde. Chlorpromazin zeigte als einziger Antagonist bereits bei der sehr geringen Konzentration von 1 nM eine antagonistische Wirkung auf die  $[cAMP]_i$  ( $[cAMP]_i = 83 \%$ ). In Gegenwart von 10 nM Chlorpromazin sank die  $[cAMP]_i$  auf 19 %. Ein weiterer hochpotenter Antagonist ist Flupenthixol. Bei einer Konzentration von 10 nM wurde die Dopamin-induzierte  $[cAMP]_i$  auf etwa 40 % vermindert. Sowohl Chlorpromazin als auch Flupenthixol blockieren in Konzentrationen  $\geq 1 \mu$ M die durch 300 nM Dopamin induzierte cAMP-Synthese vollständig. Hingegen zeigten Butaclamol und SCH 23390 erst ab Konzentrationen  $\geq 1 \mu$ M eine hemmende Wirkung auf die Dopamin-induzierte cAMP-Produktion.



**Abbildung 3.34: Einfluss von Dopaminrezeptorantagonisten auf die Dopamin-induzierte cAMP-Produktion.** Es sind Mittelwerte aus Vierfachbestimmungen dargestellt. Die Fehlerbalken geben die Standardfehler an. **(A)** Die Antagonisten wurden in Konzentrationen von 10  $\mu$ M in Anwesenheit von 300 nM Dopamin eingesetzt. Die Prozentangaben beziehen sich auf den gemessenen [cAMP]<sub>i</sub>-Maximalwert in Gegenwart von 300 nM Dopamin (100 %). (\*\*) zeigt statistisch signifikante Unterschiede zwischen der Dopamin-induzierten [cAMP]<sub>i</sub> und der Antagonisten-modulierten [cAMP]<sub>i</sub> an. Die statistische Auswertung basiert auf einer *one-way* ANOVA gefolgt von *Dunnett's multiple comparison* Test \*\*  $p < 0,01$ . **(B)** Die PeaDop2A-Rezeptorzelllinien wurden auf einem Hintergrund von 300 nM Dopamin mit steigenden Konzentrationen (10<sup>-9</sup> bis 10<sup>-5</sup> M) verschiedener Antagonisten inkubiert.

## 4 DISKUSSION

G-Protein-gekoppelte-Rezeptoren sind evolutiv sehr alte Strukturen und bilden die größte und vielfältigste Supergenfamilie für membranständige Rezeptoren. Sie sind bei diversen Aspekten der Interaktion eines Lebewesens und der Perzeption seiner Umwelt sowie bei zahllosen Kommunikationsprozessen innerhalb eines Organismus von Bedeutung und spielen somit eine elementare Rolle bei einer Vielzahl physiologischer und neurologischer Vorgänge. Die Transduktion der Information erfolgt bei allen GPCRs nach einem einheitlichen Prinzip: Die Bindung des spezifischen Liganden induziert eine Konformationsänderung des Rezeptorproteins und aktiviert intrazelluläre heterotrimere G-Proteine und/oder G-Protein-unabhängige Signalwege (KOBILKA 2007, LUTTRELL 2008). Eine Unterfamilie der Rhodopsin-Rezeptoren bilden die aminergen Rezeptoren. Die biogenen Amine Dopamin und Serotonin kommen sowohl bei Vertebraten als auch bei Invertebraten vor und regulieren und modulieren in den verschiedensten Tierstämmen zahlreiche physiologische Funktionen und Verhaltensweisen (EVANS 1980, WEIGER 1997, SCHEINER ET AL. 2006). Bei Säugetieren werden die vielfältigen Wirkungen von Serotonin durch 13 verschiedene GPCRs und einen Gruppe Liganden-gesteuerter Ionenkanäle vermittelt. (BARNES & SHARP 1999, HANNON & HOYER 2008, NICHOLS & NICHOLS 2008). Bei den Dopaminrezeptoren werden fünf Typen unterschieden ( $D_1$ – $D_5$ ), welche in zwei Klassen, die  $D_1$ -ähnlichen und die  $D_2$ -ähnlichen Rezeptoren, zusammengefasst werden (MISSALE ET AL. 1998, NEVE ET AL. 2004). Anhand von Genomanalysen sowie pharmakologischen und physiologischen Untersuchungen wird angenommen, dass bei Insekten ein ähnlich komplexes aminerges System existiert (TIERNEY 2001, BLENAU & BAUMANN 2001, MUSTARD ET AL. 2005). Bis zum jetzigen Zeitpunkt wurden vier Serotoninrezeptoren aus dem klassischen Modellorganismus *Drosophila melanogaster* (WITZ ET AL. 1990, SAUDOU ET AL. 1992, COLAS ET AL. 1995) sowie Serotoninrezeptoren aus zahlreichen weiteren Insekten beschrieben (siehe Einleitung Tab. 1.1). Insgesamt drei Dopaminrezeptoren, zwei  $D_1$  ähnliche und ein  $D_2$ -ähnlicher Rezeptor, sind aus *D. melanogaster* (GOTZES ET AL. 1994, SUGAMORI ET AL. 1995, FENG ET AL. 1996, HAN ET AL. 1996, HEARN ET AL. 2002) sowie *A. mellifera* (BLENAU ET AL. 1998, HUMPHRIES ET AL. 2003, BEGGS ET AL. 2005) charakterisiert.  $D_1$ -ähnliche Rezeptoren sind auch aus weiteren Insekten bereits kloniert und charakterisiert (siehe Einleitung Tab.1.2). Aus der Amerikanischen Großschabe *Periplaneta americana* sind bis zum jetzigen Zeitpunkt zwei aminerge Rezeptoren bekannt, ein Octopaminrezeptor (BISCHOF & ENAN 2004) sowie ein Tyraminrezeptor (ROTTE ET AL. 2009b), jedoch sind bisher weder Serotonin- noch

Dopaminrezeptoren molekular charakterisiert. Zahlreiche physiologische und neurobiologische Studien an dem Modellorganismus *P. americana* haben einen Beitrag zum Verständnis der diversen Funktionen des aminergen Systems auf zellulärer und physiologischer Ebene im Reich der Insekten geleistet (siehe Einleitung 1.4). Für die Aufklärung dieser Vielfalt von Funktionen auch auf molekularer Ebene und zur Bereitstellung von Grundlagen für gezielte molekulare Experimente zur funktionellen Überprüfung der physiologischen Hypothesen, ist die Kenntnis der beteiligten Rezeptorklassen sowie die zelluläre Lokalisation identifizierter Rezeptoren und somit der funktionellen Organisation des aminergen Systems von grundlegender Bedeutung. Daher war das Ziel der vorliegenden Arbeit, die cDNAs serotonerger und dopaminerger Rezeptoren aus *Periplaneta americana* zu klonieren, die Rezeptoren funktionell zu charakterisieren und ihr Expressionsprofil aufzuklären.

Die folgende Diskussion gliedert sich in vier Abschnitte: Im ersten Abschnitt werden die strukturellen Eigenschaften der cDNAs, sowie der Aminosäuresequenz der untersuchten aminergen Rezeptoren erläutert. Basierend auf diesen Sequenzinformationen der einzelnen Rezeptoren werden diese phylogenetisch eingeordnet. Im zweiten Teil wird die funktionelle Kopplung der Rezeptoren an intrazelluläre Signalwege sowie die Pharmakologie der Rezeptoren diskutiert. Der dritte Teil enthält die Diskussion der Expression der mRNAs der Rezeptoren und die Verteilung der Rezeptorproteine im Gehirn. Begleitend werden mögliche *in vivo* Funktionen der Rezeptoren in *P. americana* diskutiert. Abschließend folgt ein Ausblick auf mögliche weiterführende experimentelle Aspekte dieses Projekts.

## 4.1 Strukturelle Eigenschaften der aminergen Rezeptoren

Die große Sequenzhomologie innerhalb der hoch konservierten TMs von Mitgliedern der GPCR-Superfamilie ermöglichte die Identifizierung und Isolierung homologer Sequenzen aus derselben oder aus anderen Spezies (z. B. KOBILKA ET AL. 1987, WITZ ET AL. 1990, BARD ET AL. 1993, FENG & GREGOR 1997, O'DOWD ET AL. 1997, BLENAU ET AL. 1998, CLARK ET AL. 2004). Mehrere Genome von Invertebraten sind bereits entschlüsselt worden, darunter befinden sich zahlreiche Genome holometaboler Insekten wie dem des klassischen genetischen Modellorganismus *D. melanogaster* (ADAMS ET AL. 2000, HOLT ET AL. 2002, HONEYBEE GENOME SEQUENCING CONSORTIUM 2006, NENE ET AL. 2007, *TRIBOLIUM* GENOME SEQUENCING CONSORTIUM 2008). Das Genom von *P. americana* oder nahe verwandten Arten ist zum jetzigen Zeitpunkt noch nicht bekannt. Basierend auf den beschriebenen bemerkenswerten Sequenzhomologien wurden in der vorliegenden Arbeit mithilfe verschiedener PCR-Techniken aminerge Rezeptoren der Amerikanischen Schabe *Periplaneta americana* kloniert und strukturell analysiert.

### 4.1.1 Alternative Spleißvarianten von GPCRs

Alternatives Spleißen ist ein evolutionär bedeutsamer posttranskriptionaler Mechanismus, der die Flexibilität der Genexpression und die zeitliche und räumliche Diversität des Transkriptoms in Eukaryoten erhöht (BOUE ET AL. 2003). Während einige alternative Spleißereignisse grundlegend vorhanden sind und zu einem konstanten Auftreten von alternativen mRNA-Varianten führen, werden andere Spleißereignisse durch Entwicklungsprozesse oder physiologische Zusammenhänge reguliert. Die resultierende Entstehung neuer Proteine ermöglicht es den Organismen, sich veränderten Lebensbedingungen anzupassen.

Bei Eukaryoten besitzt die genomische DNA kodierende Regionen (Exons), welche von intervenierenden, nicht kodierenden Sequenzen (Introns) unterbrochen werden. Die Introns werden aus der neu synthetisierten RNA durch Spleißen an konservierten Nukleotidsequenzen entfernt und die angrenzenden Exons miteinander verknüpft. Für das Spleißen der prä-mRNA gibt es Konsensus-Nukleotidsequenzen, so dass bei Vertebraten Exon/Intron-Grenzen anhand ihrer Sequenzabfolge detektiert werden können. Diese Sequenzen variieren allerdings sehr stark, so dass eine exakte Vorhersage von Spleißereignissen in einem Genom nicht möglich ist (BLACK 2000, BOUE ET AL. 2003).

Im Vergleich zu anderen Proteinfamilien fehlen vergleichsweise vielen GPCRs der Säugetiere Introns innerhalb des ORF (> 90 %), während bei Invertebraten deutlich mehr GPCRs Introns aufweisen. Die ursächlichen Hintergründe für dieses Phänomen sind jedoch unbekannt (GENTLES & KARLIN 1999). Dessen ungeachtet gibt es eine Reihe von GPCRs von denen Spleißvarianten sowohl aus Invertebraten als auch Vertebraten

bekannt sind, darunter auch Dopaminrezeptoren (MONSMA ET AL. 1989, HIRASAWA ET AL. 1995, HEARN ET AL. 2002, SUGIURA ET AL. 2005, CLARK & BARO 2007, EINSTEIN ET AL. 2008). Für diverse alternative Spleißvarianten wurden Unterschiede in Bezug auf ihre Verteilungsmuster auf der Ebene von Zellen und auch Geweben beschrieben. Weiterhin wurden differente Eigenschaften in Hinblick auf die Bindung des Liganden, die Kopplung an G-Proteine und die resultierenden Aktivierung von Signalwegen beobachtet (KILPATRICK ET AL. 1999, MINNEMAN 2001).

### **Alternatives Spleißen des PeaDop2-Rezeptors**

Bei der Klonierung der PeaDop2-Rezeptor-cDNA wurden zwei Varianten isoliert, die sich in der Länge der C-terminalen Region unterscheiden. Anhand von Studien an der Klasse der INDRs konnten ONO und YOSHIKAWA (2004) zeigen, dass die genomische Struktur dieser Rezeptorklasse innerhalb der kodierenden Sequenzbereiche hoch konserviert ist. Demzufolge wird ein großer Teil des Rezeptorproteins, beginnend am N-Terminus bis einschließlich der TM 7, durch Exon 1 kodiert, während die C-terminale Region durch die Exons 2 und 3 kodiert wird. Vergleichend konnte an der Divergenzstelle der beiden Isoformen der Peadop2-cDNA eine wahrscheinliche Spleißstelle identifiziert werden. Eine genaue Übereinstimmung mit der Konsensusstruktur für Vertebraten-Spleißstellen konnte nicht identifiziert werden, jedoch wurden die bei dem orthologen Rezeptor aus *D. melanogaster* auftretenden Sequenz-Motive an den Exon/Intron-Grenzen in der vorliegenden Sequenz des Peadop2-Rezeptors detektiert. Entsprechend wäre der PeaDop2A-Rezeptor aus allen drei prognostizierten Exons aufgebaut. Demgegenüber würde der PeaDop2B-Rezeptor hypothetisch durch individuelles Spleißen des Exons 1 und Intron-*Retention* entstehen, dies wird basierend auf der identifizierten Spleißdonorstelle mit konservierter Intronsequenz und anschließendem Stopp-Kodon postuliert (Abb. 3.22). Bei dem orthologen Rezeptor aus dem Katzenfloh *Ctenocephalides felis* wurden ebenfalls mehrere Spleißvarianten beschrieben, die sich lediglich in der Länge des C-Terminus unterscheiden (GERBER ET AL. 2006) und aufgrund der Divergenzstellen der Varianten die Hypothese der konservierten genomischen Struktur bestätigen. Die längste Variante CfDop2A wurde aufgrund ihrer mit den bisher charakterisierten INDRs vergleichbaren Aminosäureanzahl im C-terminalen Bereich funktionell analysiert (GERBER ET AL. 2006). Während CfDop2C von der Länge her eine entsprechende C-terminale Region zu PeaDop2B besitzt und mit derselben Aminosäurefolge endet, besteht CfDop2B aus den putativen Exons 1 und 2. Die beiden Varianten des Dop2-Rezeptors aus *D. melanogaster* unterscheiden sich ebenfalls bezüglich der C-terminalen Sequenz, wobei die Divergenz auf das Exon 3 beschränkt ist (FENG ET AL. 1996, HAN ET AL. 1996). Die unterschiedlichen Rezeptorvarianten wurden

jedoch nicht vergleichend analysiert, so dass mögliche funktionelle Konsequenzen des trunkierten C-Terminus bei *C. felis* bzw. der unterschiedlichen C-terminalen Region bei *D. melanogaster* nicht bekannt sind.

Die hohe Konservierung der Spleißstellen weist auf die Abstammung der INDRs von einem gemeinsamen Vorfahren hin. Eine ausgeprägte Konservierung von Spleißstellen spricht für einen hohen Selektionsdruck auf den Erhalt dieser Strukturen und damit für eine funktionelle Bedeutung der alternativ gespleißten Varianten des Rezeptorproteins. Aufgrund der Rolle des C-Terminus bei der Kopplung von GPCRs an G-Proteine und der Desensibilisierung ist eine Auswirkung unterschiedlicher C-terminaler Regionen durch alternatives Spleißen auf diese Prozesse möglich. Weiterhin wurde gezeigt, dass der C-Terminus sowohl bei der Interaktion des Rezeptors mit verschiedenen Proteinen als auch bei der Dimerisierung von Rezeptorproteinen entscheidend ist (BÉCAMEL ET AL. 2002, BOCKAERT ET AL. 2003, 2004; SCHRÖDER ET AL. 2009).

Eine fundamentale Auswirkung auf die Funktionalität zeigte sich bei der Expression der beiden Rezeptorvarianten des PeaDop2-Rezeptors in HEK 293-Zellen (siehe 4.2.3).

Für den Pea5-HT<sub>1</sub>-Rezeptor wurden keine alternativ gespleißten mRNA-Varianten detektiert, allerdings wurden keine gezielten Experimente zur Auffindung weiterer Varianten durchgeführt. Interessanterweise enthalten humane 5-HT<sub>1</sub>-Rezeptoren keine Introns (BOCKAERT ET AL. 2006), im Gegensatz dazu weisen 5-HT<sub>1</sub>-Rezeptoren vieler Invertebraten zahlreiche Introns auf, jedoch ist über divergente Spleißvarianten nichts bekannt (SAUDOU ET AL. 1992, ONO & YOSHIKAWA 2004).

#### **4.1.2 Eigenschaften der Aminosäuresequenz**

##### **4.1.2.1 Charakteristisch für GPCRs: die heptahelikale Architektur**

Die sieben hydrophoben Transmembranhelices sind das definierende gemeinsame Strukturelement der Supergenfamilie der GPCRs. Dies spiegelt sich auch in einer alternativen Bezeichnung dieser Supergenfamilie wider: 7-TM-Rezeptoren oder heptahelikale Rezeptoren. Dabei berücksichtigen diese Bezeichnungen auch neuere Erkenntnisse, dass einige heptahelikale Rezeptoren G-Protein-unabhängige Signaltransduktionswege aktivieren (JACOBY ET AL. 2006). Die typische Struktur der GPCRs ist weiterhin gekennzeichnet durch eine extrazelluläre Lokalisation des N-Terminus, durch drei intrazelluläre und drei extrazelluläre hydrophile Schleifen, welche die transmembranalen Segmente alternierend verbinden, und einen intrazellulär gelegenen C-Terminus (STRADER ET AL. 1995, KOBILKA 2007). Das Hydropathieprofil sowie die Vorhersage der strukturellen Membrantopologie des Pea5-HT<sub>1</sub>- und des PeaDop2-Rezeptorproteins weisen alle kennzeichnenden Eigenschaften der

charakteristischen Architektur von GPCRs auf und ermöglichen so die eindeutige Zuordnung der untersuchten Rezeptoren in diese Supergenfamilie. Konservierte Aminosäurereste mit spezifischer Bedeutung bei der Bindung des Liganden und phylogenetische Sequenzanalysen offenbarten die Zugehörigkeit der Rezeptoren zur Subfamilie der aminergen Rezeptoren und ermöglichten die Einordnung der Rezeptoren in die jeweiligen Klassen der Serotonin- und Dopaminrezeptoren.

#### 4.1.2.2 Posttranslationale Modifikationen

Posttranslationale Modifikationen wie Glykosylierung, Phosphorylierung und Palmitoylierung sind von essentieller Bedeutung für die Funktionalität und Regulation vieler Membranproteine.

Auch die große Mehrheit der GPCRs besitzt eine oder mehrere Konsensusstellen für N-Glykosylierung. Es wird angenommen, dass diese Modifikation bei einigen GPCRs für den gerichteten Transport zur Zellmembran und eine stabile Anordnung des Rezeptors in der Membran benötigt wird (CLAGETT-DAME & MCKELVY 1989, RANDS ET AL. 1990, DESLAURIERS ET AL. 1999, TANSKY ET AL. 2007).

Der Pea5-HT<sub>1</sub>-Rezeptor besitzt sieben und der PeaDop2-Rezeptor drei Konsensusstellen für N-Glykosylierung in der N-terminalen Region des Rezeptorproteins. Mindestens eine der Konsensusstellen der Rezeptoren wird bei der heterologen Expression der Rezeptoren in HEK 293-Zellen glykosyliert. Diese Aussage stützt sich auf die Ergebnisse der Western-Blot-Analysen von Membranproteinen die aus pcPea5-*ht1*- bzw. pcPeadop2-transfizierten HEK 293-Zellen isoliert wurden. Des Weiteren zeigte sich, dass der Pea5-HT<sub>1</sub>-Rezeptor auch in nativen Geweben in leicht glykosylierter Form vorliegt.

Als Antwort auf die Bindung eines Agonisten werden nahezu alle GPCRs durch *second-messenger*-regulierte oder spezifische G-Protein-gekoppelte-Rezeptor-Kinasen (GRKs) phosphoryliert (FERGUSON 2001, TOBIN 2008). Veränderungen des Phosphorylierungsmusters von intrazellulären Regionen der Rezeptoren sind entscheidend für Desensibilisierungsprozesse und die Aktivierung von Arrestin-abhängigen Signalwegen (LUTTRELL & LEFKOWITZ 2002, DEFEA 2008).

Der Pea5-HT<sub>1</sub>-, Pea5-HT<sub>7</sub>- und PeaDop2-Rezeptor besitzen jeweils mehrere Konsensusstellen für Phosphorylierungen. Im Falle des Pea5-HT<sub>1</sub>-Rezeptors liegen alle Konsensusstellen in der dritten cytoplasmatischen Schleife. In der Sequenz des Pea5-HT<sub>7</sub>- und des PeaDop2-Rezeptors ist, neben den potentiellen Phosphorylierungsstellen in der dritten cytoplasmatischen Schleife, jeweils eine weitere Konsensusstelle in der zweiten cytoplasmatischen Schleife zu finden. Die untersuchten Rezeptoren könnten damit durch mögliche Agonist-induzierte Phosphorylierungen von



den G-Protein-abhängigen Signalkaskaden entkoppelt werden und/oder G-Protein-unabhängigen Signalwege aktivieren.

Eine weitere entscheidende posttranslationale Modifikation von GPCRs ist die Palmitoylierung von Cystein-Resten (QANBAR & BOUVIER 2003, TORRECILLA & TOBIN 2006). Im C-Terminus zahlreicher GPCRs wurden Cystein-Reste identifiziert, an welche posttranslational Palmitinsäure addiert wird. Durch die Verankerung des hydrophoben Anteils der Palmitinsäure in der Plasmamembran entsteht eine zusätzliche intrazelluläre Schleife, wodurch eine Vielzahl der Eigenschaften des Rezeptors beeinflusst wird (CHINI & PARENTI 2009). So konnte gezeigt werden, dass die posttranslationale Palmitoylierung bei einigen Rezeptoren entscheidend für den Transport zur Zellmembran und die Lokalisierung in Membranlipid-Microdomänen (NG et al 1994a, RENNER ET AL. 2007), für eine optimale G-Protein-Interaktion (O'DOWD ET AL. 1989, PAPOUCHEVA ET AL. 2004), für Desensibilisierungs- und Internalisierungs-Prozesse (PONIMASKIN ET AL. 2005) und möglicherweise auch für die Oligomerisierung von Rezeptoren ist (KOBÉ ET AL. 2008). Basierend auf diesen divergenten Erkenntnissen bezüglich der funktionellen Konsequenzen von Palmitoylierungsprozessen ist eine individuelle Analyse für einzelne Rezeptoren erforderlich.

Im C-Terminus des Pea5-HT<sub>1</sub>-Rezeptors befindet sich ein Cystein-Rest, wodurch sich die Möglichkeit der posttranslationalen Palmitoylierung ergibt. Sequenzvergleiche mit weiteren 5-HT<sub>1</sub>-Rezeptoren der Invertebraten zeigten, dass dieser Cystein-Rest nicht hoch konserviert ist. Die charakterisierten 5-HT<sub>1</sub>-Rezeptoren aus *Manduca sexta* (1B) (DACKS ET AL. 2006), *Boophilus microplus* (CHEN ET AL. 2004) und *Bombyx mori* (NICKISCH-ROSENEGK ET AL. 1996) weisen ebenfalls einen Cystein-Rest auf, während die Mehrzahl der analysierten Rezeptoren an dieser Position einheitlich einen Phenylalanin-Rest besitzt und damit keine potentielle Palmitoylierungsstelle im C-terminalen Bereich haben. 5-HT<sub>1</sub>-Rezeptoren von Vertebraten besitzen häufig Cystein-Reste im C-terminalen Bereich des Rezeptorproteins. Für den 5-HT<sub>1A</sub>-Rezeptor der Maus wurde gezeigt, dass eine stabile Palmitoylierung entscheidend für die Rezeptor-G-Protein-Interaktion ist (PAPOUCHEVA ET AL. 2004).

Der PeaDop2A-Rezeptor besitzt in der C-terminalen Region drei hoch konservierte Cystein-Reste, die eine Palmitoylierung ermöglichen und somit die Bildung einer vierten intrazellulären Schleife. Der hohe Konservierungsgrad dieser Cystein-Reste innerhalb der Invertebraten legt eine funktionelle Bedeutung nahe. Für mehrere humane Dopaminrezeptoren konnte bereits nachgewiesen werden, dass diese palmitoyliert werden (NG ET AL. 1994a/b, JIN ET AL. 1999).

#### 4.1.2.3 Die Liganden-Bindungstasche und Aktivierung von aminergen Rezeptoren

Sequenzvergleiche von GPCRs zeigten, dass die zur extrazellulären Ebene gelegenen Bereiche der transmembranalen Segmente im Vergleich zu den stark konservierten cytoplasmatisch ausgerichteten Abschnitten nur relativ schwach konserviert sind. Dies gilt als Hinweis für einen konservierten Mechanismus der Aktivierung und Signaltransduktion für Rezeptoren der Rhodopsin-Familie. Demgegenüber spiegelt sich die strukturelle Vielfalt der Liganden in der generell geringeren Konservierung der Bindungstasche wider (MIRZADEGAN ET AL. 2003). In der abgeleiteten Aminosäuresequenz der Subfamilie der aminergen Rezeptoren gibt es jedoch eine Reihe hoch konservierter Aminosäurereste, die für die Bindung der biogenen Amine essentiell sind (HUANG ET AL. 2003). Die Bindungstasche für die klassischen niedermolekularen Liganden – wie biogene Amine – wird von den transmembranalen Segmenten gebildet, wobei Aminosäurereste der TM 3, TM 5 und TM 6 von besonderer Bedeutung sind (GETHER 2000). Ein hoch konservierter Asparaginsäure-Rest D 3.32 der TM 3 bindet die Aminogruppe des Liganden, während die Hydroxylgruppe des Liganden Wasserstoffbrückenbindungen zu Serin-Resten der TM 5 ausbildet (STRADER ET AL. 1995, KROEZE ET AL. 2002). Die aromatische Ringstruktur des Liganden interagiert mit einem Tryptophan- W 6.48 und einem Phenylalanin-Rest F 6.52 der TM 6. Daraufhin wird der Winkel der TM 6 entlang des konservierten Prolin-Knicks P 6.50 moduliert. Dieser entscheidende Konformationswechsel während der Aktivierung führt zu einer Entfernung der cytoplasmatischen Enden der TM 6 und TM 3 (SHI ET AL. 2002, KOBILKA 2007). Weiterhin ist das Auflösen von ionischen Wechselwirkungen zwischen dem hoch konservierten DRY-Motiv, welches in über 70 % der GPCRs der Rhodopsin-Familie vorhanden ist, und Aminosäureresten der cytoplasmatischen Seite der TM 6 von entscheidender Bedeutung bei der Rezeptoraktivierung (FARRENS ET AL. 1996, SHAPIRO ET AL. 2002). In den meisten GPCRs der Rhodopsin-Familie ist weiterhin das NPxxY-Motiv am cytoplasmatischen Ende der TM 7 konserviert. Die Ergebnisse umfangreicher Mutagenesestudien demonstrierten, dass dieses Motiv für die Internalisierung, Sequestrierung, die Affinität, die Stabilisierung der inaktiven Konformation des Rezeptors und damit die Rezeptoraktivierung sowie die Signaltransduktion bedeutend ist (BARAK ET AL. 1994, SEALFON ET AL. 1995, GETHER 2000, PRIOLEAU ET AL. 2002, FRITZE ET AL. 2003, KALATSKAYA ET AL. 2004).

Diese an der Ligandenbindung und Rezeptoraktivierung beteiligten Aminosäurereste sind zum großen Teil in den untersuchten Rezeptoren konserviert. Der Asparaginsäure-Rest (D) in der TM 3 sowie das DRY-Motiv sind in allen drei untersuchten aminergen Rezeptoren aus *P. americana* konserviert. Auch die entscheidenden Aminosäurereste der TM 6 sind sowohl im Pea5-HT<sub>1</sub>- als auch PeaDop2-Rezeptor vorhanden. Die Serin-Reste der TM 5 sind nur in der PeaDop2-Rezeptorsequenz konserviert. Diese Reste sind für die

Interaktion des Rezeptors mit den Hydroxylgruppen des Katecholamins bedeutsam (COX ET AL. 1992, POLLOCK ET AL. 1992, SARTANIA & STRANGE 1999) und treten auch in orthologen Rezeptoren anderer Invertebraten auf (FENG ET AL. 1996, HAN ET AL. 1996, SUGIURA ET AL. 2005). Hingegen befinden sich an diesen Positionen im Pea5-HT<sub>1</sub>-Rezeptor Threonin-Reste. Phylogenetische Analysen zeigten, dass sich einzelne 5-HT-Rezeptorklassen in ihren Bindungsstellen unterscheiden. Die Serin-Reste sind in Rezeptoren vorhanden, die den IP<sub>3</sub>-Signalweg regulieren. Bei Rezeptoren, die an AC koppeln, wurden diese hingegen konservativ gegen Threonin oder Cystein ausgetauscht (DONNELLY ET AL. 1994). Das hoch konservierte NPxxY-Motiv der TM 7 ist ebenfalls in den untersuchten Rezeptoren Pea5-HT<sub>1</sub> und PeaDop2 vorhanden. Dieses Motiv ermöglicht zusätzlich die Bindung von monomeren GTP-bindenden Proteinen an den Rezeptor und koppelt diesen so unter anderem an den Phospholipase D-Signalweg (MITCHELL ET AL. 1998, HALL ET AL. 1999, JOHNSON ET AL. 2006).

#### 4.1.3 Phylogenetische Einteilung

Innerhalb der Klasse der Insekten stellen die Schaben (Blattodea) als Vertreter der hemimetabolen Insekten eine vergleichsweise ursprüngliche Ordnung dar. Die Charakterisierung der ersten 5-HT-Rezeptoren eines hemimetabolen Insektes zeigt entsprechend interessante phylogenetische Aspekte auf. Phylogenetische Studien postulieren, dass drei Hauptklassen der 5-HT-Rezeptoren bereits früh im Verlauf der Evolution - vor der Trennung der Protostomia und der Deuterostomia - divergierten (PEROUTKA & HOWELL 1994, TIERNEY 2001). Diese drei Hauptklassen 5-HT<sub>1</sub>, 5-HT<sub>2</sub> und 5-HT<sub>6</sub> existierten folglich bereits vor über 750 Millionen Jahren. Vor etwa 650 Millionen Jahren entwickelten sich die 5-HT<sub>5</sub>- und 5-HT<sub>7</sub>-Rezeptorklassen als Schwestergruppen der 5-HT<sub>1</sub>-Hauptklasse. Dieses Ereignis datiert vor der evolutiven Trennung der Vertebraten und Invertebraten. Dementsprechend besteht die Möglichkeit, dass orthologe Mitglieder dieser Klassen sowohl bei Invertebraten als auch bei Vertebraten vorkommen (PEROUTKA 1994). Überraschenderweise beschränken sich alle Homologien der Insekten 5-HT-Rezeptoren auf die 5-HT<sub>1</sub>-, 5-HT<sub>2</sub>- und 5-HT<sub>7</sub>-Rezeptorklassen. Dieser Zusammenhang wird auch in der im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten phylogenetischen Analyse der 5-HT-Rezeptoren (siehe Abb. 3.3/3.19) deutlich: Es separieren sich klar zwei Hauptäste, wobei einer die 5-HT<sub>2</sub>-Rezeptoren beherbergt. Der zweite Hauptast gliedert sich in die 5-HT<sub>1</sub>- und die 5-HT<sub>7</sub>-Rezeptoren, die eine geringere phylogenetische Distanz trennt. Die vorläufige phylogenetische Analyse des partiellen Pea5-HT<sub>7</sub>-Rezeptors ordnet diesen eindeutig in die Klasse der 5-HT<sub>7</sub>-Rezeptoren der Insekten ein, während der Pea5-HT<sub>1</sub>-Rezeptor deutlich in die Klasse der 5-HT<sub>1</sub>-Rezeptoren eingegliedert wird. Im Gegensatz zur 5-HT<sub>1</sub>-Rezeptorklasse der Vertebraten,

die fünf paraloge Rezeptoren enthält, welche offensichtlich aus einem gemeinsamen Vorfahren durch Genduplikation hervorgegangen sind (BARNES & SHARP 1999), beinhaltet die 5-HT<sub>1</sub>-Rezeptorklasse der Insekten in den meisten Spezies nur ein Homolog. In wenigen Fällen gibt es mehr als eine homologe Sequenz, bei *D. melanogaster* scheint es erst spät in der Evolution zu einer Genduplikation gekommen zu sein. Dies spiegelt sich in der hohen Sequenzhomologie der beiden 5-HT<sub>1</sub>-Rezeptoren und der benachbarten Lage auf Chromosom 2R(56A-B) wider (SAUDOU ET AL. 1992). Demgegenüber deuten molekulare Analysen der 5-HT-Rezeptoren aus Lepidopteren auf zwei deutlich getrennte Gruppen von 5-HT<sub>1</sub>-Rezeptoren hin (DACKS ET AL. 2006), die auch in der vorliegenden Analyse bestätigt wurden. Die paraloge Rezeptoren der Lepidopteren (Ms5-HT<sub>1B</sub>, Bm5-HT<sub>1</sub>) bilden einen eigenständigen Ast innerhalb der 5-HT<sub>1</sub>-Rezeptoren der Arthropoden. Möglicherweise handelt es sich um eine den Lepidopteren eigene Gruppe von 5-HT<sub>1</sub>-Rezeptoren mit einer hohen Evolutionsrate. Der Pea5-HT<sub>1</sub>-Rezeptor bildet mit den weiteren 5-HT<sub>1</sub>-Rezeptoren der Arthropoden ein großes Cluster, innerhalb dessen der 5-HT<sub>1</sub>-Rezeptor der Rinderzecke (*Boophilus microplus*, Boo5-HT<sub>1</sub>) aus der Klasse der Cheliceraten einen eigenen Ast bildet. Der zweite Hauptast des Clusters spaltet sich in die 5-HT<sub>1</sub>-Rezeptoren der holometabolen Insekten, den Pea5-HT<sub>1</sub>-Rezeptor sowie die 5-HT<sub>1</sub>-Rezeptoren der Krebstiere. Dies ist in Übereinstimmung mit der ursprünglichen Stellung der Blattodea innerhalb des Stammes der Arthropoden.

Bioinformatische Analysen der aminergen Rezeptoren zeigten, dass alle Dopaminrezeptorklassen der Insekten überdurchschnittlich hoch konserviert sind (MUSTARD ET AL. 2005, GERBER ET AL. 2006). Der PeaDop2-Rezeptor bildet mit orthologen Dopaminrezeptoren anderer Invertebraten eine gegenüber bekannten D<sub>1</sub>- und D<sub>2</sub>-ähnlichen Rezeptoren von Vertebraten und Invertebraten deutlich abgesetzte, eigenständige Gruppe. Diese Gruppe wurde von MUSTARD ET AL. (2005) als Invertebratentyp-Dopaminrezeptoren (INDRs) zusammengefasst. Diese Gruppe von Dopaminrezeptoren ist vermutlich näher mit Octopaminrezeptoren verwandt als mit den D<sub>1</sub>-ähnlichen Rezeptoren der Vertebraten (MUSTARD ET AL. 2005). HAUSER ET AL. (2006) formulierten die Hypothese, dass während der Evolution aminerg GPCRs zusätzliche Rezeptoren durch Genduplikation entstanden sind, welche in der weiteren Entwicklung die Fähigkeit erwarben einen „neuen“ Liganden zu nutzen. Aufgrund der spezialisierten Bindungstasche der aminergen Rezeptoren bezieht sich dieser Ligandentausch auf den Pool vorhandener biogener Amine. Da nah verwandte Orthologe dieser Dopaminrezeptorklassen sowohl in holometabolen Insekten (Dipetera, Hymenoptera, Siphonaptera, Lepidoptera) aber auch in *Periplaneta americana* (Blattodea), einem hemimetabolen Insekt, auftreten, scheint der Vorfahr der INDRs bereits vor der

Aufspaltung dieser Ordnungen bestanden zu haben (FENG ET AL. 1996, HAN ET AL. 1996, HUMPHRIES ET AL. 2003, MUSTARD ET AL. 2003, ONO & YOSHIKAWA 2004, GERBER ET AL. 2006, MITSUMASU ET AL. 2008). Mittlerweile wurden Mitglieder der INDRs auch bei Krebstieren und schließlich bei Nematoden charakterisiert (SUGIURA ET AL. 2005, CLARK & BARO 2006). Daher entstand diese Rezeptorklasse vermutlich vor der Divergenz der einzelnen Invertebratenstämme. Trotz der weitreichenden Sequenz- und Strukturunterschiede zu den D1-ähnlichen Rezeptoren, zeigen sich grundlegende Gemeinsamkeiten bei dem Prozess der Signaltransduktion (Stimulation der AC), daher werden die INDRs häufig als funktionell D1-ähnliche Rezeptoren bezeichnet.

## **4.2 Die funktionelle Charakterisierung des Pea5-HT<sub>1</sub>- und der PeaDop2-Rezeptoren**

Für die funktionelle Charakterisierung und pharmakologische Analyse wurde die Rezeptor-cDNA des Pea5-*ht1*- bzw. des Pea*dop2A/B*-Rezeptors stabil in HEK 293-Zellen integriert. Die Änderungen der Konzentration von intrazellulären Botenstoffen in Abhängigkeit von der Inkubation mit diversen Substanzen wurden in diesen transfizierten Zelllinien anschließend untersucht. In zahlreichen Studien wurde das in der vorliegenden Arbeit verwendete HEK 293-Expressionssystem bereits erfolgreich für die Untersuchung funktioneller und pharmakologischer Eigenschaften klonierter aminergere Rezeptoren von Invertebraten verwendet (z. B. BLENAU ET AL. 1998, GROHMANN ET AL. 2003, BEGGS ET AL. 2005, SCHLENSTEDT ET AL. 2006, SPITZER ET AL. 2008). Das vergleichende pharmakologische Profil eines Rezeptors ist abhängig von der relativen Konservierung der Aminosäuresequenz in und um die Bindungsstelle für den Liganden des Rezeptors. Das pharmakologische Profil spezifischer Rezeptoren der Invertebraten weicht meist deutlich von denen der homologen Rezeptoren der Vertebraten ab. Dies beruht auf Veränderungen der molekularen Struktur und der daraus resultierenden Bindungscharakteristika bedingt durch die große phylogenetische Distanz zwischen Vertebraten und Invertebraten (TIERNEY 2001, BLENAU & BAUMANN 2001).

### **4.2.1 Der Pea5-HT<sub>1</sub>-Rezeptor ist ein funktioneller Serotoninrezeptor**

Verschiedene biogene Amine wurden auf ihre Fähigkeit, den Pea5-HT<sub>1</sub>-Rezeptor zu aktivieren, getestet. Sowohl Dopamin als auch Octopamin verursachten jedoch einen deutlichen Anstieg der [cAMP]<sub>i</sub> in nicht transfizierten Zellen. Auch bei der Pea5-HT<sub>1</sub>-Zelllinie wurden identische Effekte beobachtet. Diese komplexen Wirkungen sind auf endogene aminergere Rezeptoren zurückzuführen, die sich bereits vor der Transfektion des Pea5-HT<sub>1</sub>-Rezeptors in der verwendeten parental Charge von HEK 293-Zellen

manifestiert hatten. Es ist nicht ungewöhnlich, dass über einen längeren Zeitraum und aufgrund von fehlendem Selektionsdruck eine Veränderung des Expressionsprofils bei Zellkulturen beobachtet werden kann (FRIEDMAN 2002, CLARK & BARO 2007). Jedoch zeigte Serotonin keinerlei Wirkung auf die  $[cAMP]_i$  nicht transfizierter HEK 293-Zellen, so dass aufgrund der selektiven Wirkung von Serotonin auf die pcPea5-*ht1*-transfizierten Zellen eine pharmakologische Analyse des Pea5-HT<sub>1</sub>-Rezeptors in diesem System durchgeführt werden konnte. Dabei wurden alle verwendeten Substanzen auch kritisch bezüglich ihres Einflusses auf die  $[cAMP]_i$  nicht transfizierter HEK 293-Zellen untersucht. Als einziges der getesteten biogenen Amine (Serotonin, Dopamin, Tyramin, Histamin und Octopamin) zeigte Serotonin eine spezifische Wirkung auf die pcPea5-*ht1*-transfizierten HEK 293-Zellen. Die agonistische Wirkung von Serotonin an der Pea5-HT<sub>1</sub>-Zelllinie bewirkte eine konzentrationsabhängige Verminderung der NKH-477-induzierten  $[cAMP]_i$ . Der Pea5-HT<sub>1</sub>-Rezeptor ist demnach ein funktioneller 5-HT-Rezeptor. Im Gegensatz zu der spezifischen cAMP-Antwort, veranlasste die Stimulation der pcPea5-*ht1*-transfizierten Zellen keine Änderung der  $[Ca^{2+}]_i$ . Daraus kann geschlossen werden, dass der Pea5-HT<sub>1</sub>-Rezeptor in diesem heterologen Expressionssystem ausschließlich heterotrimere G-Proteine (G<sub>i</sub>) aktiviert, welche eine Hemmung der AC steuern. Die Zugabe von Serotonin zu Pea5-HT<sub>1</sub>-exprimierenden Zellen erniedrigt die  $[cAMP]_i$  dosisabhängig und vermindert die NKH-477-induzierte  $[cAMP]_i$  um 67 %. Während die beiden orthologen Rezeptoren aus *D. melanogaster* eine vergleichbare Reduzierung der cAMP-Synthese induzierten, zeigte der 5-HT<sub>1</sub>-Rezeptor aus *Boophilus microplus* deutlich geringere Einflüsse auf die gemessenen cAMP-Konzentration (SAUDOU ET AL. 1992, CHEN ET AL. 2004). Es ist jedoch davon auszugehen, dass für die maximale Wirksamkeit die jeweils unterschiedlich gewählten Expressionssysteme eine ausschlaggebende Rolle spielen. Der EC<sub>50</sub>-Wert des Pea5-HT<sub>1</sub>-Rezeptors ist mit 150 nM (5-HT) im Vergleich zu anderen 5-HT<sub>1</sub>-Rezeptoren von Invertebraten relativ hoch, z. B. *D. melanogaster* Dm5-HT<sub>1A</sub> 30 nM, Dm5-HT<sub>1B</sub> 18 nM, *B. microplus* Bm5-HT<sub>1</sub> 83 nM, *Procambarus clarkii* Pro5-HT<sub>1α</sub> 31 nM (SAUDOU ET AL. 1992, CHEN ET AL. 2004, SPITZER ET AL. 2008) und deutet eine vergleichsweise niedrige Affinität an.

#### 4.2.1.1 Pharmakologie des Pea5-HT<sub>1</sub>-Rezeptors

Bei der pharmakologischen Analyse und dem Versuch, spezifische Agonisten für den Pea5-HT<sub>1</sub>-Rezeptor zu ermitteln, die den inhibitorischen Effekt von Serotonin nachahmen, zeigte sich, dass der heterolog exprimierte Pea5-HT<sub>1</sub>-Rezeptor vergleichsweise unempfindlich gegenüber gängigen 5-HT-Rezeptoragonisten ist. Der spezifische 5-HT<sub>1</sub>- und 5-HT<sub>7</sub>-Rezeptoragonist 8-OH-DPAT zeigte keinerlei Wirkung am Pea5-HT<sub>1</sub>-Rezeptor, auch für weitere 5-HT<sub>1</sub>-Rezeptoren aus Invertebraten wurden lediglich geringe Affinitäten

beschrieben (SAUDOU ET AL. 1992, ANGERS ET AL. 1998). Andere getestete Agonisten zeigten ebenfalls keine Wirkung, darunter auch 5-CT, ein hochwirksamer Agonist an 5-HT<sub>1</sub>- 5-HT<sub>2</sub>- und 5-HT<sub>7</sub>-Rezeptoren anderer Arthropoden (ANGERS ET AL. 1998, LEE & PIETRANTONIO 2003, SCHLENSTEDT ET AL. 2006, SPITZER ET AL. 2008). Lediglich der nicht selektive 5-HT-Rezeptoragonist 5-MeOT wirkt als partieller Agonist und inhibiert die induzierte cAMP-Synthese teilweise. Die Wirkung von Serotonin kann somit lediglich durch nicht selektive 5-HT-Rezeptoragonisten imitiert werden, während keiner der spezifischen Agonisten eine Wirkung zeigte. Damit sind Rückschlüsse bezüglich der Rezeptorklassen-Zugehörigkeit basierend auf dem Agonisten-Profil nicht möglich.

Der nicht selektive 5-HT-Rezeptorantagonist Methiothepin (HOYER ET AL. 1994) sowie der hoch selektive 5-HT<sub>1A</sub>-Rezeptorantagonist WAY 100635 (FLETCHER ET AL. 1996, NEWMAN-TANCREDI ET AL. 1997) wirken dem Effekt von Serotonin entgegen. Interessanterweise blockiert WAY 100635 nicht nur die 5-HT-induzierte Hemmung der AC, sondern erhöht die [cAMP]<sub>i</sub> auf deutlich über 100 % (siehe 4.2.1.2).

#### 4.2.1.2 Der Pea5-HT<sub>1</sub>-Rezeptor ist konstitutiv aktiv

Konstitutive Aktivität bezeichnet die Eigenschaft eines Rezeptors eine aktive Konformation in Abwesenheit eines Liganden einzunehmen. Die Hypothese, dass einige GPCRs in der Abwesenheit eines Liganden aktiv sind, wurde als erstes durch Studien an Opioidrezeptoren und  $\beta_2$ -adrenergen Rezeptoren unterstützt (KOSKI ET AL. 1982, CERIONE ET AL. 1987). Mittlerweile wurde bei einer Vielzahl von GPCRs konstitutive Aktivität beschrieben und gilt als verbreitetes Phänomen dieser Proteinfamilie (SEIFERT & WENZEL-SEIFERT 2002, MILLIGAN 2003). Auch 5-HT<sub>1</sub>-Rezeptoren aus Vertebraten und Krebstieren zeigen konstitutive Aktivität (NEWMAN-TANCREDI ET AL. 1997, MARTEL ET AL. 2007, SPITZER ET AL. 2008).

Zahlreiche Studien offenbarten die ausgeprägte physiologische und pathophysiologische Relevanz dieses Phänomens (MORISSET ET AL. 2000, SEIFERT & WENZEL-SEIFERT 2002, BOND & IJZERMAN 2006). So konnte kürzlich für einen G-Protein-gekoppelten-Pheromonrezeptor (Cpr2) aus dem humanpathogenen Pilz *Cryptococcus neoformans* gezeigt werden, dass der Rezeptor *in vivo* konstitutiv aktiv ist und die Morphogenese der Zellen steuert (HSUEH ET AL. 2009). Demgegenüber ist die physiologische Rolle konstitutiv aktiver GPCRs des Menschen häufig noch unbekannt. Es konnten jedoch eine Reihe von konstitutiv aktiven GPCRs mit pathologischen Zuständen in Verbindung gebracht werden. So werden durch Mutationen erzeugte Störungen bezüglich der konstitutiven Aktivität von GPCRs mit spezifischen Krankheiten in Zusammenhang gebracht, darunter Stoffwechselerkrankungen, Augenkrankheiten und einige Formen von Krebs (ARVANITAKIS ET AL. 1998, SEIFERT & SEIFERT-WENZEL 2002, KENAKIN 2004, SMIT ET AL. 2007).

Bei Insekten wurden bisher erst drei aminerge Rezeptoren als konstitutiv aktiv beschrieben, zwei Dopaminrezeptor (MUSTARD ET AL. 2003, BEGGS ET AL. 2005) sowie ein 5-HT<sub>7</sub>-Rezeptor aus der Honigbiene *A. mellifera* (SCHLENSTEDT ET AL. 2006).

Einen ersten Hinweis auf eine mögliche Agonist-unabhängige (konstitutive) Aktivität des Pea5-HT<sub>1</sub>-Rezeptors stellte die erhöhte Sensibilität der Pea5-HT<sub>1</sub>-exprimierenden HEK 293-Zellen gegenüber der pharmakologischen Aktivierung der AC durch NKH-477 im Vergleich zu nicht transfizierten HEK 293-Zellen dar. Es ist bekannt, dass eine konstitutive Aktivierung von inhibitorischen G-Proteinen über verschiedene molekulare Mechanismen letztlich zu einer paradoxen Erhöhung der pharmakologisch stimulierten Aktivität der AC führt (JOHNSTON & WATTS 2003). Diese Sensibilisierung der AC stellt eine zelluläre Anpassung an eine andauernde Aktivierung von Rezeptoren, die an G<sub>i</sub>-Proteine koppeln, dar und ist Teil eines Kompensationsprozesses (WATTS & NEVE 2005). Bei der Erstellung des pharmakologischen Profils mit verschiedenen 5-HT-Rezeptorantagonisten zeigte sich, dass WAY 100635 nicht nur die Wirkung von 5-HT vollständig aufhebt, sondern darüber hinaus einen weiteren Anstieg der [cAMP]<sub>i</sub> auf über 100 % auslöst (siehe oben). In weiterführenden Experimenten zeigte sich außerdem, dass WAY 100635 auch in der Abwesenheit von 5-HT einen Anstieg der [cAMP]<sub>i</sub> bewirkt und dieser Effekt von Methiothepin vollständig blockiert wird. Diese Ergebnisse demonstrieren zweifelsfrei, dass der Pea5-HT<sub>1</sub>-Rezeptor konstitutiv aktiv ist, WAY 100635 als inverser Agonist fungiert und Methiothepin an diesem Rezeptor als neutraler Antagonist wirkt. Dieses pharmakologische Profil beinhaltet überraschende Aspekte einzelner Substanzen: WAY 100635 wurde als neutraler Antagonist an 5-HT<sub>1A</sub>-Rezeptoren der Vertebraten charakterisiert (FORSTER ET AL. 1995, FLETCHER ET AL. 1996, NEWMAN-TANCREDI ET AL. 1996, 1997; MARTEL ET AL. 2007). Nur unter speziellen Pufferbedingungen wurde für diese Substanz die Wirkung als inverser Agonist bei Vertebraten beschrieben (COSI & KOEK 2000). Diese hoch selektive Substanz wurde bisher nur an wenigen Rezeptoren von Invertebraten getestet und wirkte am 5-HT<sub>1</sub>-Rezeptor aus *A. mellifera* als partieller Antagonist (M. THAMM, persönliche Mitteilung). An 5-HT<sub>1</sub>-Rezeptoren aus Krebstieren zeigte WAY 100635 keinerlei antagonistische Wirkung und wurde als inaktiv eingestuft (SPITZER ET AL. 2008). Methiothepin hingegen ist ein wirksamer inverser Agonist an konstitutiv aktiven 5-HT<sub>1A</sub>-Rezeptoren der Vertebraten, d. h. es inhibiert die Agonist-unabhängige Aktivität des Rezeptors (MCLOUGHLIN & STRANGE 2000, MARTEL ET AL. 2007). Auch an den konstitutiv aktiven 5-HT<sub>7</sub>-Rezeptoren aus *A. mellifera* erwies sich Methiothepin als inverser Agonist (SCHLENSTEDT ET AL. 2006).

Bislang ist nicht abschließend geklärt, worauf genau die konstitutive Aktivität von GPCRs zurückzuführen ist. Jedoch gibt es zahlreiche Untersuchungen an GPCRs, die Modifikationen verschiedener intrazellulärer Regionen dafür verantwortlich machen. So



spielt zum einen die Länge (CLAEYSEN ET AL. 1999, DEMCHYSHYN ET AL. 2000) und Palmitoylierung (PONIMASKIN ET AL. 2002) des C-terminalen Bereichs eine Rolle. Zum anderen haben Aminosäuren der dritten cytoplasmatischen Schleife eine Bedeutung bei der Entstehung Agonist-unabhängiger Aktivität (KJELSBURG ET AL. 1992, SAMAMA ET AL. 1994, CHARPENTIER ET AL. 1996, NISWENDER ET AL. 1999, PUROHIT ET AL. 2005). Ebenso können Modifikationen des DRY-Motivs im N-terminalen Bereich der zweiten cytoplasmatischen Schleife zu konstitutiver Aktivität führen (SCHEER ET AL. 1996, ALEWIJNSE ET AL. 2000, CLARK ET AL. 2004). Vermutlich spielt jedoch neben der exakten Lokalisation der Mutation vor allem der Einfluss der Mutation auf die komplexe Struktur des gesamten Rezeptorproteins und damit der Position der TMs und der intrazellulären Schleifen, welche für die Interaktion mit dem G-Protein verantwortlich sind, eine entscheidende Rolle. Die Aufhebung von intramolekularen Strukturen, die normalerweise die inaktive Konformation des Rezeptors stabilisieren, wie etwa die starken ionischen Wechselwirkungen des DRY-Motivs mit Aminosäureresten der TM 6, führt letztlich zu erhöhter konstitutiver Aktivität (KONOPOKA ET AL. 1996, SHAPIRO ET AL. 2002).

Die konstitutive Aktivität eines Rezeptors moduliert die Stärke der Agonist-induzierten Antwort und dient möglicherweise als Regulator zur Herabsetzung des Signal-Rausch-Verhältnisses (LEFKOWITZ ET AL. 1993). Zusätzlich können konstitutiv aktive GPCRs durch natürliche inverse Agonisten beeinflusst werden, somit bietet sich ein weiterer Mechanismus zur Regulation der Rezeptoraktivität. Für einige GPCRs konnten bereits natürlich auftretende inverse Agonisten identifiziert werden, wie z. B. das *Agouti-related*-Protein, welches als endogener inverser Agonist an humanen Melanocortinrezeptoren wirkt (SIEGRIST ET AL. 1997, NIJENHUIS ET AL. 2001).

In Anbetracht der Relevanz des serotonergen Systems und der konstitutiven Aktivität von GPCRs für verschiedene Erkrankungen sowie für die Wirkung einer Vielzahl von Medikamenten ist das Verständnis der Entstehung konstitutiver Aktivität G-Proteingekoppelter 5-HT-Rezeptoren und deren Modulation durch inverse Agonisten für die Entwicklung wirksamer Medikamente von entscheidender Bedeutung (BOND & IJZERMAN 2006, RODRÍGUEZ-PUERTAS & BARREDA-GÓMEZ 2006).

#### **4.2.2 Der PeaDop2A-Rezeptor ist ein funktioneller Dopaminrezeptor**

Die Aktivierung des PeaDop2A-Rezeptors durch Dopamin bewirkt in HEK 293-Zellen die Erhöhung der  $[cAMP]_i$ . Die Inkubation pcPea*dop2A*-transfizierter Zellen mit den biogenen Aminen Serotonin, Histamin, Octopamin und Tyramin führt demgegenüber zu keiner Veränderung der  $[cAMP]_i$ . Dies weist den PeaDop2A-Rezeptor als einen funktionellen Dopaminrezeptor aus. Im Gegensatz dazu führte die Stimulierung von pcPea*dop2B*-transfizierten HEK 293-Zellen mit Dopamin weder zu einem Anstieg der  $[cAMP]_i$  noch trat

eine inhibierende Wirkung auf die NKH-477-stimulierte  $[cAMP]_i$  auf. Beide Rezeptorvarianten zeigten weiterhin keinerlei Wirkung auf die  $[Ca^{2+}]_i$  von entsprechend transfizierten HEK 293-Zellen. Dies bedeutet zum einen, dass der PeaDop2A-Rezeptor ausschließlich heterotrimere G-Proteine aktiviert, welche die Aktivität der AC stimulieren ( $G_s$ ). Zum anderen wird deutlich, dass der PeaDop2B-Rezeptor demgemäss an keinen der klassischen G-Protein-vermittelten Signalwege koppelt und folglich aller Wahrscheinlichkeit nach eigenständig nicht funktional ist. Weitere Studien an C-terminal trunkierten Dopaminrezeptoren belegen die Bedeutung dieser Region für die Funktionalität des Rezeptorproteins. Bei einer Analyse von Dopaminrezeptoren aus *Bombyx mori* wurde beobachtet, dass die untersuchte Form des BmDop2-Rezeptors, welche ebenfalls einen trunkierten C-Terminus im Vergleich zu den orthologen Rezeptoren aus *D. melanogaster* und *A. mellifera* aufweist, eine Aktivierung erst nach Stimulierung mit hohen Konzentrationen Dopamin zeigte (MITSUMASU ET AL. 2008, OHTA ET AL. 2009). Auch bei Mitgliedern weiterer Klassen der Dopaminrezeptoren der Invertebraten wurden Spleißvarianten bezüglich der C-terminalen Region detektiert. So zeigte eine Spleißvariante des D2-Rezeptors von *Panulirus interruptus*, dessen C-Terminus auf etwa 20 Aminosäurereste halbiert ist, eine dramatische Reduzierung des  $EC_{50}$ -Wertes (CLARK & BARO 2007). Basierend auf den immunocytochemischen Analysen, zeigt sich jedoch, dass auch die trunkierte Variante (PeaDop2B) translatiert wird und in die Plasmamembran eingebaut wird. In Untersuchungen an trunkierten Acetylcholinrezeptoren und Chemokinrezeptoren konnte gezeigt werden, dass auch trunkierte Rezeptorvarianten in die Plasmamembran eingebaut werden, wobei auch in diesen Fällen vermutlich keine funktionellen Rezeptoren entstehen (SCHONEBERG ET AL. 1995, EHLERT ET AL. 2004). Mehrere Studien an aminergen Rezeptoren führten jedoch zu der Annahme, dass Interaktionen zwischen trunkierten Rezeptoren und den vollständigen Varianten eine funktionelle Bedeutung haben (ELMHURST ET AL. 2000, KARPA ET AL. 2000, EHLERT ET AL. 2004). Eine Dopaminrezeptor-Spleißvariante (CeDOP-3nf) aus *C. elegans*, in der die TM 6 und TM 7 fehlen, war in heterologen Expressionsanalysen nicht in der Lage, eine intrazelluläre Antwort hervorzurufen (SUGIURA ET AL. 2005). Bei Koexpressionsexperimenten mit dem vollständigen Rezeptor, wirkte sich die trunkierte Form jedoch inhibierend auf die Funktionalität des vollständigen Rezeptors aus. Auch bei humanen Dopaminrezeptoren wurden vergleichbare, physiologisch relevante Interaktionen zwischen trunkierten Rezeptorvarianten und den vollständigen Rezeptoren vermutet und mit Erkrankungen wie z. B. Schizophrenie in Verbindung gebracht (SCHMAUSS ET AL. 1993, SCHMAUSS 1996, ELMHURST ET AL. 2000, KARPA ET AL. 2000). Die Zellantwort pcPeadop2A-transfizierter HEK 293-Zellen auf Dopamin ist konzentrationsabhängig. Der  $EC_{50}$ -Wert von 160 nM für Dopamin ist im Vergleich zur

Wirkung von Dopamin an orthologen Rezeptoren teilweise ähnlich (DmDop2: EC<sub>50</sub> 350 nM, FENG ET AL. 1996, HAN ET AL. 1996) mehrheitlich aber vergleichsweise niedrig (AmDop2: EC<sub>50</sub> 2,2 mM, MUSTARD ET AL. 2003; CfDop2A: EC<sub>50</sub> 2,4 mM, GERBER ET AL. 2006) und deutet auf eine hohe Affinität des Rezeptors zu seinem Liganden hin.

#### 4.2.2.1 Pharmakologie des PeaDop2A-Rezeptors

Studien zur Charakterisierung von Dopaminrezeptoren in Gehirngewebe verschiedener Insekten zeigten bereits, dass Dopaminrezeptoren der Insekten deutlich abweichende pharmakologische Eigenschaften im Vergleich zu Vertebraten aufweisen (ORR ET AL. 1987, BLENAU ET AL. 1995, DEGEN ET AL. 2000), dies wurde durch zahlreiche Untersuchungen an heterolog exprimierten Dopaminrezeptoren bestätigt (MUSTARD ET AL. 2005). Sowohl nicht selektive Dopaminrezeptor-Agonisten (6,7-ADTN und Apomorphin) als auch der D1-Rezeptor-Agonist 6-Chloro-APB bewirken einen Anstieg der [cAMP]<sub>i</sub> in PeaDop2A-exprimierenden Zellen, jedoch mit einer deutlich unterschiedlichen Wirksamkeit (6,7-ADTN > Dopamin > 6-Chloro-APB > Apomorphin). Diese klassischen Dopaminrezeptor-Agonisten zeigen vergleichbare agonistische Wirkungen auch an untersuchten orthologen Dopaminrezeptoren der Insekten wie *B. mori* (6,7-ADTN > Dopamin > Apomorphin), *D. melanogaster* (Dopamin > 6-Chloro-APB) und *A. mellifera* (6,7-ADTN > 6-Chloro-APB > Dopamin > Apomorphin) (FENG ET AL. 1996, MUSTARD ET AL. 2003, OHTA ET AL. 2009; nicht aufgeführte Substanzen wurden in den jeweiligen Studien nicht untersucht). Hingegen zeigte der bekannte D1-Rezeptor-Agonist SKF 38393 keinerlei Wirkung auf die [cAMP]<sub>i</sub>. Die fehlende agonistische Aktivität von SKF 38393 ist bei allen INDRs und D1-ähnlichen Rezeptoren von Insekten zu beobachten (SUGAMORI ET AL. 1995, FENG ET AL. 1996, BLENAU ET AL. 1998, MUSTARD ET AL. 2003, OHTA ET AL. 2009). Für die agonistische Wirkung von SKF 38393 scheinen somit nicht nur die klassischen, auch in Invertebraten hoch konservierten Aminosäurereste der Liganden-Bindungstasche erforderlich zu sein. Offensichtlich spielen auch andere Aminosäurereste und/oder spezielle Konformationen für die Bindung von SKF 38393 eine entscheidende Rolle. Erwartungsgemäß zeigte Bromocriptin, ein D2-ähnlicher-Rezeptor-Agonist, der unter anderem als Medikament zur Behandlung der Parkinson-Krankheit eingesetzt wird, keine Wirkung auf die [cAMP]<sub>i</sub> in pcPeaDop2A-transfizierten Zellen. An D2-ähnlichen Rezeptoren aus Insekten und Vertebraten wirkt diese Substanz demgegenüber als potenter Agonist (BEGGS ET AL. 2005, HEARN ET AL. 2002, DRAPER ET AL. 2007) und ermöglicht so die pharmakologische Einordnung des PeaDop2A-Rezeptors in die Gruppe der funktionell D1-ähnlichen Rezeptoren. Unter den getesteten Antagonisten inhibierten neben den nicht selektiven Antagonisten Flupenthixol und Butaclamol auch der D1-selektive Rezeptorantagonist SCH 23390 sowie der D2-selektive Rezeptorantagonist

Chlorpromazin den Dopamin-induzierten Anstieg der  $[cAMP]_i$  vollständig (Flupenthixol > Chlorpromazin > Butaclamol > SCH23390 >> Spiperon). Auch bezüglich des pharmakologischen Profils der Antagonisten zeigen sich deutliche Parallelen zu den orthologen Rezeptoren wie z. B. BmDop2: Flupenthixol > Chlorpromazin > SCH23390 > Butaclamol >> Spiperon oder DmDop2: Flupenthixol > SCH23390 > Butaclamol  $\geq$  Spiperon (FENG ET AL. 1996, OHTA ET AL. 2009). Die gesamten Ergebnisse der pharmakologischen Analyse sind somit kongruent zu vergleichbaren Untersuchungen der charakterisierten INDRs anderer Insekten (FENG ET AL. 1996, MUSTARD ET AL. 2003, OHTA ET AL. 2009). Das nahezu identische pharmakologische Profil des PeaDop2A-Rezeptors bestätigt zum einen die phylogenetische Einordnung in die Klasse der INDRs und zum anderen den hohen Konservierungsgrad dieser Rezeptorklasse.

### **4.3 Lokalisation des Pea5-HT<sub>1</sub>-, Pea5-HT<sub>7</sub>- und PeaDop2-Rezeptors und mögliche Funktionen der Rezeptoren *in vivo***

Biogene Amine werden häufig als zentrale modulatorisch wirksame neuroaktive Substanzen bei Invertebraten bezeichnet. Serotonin und Dopamin beeinflussen in ihrer Funktion als Neurotransmitter, Neuromodulatoren und/oder Neurohormone verschiedenste zelluläre, physiologische und verhaltensmodulatorische Prozesse (EVANS 1980, ROEDER 1994, BLENAU & BAUMANN 2001, WALZ ET AL. 2006). Die Kenntnis und Lokalisation der einzelnen Komponenten der Signaltransduktion ist für das bessere Verständnis der mannigfaltigen Wirkungen biogener Aminen entscheidend. In der vorliegenden Arbeit wurde daher das Expressionsmuster der mRNA der untersuchten Rezeptoren durch RT-PCR an Gewebeproben des Gehirns und peripheren Geweben aus *P. americana* analysiert. Für den Pea5-HT<sub>1</sub>- und den PeaDop2-Rezeptor wurde weiterhin die Verteilung des Rezeptorproteins durch Rezeptor-spezifische Antikörper untersucht. Die Lokalisation spezifischer Rezeptoren ermöglicht erste Rückschlüsse auf physiologische und funktionelle Zusammenhänge.

#### **4.3.1 Verteilungsmuster der serotonergen Rezeptoren**

##### **4.3.1.1 Verteilungsmuster der serotonergen Rezeptoren im ZNS**

Mittels RT-PCR konnte sowohl die *Pea5-ht1*- als auch die *Pea5-ht7*-Rezeptor-mRNA im Gehirn nachgewiesen werden. Für den Pea5-HT<sub>1</sub>-Rezeptor wurde zusätzlich die Verteilung des Rezeptorproteins mit dem spezifischen anti-Pea5-HT<sub>1</sub>-Antikörper näher untersucht. Er wurde so nicht nur in den einzelnen Arealen des Gehirns, sondern auch im

Unterschlundganglion sowie in den Thorakal-, Abdominal- und Terminalganglien des Nervensystems nachgewiesen. Die hohe Expressionsrate der 5-HT-Rezeptoren im Nervensystem von *P. americana* ist kongruent zu Untersuchungen an anderen Invertebraten. 5-HT<sub>1</sub>- und 5-HT<sub>7</sub>-Rezeptoren wurden sowohl auf mRNA- als auch auf Protein-Ebene in großen Mengen im ZNS von Dipteren [*D. melanogaster* (WITZ ET AL. 1990, SAUDOU ET AL. 1992), *A. aegypti* (LEE & PIETRANTONIO 2003)], Lepidopteren [*H. virescens* (NICKISCH-ROSENEGK ET AL. 1996), *P. xuthus* (ONO & YOSHIKAWA 2004), *M. sexta* (DACKS ET AL. 2006)], *A. mellifera* (SCHLENSTEDT ET AL. 2006) und weiteren Invertebraten (ANGERS ET AL. 1998, SOSA ET AL. 2004, BARBAS ET AL. 2005) nachgewiesen. Diese Verteilung der serotonergen Rezeptoren ist in Übereinstimmung mit einer entscheidenden Rolle dieser 5-HT-Rezeptoren im ZNS.

Bei Vertebraten zeigt sich eine ähnlich weite Verbreitung von 5-HT-Rezeptoren im ZNS: So werden beispielsweise 5-HT<sub>1</sub>-Rezeptoren bei Säugetieren im Hippocampus, dem entorhinalen Cortex und dem Septum exprimiert (PAZOS & PALACIOS 1985, NICHOLS & NICHOLS 2008), während 5-HT<sub>7</sub>-Rezeptoren in großen Mengen im Hypothalamus, Thalamus, Hippocampus und im frontalen Cortex nachgewiesen wurden (NEUMAIER ET AL. 2001, BONAVENTURE ET AL. 2004, NICHOLS & NICHOLS 2008).

Die zelluläre Verteilung des Pea5-HT<sub>1</sub>-Rezeptors im Gehirn wurde im Detail an Schnittpräparaten untersucht. Das Pea5-HT<sub>1</sub>-Rezeptorprotein wird in einer Subpopulation von Pars intercerebralis-Neuronen exprimiert. Diese Markierung erstreckt sich auch auf deren axonale Strukturen, die in einem neuronalen Trakt zum Retrocerebralkomplex ziehen. Innerhalb der Klasse der Insekten ist die Verteilung von 5-HT<sub>1</sub>-Rezeptoren im Gehirn bisher nur bei *D. melanogaster* beschrieben. Der Dm5-HT<sub>1A</sub>-Rezeptor wird vorwiegend in den Pilzkörpern, den Zentren für Lernen und Gedächtnisbildung, exprimiert (YUAN ET AL. 2006). Dagegen wird der Dm5-HT<sub>1B</sub>-Rezeptor nicht nur in den Pilzkörpern exprimiert, sondern auch deutlich in einigen Neuronen der Pars intercerebralis sowie bestimmten Schrittmacherneuronen (YUAN ET AL. 2005).

Die Markierung nur einiger weniger Zellen innerhalb des Gehirns von *P. americana* ist in Anbetracht der großflächigen Verteilung von Serotonin und serotonergen Fasern im Gehirn (BISHOP & O'SHEA 1983, NÄSSEL & KLEMM 1983, KLEMM ET AL. 1984) etwas überraschend. Allerdings ist zum einen zu erwarten, dass neben dem Pea5-HT<sub>1</sub>-Rezeptor noch 5-HT-Rezeptoren weiterer Klassen im Gehirn exprimiert werden. Dies konnte in der vorliegenden Arbeit bereits für die Pea5-*ht7*-Rezeptor-mRNA gezeigt werden. Zum anderen besteht die Möglichkeit, dass der anti-Pea5-HT<sub>1</sub>-Antikörper im Gewebe nur Strukturen markiert, die den Rezeptor in hoher Dichte exprimieren. Diese Erklärung deckt sich zum einen mit der Beobachtung, dass einige sehr schwach markierte Zellkörper und

Fasern im Bereich der optischen Loben detektiert werden konnten, und zum anderen mit der Auffälligkeit, dass neben dem erhöhten Hintergrund in den immunocytochemischen Präparaten der Speicheldrüsen keine spezifische Markierung beobachtet werden konnte, trotz des Nachweises des Rezeptorproteins in Western-Blot-Analysen.

Erstaunlich ist weiterhin die nur äußerst gering vorhandene 5-HT-Immunreaktivität im Bereich der Pars intercerebralis und des neuronalen Traktes, in dem der Pea5-HT<sub>1</sub>-Rezeptor deutlich exprimiert wird. Es zeigte sich keine umfangreiche Innervierung der Zellen durch 5-HT-immunreaktive Fasern, sondern lediglich partielle serotonerge Innervation im Bereich des neuronalen Traktes und vereinzelt schwach markierte serotonerge Zellkörper im Bereich der Pars intercerebralis in zentralen und posterioren Schnitten des Gehirns. Mehrere kleine 5-HT-immunreaktive Zellkörper wurden jedoch im Bereich der Pars intercerebralis im Gehirn von *P. americana* beschrieben (BISHOP & O'SHEA 1983, KLEMM ET AL. 1984). Es kann nicht nachvollzogen werden, ob diese Zellen möglicherweise in der Nähe der Pe5-HT<sub>1</sub>-positiven Zellen liegen oder in abweichenden Ebenen des Gehirns auftreten. Die in dieser Arbeit verwendete Methode ist an sich durchaus geeignet, serotonerge Zellkörper zu detektieren, da beschriebene serotonerge Zellkörper im Bereich der optischen Loben (NÄSSEL & KLEMM 1983) reproduzierbar nachgewiesen wurden. Serotonin wird jedoch in weiten Bereichen des Gehirns freigesetzt und könnte demnach über relativ weite Entfernungen zu den Rezeptoren diffundieren. Vergleichbare Abweichungen bezüglich der Lokalisation der Immunreaktivität eines Neurotransmitters und der entsprechenden Rezeptoren wurden auch für andere aminerge Systeme beschrieben (ERBER ET AL. 1991, KREISSL ET AL. 1994, BLENAU ET AL. 1998, YUAN ET AL. 2005).

#### **4.3.1.2 Mögliche Funktionen der serotonergen Rezeptoren**

Die Expression des Pea5-HT<sub>1</sub>-Rezeptors in Neuronen der Pars intercerebralis, welche in den Retrocerebralkomplex und das stomatogastrische Nervensystem projizieren, deutet an, dass der Pea5-HT<sub>1</sub>-Rezeptor möglicherweise an der serotonergen Regulation und Modulation neuroendokriner Sekretionsprozesse beteiligt ist. Der Pars intercerebralis-Corpora cardiaca-Komplex von Insekten gilt als das Äquivalent zum Hypothalamus-Hypophysen-System von Wirbeltieren. Die Pars intercerebralis ist bei *P. americana* unter anderem für die Rhythmik der Bewegungsaktivität verantwortlich (NISHITSUTSUJI-UWO ET AL. 1967, MATSUI ET AL. 2009).

Deutlich mehr ist bezüglich der Funktionen der beiden 5-HT<sub>1</sub>-Rezeptoren in dem genetischen Modellorganismus *D. melanogaster* bekannt, wobei – wie bereits erwähnt – teilweise Übereinstimmungen bei der Verteilung des Pea5-HT<sub>1</sub>-Rezeptors und dem Dm5-HT<sub>1B</sub>-Rezeptor auftreten. Während keine circadianen Veränderungen des mRNA-

oder Protein-Spiegels bei Dm5-HT<sub>1B</sub> beobachtet wurden (YUAN ET AL. 2005), oszilliert der mRNA-Gehalt des Dm5-HT<sub>1A</sub>-Rezeptors deutlich (CLARIDGE-CHANG ET AL. 2001). Der Dm5-HT<sub>1B</sub>-Rezeptor wird im Schrittmacher-Netzwerk exprimiert und beeinflusst die circadiane Lichtempfindlichkeit durch die Verminderung der Aktivität der Proteinkinase SHAGGY, welche wiederum die Stabilität des Transkriptionsfaktors TIMELESS erhöht (YUAN ET AL. 2005). Der Dm5-HT<sub>1A</sub>-Rezeptor scheint demgegenüber eine Funktion bei der Regulation von Schlaf zu haben (YUAN ET AL. 2006). Kürzlich wurde eine Rolle von 5-HT<sub>1</sub>-Rezeptoren in der Modulation von aggressivem Verhalten bei *D. melanogaster* postuliert (JOHNSON ET AL. 2009). Bemerkenswerterweise scheint eine gewisse konstitutive Aktivität der 5-HT<sub>1</sub>-Rezeptoren in diesem System vorhanden zu sein, da die pharmakologische Erhöhung der Aktivität dieses Systems durch den Agonisten 8-OH-DPAT spezielle Formen des aggressiven Verhaltens verstärkt, während die Inaktivierung dieses Systems durch den Antagonisten WAY 100635 diese Verhalten abschwächte (Johnson ET AL. 2009).

Auch Schaben sind ein etabliertes Modelltier für Studien bezüglich der circadianen Rhythmik (STENGL & HOMBERG 1994, HELFRICH-FÖRSTER ET AL. 1998, REISCHING & STENGL 1996, 2003a/b) sowie der Aggression (BELL & SAMS 1973, KOU ET AL. 2008). Die pharmakologische Charakterisierung gemeinsam mit der Lokalisierung des Pea5-HT<sub>1</sub>-Rezeptorproteins bildet nun die Grundlage für weiterführende Studien bezüglich der Beteiligung des Pea5-HT<sub>1</sub>-Rezeptors an diesen Verhaltensleistungen.

#### **4.3.1.3 Verteilungsmuster der serotonergen Rezeptoren in peripheren Geweben**

Biogene Amine und ihre Rezeptoren sind nicht nur bei der Signaltransduktion im Nervensystem von Bedeutung, sondern auch für die Funktion peripherer Organe (EVANS 1980, ROEDER 1994, BLENAU & BAUMANN 2001, WALZ ET AL. 2006). Sowohl das Pea5-*ht1*- als auch das Pea5-*ht7*-Transkript werden in den Speicheldrüsen sowie im Mitteldarm exprimiert. Weiterhin wurde das Pea5-*ht7*-Transkript in den Malpighischen Gefäßen nachgewiesen. Die Verteilung der Pea5-*ht7*-Rezeptor-mRNA korrespondiert mit der Lokalisation des 5-HT<sub>7</sub>-Rezeptors aus *A. aegypti* und *A. mellifera*. Der 5-HT<sub>7</sub>-Rezeptor aus *A. aegypti* wurde sowohl auf mRNA- als auch auf Proteinebene in Tracheolen innerhalb der Malpighischen Gefäßen und im Enddarm nachgewiesen (PIETRANTONIO ET AL. 2001). Auch die Am5-HT<sub>7</sub>-Rezeptor-mRNA wurde in den Malpighischen Gefäßen nachgewiesen (SCHLENSTEDT ET AL. 2006).

Auch in Vertebraten sind sowohl 5-HT<sub>1</sub>- als auch 5-HT<sub>7</sub>-Rezeptoren in der Peripherie weit verbreitet: So wurden humane 5-HT<sub>1</sub>-Rezeptoren beispielsweise in der Milz, der Niere, dem Herz und dem Magen-Darm-Trakt nachgewiesen (KOBILKA ET AL. 1987, HOYER ET AL. 2002, NICHOLS & NICHOLS 2008). Der humane 5-HT<sub>7</sub>-Rezeptor wird sowohl in der

Muskulatur des Colons als auch in peripheren Blutgefäßen exprimiert, wo er die Relaxation der glatten Muskulatur reguliert (IRVING ET AL. 2007, NICHOLS & NICHOLS 2008).

#### **4.3.1.4 Mögliche Funktionen der serotonergen Rezeptoren in peripheren Geweben**

Der Nachweis der 5-HT-Rezeptoren im Mitteldarm legt eine mögliche Funktion bei der Regulation der Darmbewegung nahe. Serotonin ist sowohl bei Vertebraten (GERSHON 2004) als auch bei Invertebraten (LUFFY & DORN 1992) für die peristaltische Darmbewegung notwendig. Intensive serotonerge Innervation konnte für die viszerale Muskulatur des Mitteldarms von *P. americana* gezeigt werden (DAVIES 1985). Bei verschiedenen anderen Insekten wurde ebenso ein serotonerges Nervengeflecht, welches den gesamten Intestinaltrakt oberflächlich umgibt und dessen Ausläufer sowohl in die Muskulatur als auch zu den Malpighischen Gefäßen ziehen, nachgewiesen (KLEMM ET AL. 1986). Diese Verteilung der 5-HT-immunoreaktiven Neurone führte zu der Annahme, dass Serotonin als Neurotransmitter und/oder Neuromodulator die intestinale Muskulatur und möglicherweise diuretische Organe beeinflusst. Der Pea5-HT<sub>7</sub>-Rezeptor konnte in den Malpighischen Gefäßen detektiert werden, wobei auch die 5-HT<sub>7</sub>-Rezeptoren aus *A. aegypti* und *A. mellifera* in diesem System nachgewiesen wurden (PIETRANTONIO ET AL. 2001, SCHLENSTEDT ET AL. 2006). Serotonin spielt in *A. aegypti* vermutlich eine wichtige Rolle bei Atmungsprozessen und die Koordination und Modulation der diuretischen Aktivität der Malpighischen Gefäße sowie für die Peristaltik des Enddarms (MESSER & BROWN 1995, CADY & HAGEDORN 1995, PIETRANTONIO ET AL. 2001). Diese Ergebnisse deuten an, dass Serotonin innerhalb der Insekten auf die diuretischen Organe und den Darm möglicherweise ähnliche Wirkungen ausübt. Eine exakte Lokalisation der 5-HT-Rezeptoren von *P. americana* innerhalb des intestinalen Systems mithilfe von *in situ* Hybridisierungs-Experimenten oder Rezeptor-spezifischen Antikörpern sowie physiologische Experimente sind erforderlich, um diese putative physiologische Funktion zu bestätigen.

### **4.3.2 Verteilungsmuster des Peadop2-Rezeptors**

#### **4.3.2.1 Verteilung des PeaDop2-Rezeptors im Nervensystem**

Sowohl mittels RT-PCR als auch durch immunocytochemische Experimente konnte der PeaDop2-Rezeptor im Gehirn nachgewiesen werden. Auf der mRNA-Ebene konnte gezeigt werden, dass beide Rezeptorvarianten - sowohl PeaDop2A als auch der C-terminal trunke PeaDop2B-Rezeptor - im Gehirn vorliegen. In den Western-Blot-Analysen wurde ein Antikörper verwendet, der gegen eine Region der dritten cytoplasmatischen Schleife gerichtet ist, und somit in der Lage sein sollte, beide Varianten zu markieren. Es wurden auch zwei spezifische Banden beobachtet, wobei nicht



abschließend geklärt werden konnte, ob es sich um die beiden Rezeptorvarianten oder um unterschiedlich modifizierte oder prozessierte Versionen einer der Varianten handelt. Der PeaDop2-Rezeptor wurde nicht nur im Gehirn detektiert, sondern auch im Unterschlundganglion sowie in den Thorakalganglien nachgewiesen. Die hohe Expression des PeaDop2-Rezeptors im Nervengewebe von *P. americana* ist kongruent zu Untersuchungen an weiteren Insekten. So wurden durch verschiedene Methoden sowohl auf der mRNA- als zum Teil auch auf der Protein-Ebene orthologe Rezeptoren im ZNS von *D. melanogaster* (FENG ET AL. 1996, HAN ET AL. 1996), *A. mellifera* (HUMPHRIES ET AL. 2003, MUSTARD ET AL. 2003), *P. xuthus* (ONO & YOSHIKAWA 2004) und *B. mori* (MITSUMASU ET AL. 2008) nachgewiesen.

In Schnitten des Schabengehirns wurden mithilfe des spezifischen anti-PeaDop2-Antikörpers eine Zellpopulation im anterioren Randbereich der Medulla sowie ein Netzwerk von Fasern in den optischen Loben und Fasern im ventrolateralen Protocerebrum und den optischen Kommissuren angefärbt (s. Abb. 3.28). In verschiedenen Insekten wurden mehrere Dopamin-immunreaktive Neurone mit Zellkörpern im Randbereich der Medulla, welche die Lobula bilateral innervieren, beschrieben (NÄSSEL & ELEKES 1992, WENDT & HOMBERG 1992). Diese zeigen insgesamt einen ähnlichen Verlauf zu den Rezeptor-spezifisch markierten Neuronen. Bei Vertebraten sind zahlreiche präsynaptisch auftretende Dopaminrezeptoren beschrieben, die häufig als Autorezeptoren fungieren (FEUERSTEIN ET AL. 2008). Weiterhin bemerkenswert sind deutliche Parallelen zu PDF-immunreaktiven Neuronen (STENGL & HOMBERG 1994). Das Verteilungsmuster des PeaDop2A-Rezeptorproteins im Gehirn unterscheidet sich damit deutlich von dem der orthologen Rezeptoren aus *D. melanogaster*, *A. mellifera* und *P. xuthus*. Der orthologe Rezeptor aus *D. melanogaster* wird innerhalb des Gehirns verstärkt in den Pilzkörpern exprimiert. Immunreaktivität wurde im Neuropil detektiert, welches die Pilzkörperaxone sowie die  $\alpha$ -,  $\beta$ - und  $\gamma$ -Loben beinhaltet, wobei der Rezeptor in den axonalen Trakten der Pilzkörper stark angereicht ist (HAN ET AL. 1996). Auch die orthologen Rezeptoren aus *P. xuthus* (MITSUMASU ET AL. 2008) und *A. mellifera* werden vorrangig in den Pilzkörpern exprimiert, allerdings variiert die Verteilung des Rezeptorproteins in der Honigbiene zum einen innerhalb der Entwicklung und korreliert zum anderen mit altersbedingten Veränderungen bei Arbeiterinnen (HUMPHRIES ET AL. 2003, KURSHAN ET AL. 2003).

#### 4.3.2.2 Mögliche Funktionen des PeaDop2-Rezeptors

Die orthologen Rezeptoren des PeaDop2-Rezeptors wurden vorwiegend in den Strukturen der Pilzkörper nachgewiesen und entsprechend u. a. mit Prozessen des

Lernens und der Gedächtnisbildung assoziiert (FENG ET AL. 1996, HUMPHRIES ET AL. 2003). Hingegen zeigte der PeaDop2-Rezeptor eine deutlich abweichende Verteilung im Gehirn, die wiederum offensichtliche Parallelen zum Verteilungsmuster von dopaminergen Neuronen sowie Schrittmacherneuronen (speziell PDF-positive Neurone) besitzt. Eine Beteiligung von Dopamin und weiteren biogenen Aminen an der Modulation und Regulation der circadianen Rhythmik ist sowohl bei Insekten aber auch Vertebraten bekannt. Weiterhin stellten SUH & JACKSON (2007) ein hypothetisches Modell für die Kontrolle der molekularen Rhythmik von *Ebony*, einer  $\beta$ -Alanin-biogene-Amin-Synthase zur Inaktivierung biogener Amine, und der Bewegungsaktivität auf. Hierbei fungieren *Ebony* und Dopamin als Bindeglied der Schrittmacherneuronen und der lokomotorischen Aktivität. In dieser Studie wurde gezeigt, dass *Ebony*-enthaltende Gliazellen in enger Nachbarschaft zu Projektionen von Schrittmacherzellen lokalisiert sind und *Ebony* in Abhängigkeit von PERIOD und TIMELESS rhythmisch exprimiert wird. Weiterhin wurde ein Zusammenhang der enzymatischen Aktivität von *Ebony* für die Kontrolle der Bewegungsaktivität durch die biologische Uhr aufgezeigt. Zelluläre und molekulare Analysen demonstrierten die Nähe zu dopaminergen Neuronen, was in Einklang mit der Vermutung steht, dass dopaminerge Signaltransduktion eine *in vivo*-Funktion bezüglich der Rhythmik besitzt (SUH & JACKSON 2007).

Ein Antikörper gegen PDF markiert bei allen bisher untersuchten Insekten eine kleine Gruppe von Neuronen, die das Schrittmacherzentrum innervieren und weitreichende Verzweigungen im Zentralgehirn und in den optischen Loben aufweisen (HELFRICH-FÖRSTER ET AL. 1998, SEHAĐOVA ET AL. 2003). Das Projektionsmuster der anti-PeaDop2-markierten Neurone deckt sich mit dem PDF-immunreaktiver Neuronen. Möglicherweise sind diese Neuronen und der PeaDop2-Rezeptor an der Kopplung zwischen den Schrittmacherneuronen beider Hemisphären und/oder an der Efferenz der circadianen Signale beteiligt. PDF agiert als Kommunikationssignal zwischen den Schrittmacherneuronen (PETRI & STENGL 1997, PENG ET AL. 2003, LIN ET AL. 2004) und als deren Ausgangstransmitter (RENN ET AL. 1999).

Für konkretere Aussagen bezüglich funktioneller Zusammenhänge müssen Doppelmarkierungen zeigen, ob direkte Kolo-kalisation und/oder enge Nachbarschaft der durch den anti-PeaDop2-Antikörper markierten Zellkörper und Fasern mit Dopamin und/oder PDF vorliegt.

#### **4.3.2.3 Verteilung des PeaDop2-Rezeptors in peripheren Organen**

Der PeaDop2-Rezeptor konnte sowohl durch RT-PCR-Experimente als auch durch Western-Blot-Analysen in großen Mengen in den Speicheldrüsen detektiert werden (mögliche physiologische Funktionen s. 4.3.2.4). In weiteren peripheren Organen hingegen wurde der Rezeptor nicht nachgewiesen. Bei Insekten wurde die Verteilung von

Dopaminrezeptoren außerhalb des ZNS nur in wenigen Studien untersucht. Übereinstimmend zum PeaDop2-Rezeptor konnte auch der orthologe Rezeptor aus *P. xuthus* nicht in Muskelgewebe detektiert werden (ONO & YOSHIKAWA 2004). Dieser Rezeptor wird in großen Mengen in den Tarsen exprimiert und könnte eine Funktion bei chemosensorischen Prozessen haben (ONO & YOSHIKAWA 2004).

#### **4.3.2.4 Mögliche Funktionen der Pea5-HT<sub>1</sub>-, Pea5-HT<sub>7</sub>- und PeaDop2A-Rezeptoren bei der Speichelbildung und -sekretion bei *P. americana***

Die Speicheldrüse von *P. americana* eignet sich hervorragend als organotypisches Modell zur Untersuchung der zellulären Wirkungen biogener Amine auf Insektenzellen, da ihre sekretorische Aktivität durch diese Substanzen reguliert und moduliert wird (WHITEHEAD 1973, HOUSE 1980, HOUSE & GINSBORG 1985, ALI 1997, WALZ ET AL. 2006).

Alle drei in der vorliegenden Arbeit untersuchten aminergen Rezeptoren (Pea5-HT<sub>1</sub>, Pea5-HT<sub>7</sub>, PeaDop2) wurden in den Speicheldrüsen von *P. americana* nachgewiesen. Daher stellt sich die Frage, auf welche Art und Weise diese Rezeptoren an der Regulation bzw. Modulation von Speichelbildung und -sekretion beteiligt sind.

Schaben besitzen innervierte, acinöse Speicheldrüsen (HOUSE & GINSBORG 1985, JUST & WALZ 1994), wobei die Drüsenacini aus unterschiedlichen Zelltypen (periphere Zellen, zentrale Zellen, zentroacinäre Zellen) bestehen, die verschiedene Komponenten des Speichels sezernieren und selektiv durch die biogenen Amine Dopamin und/oder Serotonin stimuliert werden (WALZ ET AL. 2006). Die Regulation der sekretorischen Aktivität der Speicheldrüse erfolgt über dopaminerge und serotonerge Neurone, deren Axone auf der Oberfläche der Speicheldrüse ein dichtes Netzwerk bilden. Auch octopaminerge, tyraminerge und GABAerge Fasern innervieren die Speicheldrüse und modulieren die Neurotransmitterfreisetzung (ROTTE ET AL. 2009a/b; C. ROTTE, persönliche Mitteilung). Bezüglich der serotonergen und dopaminergen Innervation zeigen die einzelnen Zelltypen der Speicheldrüse markante Unterschiede: Die peripheren Zellen sind sowohl dopaminerg als auch serotonerg innerviert, während die zentralen Zellen ausschließlich serotonerge Innervation aufweisen (GIFFORD ET AL. 1991, BAUMANN ET AL. 2002, 2004). Die Unterschiede im Innervationsmusters spiegeln sich auch in einer unterschiedlichen Beeinflussung der Aktivität der Speicheldrüse durch die biogenen Amine Dopamin und Serotonin wider: Serotonin stimuliert die Flüssigkeitssekretion in den peripheren Zellen und die Exocytose von sekretorischen proteinhaltigen Vesikeln aus den zentralen Zellen und löst so die Bildung eines proteinhaltigen Speichels aus (JUST & WALZ 1996). Dopamin hingegen bewirkt die Sekretion eines proteinfreien Speichels allein durch die sekretorische Aktivität der peripheren Zellen. Zusätzlich beeinflusst Dopamin die

Speichelmodifikation durch die Ausführungszellen (JUST & WALZ 1996, LANG & WALZ 1999).

In physiologischen Studien wurde für die 5-HT-induzierte Speichelsekretion ein pharmakologisches Profil aufgezeigt, dass dem des heterolog exprimierten Pea5-HT<sub>1</sub>-Rezeptors ähnlich ist (TROPFMANN ET AL. 2007): 5-MeOT wirkt als partieller Agonist und löste die Sekretion eines proteinhaltigen Speichels aus. Dagegen zeigten sowohl 5-CT als auch 8-OH-DPAT nur äußerst geringe Effekte. Weiterhin war der nicht selektive 5-HT-Rezeptor-Antagonist Methiothepin, welcher als neutraler Antagonist am heterolog exprimierten Pea5-HT<sub>1</sub>-Rezeptor wirkt, in der Lage, die 5-HT-induzierte Speichelsekretion vollständig zu blockieren. Jedoch blockierte auch Mianserin die Speichelsekretion, während diese Substanz an den Pea5-HT<sub>1</sub>-exprimierenden HEK 293-Zellen keine Wirkung entfaltet. Weiterhin ist zu berücksichtigen, dass die Übereinstimmungen bezüglich der Pharmakologie vorrangig auf nicht selektiven 5-HT-Rezeptorliganden oder Negativaussagen beruhen.

Serotonin induziert die Sekretion von proteinhaltigen Vesikeln aus den zentralen Zellen der Speicheldrüse (JUST & WALZ 1996, WALZ ET AL. 2006). Pharmakologische Experimente zeigten, dass diese Wirkung sowohl eine Erhöhung der intrazellulären cAMP-Konzentration als auch der [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> erfordert (RIETDORF ET AL. 2005). Es konnte bereits aufgeklärt werden, dass eine Stimulation mit Serotonin sowohl in den zentralen Zellen als auch den peripheren Zellen zu einer Erhöhung der intrazellulären Ca<sup>2+</sup>-Konzentration führt (Walz ET AL. 2006). Dies legt zum einen die Beteiligung von 5-HT<sub>2</sub>-Rezeptoren an diesem Prozess nahe, da deren Aktivierung in der Regel zu einer Erhöhung der Ca<sup>2+</sup>-Konzentration führt. Zum anderen kann aufgrund der Abhängigkeit der Proteinsekretion von einer erhöhten [cAMP]<sub>i</sub> die Anwesenheit eines Rezeptors der 5-HT<sub>7</sub>-Rezeptorklasse in den zentralen Zellen postuliert werden. Wirklich konnte der partiell klonierte Pea5-HT<sub>7</sub>-Rezeptor bereits in großen Mengen in der Speicheldrüse nachgewiesen werden, wobei Experimente zur zellulären Lokalisation noch ausstehen. Demgegenüber ist es eher unwahrscheinlich, dass der Pea5-HT<sub>1</sub>-Rezeptor für den oben beschriebenen 5-HT-vermittelten Effekte direkt verantwortlich ist, da er die [cAMP]<sub>i</sub> über eine Inhibierung der AC reduziert. Das vergleichsweise niedrige Expressionsniveau des Pea5-HT<sub>1</sub>-Rezeptors in der Speicheldrüse und die andererseits vorhandene Expression im Bereich des Unterschlundganglions könnten bedeuten, dass der Pea5-HT<sub>1</sub>-Rezeptor nicht in den Zellen der Speicheldrüse sondern in Nervenfasern, welche die Speicheldrüse innervieren, exprimiert wird und evtl. präsynaptisch die Freisetzung von Neurotransmittern moduliert. Für 5-HT<sub>1A</sub>-Rezeptoren der Vertebraten wurde gezeigt, dass sie sowohl prä- als auch postsynaptisch auftreten können und häufig als Autorezeptoren fungieren (NICHOLS & NICHOLS 2008).

Die pharmakologischen Eigenschaften der Dopamin-induzierten Speichelsekretion wurde ebenfalls im Detail untersucht (MARG ET AL. 2004) und zeigte ausgeprägte Gemeinsamkeiten zum pharmakologischen Profil des heterolog exprimierten PeaDop2A-Rezeptors: In beiden Systemen stimmten die Reihenfolgen der Wirksamkeit der getesteten Agonisten (6,7-ADTN > Dopamin > 6-Chloro-APB >> SKF 38393 = unwirksam) und Antagonisten (Flupenthixol > Chlorpromazin ≥ Butaclamol) überein. In früheren Studien an Speicheldrüsen der Grauschabe *Nauphoeta cinerea* erwiesen sich ebenfalls Dopamin und 6,7-ADTN als potenteste Agonisten und Flupenthixol als hoch potenter Blocker der sekretorischen Dopamin-Antwort (HOUSE & GINSBORG 1985; BREWARD ET AL. 1980, HOUSE 1980). Die an der Dopamin-induzierten Speichelsekretion beteiligten Botenstoffe sind bei *P. americana* noch weitgehend unbekannt. An Speicheldrüsen aus *N. cinerea* konnte jedoch eine über die Phosphoinositidkaskade vermittelte Erhöhung der  $[Ca^{2+}]_i$  mit den durch Dopamin hervorgerufenen Effekten in Verbindung gebracht werden (MITCHELL & MARTIN 1980, EVANS ET AL. 1991). Weiterhin konnte gezeigt werden, dass Dopamin die cAMP-Produktion in den Speicheldrüsen von *N. cinerea* stimuliert, allerdings erfolgten die Messungen an Gewebehomogenaten, so dass der Anstieg keinem spezifischen Zelltyp zugeordnet werden kann (GREWE & KEBABIAN 1982). Dies könnte möglicherweise über einen funktionell D1-ähnlichen Dopaminrezeptoren - evtl. PeaDop2A - gesteuert werden.

Erst eine ausführliche Charakterisierung weiterer 5-HT- und Dopaminrezeptoren sowie die zelluläre Lokalisation der Rezeptoren im Bereich des Speicheldrüsenkomplexes wird es ermöglichen, die komplexen Effekte von Serotonin und Dopamin auf die Regulation der Speichelsekretion bei *P. americana* vollständig aufzuklären.

#### 4.4 Ausblick

Die vorliegende Arbeit beschreibt die molekulare Charakterisierung der ersten 5-HT-Rezeptoren (Pea5-HT<sub>1</sub> und Pea5-HT<sub>7</sub>) sowie eines Dopaminrezeptors vom INDR-Typ (PeaDop2) der Amerikanischen Schabe *Periplaneta americana*. Es wurden Untersuchungen zur gewebespezifischen Expression der Rezeptoren durchgeführt. Für den Pea5-HT<sub>1</sub>- sowie den PeaDop2-Rezeptor wurden die intrazellulären Signalwege sowie die pharmakologischen Eigenschaften bestimmt und die Verteilungsmuster der Rezeptorproteine im Gehirn ermittelt. Weiterführende Untersuchungen sollten sich vordergründig mit den *in vivo*-Funktion der Rezeptoren beschäftigen. Weiterhin ist langfristig die Aufklärung und Charakterisierung des kompletten Repertoires an 5-HT- und Dopaminrezeptoren von *P. americana* erforderlich, um die vielfältigen und komplexen Wirkungsfelder des serotonergen und dopaminergen Systems aufzuklären.

Die Expression des *Peadop2*- und *Pea5-ht1*-Gens sowie des noch nicht vollständig klonierten *Pea5-ht7*-Rezeptorgens wurde in dieser Arbeit an verschiedenen neuronalen und nicht neuronalen Geweben adulter männlicher Schaben untersucht. Es wäre nun interessant, die Expression der Rezeptoren zum einen für weitere Gewebe, wie z. B. den Fortpflanzungsapparat, und zum anderen auf geschlechtsspezifische sowie ontogenetische Unterschiede hin mit *real-time* PCR-Experimenten zu untersuchen, um auf die Bedeutung der Rezeptoren in den verschiedenen Geweben, Geschlechtern und Entwicklungsstadien schließen zu können.

Im Rahmen dieser Arbeit ist es gelungen, die intrazellulären Signalwege, welche durch den Pea5-HT<sub>1</sub>- bzw. den PeaDop2A-Rezeptor gesteuert werden, aufzuklären. Vergleichbare Untersuchungen für den Pea5-HT<sub>7</sub>-Rezeptor stehen noch aus. Dessen Sequenzinformation müsste hierzu durch RACE-PCR-Experimente oder das Durchmustern einer cDNA-Bibliothek vervollständigt werden, um anschließend die cDNA des Rezeptors stabil in eine Zelllinie zu transfizieren. An den transfizierten Zellen kann die 5-HT-vermittelte zelluläre Antwort untersucht werden und parallel ein vergleichendes pharmakologisches Profil sowohl zum bereits charakterisierten Pea5-HT<sub>1</sub>-Rezeptor als auch zu orthologen Rezeptoren anderer Insekten erstellt werden.

Es wäre weiterhin interessant, die Spleißvarianten des PeaDop2-Rezeptors detaillierter zu untersuchen und zu überprüfen, ob tatsächlich beide Varianten *in vivo* translatiert werden und gegebenenfalls räumlich und/oder zeitlich differente Expressionsmuster aufweisen. Zusätzlich zu dem bereits vorhandenen Antikörper, der beide Spleißvarianten detektieren kann, wäre es möglich, mit einem Antikörper gegen die C-terminale Struktur des PeaDop2A-Rezeptors (welche der trunkierten Variante fehlt) Rezeptorvariantenspezifische Unterschiede zu detektieren. Wird auch die trunkierte Variante translatiert,

könnten nachfolgend in Koexpressions-Experimenten die Einflüsse der trunkierten Variante auf die Funktion des PeaDop2A-Rezeptors untersucht werden.

Die pharmakologische Charakterisierung und Lokalisierung der Rezeptoren bietet die Grundlagen und ersten Hinweise für weiterführende Studien zur Untersuchung der Beteiligung der einzelnen Rezeptoren an verschiedenen Verhaltensweisen oder physiologischen und neuronalen Prozessen *in vivo*. Sowohl der Pea5-HT<sub>1</sub>- als auch der PeaDop2-Rezeptor sind möglicherweise an der Modulation des Tag-Nacht-Rhythmus beteiligt. Bei Schaben (*Leucophaea maderae*) konnte erstmals die genaue Lokalisation der biologischen Uhr in einem distinkten Bereich des Gehirns bestimmt und die Bedeutung des *pigment dispersing factors* (PDF) für die circadiane Rhythmik aufgeklärt werden (NISHIITSUJUJI-UWO & PITTENDRIGH 1968, STENGL & HOMBERG 1994). Die weitreichenden morphologischen und funktionellen Grundlagen, die bereits an Schaben bezüglich der circadianen Rhythmik gewonnen wurden, können nun genutzt werden, um die genaue Funktion der untersuchten Rezeptoren in diesem System aufzuklären. Eine weitere Möglichkeit, die Funktion der Rezeptoren zu untersuchen, bieten molekulare *knock-down*-Technologien, die auch an Schaben bereits erfolgreich eingesetzt wurden (MARIE ET AL. 2000, BOOTH ET AL. 2009). Die Anwendung dieser Methode in Kombination mit physiologischen oder Verhaltens-Experimenten könnte zusätzlich Hinweise auf die Bedeutung der Rezeptoren liefern. Beispielsweise stehen verschiedene Techniken zur Untersuchung von Konditionierungs- und Lernprozessen für *P. americana* zur Verfügung (WATANABE ET AL. 2003, LENT & KWON 2004, KWON ET AL. 2004, WATANABE & MIZUNAMI 2007). Somit kann der Einfluss von biogenen Aminen auf assoziatives Lernen visueller oder olfaktorischer Reize untersucht werden. Durch gezielte pharmakologische und *knock-down*-Experimente, die aufgrund der in dieser Arbeit beschriebenen Rezeptorcharakterisierungen möglich geworden sind, könnten die spezifisch beteiligten Rezeptorklassen ermittelt werden.

## 5 LITERATUR

- ADAMS M. D., CELNIKER S. E., HOLT R. A., EVANS C. A., GOCAYNE J. D. ET AL. (2000) The genome sequence of *Drosophila melanogaster*. *Science*. **287**(5461), 2185-2195.
- ALEWIJNSE A. E., TIMMERMAN H., JACOBS E. H., SMIT M. J., ROOVERS E., COTECCHIA S., AND LEURS R. (2000) The effect of mutations in the DRY motif on the constitutive activity and structural instability of the histamine h2 receptor. *Mol. Pharmacol.* **57**, 890–898.
- ALI D. W. (1997) The aminergic and peptidergic innervation of insect salivary glands. *J. Exp. Biol.* **200**, 1941-1949.
- ALTSCHUL S. F., MADDEN T. L., SCHAFER A. A., ZHANG J., ZHANG Z., MILLER W., LIPMAN D. J. (1997) Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucl. Acids Res.* **25**, 3389-3402.
- ANGERS A., STOROZHUK M. V., DUCHAINE T., CASTELLUCCI V. F., AND DESGROSEILLERS L. (1998) Cloning and functional expression of an aplysia 5-HT receptor negatively coupled to adenylate cyclase. *J. Neurosci.* **18**, 5586–5593.
- ANSTEY M. L., ROGERS S. M., OTT S. R., BURROWS M., AND SIMPSON S. J. (2009) Serotonin mediates behavioral gregarization underlying swarm formation in desert locusts. *Science*. **323**, 627-630.
- ARVANITAKIS L., GERAS-RAAKA E., GERSHENGORN M. C. (1998) Constitutively signaling G protein-coupled receptors and human disease. *Trends Endocrinol. Metab.* **9**, 27–31.
- BALLESTEROS J. A. AND WEINSTEIN H. (1995) Integrated methods for the construction of three-dimensional models and computational probing of structure-function relations in G protein-coupled receptors. *Methods Neurosci.* **25**, 366-428.
- BALLESTEROS J. A., JENSEN A. D., LIAPAKIS G., RASMUSSEN S. G., SHI L., GETHER U., AND JAVITCH J. A. (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**, 29171–29177.
- BARAK L. S., TIBERI M., FREEDMAN N. J., KWATRA M. M., LEFKOWITZ R. J., AND CARON M. G. (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), 2790–2795.
- BARBAS D., ZAPPULLA J. P., ANGERS S., BOUVIER M., MOHAMED H. A., BYRNE J. H., CASTELLUCCI V. F., DESGROSEILLERS L. (2005) An aplysia dopamine1-like receptor: molecular and functional characterization. *J. Neurochem.* **96**(2), 414-427.
- BARD J. A., ZGOMBICK J., ADHAM N., VAYSSE P., BRANCHEK T. A., WEINSHANK R. L. (1993) Cloning of a novel human serotonin receptor (5-HT7) positively linked to adenylate cyclase. *J. Biol. Chem.* **268**(31), 23422-23426.
- BARNES N. M. AND SHARP T. (1999) A review of central 5-HT receptors and their function. *Neuropharmacol.* **38**, 1083-1152.
- BAUMANN O., DAMES P., KÜHNEL D., AND WALZ B. (2002) Distribution of serotonergic and dopaminergic fibers in the salivary gland complex of the cockroach *Periplaneta americana*. *BMC Physiology.* **2**, 9-23.
- BAUMANN O., KÜHNEL D., DAMES P., AND WALZ B. (2004) Dopaminergic and serotonergic innervation of the cockroach salivary glands: distribution and morphology of synapses and release sites. *J. Exp. Biol.* **207**, 2565-2575.
- BÉCAMEL C., ALONSO G., GALÉOTTI N., DEMEY E., JOUIN P., ULLMER C., DUMUIS A., BOCKAERT J., MARIN P. (2002) Synaptic multiprotein complexes associated with 5-HT(2C) receptors: a proteomic approach. *EMBO J.* **21**(10), 2332-2342.
- BEGGS K. T., HAMILTON I. S., KURSHAN P. T., MUSTARD J. A., AND MERCER A. R. (2005). Characterization of a D2-like dopamine receptor (AmDOP3) in honey bee, *Apis mellifera*. *Insect Biochem. Mol. Biol.* **35**(8), 873–882.
- BELL W. J. AND SAMS G. R. (1973) Aggressiveness in the cockroach *Periplaneta americana* (Orthoptera, Blattidae). *Behav. Biol.* **9**, 581-593.



- BHATTACHARYA S., HALL S. E., LI H., AND VAIDEHI N. (2008) Ligand-Stabilized Conformational States of Human  $\beta_2$  Adrenergic Receptor: Insight into G-Protein-Coupled Receptor Activation. *Biophys. J.* **94**, 2027–2042.
- BISCHOF L. J. AND ENAN E. E. (2004) Cloning, expression and functional analysis of an octopamine receptor from *Periplaneta americana*. *Insect Biochem. Mol. Biol.* **34**, 511–521.
- BISHOP C. A. AND O'SHEA M. (1983) Serotonin immunoreactive neurons in the central nervous system of an insect (*Periplaneta americana*). *J. Neurobiol.* **14**(4), 251–269.
- BLACK D. L. (2000) Protein Diversity from Alternative Splicing: A Challenge for Bioinformatics and Post-Genome Biology. *Cell.* **103**, 367–370.
- BLENAU W., MAY T., ERBER J. (1995) Characterization of a dopamine-sensitive [3H]LSD binding site in honeybee (*Apis mellifera*) brain. *Comp. Biochem. Physiol.* **110C**, 197–205.
- BLENAU W., ERBER J., AND BAUMANN A. (1998) Characterization of a dopamine D1 receptor from *Apis mellifera*: cloning, functional expression, pharmacology, and mRNA localization in the brain. *J. Neurochem.* **70**(1), 15–23.
- BLENAU W., BALFANZ S., AND 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. AND 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. AND BAUMANN A. (2003) Aminergic signal transduction in invertebrates: focus on tyramine and octopamine receptors. *Recent Res. Devel. Neurochem.* **6**, 225–240.
- BOCKAERT J. AND PIN J. P. (1999) Molecular tinkering of G protein-coupled receptors: an evolutionary success. *EMBO J.* **18**(7), 1723–1729.
- BOCKAERT J., MARIN P., DUMUIS A., AND FAGNI L. (2003). The 'magic tail' of G proteincoupled receptors: an anchorage for functional protein networks. *FEBS Lett.* **546**(1), 65–72.
- BOCKAERT J., ROUSSIGNOL G., BECAMEL C., GAVARINI S., JOUBERT L., DUMUIS A., FAGNI L., AND MARIN, P. (2004) GPCR-interacting proteins (GIPs): nature and functions. *Biochem. Soc. Trans.* **32**, 851–855.
- BOCKAERT J., CLAEYSEN S., BÉCAMEL C., DUMUIS A., MARIN P. (2006) Neuronal 5-HT metabotropic receptors: fine-tuning of their structure, signaling, and roles in synaptic modulation. *Cell Tissue Res.* **326**(2), 553–572.
- BONAVENTURE P., NEPOMUCENO D., HEIN L., SUTCLIFFE J. G., LOVENBERG T., HEDLUND P. B. (2004) Radioligand binding analysis of knockout mice reveals 5-hydroxytryptamine(7) receptor distribution and uncovers 8-hydroxy-2-(di-n-propylamino)tetralin interaction with alpha(2) adrenergic receptors. *Neuroscience.* **124**(4), 901–911.
- BOND R. A. AND IJZERMAN A. P. (2006) Recent developments in constitutive receptor activity and inverse agonism, and their potential for GPCR drug discovery. *Trends Pharmacol. Sci.* **27**(2), 92–96.
- BOOTH D., MARIE B., DOMENICI P., BLAGBURN J. M., BACON J. P. (2009) Transcriptional control of behavior: engrailed knock-out changes cockroach escape trajectories. *J. Neurosci.* **29**(22), 7181–7190.
- BOROWSKY B., ADHAM N., JONES K. A., RADDATZ R., ARTYMYSHYN R. ET AL. (2001). "Trace amines: identification of a family of mammalian G protein-coupled receptors". *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **98** (16), 8966–8971.
- BOUE S., LETUNIC I., AND BORK P. (2003) Alternative splicing and evolution. *Bioessays.* **25**(11), 1031–1034.
- BRADFORD M. M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* **72**, 248–254.
- BRANDT D. R. AND ROSS E. M. (1985) GTPase activity of the stimulatory GTP-binding regulatory protein of adenylate cyclase, Gs. Accumulation and turnover of enzymenucleotide intermediates. *J. Biol. Chem.* **260**(1), 266–272.
- BREWARD J., HOUSE C. R., SMITH R. K. (1980)  $\alpha$ -Flupenthixol: an antagonist of dopamine-evoked fluid secretion by an insect salivary gland preparation. *Br. J. Pharmacol.* **69**, 123–129.
- BUCHNER E. (1991) Genes expressed in the adult brain of *Drosophila* and effects of their mutations on behavior: a survey of transmitter- and second messenger-related genes. *J. Neurogenet.* **7**(4), 153–192.

- CADY C. AND HAGEDORN H. H. (1999) Effects of putative diuretic factors on intracellular second messenger levels in the Malpighian tubules of *Aedes aegypti*. *J. Insect Physiol.* **45**, 327–337.
- CARMAN C. V. AND BENOVIC J. L. (1998) G-protein-coupled receptors: turn-ons and turn-offs. *Curr. Opin. Neurobiol.* **8**, 335–344.
- CHARPENTIER S., JARVIE K. R., SEVERYNSE D. M., CARON M. G., TIBER M. (1996) Silencing of the constitutive activity of the dopamine D1B receptor. Reciprocal mutations between D1 receptor subtypes delineate residues underlying activation properties. *J. Biol. Chem.* **271**, 28071–28076.
- CERIONE R. A., CODINA J., BENOVIC J. L., LEFKOWITZ R. J., BIRNBAUMER L., CARON M. G. (1984) The mammalian beta 2-adrenergic receptor: reconstitution of functional interactions between pure receptor and pure stimulatory nucleotide binding protein of the adenylate cyclase system. *Biochemistry.* **23**, 4519–4525.
- CHEN A., HOLMES S. P., AND PIETRANTONIO P. V. (2004) Molecular cloning and functional expression of a serotonin receptor from the Southern cattle tick, *Boophilus microplus* (Acari: Ixodidae). *Insect Mol. Biol.* **13**, 45–54.
- CHEN C. AND OKAYAMA H. (1987) High-efficiency transformation of mammalian cells by plasmid DNA. *Mol. Cell. Biol.* **7**, 2745–2752.
- CHEREZOV V., ROSENBAUM D. M., HANSON M. A., RASMUSSEN S. G., THIAN F. S. ET AL. (2007) High-resolution crystal structure of an engineered human beta2-adrenergic G protein-coupled receptor. *Science.* **318**(5854), 1258–1265.
- CHINI B. AND PARENTI M. (2009) G-protein-coupled receptors, cholesterol and palmitoylation: facts about fats. *J. Mol. Endocrinol.* **42**(5), 371–379.
- CHOMCZYNSKI P. AND SACCHI N. (1987) Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal. Biochem.* **162**(1), 156–159.
- CLARIDGE-CHANG A., WIJNEN H., NAEF F., BOOTHROYD C., RAJEWSKY N., AND YOUNG M. W. (2001) Circadian regulation of gene expression systems in the *Drosophila* head. *Neuron.* **32**, 657–671.
- CLAGETT-DAME M. AND MCKELVY J. F. (1989) N-linked oligosaccharides are responsible for rat striatal dopamine D2 receptor heterogeneity. *Arch. Biochem. Biophys.* **274**(1), 145–154.
- CLARK M. C., DEVER T. E., DEVER J. J., REHDER V., SOSA M. A., AND BARO D. J. (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), 3421–3435.
- CLARK M. C AND BARO D. J. (2006) Molecular cloning and characterization of crustacean type-one dopamine receptors: D<sub>1αPan</sub> and D<sub>1βPan</sub>. *Comp. Biochem. Physiol.* **143B**, 294–301.
- CLARK M. C AND BARO D. J. (2007) Arthropod D2 receptors positively couple with cAMP through the Gi/o protein family. *Comp. Biochem. Physiol. B. Biochem. Mol. Biol.* **146**(1), 9–19.
- CLAEYSEN S., SEBBEN M., BECAMEL C., BOCKAERT J., AND DUMUIS A. (1999) Novel brainspecific 5HT4 receptor splice variants show marked constitutive activity: Role of the C-terminal intracellular domain. *Mol. Pharmacol.* **55**, 910–920.
- COLAS J. F., LAUNAY J. M., KELLERMANN O., ROSAY P., AND MAROTEAUX L. (1995) *Drosophila* 5-HT serotonin receptor: Coexpression with fushi-tarazu during segmentation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **92**, 5441–5445.
- COLAS J. F., LAUNAY J. M., VONESCH J. L., HICKEL P., AND MAROTEAUX L. (1999) Serotonin synchronises convergent extension of ectoderm with morphogenetic gastrulation movements in *Drosophila*. *Mech. Dev.* **87**, 77–91.
- COLEMAN C. M. AND NECKAMEYER W. S. (2005). Serotonin synthesis by two distinct enzymes in *Drosophila melanogaster*. *Arch. Insect Biochem. Physiol.* **59**, 12–31.
- COOPER R. L. AND NECKAMEYER W. S. (1999) Dopaminergic modulation of motor neuron activity and neuromuscular function in *Drosophila melanogaster*. *Comp. Biochem. Physiol. B. Biochem. Mol. Biol.* **122**(2), 199–210.
- COSI C. AND KOEK W. (2000) The putative «silent» 5-HT<sub>1A</sub> receptor antagonist, WAY 100635, has inverse agonist properties at cloned human 5-HT<sub>1A</sub> receptors. *Eur. J. Pharmacol.* **401**, 9–15.

- COX B. A., HENNINGSSEN R. A., SPANOYANNIS A., NEVE R. L., NEVE K. A. (1992) Contributions of conserved serine residues to the interactions of ligands with dopamine D2 receptors. *J. Neurochem.* **59**(2), 627-635.
- DACKS A. M., DACKS J. B., CHRISTENSEN T. A., NIGHORN A. J. (2006) The cloning of one putative octopamine receptor and two putative serotonin receptors from the tobacco hawkmoth, *Manduca sexta*. *Insect Biochem. Mol. Biol.* **36**, 741-747.
- DAVIES M. N., SECKER A., FREITAS A. A., MENDAO M., TIMMIS J., FLOWER D. R. (2007) On the hierarchical classification of G protein-coupled receptors. *Bioinformatics.* **23**(23), 3113-3118.
- DAVIS N. T. (1985) Serotonin-immunoreactive visceral nerves and neurohemal system in the cockroach *Periplaneta americana* (L.). *Cell Tissue Res.* **240**, 593-600.
- DEFEA K. (2008) Beta-arrestins and heterotrimeric G-proteins: collaborators and competitors in signal transduction. *Br. J. Pharmacol.* **153**(Suppl 1), S298-309.
- DEGEN J., GEWECKE M., ROEDER T. (2000) The pharmacology of a dopamine receptor in the locust nervous tissue. *Eur. J. Pharmacol.* **396**(2-3), 59-65.
- DEMCHYSHYN L. L., MCCONKEY F., NIZNIK H. B. (2000) Dopamine D5-receptor agonist high affinity and constitutive activity profile conferred by carboxyl-terminal tail sequence. *J. Biol. Chem.* **275**, 23446-23455.
- DESLAURIERS B., PONCE C., LOMBARD C., LARGUIER R., BONNAFOUS J. C., MARIE J. (1999) N-glycosylation requirements for the AT1a angiotensin II receptor delivery to the plasma membrane. *J. Biochem.* **339**, 397-405.
- DIERICK H. A. AND GREENSPAN R. J. (2007) Serotonin and neuropeptide F have opposite modulatory effects on fly aggression. *Nat. Genet.* **39**, 678-682.
- DIXON R. A., SIGAL I. S., CANDELORE M. R., REGISTER R. B., SCATTERGOOD W., RANDS E., STRADER C. D. (1987) Structural features required for ligand binding to the beta-adrenergic receptor. *EMBO J.* **6**(11), 3269-3275.
- DOHLMAN H. G., THORNER J., CARON M. G., LEFKOWITZ R. J. (1991) Model systems for the study of seven-transmembrane-segment receptors. *Annu. Rev. Biochem.* **60**, 653-88.
- DONNELLY D., FINDLAY J. B. C., AND BLUNDELL T. L. (1994) The evolution and structure of aminergic G protein-coupled receptors. *Recept. Channels.* **2**, 61-78.
- DOWNER R. G. H. (1990) Octopamine, dopamine, and 5-hydroxytryptamine in the cockroach nervous system. In: Huber I., Masler E. P., Rao B. R. (Eds.) *Cockroaches as Models for Neurobiology: Application in Biomedical Research*. CRC Press, Boca Raton, pp. 103-124.
- DOWNES G. B. AND GAUTAM N. (1999) The G protein subunit gene families. *Genomics.* **62**(3), 544-552.
- DRAPER I., KURSHAN P. T., MCBRIDE E., JACKSON F. R., KOPIN A. S. (2007) Locomotor activity is regulated by D2-like receptors in *Drosophila*: an anatomic and functional analysis. *Dev. Neurobiol.* **67**(3), 378-393.
- EHLERT J. E., ADDISON C. A., BURDICK M. D., KUNKEL S. L., AND STRIETER R. M. (2004) Identification and partial characterization of a variant of human cxcr3 generated by posttranscriptional exon skipping. *J. Immunol.* **173**(10), 6234-6240.
- EINSTEIN R., JORDAN H., ZHOU W., BRENNER M., MOSES E. G., LIGGETT S. B. (2008) Alternative splicing of the G protein-coupled receptor superfamily in human airway smooth muscle diversifies the complement of receptors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **105**(13), 5230-5235.
- ELMHURST J. L., XIE Z., O'DOWD B. F., AND GEORGE S. R. (2000) The splice variant d3nf reduces ligand binding to the D3 dopamine receptor: evidence for heterooligomerization. *Brain Res. Mol. Brain Res.* **80**(1), 63-74.
- EMILIEN G., MALOTEAUX J. M., GEURTS M., HOOGENBERG K., CRAGG S. (1999) Dopamine receptors-physiological understanding to therapeutic intervention potential. *Pharmacol. Ther.* **84**(2), 133-156.
- ERBER J., KLOPPENBURG P., AND SCHEIDLER A. (1991) Neuromodulation in the honeybee: autoradiography, behaviour and electrophysiology. In L. J. Goodman and R. C. Fisher. *The behaviour and pharmacology of bees*. chapter 19, p 273-287. CAB International.
- EVANS P. D. (1980) Biogenic amines in the insect nervous system. *Adv. Insect Physiol.* **15**, 317-473.
- EVANS P. D. (1985) Octopamine. In: Kerkut, G.A. and Gilbert, L.I. Eds, *Comprehensive Insect Physiology, Biochemistry, and Pharmacology*, vol. 11: Pharmacology, Oxford, Pergamon Press. pp 499-530.

- EVANS P. D. (1986) Biogenic amine receptors and their mode of action. In: Borkovec, A.B., Gelman, D.B. Eds, *Insect Neurochemistry and Neurophysiology*. Clifton, N.J., Humana Press, pp 117-141.
- EVANS A. M., MACEWAN D. J., AND PALMER S. (1991) The D1-like dopamine receptor of the cockroach salivary gland is coupled to phospholipase C in addition to adenylyl cyclase. *Br. J. Pharmacol.* **102**, 212.
- FARRENS D. L., ALTENBACH C., YANG K., HUBBELL W. L., KHORANA H. G. (1996) Requirement of rigid-body motion of transmembrane helices for light activation of rhodopsin. *Science*. **274**(5288), 768-770.
- FENG G., HANNAN F., REALE V., HON Y. Y., KOUSKY C. T., EVANS P. D., AND HALL L. M. (1996) Cloning and functional characterization of a novel dopamine receptor from *Drosophila melanogaster*. *J. Neurosci.* **16**(12), 3925-3933.
- FENG Y. AND GREGOR P. (1997) Cloning of a novel member of the G protein-coupled receptor family related to peptide receptors. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **231**(3), 651-654.
- FERGUSON S. S. (2001) Evolving concepts in G protein-coupled receptor endocytosis: the role in receptor desensitization and signaling. *Pharmacol. Rev.* **53**, 1-24.
- FEUERSTEIN T. J. (2008) Presynaptic receptors for dopamine, histamine, and serotonin. *Handb. Exp. Pharmacol.* (**184**), 289-338.
- FLANAGAN C. A. (2005) A GPCR that is not 'DRY'. *Mol. Pharmacol.* **68**(1), 1-3.
- FLETCHER A., FORSTER E. A., BILL D. J., BROWN G., CLIFFE I. A. ET AL. (1996) Electrophysiological, biochemical, neurohormonal and behavioural studies with WAY-100635, a potent, selective and silent 5-HT<sub>1A</sub> receptor antagonist. *Behav. Brain Res.* **73**, 337-353.
- FLOWER D. R. (1999) Modelling G-protein-coupled receptors for drug design. *Biochim. Biophys. Acta.* **1422**(3), 207-234.
- FORSTER E. A., CLIFFE I. A., BILL D. J., DOVER G. M., JONES D., REILLY Y., AND A. FLETCHER (1995) A pharmacological profile of the selective silent 5-HT<sub>1A</sub> receptor antagonist. WAY 100,635. *Eur. J. Pharmacol.* **281**, 81-88.
- FRASER C. M. (1989) Site-directed mutagenesis of beta-adrenergic receptors. Identification of conserved cysteine residues that independently affect ligand binding and receptor activation. *J. Biol. Chem.* **264**(16), 9266-9270.
- FREDRIKSSON R., LAGERSTROM M. C., LUNDIN L. G., AND SCHIÖTH H. B. (2003) The G-protein-coupled receptors in the human genome form five main families. Phylogenetic analysis, paralogon groups, and fingerprints. *Mol. Pharmacol.* **63**, 1256-1272.
- FRIEDMAN J., BABU B., CLARK R. B. (2002) Beta(2)-adrenergic receptor lacking the cyclic AMP-dependent protein kinase consensus sites fully activates extracellular signal-regulated kinase 1/2 in human embryonic kidney 293 cells: lack of evidence for G(s)/G(i) switching. *Mol. Pharmacol.* **62**, 1094-1102.
- FRITZE O., FILIPEK S., KUKSA V., PALCZEWSKI K., HOFMANN K. P., AND ERNST O. P. (2003) Role of the conserved NPxxY(x)5,6F motif in the rhodopsin ground state and during activation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **100**, 2290-2295.
- GENTLES A. J. AND KARLIN S. (1999) Why are human G-proteincoupled receptors predominantly intronless? *Trends Genet.* **15**, 47-49.
- GERBER S., KRASKY A., ROHWER A., LINDAUER S., CLOSS E., ROGNAN D., GUNKEL N., SELZER P. M., WOLF C. (2006) Identification and characterisation of the dopamine receptor II from the cat flea *Ctenocephalides felis* (CfDopRII). *Insect Biochem. Mol. Biol.* **36**, 749-758.
- GERHARDT C. C. AND VAN HEERIKHUIZEN H. (1997) Functional characteristics of heterologously expressed 5-HT receptors. *Eur. J. Pharmacol.* **334**, 1-23.
- GERSHON M. D. (2004) Review article: serotonin receptors and transporters—roles in normal and abnormal gastrointestinal motility. *Aliment. Pharmacol. Ther.* **20**(Suppl 7), 3-14.
- GETHER U. AND KOBILKA B. K. (1998) G protein-coupled receptors II. mechanism of agonist activation. *J. Biol. Chem.* **273**, 17979-17982.
- GETHER U. (2000) Uncovering molecular mechanisms involved in activation of G protein-coupled receptors. *Endocr. Rev.* **21**, 90-113.

- GEYER M. A. AND VOLLENWEIDER F. X. (2008) Serotonin research: contributions to understanding psychoses. *Trends Pharmacol. Sci.* **29**, 445-453.
- GIFFORD A. N., NICHOLSON R. A., PITMAN R. M. (1991) The dopamine and 5-hydroxytryptamine content of locust and cockroach salivary neurons. *J. Exp. Biol.* **161**, 405-414.
- GOLDSTEIN R. S. AND CAMHI J. M. (1991) Different effects of the biogenic amines dopamine, serotonin and octopamine on the thoracic and abdominal portions of the escape circuit in the cockroach. *J. Comp. Physiol. A.* **168**(1), 103-112.
- GOLDSTEIN M. AND DEUTCH A. Y. (1992) Dopaminergic mechanisms in the pathogenesis of schizophrenia. *FASEB J.* **6**, 2413-2421.
- GOTZES F., BALFANZ S., AND 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.
- GREWE C. W. AND KEBABIAN J. W. (1982) Dopamine stimulates production of cyclic AMP by the salivary glands of the cockroach, *Nauphoeta cinerea*. *Cell. Mol. Neurobiol.* **2**, 65-69.
- GROHMANN L., BLENAU W., ERBER J., EBERT P. R., STRÜNKER T., AND BAUMANN A. (2003) Molecular and functional characterization of an octopamine receptor from honeybee (*Apis mellifera*) brain. *J. Neurochem.* **86**, 725-735.
- HALL R. A., PREMONT R. T., AND LEFKOWITZ R. J. (1999). Heptahelical receptor signaling: beyond the G protein paradigm. *J. Cell Biol.* **145**(5), 927-932.
- HALL T. A. (1999) BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucl. Acids Symp. Ser.* **41**, 95-98.
- HAN K. A., MILLAR N. S., GROTEWIEL M. S., DAVIS R. L. (1996) DAMB, a novel dopamine receptor expressed specifically in *Drosophila* mushroom bodies. *Neuron.* **16**, 1127-1135.
- HANNON J. AND HOYER D. (2008) Molecular biology of 5-HT receptors. *Behav. Brain Res.* **195**(1), 198-213.
- HAUSER F., CAZZAMALI G., WILLIAMSON M., BLENAU W., AND GRIMMELIKHUIJZEN C. J. P. (2006) A review of neurohormone GPCRs present in the fruitfly *Drosophila melanogaster* and the honey bee *Apis mellifera*. *Prog. Neurobiol.* **80**, 1-19.
- HEARN M. G., REN Y., MCBRIDE E. W., REVEILLAUD I., BEINBORN M., AND KOPIN A. S. (2002). A *Drosophila* dopamine 2-like receptor: Molecular characterization and identification of multiple alternatively spliced variants. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **99**(22), 14554-14559.
- HELFRICH-FÖRSTER C., STENGL M., HOMBERG U. (1998) Organization of the circadian system in insects. *Chronobiol. Int.* **15**, 567-594.
- HELFRICH-FÖRSTER C. (2004) The circadian clock in the brain: a structural and functional comparison between mammals and insects. *J. Comp. Physiol. A.* **190**, 601-613.
- HERMANS E. (2003) Biochemical and pharmacological control of the multiplicity of coupling at G-protein-coupled receptors. *Pharmacol. Ther.* **99**(1), 25-44.
- HIGASHIJIMA T., FERGUSON K. M., STERNWEIS P. C., SMIGEL M. D., GILMAN A. G. (1987) Effects of Mg<sup>2+</sup> and the  $\beta\gamma$ -subunit complex on the interactions of guanine nucleotides with G proteins. *J. Biol. Chem.* **262**(2), 762-766.
- HIRASAWA A., SHIBATA K., HORIE K., TAKEI Y., OBIKA K., TANAKA T., MURAMOTO N., TAKAGAKI K., YANO J., TSUJIMOTO G. (1995) Cloning, functional expression and tissue distribution of human alpha 1c-adrenoceptor splice variants. *FEBS Lett.* **363**(3), 256-260.
- HIRSH J. AND DAVIDSON N. (1981) Isolation and characterization of the dopa decarboxylase gene of *Drosophila melanogaster*. *Mol. Cell. Biol.* **1**, 475-485.
- HO B. Y., KARSCHIN A., BRANCHEK T., DAVIDSON N., LESTER H. A. (1992) The role of conserved aspartate and serine residues in ligand binding and in function of the 5-HT1A receptor: a site-directed mutation study. *FEBS Lett.* **312**(2-3), 259-262.

- HOBSON R. J., GENG J., GRAY A. D., AND KOMUNIECKI R. W. (2003) SER-7b, a constitutively active Galphas coupled 5-HT<sub>7</sub>-like receptor expressed in the *Caenorhabditis elegans* M4 pharyngeal motorneuron. *J. Neurochem.* **87**, 22–29.
- HOLT R. A., G. SUBRAMANIAN G. M., HALPERN A., SUTTON G. G., CHARLAB R. ET AL. (2002) The Genome Sequence of the Malaria Mosquito *Anopheles gambiae*. *Science.* **298**(5591), 129-149.
- HOMBERG U. (2002) Neurotransmitters and neuropeptides in the brain of the locust. *Microsc. Res. Tech.* **56**(3), 189-209.
- HONEY BEE GENOME SEQUENCING CONSORTIUM (2006) Insights into social insects from the genome of the honeybee *Apis mellifera*. *Nature.* **443**(7114), 931-949.
- HOPKINS A. L. AND GROOM C. R. (2002) The druggable genome. *Nat. Rev. Drug Discov.* **1**, 727-730.
- HOUSE C. R. (1980) Physiology of invertebrate salivary glands. *Biol. Rev.* **55**, 417-473.
- HOUSE C. R. AND GINSBORG B. L. (1985) Salivary Gland. In: Comprehensive Insect Physiology and Pharmacology, Eds. KERKUT, G.A., GILBERT, L.I., Pergamon Press, Oxford.
- HOYER D., CLARKE D. E., FOZARD J. R., HARTIG P. R., MARTIN G. R., MYLECHARANE E. J., SAXENA P. R., AND HUMPHREY P. P. (1994) International Union of Pharmacology classification of receptors for 5-hydroxytryptamine (serotonin). *Pharmacol. Rev.* **46**, 157–203.
- HOYER D., HANNON J. P., AND MARTIN G. R. (2002) Molecular, pharmacological and functional diversity of 5-HT receptors. *Pharmacol. Biochem. Behav.* **71**, 533–554.
- HSUEH Y.-P, XUE C., AND HEITMAN J. (2009) A constitutively active GPCR governs morphogenic transitions in *Cryptococcus neoformans*. *EMBO J.* **28**, 1220–1233.
- HUANG E. S. (2003) Construction of a sequence motif characteristic of aminergic G protein-coupled receptors. *Protein Sci.* **12**(7), 1360-1367.
- HUBER I., MASLER E. P., RAO B. R. (1990) Cockroaches as models for neurobiology: applications in biomedical research. (Vol. I + II) CRC Press, Boca Raton
- HUMPHRIES M. A., MUSTARD J. A., HUNTER S. J., MERCER A., WARD V., AND EBERT P. R. (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.
- HUNYADY L., VAUQUELIN G., VANDERHEYDEN P. (2003) Agonist induction and conformational selection during activation of a G-protein-coupled receptor. *Trends Pharmacol. Sci.* **24**(2), 81-86.
- IRVING H. R., TAN Y. Y., TOCHON-DANGUY N., LIU H., CHETTY N., DESMOND P. V., POUTON C. W., COUPAR I. M. (2007) Comparison of 5-HT<sub>4</sub> and 5-HT<sub>7</sub> receptor expression and function in the circular muscle of the human colon. *Life Sci.* **80**(13), 1198-1205.
- JAAKOLA V. P., GRIFFITH M. T., HANSON M. A., CHEREZOV V., CHIEN E. Y., LANE J. R., IJZERMAN A. P., STEVENS R. C. (2008) The 2.6 angstrom crystal structure of a human A2A adenosine receptor bound to an antagonist. *Science.* **322**, 1211–1217.
- JACKSON D. M. AND WESTLIND-DANIELSSON A. (1994) Dopamine receptors: molecular biology, biochemistry and behavioural aspects. *Pharmacol. Ther.* **64**, 291-370.
- JACOBY E., BOUHELAL R., GERSPACHER M., SEUWEN K. (2006) The 7 TM G-protein-coupled receptor target family. *Chem. Med. Chem.* **1**(8), 761-782.
- JIN H., XIE Z., GEORGE S. R., AND O'DOWD B. F. (1999). Palmitoylation occurs at cysteine 347 and cysteine 351 of the dopamine D(1) receptor. *Eur. J. Pharmacol.* **386**(2-3), 305–312.
- JOHNSON M. S., ROBERTSON D. N., HOLLAND P. J., LUTZ E. M., MITCHELL R. (2006) Role of the conserved NPxxY motif of the 5-HT<sub>2A</sub> receptor in determining selective interaction with isoforms of ADP-ribosylation factor (ARF). *Cell Signal.* **18**(10), 1793-1800.
- JOHNSON O., BECNEL J., AND NICHOLS C. D. (2009) Serotonin 5-HT<sub>2</sub> and 5-HT<sub>1A</sub>-like receptors differentially modulate aggressive behaviors in *Drosophila melanogaster*. *Neuroscience.* **158**, 1292-1300.
- JOHNSTON C. A. AND WATTS V. J. (2003) Sensitization of adenylate cyclase: a general mechanism of neuroadaptation to persistent activation of Galpha (i/o)-coupled receptors? *Life Sci.* **73**, 2913-2925.

- JONES B. J. AND BLACKBURN T. P. (2002) The medical benefit of 5-HT research. *Pharmacol. Biochem. Behav.* **71**, 555-568.
- JUST F. AND WALZ B. (1994) Salivary glands of the cockroach, *Periplaneta americana*: new data from light and electron microscopy. *J. Morphol.* **220**, 35-46.
- JUST F. AND WALZ B. (1996) The effects of serotonin and dopamine on salivary secretion by isolated cockroach salivary glands. *J. Exp. Biol.* **199**, 407-413.
- KALATSKAYA I., SCHÜSSLER S., BLAUKAT A., MÜLLER-ESTERL W., JOCHUM M., PROUD D., FAUSSNER A. (2004) Mutation of tyrosine in the conserved NPXXY sequence leads to constitutive phosphorylation and internalization, but not signaling, of the human B2 bradykinin receptor. *J. Biol. Chem.* **279**(30), 31268-31276.
- KÄLL L., KROGH A., AND SONNHAMMER E. L. (2004) A Combined Transmembrane Topology and Signal Peptide Prediction Method. *J. Mol. Biol.* **338**, 1027-1036.
- KANDEL E. R., SCHWARTZ J. H. AND JESSELL T. M. (1996) *Neurowissenschaften - Eine Einführung*. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg.
- KARPA K. D., LIN R., KABBANI N., AND LEVENSON R. (2000) The dopamine D3 receptor interacts with itself and the truncated d3 splice variant d3nf: D3-d3nf interaction causes mislocalization of D3 receptors. *Mol. Pharmacol.* **58**(4), 677-683.
- KENAKIN T. (2004) Efficacy as a vector: the relative prevalence and paucity of inverse agonism. *Mol. Pharmacol.* **65**, 2-11.
- KILPATRICK G. J., DAUTZENBERG F. M., MARTIN G. R., AND EGLER R. M. (1999) 7TM receptors: the splicing on the cake. *Trends Pharmacol. Sci.* **20**(7), 294-301.
- KJELSBERG M. A., COTECCHIA S., OSTROWSKI J., CARON M. G., AND LEFKOWITZ R. J. (1992) Constitutive activation of the alpha 1b-adrenergic receptor by all amino acid substitutions at a single site. evidence for a region which constrains receptor activation. *J. Biol. Chem.* **267**(3), 1430-1433.
- KLEMM N., STEINBUSCH H. W., SUNDLER F. (1984) Distribution of serotonin-containing neurons and their pathways in the supraoesophageal ganglion of the cockroach *Periplaneta americana* (L.) as revealed by immunocytochemistry. *J. Comp. Neurol.* **225**(3), 387-395.
- KLEMM N., NÄSSEL D. R., OSBORNE N. N. (1985) Dopamine-beta-hydroxylase-like immunoreactive neurons in two insect species, *Calliphora erythrocephala* and *Periplaneta americana*. *Histochemistry.* **83**(2), 159-164.
- KLEMM N., HUSTERT R., CANTERA R., NÄSSEL D. R. (1986) Neurons reactive to antibodies against serotonin in the stomatogastric nervous system and in the alimentary canal of locust and crickets (Orthoptera, Insecta). *Neuroscience.* **17**(1), 247-261
- KOBE F., RENNER U., WOEHLER A., WLODARCZYK J., PAPUSHEVA E., BAO G., ZEUG A., RICHTER D. W., NEHER E. AND PONIMASKIN E. (2008) Stimulation- and palmitoylation-dependent changes in oligomeric conformation of serotonin 5-HT1A receptors. *Biochim. Biophys. Acta.* **1783**, 1503-1516.
- KOBILKA B. K., FRIELLE T., COLLINS S., YANG-FENG T., KOBILKA T. S., FRANCKE U., LEFKOWITZ R. J., AND CARON M. G. (1987). An intronless gene encoding a potential member of the family of receptors coupled to guanine nucleotide regulatory proteins. *Nature.* **329**, 75-79.
- KOBILKA B. K. (2007) G Protein Coupled Receptor Structure and Activation. *Biochim. Biophys. Acta.* **1768**(4), 794-807.
- KOHOUT T. A., LIN F. S., PERRY S. J., CONNER D. A., LEFKOWITZ R. J. (2001) beta-Arrestin 1 and 2 differentially regulate heptahelical receptor signaling and trafficking. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **98**(4), 1601-1606.
- KOHOUT T. A. AND LEFKOWITZ R. J. (2003) Regulation of G protein-coupled receptor kinases and arrestins during receptor desensitization. *Mol. Pharmacol.* **63**, 9-18.
- KONOPKA J. B., MARGARIT S. M., DUBE P. (1996) Mutation of Pro-258 in transmembrane domain 6 constitutively activates the G protein-coupled alpha-factor receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **93**, 6764-6769.
- KOSKI G., STREATY R. A., KLEE W. A. (1982) Modulation of sodiumsensitive GTPase by partial opiate agonists. An explanation for the dual requirement for Na<sup>+</sup> and GTP in inhibitory regulation of adenylate cyclase. *J. Biol. Chem.* **257**, 14035-14040

- KOU R., CHOU S. Y., HUANG Z. Y., YANG R. L. (2008) Juvenile hormone levels are increased in winners of cockroach fights. *Horm. Behav.* **54**(4), 521-527.
- KOZAK M. (1984) Compilation and analysis of sequences upstream from the translational start site in eukaryotic mRNAs. *Nucl. Acids Res.* **12**, 857-872.
- KOZAK M. (1996) Interpreting cDNA sequences: some insights from studies on translation. *Mamm. Genome.* **7**(8), 563-574.
- KRACH C. (2007) Biogene Aminrezeptoren der Schabe *Periplaneta americana*: Identifizierung, Charakterisierung und Lokalisierung von PeaTYR1 und PeaDOP2. *Dissertation*.
- KREISSL S., EICHMULLER S., BICKER G., RAPUS J., AND ECKERT M. (1994) Octopamine-like immunoreactivity in the brain and subesophageal ganglion of the honeybee. *J Comp. Neurol.* **348**(4), 583-595.
- KROEZE W. K., KRISTIANSEN K., AND ROTH B. L. (2002) Molecular biology of serotonin receptors - structure and function at the molecular level. *Curr. Top. Med. Chem.* **2**, 507-528.
- KROEZE W. K., SHEFFLER D. J., ROTH B. L. (2003) G-protein-coupled receptors at a glance. *J. Cell. Sci.* **116**(Pt 24), 4867-4869.
- KURSHAN P. T., HAMILTON I. S., MUSTARD J. A., MERCER A. R. (2003) Developmental changes in expression patterns of two dopamine receptor genes in mushroom bodies of the honeybee, *Apis mellifera*. *J. Comp. Neurol.* **466**, 91-103.
- KWON H. W., LENT D. D., STRAUSFELD N. J. (2004) Spatial learning in the restrained American cockroach *Periplaneta americana*. *J. Exp. Biol.* **207**(Pt 2):377-383.
- KYTE J. AND DOOLITTLE R. F. (1982) A simple method for displaying the hydropathic character of a protein. *J. Mol. Biol.* **157**, 105-132.
- LAEMMLI U. K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.* **227**, 680-685.
- LANG I. AND WALZ B. (1999) Dopamine stimulates salivary duct cells in the cockroach *Periplaneta americana*. *J. Exp. Biol.* **202**, 729-738.
- LEE D. W. AND PIETRANTONIO P. V. (2003) In vitro expression and pharmacology of 5-HT<sub>7</sub>-like receptor present in the mosquito *Aedes aegypti* tracheolar cells and hindgut associated nerves. *Insect. Mol. Biol.* **12**, 561-569.
- LEFKOWITZ R. J., COTECCHIA S., SAMAMA P., COSTA T. (1993) Constitutive activity of receptors coupled to guanine nucleotide regulatory proteins. *Trends Pharmacol. Sci.* **14**(8), 303-307.
- LENT D. D. AND KWON H. W. (2004) Antennal movements reveal associative learning in the American cockroach *Periplaneta americana*. *J. Exp. Biol.* **207**(Pt 2), 369-375.
- LEVI R. AND CAMHI J. M. (2000) Wind direction coding in the cockroach escape response: winner does not take all. *J. Neurosci.* **20**(10), 3814-3821.
- LIBERSAT F., LEUNG V., MIZRAHI A., MATHENIA N., COMER C. (2005) Maturation of escape circuit function during the early adulthood of cockroaches *Periplaneta americana*. *J. Neurobiol.* **62**(1), 62-71.
- LIN Y., STORMO G. D., TAGHERT P. H. (2004) The neuropeptide pigment-dispersing factor coordinates pacemaker interactions in the *Drosophila* circadian system. *J. Neurosci.* **24**, 7951-7957.
- LIVINGSTONE M. S. AND TEMPEL B. L. (1983) Genetic dissection of monoamine neurotransmitter synthesis in *Drosophila*. *Nature.* **303**, 67-70.
- LUFFY D AND DORN A. (1992) Immunohistochemical demonstration in the stomatogastric nervous system and effects of putative neurotransmitters on the motility of the isolated midgut of the stick insect, *Carausius morosus*. *J. Insect Physiol.* **37**, 287-299.
- LUTTRELL L. M. AND LEFKOWITZ R. J. (2002) The role of beta-arrestins in the termination and transduction of G-protein-coupled receptor signals. *J. Cell Sci.* **115** (Part 3), 455-465.
- LUTTRELL L. M. (2008) Reviews in Molecular Biology and Biotechnology: Transmembrane Signaling by G Protein-Coupled Receptors. *Mol. Biotechnol.* **39**, 239-264.



- MAQUEIRA B., CHATWIN H., AND EVANS P. D. (2005) Identification and characterization of a novel family of *Drosophila*  $\beta$ -adrenergic-like octopamine G-protein coupled receptors. *J. Neurochem.* **94**(2), 547-560.
- MARG S., WALZ B., AND BLENAU W. (2004) The effects of dopamine receptor agonists and antagonists on the secretory rate of cockroach (*Periplaneta americana*) salivary glands. *J. Insect Physiol.* **50**, 821-830.
- MARIE B., BACON J. P., BLAGBURN J. M. (2000) Double-stranded RNA interference shows that Engrailed controls the synaptic specificity of identified sensory neurons. *Curr. Biol.* **10**(5), 289-292.
- MARTEL J. C., ORMIÈRE A. M., LEDUC N., ASSIÉ M. B., CUSSAC D., AND NEWMAN-TANCREDI A. (2007) Native rat hippocampal 5-HT<sub>1A</sub> receptors show constitutive activity. *Mol. Pharmacol.* **71**, 638-643.
- MATSUI T., MATSUMOTO T., ICHIHARA N., SAKAI T., SATAKE H., WATARI Y., TAKEDA M. (2009) The pars intercerebralis as a modulator of locomotor rhythms and feeding in the American cockroach, *Periplaneta americana*. *Physiol. Behav.* **96**(4-5), 548-556.
- MCLOUGHLIN D. J. AND STRANGE P. G. (2000) Mechanisms of agonism and inverse agonism at serotonin 5-HT<sub>1A</sub> receptors. *J. Neurochem.* **74**, 347-357.
- MENZEL R. AND MÜLLER U. (1996) Learning and memory in honeybees: From behavior to neural substrates. *Annu. Rev. Neurosci.* **19**, 379-404.
- MELTZER H. Y., LI Z., KANEDA Y., ICHIKAWA J. (2003) Serotonin receptors: their key role in drugs to treat schizophrenia. *Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry.* **27**(7), 1159-1172.
- MELTZER H. Y. AND HUANG M. (2008) In vivo actions of atypical antipsychotic drug on serotonergic and dopaminergic systems. *Prog. Brain Res.* **172**, 177-197.
- MERCER A. R. & MENZEL R. (1982) The effects of biogenic amines on conditioned and unconditioned responses to olfactory stimuli in the honeybee *Apis mellifera*. *J. Comp. Physiol.* **145**, 363-368.
- MERCER A. R. & ERBER J. (1983) The effects of amines on evoked potentials recorded in the mushroom bodies of the bee brain. *J. Comp. Physiol.* **151**, 469-476.
- MERCER A. R., MOBBS P. G., DAVENPORT A. P., AND EVANS P. D. (1983) Biogenic amines in the brain of the honeybee, *Apis mellifera*. *Cell Tissue Res.* **234**, 655-677.
- MESSER A. C. AND BROWN M. R. (1995) Non-linear dynamics of neurochemical modulation of mosquito oviduct and hindgut contractions. *J. Exp. Biol.* **198**, 2325-2336.
- MILLIGAN G. (2003) Constitutive activity and inverse agonists of G protein-coupled receptors: a current perspective. *Mol. Pharmacol.* **64**(6), 1271-1276.
- MILLIGAN G. AND KOSTENIS E. (2006) Heterotrimeric G-proteins: a short history. *Br. J. Pharmacol.* **147** (Suppl 1), S46-55.
- MINNEMAN K. P. (2001) Splice variants of G protein-coupled receptors. *Mol. Interv.* **1**(2), 108-116.
- MIRZADEGAN T., BENKO G., FILIPEK S., AND PALCZEWSKI K. (2003). Sequence analyses of G-protein-coupled receptors: similarities to rhodopsin. *Biochemistry.* **42**(10), 2759-2767.
- MISSALE C., NASH S. R., ROBINSON S. W., JABER M., CARON M. G. (1998) Dopamine receptors: from structure to function. *Physiol. Rev.* **78**, 189-225.
- MITCHELL M. R. AND MARTIN A. R. (1980) An electrophysiological study of the effects of ionophore A23187 on *Nauphoeta* salivary glands. *Q. J. Exp. Physiol.* **65**, 309-320.
- MITCHELL R., MCCULLOCH D., LUTZ E., JOHNSON M., MACKENZIE C., FENNELL M., FINK G., ZHOU W., AND SEALFON S. C. (1998) Rhodopsin-family receptors associate with small G proteins to activate phospholipase d. *Nature.* **392**(6674), 411-414.
- MITSUMASU K., OHTA H., TSUCHIHARA K., ASAOKA K., OZOE Y., NIIMI T., YAMASHITA O., YAGINUMA T. (2008) Molecular cloning and characterization of cDNAs encoding dopamine receptor-1 and -2 from brain-suboesophageal ganglion of the silkworm, *Bombyx mori*. *Insect Mol. Biol.* **17**(2), 185-195.
- MONSMA F. J., MCVITTIE L. D., GERFEN C. R., MAHAN L. C., AND SIBLEY D. R. (1989) Multiple D<sub>2</sub> dopamine receptors produced by alternative RNA splicing. *Nature.* **342**, 926-929.

- MORISSET S., ROULEAU A., LIGNEAU X., GBAHOU F., TARDIVEL-LACOMBE J., STARK H., SCHUNACK W., GANELLIN C. R., SCHWARTZ J. C., AND ARRANG J. M. (2000) High constitutive activity of native H3 Receptors regulates histamine neurons in brain. *Nature (Lond.)* **408**, 860–864.
- MUSTARD J. A., BLENAU W., HAMILTON I. S., WARD V. K., EBERT P. R., MERCER A. R. (2003). Analysis of two D1-like dopamine receptors from the honey bee *Apis mellifera* reveals agonist-independent activity. *Mol. Brain Res.* **113**, 67-77.
- MUSTARD J. A., BEGGS K. T., AND MERCER A. R. (2005) Molecular biology of invertebrate dopamine receptors. *Arch. Insect Biochem. Physiol.* **59**, 103-117.
- NÄSSEL D. R. (1988) Serotonin and serotonin-immunoreactive neurons in the nervous system of insects. *Prog. Neurobiol.* **30**(1), 1-85.
- NÄSSEL D. R. AND KLEMM N. (1983) Serotonin-like immunoreactivity in the optic lobes of three insect species. *Cell Tissue Res.* **232**(1), 129-140.
- NÄSSEL D. R. AND ELEKES K. (1992) Aminergic neurons in the brain of blowflies and *Drosophila*: dopamine- and tyrosine hydroxylase-immunoreactive neurons and their relationship with putative histaminergic neurons. *Cell Tissue Res.* **267**(1), 147-67.
- NECKAMEYER W. S. AND QUINN W. G. (1989) Isolation and characterization of the gene for *Drosophila* tyrosine hydroxylase. *Neuron.* **2**, 1167–1175.
- NECKAMEYER W. S. (1996) Multiple roles for dopamine in *Drosophila* development. *Dev. Biol.* **176**, 209-219.
- NECKAMEYER W. S. (1998) Dopamine and mushroom bodies in *Drosophila*: experience-dependent and -independent aspects of sexual behavior. *Learn. Mem.* **5**, 157-165.
- NECKAMEYER W. S. (1998) Dopamine modulates female sexual receptivity in *Drosophila melanogaster*. *J. Neurogenet.* **12**, 101-114.
- NENE V., WORTMAN J. R., LAWSON D., HAAS B., KODIRA C., TU Z. J., LOFTUS B., XI Z., MEGY K., GRABHERR M. ET AL. (2007) Genome sequence of *Aedes aegypti*, a major arbovirus vector. *Science.* **316**(5832), 1718-1723.
- NEUMAIER J. F., SEXTON T. J., YRACHETA J., DIAZ A. M., BROWNFIELD M. (2001) Localization of 5-HT(7) receptors in rat brain by immunocytochemistry, in situ hybridization, and agonist stimulated cFos expression. *J. Chem. Neuroanat.* **21**(1), 63-73.
- NEVE K. A., SEAMANS J. K., AND TRANTHAM-DAVIDSON H. (2004) Dopamine receptor signaling. *J. Recept. Signal Transduct. Res.* **24**, 165-205.
- NEW D. C. AND WONG J. T. (1998) The evidence for G-protein-coupled receptors and heterotrimeric G proteins in protozoa and ancestral metazoa. *Biol. Signals Recept.* **7**(2), 98-108.
- NEWMAN-TANCREDI A., CHAPUT C., VERRIELE L., AND MILLAN J. (1996) S15535 and WAY100,635 antagonise 5-HT-stimulated [<sup>35</sup>S]-GTPγS binding at cloned human 5-HT<sub>1A</sub> receptors. *Eur. J. Pharmacol.* **307**, 107-111.
- NEWMAN-TANCREDI A., CONTE C., CHAPUT C., SPEDDING M., AND MILLAN M. J. (1997) Inhibition of the constitutive activity of human 5-HT<sub>1A</sub> receptors by the inverse agonist, spiperone but not the neutral antagonist, WAY 100,635. *Br. J. Pharmacol.* **120**, 737-739.
- NEVE K. A., SEAMANS J. K., TRANTHAM-DAVIDSON H. (2004) Dopamine receptor signaling. *J. Recept. Signal Transduct. Res.* **24**(3), 165-205.
- NG G. Y., MOUILLAC B., GEORGE S. R., CARON M., DENNIS M., BOUVIER M. AND O'DOWD B. F. (1994a) Desensitization, phosphorylation and palmitoylation of the human dopamine D1 receptor. *Eur. J. Pharmacol.* **267**, 7–19.
- NG G. Y., O'DOWD B. F., CARON M., DENNIS M., BRANN M. R., GEORGE S. R. (1994b) Phosphorylation and palmitoylation of the human D2L dopamine receptor in Sf9 cells. *J. Neurochem.* **63**(5), 1589-1595.
- NICHOLS C. D. (2007) 5-HT<sub>2</sub> receptors in *Drosophila* are expressed in the brain and modulate aspects of circadian behaviors. *Dev. Neurobiol.* **67**, 752-763.
- NICHOLS D. E. AND NICHOLS C. D. (2008) Serotonin receptors. *Chem. Rev.* **108**, 1614-1641.
- NICKISCH-ROSENECK E. V., KRIEGER J., KUBICK S., LAAGE R., STROBEL J., STROTMANN J., AND BREER H. (1996) Cloning of biogenic amine receptors from moths (*Bombyx mori* and *Heliothis virescens*). *Insect Biochem. Mol. Biol.* **26**, 817–827.

- NIJENHUIS W. A., OOSTEROM J., ADAN R. A. (2001) AgRP(83-132) acts as an inverse agonist on the human-melanocortin-4 receptor. *Mol. Endocrinol.* **15**, 164–171.
- NISHIITSUJUI-UWO J., PETROPULOS S. F., PITTENDRIGH C. S. (1967) Central nervous system control of circadian rhythmicity in the cockroach. I. Role of the pars intercerebralis. *Biol. Bull.* **133**, 679–696.
- NISHIITSUJUI-UWO J. AND PITTENDRIGH C. S. (1968) Central nervous system control of circadian rhythmicity in the cockroach. III. The optic lobes, locus of the driving oscillation. *Z. Vergl. Physiol.* **58**, 14–46.
- NISWENDER C. M., COPELAND S. C., HERRICK-DAVIS K., EMESON R. B., AND SANDERS-BUSH E. (1999) RNA editing of the human serotonin 5-hydroxytryptamine 2c receptor silences constitutive activity. *J. Biol. Chem.* **274**(14), 9472–9478.
- NODA M., HIGASHIDA H., AOKI S., WADA K. (2004) Multiple signal transduction pathways mediated by 5-HT receptors. *Mol. Neurobiol.* **29**, 31–39.
- OBOSSI L. A., SCHUETTE D. G., EUROPE-FINNER G. N., BEADLE D. J., HEN R., KING L. A., AND BERMUDEZ I. (1996) Functional characterisation of the *Drosophila* 5-HTdro1 and 5-HTdro2B serotonin receptors in insect cells: activation of a G(alpha)s-like protein by 5-HTdro1 but lack of coupling to inhibitory G-proteins by 5-HTdro2B. *FEBS Lett.* **381**, 233–236.
- O'DOWD B. F., HNATOWICH M., CARON M. G., LEFKOWITZ R. J., AND BOUVIER M. (1989). Palmitoylation of the human  $\beta$ 2-adrenergic receptor. *J. Biol. Chem.* **264**(13), 7564–7569.
- O'DOWD B. F., NGUYEN T., JUNG B. P., MARCHESI A., CHENG R., HENG H. H., KOLAKOWSKI L. F., LYNCH K. R., GEORGE S. R. (1997) Cloning and chromosomal mapping of four putative novel human G-protein-coupled receptor genes. *Gene.* **187**(1), 75–81.
- OHTA H., TSUCHIHARA K., MITSUMASU K., YAGINUMA T., OZOE Y., ASAOKA K. (2009) Comparative pharmacology of two D1-like dopamine receptors cloned from the silkworm *Bombyx mori*. *Insect Biochem. Mol. Biol.* **39**(5–6), 342–347.
- ONO H. AND 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**, 1247–1256.
- ORR G. L., GOLE J. W., NOTMAN H. J., DOWNER R. G. (1987) Pharmacological characterisation of the dopamine-sensitive adenylate cyclase in cockroach brain: evidence for a distinct dopamine receptor. *Life Sci.* **41**(25), 2705–2715.
- OSBORNE R. H. (1996) Insect neurotransmission: neurotransmitters and their receptors. *Pharmacol. Ther.* **69**(2), 117–142.
- PAGE T. L. (1987) Serotonin phase-shifts the circadian rhythm of locomotor activity in the cockroach. *J. Biol. Rhythms.* **2**, 23–34.
- PALCZEWSKI K., KUMASAKA T., HORI T., BEHNKE C. A., MOTOSHIMA H., FOX B. A., LE TRONG I., TELLER D. C., OKADA T., STENKAMP R. E., YAMAMOTO M., AND MIYANO M. (2000) Crystal structure of rhodopsin: a G protein-coupled receptor. *Science.* **289**, 739–745.
- PAPOUCHEVA E., DUMUIS A., SEBBEN M., RICHTER D. W., PONIMASKIN E. G. (2004) The 5-hydroxytryptamine(1A) receptor is stably palmitoylated, and acylation is critical for communication of receptor with Gi protein. *J. Biol. Chem.* **279**, 3280–3291.
- PAZOS A. AND PALACIOS J. M. (1985) Quantitative autoradiographic mapping of serotonin receptors in the rat brain. I. Serotonin-1 receptors. *Brain Res.* **346**(2), 205–230.
- PENG Y., STOLERU D., LEVINE J. D., HALL J. C., ROSBASH M. (2003) *Drosophila* freerunning rhythms require intercellular communication. *PLoS Biol.* **1**, E13.
- PEROUTKA S. J. (1994) 5-Hydroxytryptamine receptors in vertebrates and invertebrates: why are there so many? *Neurochem. Int.* **25**(6), 533–536.
- PEROUTKA S. J. AND HOWELL T. A. (1994) The molecular evolution of G protein-coupled receptors: focus on 5-hydroxytryptamine receptors. *Neuropharmacology.* **33**, 319–324.
- PETRI B. AND STENGL M. (1997) Pigment-dispersing hormone shifts the phase of the circadian pacemaker of the cockroach *Leucophaea maderae*. *J. Neurosci.* **17**, 4087–4095.

- PIETRANTONIO P. V., JAGGE C., AND MCDOWELL C. (2001) Cloning and expression analysis of a 5HT<sub>7</sub>-like serotonin receptor cDNA from mosquito *Aedes aegypti* female excretory and respiratory systems. *Insect Mol. Biol.* **10**(4), 357–369.
- PIRRI J. K., MCPHERSON A. D., DONNELLY J. L., FRANCIS M. M., AND ALKEMA M. J. (2009) A Tyramine-Gated Chloride Channel Coordinates Distinct Motor Programs of a *Caenorhabditis elegans* Escape Response. *Neuron.* **62**, 526–538.
- POLLOCK N. J., MANELLI A. M., HUTCHINS C. W., STEFFEY M. E., MACKENZIE R. G., FRAIL D. E. (1992) Serine mutations in transmembrane-V of the dopamine D1-receptor affect ligand interactions and receptor activation. *J. Biol. Chem.* **267**, 17780–17786.
- PONIMASKIN E. G., HEINE M., JOUBERT L., SEBEN M., BICKMEYER U., RICHTER D. W., AND DUMUIS A. (2002) The 5-hydroxytryptamine(4a) receptor is palmitoylated at two different sites, and acylation is critically involved in regulation of receptor constitutive activity. *J. Biol. Chem.* **277**(4), 2534–2546.
- PONIMASKIN E., DUMUIS A., GAVEN F., BARTHET G., HEINE M., GLEBOV K., RICHTER D. W., OPPERMAN M. (2005) Palmitoylation of the 5-hydroxytryptamine4a receptor regulates receptor phosphorylation, desensitization, and beta-arrestin-mediated endocytosis. *Mol Pharmacol.* **67**(5), 1434–1443.
- PREDEL R. AND ECKERT M. (2000) Neurosecretion: peptidergic systems in insects. *Naturwissenschaften.* **87**(8), 343–350.
- PRIOLEAU C., VISIERS I., EBERSOLE B. J., WEINSTEIN H., AND SEALFON S. C. (2002) Conserved helix 7 tyrosine acts as a multistate conformational switch in the 5HT<sub>2C</sub> receptor. Identification of a novel "locked-on" phenotype and double revertant mutations. *J. Biol. Chem.* **277**, 36577–36584.
- PUROHIT A., SMITH C., HERRICK-DAVIS K., AND TEITLER M. (2005) Stable expression of constitutively activated mutant h5HT<sub>6</sub> and h5HT<sub>7</sub> serotonin receptors: inverse agonist activity of antipsychotic drugs. *Psychopharmacology (Berl.)*. **179**(2), 461–469.
- QANBAR R. AND BOUVIER M. (2003) Role of palmitoylation/depalmitoylation reactions in G-protein-coupled receptor function. *Pharmacol. Ther.* **97**, 1–33.
- RANDS E., CANDELORE M. R., CHEUNG A. H., HILL W. S., STRADER C. D., AND DIXON R. A. (1990) Mutational analysis of beta-adrenergic receptor glycosylation. *J. Biol. Chem.* **265**(18), 10759–10764.
- RANGANATHAN R., CANNON S. C., HORVITZ H. R. (2000) MOD-1 is a serotonin-gated chloride channel that modulates locomotory behaviour in *C. elegans*. *Nature.* **408**, 470–475.
- RASMUSSEN S. G., CHOI H. J., ROSENBAUM D. M., KOBILKA T. S., THIAN F. S. ET AL. (2007) Crystal structure of the human  $\beta_2$  adrenergic G-protein-coupled receptor. *Nature.* **450**, 383–387.
- RAYMOND J. R., MUKHIN Y. V., GELASCO A., TURNER J., COLLINSWORTH G., GETTYS T. W., GREWAL J. S., AND GARNOVSKAYA M. N. (2001) Multiplicity of mechanisms of serotonin receptor signal transduction. *Pharmacol. Ther.* **92**, 179–212.
- REISCHIG T. AND STENGL M. (1996) Morphology and pigment-dispersing hormone immunocytochemistry of the accessory medulla, the presumptive circadian pacemaker of the cockroach *Leucophaea maderae*. *Cell Tissue Res.* **285**, 305–319
- REISCHIG T. AND STENGL M. (2003a) Ectopic transplantation of the accessory medulla restores circadian locomotor rhythms in arrhythmic cockroaches (*Leucophaea maderae*). *J. Exp. Biol.* **206**, 1877–1886.
- REISCHIG T. AND STENGL M. (2003b) Ultrastructure of pigment-dispersing hormone immunoreactive neurons in a three-dimensional model of the accessory medulla of the cockroach *Leucophaea maderae*. *Cell Tissue Res.* **314**, 421–435.
- RENN S. C., PARK J. H., ROSBASH M., HAL J. C., TAGHERT P. H. (1999) A pdf neuropeptide gene mutation and ablation of PDF neurons each cause severe abnormalities of behavioral circadian rhythms in *Drosophila*. *Cell.* **99**, 791–802.
- RENNER U., GLEBOV K., LANG T., PAPUSHEVA E., BALAKRISHNAN S., KELLER B., RICHTER D. W., JAHN R., PONIMASKIN E. (2007) Localization of the mouse 5-hydroxytryptamine(1A) receptor in lipid microdomains depends on its palmitoylation and is involved in receptor-mediated signaling. *Mol. Pharmacol.* **72**(3), 502–513.

- RIETDORF K., BLENAU W., WALZ B. (2005) Protein secretion in cockroach salivary glands requires an increase in intracellular cAMP and Ca<sup>2+</sup> concentrations. *J. Insect Physiol.* **51**, 1083-1091.
- RODRÍGUEZ-PUERTAS R. AND BARREDA-GÓMEZ G. (2006) Development of new drugs that act through membrane receptors and involve an action of inverse agonism. *Recent Pat. CNS Drug Discov.* **1**(2), 207-217.
- ROEDER T. (1994) Biogenic amines and their receptors in insects. *Comp. Biochem. Physiol.* **107C**, 1-12.
- ROEDER T., SEIFERT M., KÄHLER C., GEWECKE M. (2003) Tyramine and octopamine: Antagonistic modulators of behavior and metabolism. *Arch. Insect Biochem. Physiol.* **54**, 1-13.
- ROEDER T. (2005) Tyramine and octopamine: ruling behavior and metabolism. *Annu. Rev. Entomol.* **50**, 447-477.
- RÖMPLER H., STÄUBERT C., THOR D., SCHULZ A., HOFREITER M., AND SCHÖNEBERG T. (2007) G Protein-Coupled Time Travel: Evolutionary Aspects of GPCR Research. *Mol. Interv.* **7**, 17-25
- ROSENBAUM D. M., CHEREZOV V., HANSON M. A., RASMUSSEN S. G., THIAN F. S., KOBILKA T. S., CHOI H. J., YAO X. J., WEIS W. I., STEVENS R. C., KOBILKA B. K. (2007) GPCR engineering yields high-resolution structural insights into  $\beta$ 2-adrenergic receptor function. *Science.* **318**, 1266–1273.
- ROSENBAUM D. M., RASMUSSEN S. G., AND KOBILKA B. K. (2009) The structure and function of G-protein-coupled receptors. *Nature.* **459**(7245), 356-363.
- ROTTE C., WITTE J., BLENAU W., BAUMANN O., WALZ B. (2009a) Source, topography and excitatory effects of GABAergic innervation in cockroach salivary glands. *J. Exp. Biol.* **212**, 126-136.
- ROTTE C., KRACH C., BALFANZ S., BAUMANN A., WALZ B., BLENAU W. (2009b) Molecular characterization and localization of the first tyramine receptor of the American cockroach (*Periplaneta americana*). *Neuroscience.* (in press).
- ROVATI G. E., CAPRA V., NEUBIG R. R. (2007) The highly conserved DRY motif of class A G protein-coupled receptors: beyond the ground state. *Mol. Pharmacol.* **71**(4), 959-964.
- SAMAMA P., COTECCHIA S., COSTA T., AND LEFKOWITZ R. J. (1993). A mutation-induced activated state of the beta 2-adrenergic receptor. Extending the ternary complex model. *J. Biol. Chem.* **268**(7), 4625–4636.
- SAMAMA P., PEI G., COST T., COTECCHIA S., AND LEFKOWITZ R. J. (1994) Negative antagonists promote an inactive conformation of the beta 2-adrenergic receptor. *Mol. Pharmacol.* **45**, 390–394.
- SAMBROOK J. AND RUSSELL R. W. (2001) Molecular cloning: A laboratory manual, 3<sup>rd</sup> ed. *Cold Spring, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press.*
- SARTANIA N. AND STRANGE P. G. (1999) Role of conserved serine residues in the interaction of agonists with D3 dopamine receptors. *J. Neurochem.* **72**(6), 2621-2624.
- SAUDOU F., AMLAIKY N., PLASSAT J.-L., BORELLI E., AND HEN R. (1990) Cloning and characterization of a *Drosophila* tyramine receptor. *EMBO J.* **9**, 3611–3617.
- SAUDOU F., BOSCHERT U., AMLAIKY N., PLASSAT J.-L., AND HEN R. (1992) A family of *Drosophila* serotonin receptors with distinct intracellular signalling properties and expression patterns. *EMBO J.* **11**, 7–17.
- SAVITZ J., LUCKI I., DREVETS W. C. (2009) 5-HT(1A) receptor function in major depressive disorder. *Prog. Neurobiol.* **88**(1), 17-31.
- SCHERER A., FANELLI F., COSTA T., BENEDETTI P. G. D., AND 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.
- SCHERER A., COSTA T., FANELLI F., DE BENEDETTI P.G., MHAOUTY-KODJA S., ABUIN L., NENNIGER-TOSATO M., COTECCHIA S. (2000) Mutational analysis of the highly conserved arginine within the Glu/Asp-Arg-Tyr motif of the alpha(1b)-adrenergic receptor: effects on receptor isomerization and activation. *Mol. Pharmacol.* **57**, 219-231.
- SCHERER P., PARK J. H., HILDEBRAND P. W., KIM Y. J., KRAUSS N., CHOE H. W., HOFMANN K. P., ERNST O. P. (2008) Crystal structure of opsin in its G-protein-interacting conformation. *Nature.* **455**, 497–502.
- SCHNEIDER R., BAUMANN A., BLENAU W. (2006) Aminergic control and modulation of honey bee behaviour. *Curr. Neuropharmacol.* **4**, 259-276.

- SCHIÖTH H. B. AND FREDRIKSSON R. (2005) The GRAFS classification system of G-protein coupled receptors in comparative perspective. *Gen. Comp. Endocrinol.* (2005) **142**(1-2), 94-101.
- SCHLENSTEDT J., BALFANZ S., BAUMANN A., AND BLENAU W. (2006) Am5-HT<sub>7</sub>: molecular and pharmacological characterization of the first serotonin receptor of the honeybee (*Apis mellifera*). *J. Neurosci.* **98**, 1985–1998.
- SCHMAUSS C., HAROUTUNIAN V., DAVIS K. L., DAVIDSON M. (1993) Selective loss of dopamine D3-type receptor mRNA expression in parietal and motor cortices of patients with chronic schizophrenia. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **90**(19), 8942-8946.
- SCHMAUSS C. (1996) Enhanced cleavage of an atypical intron of dopamine D3-receptor pre-mRNA in chronic schizophrenia. *J. Neurosci.* **16**(24), 7902-7909.
- SCHONEBERG T., LI J., AND WESS J. (1995) Plasma membrane localization and functional rescue of truncated forms of a G protein-coupled receptor. *J. Biol. Chem.* **270**(30), 18000–18006.
- SCHRÖDER R., MERTEN N., MATHIESEN J. M., MARTINI L., KRULJAC-LETUNIC A., KROP F., BLAUKAT A., FANG Y., TRAN E., ULVEN T., DREWKE C., WHISTLER J., PARDO L., GOMEZA J., KOSTENIS E. (2009) The C-terminal tail of CRTH2 is a key molecular determinant that constrains Gα<sub>q</sub> and downstream signaling cascade activation. *J. Biol. Chem.* **284**(2), 1324-1336.
- SCHWAERZEL M., MONASTIRIOTI M., SCHOLZ H., FRIGGI-GRELIN F., BIRMAN S., HEISENBERG M. (2003) Dopamine and octopamine differentiate between aversive and appetitive olfactory memories in *Drosophila*. *J. Neurosci.* **23**, 10495–10502.
- SEALFON S. C., CHI L., EBERSOLE B. J., RODIC V., ZHANG D., BALLESTEROS J. A., AND WEINSTEIN H. (1995) Related contribution of specific helix 2 and 7 residues to conformational activation of the serotonin 5-HT<sub>2A</sub> receptor. *J. Biol. Chem.* **270**(28), 16683–16688.
- SEHAĐOVÁ H., SAUMAN I., SEHNAL F. (2003) Immunocytochemical distribution of pigment-dispersing hormone in the cephalic ganglia of polyneopteran insects. *Cell Tiss. Res.* **312**, 113-125.
- SEIFERT R. AND WENZEL-SEIFERT K. (2002) Constitutive activity of G-protein-coupled receptors: cause of disease and common property of wild-type receptors. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* **366**, 381-416.
- SHAPIRO D. A., KRISTIANSEN K., WEINER D. M., KROEZE W. K., AND ROTH B. L. (2002) Evidence for a model of agonist-induced activation of 5-hydroxytryptamine 2a serotonin receptors that involves the disruption of a strong ionic interaction between helices 3 and 6. *J. Biol. Chem.* **277**(13), 11441–11449.
- SHI L. AND JAVITCH J. A. (2002) The binding site of aminergic G protein-coupled receptors: the transmembrane segments and second extracellular loop. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **42**, 437-467.
- SIEGRIST W., DROZDZ R., COTTI R., WILLARD D. H., WILKISON W. O., EBERLE A. N. (1997) Interactions of alpha-melanotropin and agouti on B16 melanoma cells: evidence for inverse agonism of agouti. *J. Recept. Signal Transduct. Res.* **17**, 75–98.
- SIMON M. I., STRATHMANN M. P., GAUTAM N. (1991) Diversity of G proteins in signal transduction. *Science.* **252**(5007), 802-808.
- SITARAMAN D., ZARS M., LAFERRIERE H., CHEN Y. C., SABLE-SMITH A., KITAMOTO T., ROTTINGHAUS G. E., AND ZARS T. (2008) Serotonin is necessary for place memory in *Drosophila*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **105**, 5579-5584.
- SMIT M. J., VISCHER H. F., BAKKER R. A., JONGEJAN A., TIMMERMAN H., PARDO L., LEURS R. (2007) Pharmacogenomic and structural analysis of constitutive g protein-coupled receptor activity. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **47**, 53-87.
- SMITH N. J. AND LUTTRELL L. M. (2006) Signal switching, crosstalk, and arrestin scaffolds: novel G protein-coupled receptor signaling in cardiovascular disease. *Hypertension.* **48**(2), 173-179.
- SOSA M. A., SPITZER N., EDWARDS D. H., BARO D. J. (2005) A crustacean serotonin receptor: cloning and distribution in the thoracic ganglia of crayfish and freshwater prawn. *J. Comp. Neurol.* **473**(4), 526-537.
- SPITZER N., EDWARDS D. H., AND BARO D. J. (2008) Conservation of structure, signaling and pharmacology between two serotonin receptor subtypes from decapod crustaceans, *Panulirus interruptus* and *Procambarus clarkii*. *J. Exp. Biol.* **211**, 92-105.

- STEFAN C. J., OVERTON M. C., BLUMER K. J. (1998) Mechanisms governing the activation and trafficking of yeast G protein-coupled receptors. *Mol. Biol. Cell.* **9**(4), 885-899.
- STENGL M. AND HOMBERG U. (1994) Pigment-dispersing hormone-immunoreactive neurons in the cockroach *Leucophaea maderae* share properties with circadian pacemaker neurons. *J. Comp. Physiol. A.* **175**, 203–213.
- STRADER C. D., CANDELORE M. R., HILL W. S., SIGAL I. S., AND DIXON R. A. F. (1989). Identification of two serin residues involved in agonist activation of the  $\beta$ -adrenergic receptor. *J. Biol. Chem.* **264**(23), 13572–13578.
- STRADER C. D., FONG T. M., GRAZIANO M. P., AND TOTA M. R. (1995) The family of G-protein-coupled receptors. *FASEB J.* **9**, 745–754.
- STRANGE P. G. (2001) Antipsychotic drugs: Importance of dopamine receptors for mechanisms of therapeutic actions and side effects. *Pharmacol Rev.* **53**, 119-133.
- STRANGE P. G. (2002) Mechanisms of inverse agonism at G-protein-coupled receptors. *Trends Pharmacol. Sci.* **23**, 89-95.
- SRIVASTAVA D. P., YU E. J., KENNEDY K., CHATWIN H., REALE V., HAMON M., SMITH T., EVANS P. D. (2005) Rapid, nongenomic responses to ecdysteroids and catecholamines mediated by a novel *Drosophila* G-protein-coupled receptor. *J. Neurosci.* **25**, 6145–6155.
- SUGAMORI K. S., DEMCHYSHYN L. L., MCCONKEY F., FORTE M. A., NIZNIK H. B. (1995) A primordial dopamine D1-like adenylyl cyclase-linked receptor from *Drosophila melanogaster* displaying poor affinity for benzazepines. *FEBS Lett.* **362**, 131–138.
- SUGIURA M., FUKU S., SUO S., SASAGAWA N., VAN TOL H. H., ISHIURA S. (2005) Characterization of a novel D2-like dopamine receptor with a truncated splice variant and a D1-like dopamine receptor unique to invertebrates from *Caenorhabditis elegans*. *J. Neurochem.* **94**(4), 1146-1157.
- SUH J. AND JACKSON F. R. (2007) *Drosophila* ebony activity is required in glia for the circadian regulation of locomotor activity. *Neuron.* **55**(3), 435-447.
- TAMURA K., DUDLEY J., NEI M., AND KUMAR S. (2007) MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Mol. Biol. Evol.* **24**, 1596-1599.
- TANSKY M. F., POTHOLAKIS C., LEEMAN S. E. (2007) Functional consequences of alteration of N-linked glycosylation sites on the neurokinin 1 receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **104**(25), 10691-10696.
- TAYLOR D. J., ROBINSON G. E., LOGAN B. J., LAVERTY R., MERCER A. R. (1992) Changes in brain amine levels associated with the morphological and behavioural development of the worker honeybee. *J. Comp. Physiol. A.* **170**(6):715-721.
- TEMPEL B. L., LIVINGSTONE M. S., QUINN W. G. (1984) Mutations in the dopa decarboxylase gene affect learning in *Drosophila*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **81**, 3577–3581.
- THOMPSON J. D., GIBSON T. J., PLEWNIAK F., JEANMOUGIN F., HIGGINS D. G. (1997) The CLUSTAL\_X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucl. Acids Res.* **25**, 4876-4882.
- TIERNEY A. J. (2001) Structure and function of invertebrate 5-HT receptors: a review. *Comp. Biochem. Physiol.* **128A**, 791-804.
- TOBIN A. B. (2008) G-protein-coupled receptor phosphorylation: where, when and by whom. *Br. J. Pharmacol.* **153**(Suppl. 1), 167-176.
- TOMIOKA K. AND ABDELSALAM S. (2004) Circadian organization in hemimetabolous insects. *Zoolog. Sci.* **21**(12), 1153-1162.
- TORRECILLA I. AND TOBIN A. B. (2006) Co-ordinated covalent modification of G-protein coupled receptors. *Curr. Pharm. Des.* **12**(14), 1797-1808.
- TRIBOLIUM GENOME SEQUENCING CONSORTIUM. (2008) The genome of the model beetle and pest *Tribolium castaneum*. *Nature.* **452**(7190), 949-955.
- TROPFMANN B. (2006) Molekulare und pharmakologische Charakterisierung von Serotonin-Rezeptoren bei Insekten. *Diplomarbeit*.

- TROPFMANN B., WALZ B. AND BLENAU W. (2007) Pharmacology of serotonin-induced salivary secretion in *Periplaneta americana*. *J. Insect Physiol.* **53**, 774-781.
- VALLONE D., PICETTI R., AND BORRELLI E. (2000) Structure and function of dopamine receptors. *Neurosci. Biobehav. Rev.* **24**, 125-132.
- WALZ B., BAUMANN O., KRACH C., BAUMANN A., AND BLENAU W. (2006) The aminergic control of cockroach salivary glands. *Arch. Insect Biochem. Physiol.* **62**, 141-152.
- WATANABE H., KOBAYASHI Y., SAKURA M., MATSUMOTO Y., MIZUNAMI M. (2003) Classical olfactory conditioning in the cockroach *Periplaneta americana*. *Zoolog. Sci.* **20**(12), 1447-1454.
- WATANABE H. AND MIZUNAMI M. (2007) Pavlov's cockroach: classical conditioning of salivation in an insect. *PLoS ONE.* **2**, e529.
- WATTS V. J. AND NEVE K. A. (2005) Sensitization of adenylate cyclase by Galpha i/o-coupled receptors. *Pharmacol. Ther.* **106**(3), 405-421.
- WARNE T., SERRANO-VEGA M. J., BAKER J. G., MOUKHAMETZIANOV R., EDWARDS P. C., HENDERSON R., LESLIE A. G., TATE C. G., SCHERTLER G. F. (2008) Structure of a  $\beta$ 1-adrenergic G-protein-coupled receptor. *Nature.* **454**, 486-491.
- WEGENER C., PREDEL R., ECKERT M. (1999) Quantification of periviscerokinin-1 in the nervous system of the American cockroach, *Periplaneta americana*. An insect neuropeptide with unusual distribution. *Arch. Insect Biochem. Physiol.* **40**(4), 203-11.
- WEIGER W. A. (1997) Serotonergic modulation of behaviour: a phylogenetic overview. *Biol. Rev. Camb. Philos. Soc.* **72**, 61-95.
- WENDT B. AND HOMBERG U. (1992) Immunocytochemistry of dopamine in the brain of the locust *Schistocerca gregaria*. *J. Comp. Neurol.* **321**(3), 387-403.
- WESS J. (1997) G-protein-coupled receptors: molecular mechanisms involved in receptor activation and selectivity of G-protein recognition. *FASEB J.* **11**, 346-354.
- WICHMANN T. AND DELONG M. R. (1993) Pathophysiology of parkinsonian motor abnormalities. *Adv. Neurol.* **60**, 53-61.
- WHITEHEAD A. T. (1973) Innervation of the American cockroach salivary gland: neurophysiological and pharmacological investigations. *J. Insect Physiol.* **19**, 1961-1970.
- WITZ P., AMLAIKY N., PLASSAT J.-L., MAROTEAUX L., BORRELLI E., AND HEN R. (1990) Cloning and characterization of a *Drosophila* serotonin receptor that activates adenylate cyclase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **87**, 8940-8944.
- WONG S. K. (2003). G protein selectivity is regulated by multiple intracellular regions of GPCRs. *Neurosignals.* **12**, 1-12.
- WOOD M. D. AND WREN P. B. (2008) Serotonin-dopamine interactions: implications for the design of novel therapeutic agents for psychiatric disorders. *Prog. Brain Res.* **172**, 213-230.
- YELLMAN C., TAO H., HE B. AND HIRSH J. (1997) Conserved and sexually dimorphic behavioral responses to biogenic amines in decapitated *Drosophila*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **94**, 4131-4136.
- YUAN Q., LIN F., ZHENG X., AND SEHGAL A. (2005) Serotonin modulates circadian entrainment in *Drosophila*. *Neuron.* **47**, 115-127.
- YUAN Q., JOINER W. J., AND SEHGAL A. (2006) A sleep-promoting role for the *Drosophila* serotonin receptor 1A. *Curr. Biol.* **16**, 1051-1062.
- ZORNIK E., PAISLEY K., AND NICHOLS R. (1999) Neural transmitters and a peptide modulate *Drosophila* heart rate. *Peptides.* **20**, 45-51.

**Internetdokumente:**

[www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST)



## 6 ANHANG

### 6.1 Abkürzungsverzeichnis

Allgemein gebräuchliche Abkürzungen und Maßeinheiten werden nicht gesondert aufgeführt.

5-CT	5-Carboxamidotryptamin
5-HT	5-Hydroxytryptamin, Serotonin
5-MeOT	5-Methoxytryptamin
8-OH-DPAT	8-Hydroxy-2-(di-n-propylamino)-Tetralin
AC	Adenylylcyclase
APS	Ammoniumpersulfat
AS	Aminosäure
ATP	Adenosintriphosphat
bp	Basenpaare
cAMP	cyclisches Adenosinmonophosphat
cDNA	komplementäre DNA
C-Terminus	Carboxylterminus
DAG	Diacylglycerol
DDC	DOPA-Decarboxylase
DEPC	Diethylen-Pyrocarbonat
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamin-Tetraessigsäure
GDP	Guanosindiphosphat
G-Protein	Guaninnukleotid-bindendes Protein
GPCR	<i>G protein-coupled receptor</i> , G-Protein-gekoppelter Rezeptor
GTP	Guamosintriphosphat
HRP	<i>'Horseradish Peroxidase'</i> , Meerrettich-Peroxidase
IP <sub>3</sub>	Inositol-1,4,5-triphosphat
IPTG	Isopropyl-Thio-D-Galaktopyranosid
kb	Kilobasenpaare
LSD	D-(+)-Lysergsäurediethylamid
MBP	Maltose-Bindeprotein
N-Terminus	Aminoterminus
PBS	<i>phosphate buffered saline</i> , Phosphat gepufferte Salzlösung
PCR	Polymerasekettenreaktion
PIP <sub>2</sub>	1-Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat
PKA	Proteinkinase A
PKC	Proteinkinase C
PLC	Phospholipase C
RACE	<i>rapid amplification of cDNA ends</i>
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	<i>reverse transcription</i> PCR
SMART	<i>switching mechanism at 5' end of RNA transcript</i>
SDS	<i>'sodium dodecyl sulfate'</i> , Natrium-Dodecyl-Sulfat
TEMED	Tetramethylendiamin
TH	Tyrosin-Hydroxylase
TM	Transmembrandomäne
TRH	Tryptophan-Hydroxylase
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-Aminomethan
U	Units
Upm	Umdrehungen pro Minute
USG	Unterschlundganglion
Vol.	Volumen
ZNS	Zentrales Nervensystem

## 6.2 Geräte und kommerzielle Kits

**Tabelle 6.1 Geräte**

Gerät	Hersteller
Agarose-Horizontalgelelektrophorese, Hoefer™ HE33	Amersham Bioscience (Freiburg)
Gefriermikrotom HM 500 OM	Microm (USA)
Gel-Dokumentationssystem (GelSystem 8 Entry)	Biostep (Jahnsdorf)
Kippschüttler	Cat (Staufen)
Konfokalmikroskop LSM 510	Carl Zeiss (Jena)
Kühlzentrifuge, Biofuge 15R	Heraeus (Hanau)
Mikroskop H500	Hund (Wetzlar)
Scintillation Counter	Beckman (Krefeld)
Spektralphotometer GenQuant 1300	GE Healthcare (München)
Stemi 2000-C Binokular	Zeiss (Jena)
System Mini-Protean (Gelelektrophorese)	Biorad (München)
T3 Thermocycler	Biometra (Göttingen)
Thermomixer comfort	Eppendorf (Hamburg)
Tischzentrifuge, Biofuge pico	Heraeus
Trans-Blot SD Cell	Biorad
Ultraschallprozessor	Hielscher (Teltow)
UV-Tisch	Vilber Lourmat (Eberhardzell)
Varioklav Dampfsterilisator	Thermo Scientific (Bonn)
Warmluftschüttler (Shaker ES-70)	Peqlab (Erlangen)

**Tabelle 6.2 Kommerzielle Kits**

Kit	Verwendung	Hersteller
Amersham Cyclic AMP (3H) Assay	cAMP Assay	GE Healthcare (München)
BD SMART™ RACE cDNA Amplification Kit	RACE-PCR	Clontech (Heidelberg)
Micro-FastTrack™ 2.0 Kit	mRNA Extraktion	Invitrogen (Karlsruhe)
peqGOLD® Miniprep Kit I	Isolation von Plasmid-DNA	Peqlab (Erlangen)
pGEM®-T Vector Systems	Ligation	Promega (Mannheim)
SuperScript™ One-Step RT-PCR mit Platinum® <i>Taq</i> Systems	RT-PCR	Invitrogen
SuperScript™ III First-Strand Synthesis System for RT-PCR	cDNA-Synthese	Invitrogen

## 6.3 Primer

Tabelle 6.3 Primer

Projekt	Bezeichnung	Sequenz	Verwendungszweck
<b>Pea5-HT<sub>1</sub></b>	TM 6-F	5'-TGYTGGBTICCITYTT-3'	PCR mit degenerierten Primern
	TM 7-R2	5'-TTDATISHRTADATIAIYIGGRTT-3'	PCR mit degenerierten Primern
	Pea5-HT1-SP15	5'-GACACTAGTGGTGCTTCTGG-3'	RT-PCR Vorwärts-Primer
	Pea5-HT1-SP18	5'-GTCATGGGACCTACGCCATC-3'	RT-PCR Rückwärts-Primer
	Pea5-HT1-P1	5'-TATGATGTGCGGCCGCCACCATGGATCTCCTGAGC-3'	5'-Ende des Expressionskonstrukts (5' Primer)
	Pea5-HT1-P3	5'-GTGTCACCATCTTCTCTCC-3'	5'-Ende des Expressionskonstrukts (3' Primer)
	Pea5-HT1-P2a	5'-TGGGACGTCGTATGGGTATCTAAGCTTTCCCGCCTG-3'	3'-Ende des Expressionskonstrukts (3' Primer)
	Pea5-HT1-P2b	5'-TTTTCTAGATTAAGCGTAGTCTGGGACGTCGTATGGGTA-3'	3'-Ende des Expressionskonstrukts (2. 3' Primer)
Pea5-HT1-P4	5'-CCTGGTGCTCTATTGGAAG-3'	3'-Ende des Expressionskonstrukts (5' Primer)	
<b>Pea5-HT<sub>7</sub></b>	7-F1	5'-TGCACGGCHWSSATCCTGA-3'	PCR mit degenerierten Primern
	7-R1	5'-AARTTCTGGCAMAACMRHGCA-3'	PCR mit degenerierten Primern
	Pea5-HT7-SMART1	5'-GGCGGATGATCGCGTGCCTGTCGCTGGTGTGG-3'	spezifischer Primer für RACE-PCR
	Pea5-HT7-SP1	5'-GAACCTGTGCATGATCACC-3'	spezifischer Primer für nested PCR
	Pea5-HT7-SP2	5'-GCTACTACGCCATCACGAAGC-3'	spezifischer Primer für nested PCR; RT-PCR Rückwärts-Primer
	Pea5-HT7-SP5	5'-GAGGCCGTCATCATCGCC-3'	RT-PCR Vorwärts-Primer
<b>PeaDop2</b>	TM 6-F	5'-TGYTGGBTICCITYTT-3'	PCR mit degenerierten Primern
	TM 7-R0	5'-RTTDAWVYAICCIARCC-3	PCR mit degenerierten Primern
	PeaDop2SMART1	5'-ATGTTGCCGAAAACGGTG-3'	spezifischer Primer für RACE-PCR
	PeaDopSPa	5'-GAACCTGTGCATGATCACC-3'	spezifischer Primer für nested PCR
	PeaDopSPb	GCCGCTGCTATTCTGAG	spezifischer Primer für nested PCR
	PeaDop2RT-F	5'-GCTGATACTATGTCTCCTC-3'	RT-PCR Vorwärts-Primer
	PeaDop2A-R	5'-GAGTAGAGTTCGTGTTG-3'	RT-PCR Rückwärts-Primer
	PeaDop2B-R	5'-GGTTAACACTGTCAATC-3'	RT-PCR Rückwärts-Primer
	PeaDopAK-F	5'-AAAGAATTCGGTGGGAATAACAGCAG-3'	5' Primer Antikörper Herstellung
	PeaDopAK-R1	5'-CATCACCATCATCACCCTGAGTCGACAAA-3'	3' Primer Antikörper Herstellung (His-Tag-Fusionsprotein)
	PeaDopAK-R2	5'-ATGTCTCTCCACATCACTGAGTCGACAAA-3'	3' Primer Antikörper Herstellung (MBP-Fusionsprotein)
	PeaDop2Master-F	5'-GATTAAGCTTCCACCATGAACGGAAGCCTAGCAG-3'	Expressionskonstrukts PeaDop2 (5' Primer)
	PeaDop2A-Master-R1	5'-TGGGACGTCGTATGGGTACATCGAGTAGAGTTCGTGTTG-3'	Expressionskonstrukts PeaDop2A (3' Primer)
	PeaDop2A/B-Master-R2	5'-TTTGATCCTTAAGCGTAGTCTGGGACGTCGTATGGG-3'	Expressionskonstrukts PeaDop2A/B (2. 3' Primer)
PeaDop2B-Master-R1	5'-TGGGACGTCGTATGGGTACCTTCTGAAATCTCGACTCC-3'	Expressionskonstrukts PeaDop2B (3' Primer)	
<b>RACE-PCR</b>	SMART Oligonucleotide	5'-AAGCAGTGGTATCAACGCAGAGTACGCGGG-3'	Erststrang-cDNA-Synthese
	5'-RACE CDS Primer	5'-(T)25N-1N-3'; (N = A, C, G oder T; N-1 = A, G oder C)	Erststrang-cDNA-Synthese
	10x Universal Primer Mix (UPM)	Long (0.4 mM): 5'-CTAATACGACTCACTATAGGGCAAGCAGTGGTATCAACGCAGAGT-3'; Short (2 mM): 5'-CTAATACGACTCACTATAGGGC-3'	Amplifizierung der cDNA (BD SMART)
	Nested Universal Primer (NUP)	5'-AAGCAGTGGTATCAACGCAGAGT-3'	nested PCR

**Base Ambiguity Code:** Y = C/T, B = C/G/T, I = Inosin, D = A/G/T, S = G/C, H = A/C/T, R = A/G.

## 6.4 Nukleinsäuresequenzen der Rezeptoren

### Nukleinsäuresequenz des Pea5-HT<sub>1</sub>-Rezeptors

```

GCCAGCGAAGCCTTGAGACATTTTTGCTTCAACGAGATTCTGAGTGGGGTGGTGTGCGACGCCATCCAGATCGCCTAAGTT 80
TGGACGCTCCTCTTGAAAACTCTCCCCGCCAGCGAATACGAGCAGACTGTTCACACAGGAGGACTGGATATGAGAGT 160
TGCAGATCCGGTATGATGTACATGGGTCCACCATGGATCTCCTGAGCGCCACAGAGTTTCCAACAGAGAGTGCAAACGAA 240
GCCGAAAGATACCCTGACGAGCAATTGACAGTCAAGCCTCTTTACGACACGGTTAAACTAACCGTTGCGGAAAAACCCAG 320
CGACAATGACGTGTTTATCCAAGCATCGGAAGAAGATGAGGTTCTCACAGACTTGTACATGGACGACCCCTTACCACGG 400
CGTCTCTCTCCTCGCGAACAAACCCCCACATCGAATCTGTCTGTTACTTCGAAGACATTATCGTCGGTCGCGTCGCC 480
TGTAACACGACGATCAACGGATCGACCGTATATTCTGTCCTCCATCCTGGAGTGCTACAACAGCAGCTTTCATCGGGGATCT 560
GTTTACGCAATGCCAGTGGAAATGGCAGCGCAATCGGCCGGCGTGGCGGGGACGAACCGCTACTGACGTCATCCTCATGG 640
GTGTACGTGAGTCACTGGCCCTCATGATTTTATCCTGTAATCGGTAATGTGTTCTGATCGCCGCCATCTTGCTG 720
GAACGCAATTTTCAGAACGTGGCTAACTATTGATCGTCTCTTTGCCGTAGCAGATCTCATGGTAGCCTGTCTAGTCAT 800
GCCCCTCGGTGTGTGATGAGATCAGTAAAGGGTGGATTCTGGGCCCGAGCTGTGTGACATGTGGACCTCCAGTGACG 880
TCCTCTGTTGCACAGCTTCAATACTCCATCTTGTGCTATCGCCGTAGACAGGTACTGGGCCGTGACTAACGTGGACTTAC 960
ATTCACACACGTAATGGCACACGGATCGGCATCATGATTGTCTGTCGTCGGTCTGTAGCCCTTGTCTGTCCTTTGGCACC 1040
ACAAATTCGGCTGGAAGGATCCTGACTATCTGGACCGCATCAACCTCCAACAACGGTGTCTCGTAAGCCAGGACGTGGCCT 1120
ACCAGATCTTCGCCACGTGCTCCACATTCTACGTTCCCTCTCCTTGTGATCCTGGTGTCTTATTGGAAGATCTTCCAACA 1200
GCTCGGAAGAGAAATTCATCGCCGTCGTCAACAGAGAAGCACGGTGGCCGGACACAACCGTCCCTAGTGGCGGAACCGGTAA 1280
TAAACTTCAAATAATAATCCACCACCAGCCAGTATAAGTACTAGTAAATTTATAACTAAGAGACGTTTCAGAAGGATGA 1360
AATCTAAACAAGAAATCATCTGCAGCTGAAGCACTTGTATCTTCTCTGGTTCCTGTAGAAGGTCATTCACAGCATCTGTG 1440
GATGTTGTTGGAGAGGAAGATGGTGACACAGTGGAGAACCAGAAGAGTTCTGACACTAGTGGTGTCTTGGTGGTGGTGT 1520
TGTGGTGGTGGTACTGGTGGTGGAGGTGGTAGTGTGGGAAAAAGGATAATTTGAGGAATGATACGCGTAGCATTGACG 1600
ACGGTGTGATGATGACGACGGAAGGTAGTTACAACCTCGCTTACTATTTCTAAAAGTCTTGAAGAAGCAAGTGGTCTT 1680
GGAGTCGGTGTGTTGGTACAGTTGGTGTAGAGATGGCGTAGGTCCCATGACTGCTACTTCTAATAATGTTTCTCCTGA 1760
GAAATCCTCTACAGCGACGACAACAACGGATCGGCAGATCATCAGAGTCATATCAGTGATATGAGCAGAGTTGAAA 1840
TTCTCCAGAGGGAGGCTACCAATAATACCAAGACGTGAACGTGGTGGTGGGAATGTCAAAGAGAAACTCTTAATAAAC 1920
AACCAAAGGAGAGATAAGAAAGAGACTTTAGAAGCAAAGAGAGAGAGGAAGGCTGTAAGACATTAGCCATAATCACTGG 2000
TGCCTTTGTGGTGTGTTGGTTCGCGTTTTTCATCATGGCACTCCTGATGCCTCTTTGTGAAGCGTGTACATAAATGACT 2080
ATATGGAGAGCTTCTTTCTGTGGCTCGGCTATTTCAACTCAACACTCAATCCTGTGATTTATACAATCTTCAGCCCCGAA 2160
TTTAGACAAGCGTTCAAAAGAAATCTATGTGGAGGTGGTAGGAGATCCAGACCGAGAAAATTCAGGCCGGGAAAGCTTAG 2240
ATAGAAACCGTCTCTCCCGGTTTTAGTACGTGGCTTATATTTTTTAGGGCCTATGAATGAATGAGTTACTGAATCATT 2320
ATAATATTTATGATATGAAATAACGGTATTTCTATAAAAAATAAAGACTGGGTAATGTTTTCGCAAGTGGAGAAATGACAA 2400
CGAAAACAAGTCACATACATATATACGTAAAAAGTTTATGCTTACGGAAGTCCATTGTAAAAATCTTATTGTGCGCTAT 2480
ATTAACGGAGTAAATGCTTTGTTTTTATTTTTAAATTAATTTAAATAAAATGTCACATTATAGTAATTAATAAAAAAAAA 2560
AAAA 2564

```

**Abbildung 6.1: Nukleinsäuresequenz des Pea5-*ht1*-Rezeptors.** Die Nukleotidabfolge ist in 5'-3'-Richtung dargestellt. Das Start-Kodon (ATG, Position 193-195) und das Stopp-Kodon (TAG, Position 2.242-2.244) sind grau unterlegt. Die Polyadenylierungsstelle (Position 2.525-2.531) ist unterstrichen.

## Nukleinsäuresequenz des *Peadop2A*-Rezeptors

```

GTCGAAACTAGAAATGTTCAAGATTTGTCAAAATAAATTATACGAATGTACGCAAAATTTATATGACTGACTAAAAATTGGG 80
TAGTTGAAAATTTCACTTATTGTACGAAGTTTGGCAATATTCGTTCTTCAATCAGTCAGAGTGACTAGCAAACGGACAA 160
TGATATCTAAATTTGTTTTCTAAAAAAGCGCAAGTGCAGACATTTTAAACGATTTACATGTTCTAGTTATCTAGATTTC 240
TTATCTTACTATGAACGGAAGCCTAGCAGATAGCCTTTGGGACGAAAAACAGCGCTGGGTGATGGCTCTGCTGATTGGA 320
ATTCCTGCTCCTGGGAGCCACCAAACTGGTCCGACGTCAGAAGATACATTCAGTGAAGGCATTACGCTCGACAACAACCTTC 400
ACTCTGGATGCCAACGCTTCCGACGAGAACGATGTGGCCTGGGAACGTTTGCAGAAGCGAGCCCCCTTGGCCGTTCTACT 480
GCTACTGTTCTCCGTGGCCACCGTTTTCCGGCAACATGCTCGTCATCCTCGCCGTCATCCGGGAGCGGTACCTCCACACAG 560
CCACCAATTACTTCTGTCACCTCCCTAGCAGTGGCCGACTGTCTTGTGGGTCTTGTCTGTGATGCCTTTCAGTGCCGTGAT 640
GAAGTCCTTGAGAACAGGTGGTTTTTTGGGATGGAATTGGTCCGACGTGTGGAGGTCGTTAGACGTTCTGTTGAGCAGCAG 720
ATCTATCTTGAACCTGTGTGTGATCTCTCTGGACCGGTACTGGGCTATTACCGACCCCTTACGTAACCCACCAGAATGA 800
GTGTGCGGAGAGCAGCGCTGTGATAGCGGCTGTGTGGGTGTGCTCCGGGCGATCTCCTTTCCTGCGATTGTCTGGTGG 880
AGAGCAGTCAGGACTGAAGTGGTGGCCGCTTTAAATGCCCTTACCGAAAACTCGGCTACTTGGTTTTCTCTCAAC 960
AATATCCCTTCTATCTCCCGCTCCTTGTGATGGTGTTCACGTACTACAGAATATACAGAGCTGCAGTAATCCAGACGAGAT 1040
CCCTCAAGCTGGGATCGAAGCAGGTGATGATGGCTTCTGGTGAGCTTGAATTAACCTCAGAATACACAGAGGTGGGAAT 1120
AACAGCAGTTCCACTAATAGTGGGAATACTGTAGTGGATGACAGACATATGTACAGTAGCGGAAGTGGAGGAACACCTGA 1200
TGAACCTCCGGGTGAAGTTCTAGATGCGGCTGATACTATGTCTCCTCCACATCACCATCATCATCACCATCATCACACC 1280
ACCACCATCATCAAAACAATGGACTAACCAAGACATGCATCAACTAGAAATAATGGCCGAAAACACGGCGAACAGTAAGGCG 1360
ATGTCTAAGAAATTTTCGTTGAGTAGGAAAATTGCAAAATTCGCTAAAGAGAAGAAGGCGGCGAAAACACTTGGGATCGT 1440
GATGGGAGTGTTCATTGTGTGTTGGTTGCCCTTCTTCTGTTGAAATCTTCTCTCCGGCTTCTGTCTGCGCTGCATCTGGA 1520
ACGAGGAGCTTGTGTCTGCGGTTGTGACGTGGTTGGGCTGGATCAATCCAGTATGAATCCTGTCTATGCTTGCCTGCTGG 1600
AGTCGAGATTTTCAAGAGCCTTTCGTGAGAAATTTGTGCGTTTGTGCCACGACGAATGCGAAGGCGTTACCAACCGGC 1680
GCTACGCTCGAAGCCAGTCAATACTATGGAAC TCCAATGCTGCAATCCAACAACCCCCCTAGTGTGAGCTACTCGTCTG 1760
TGAACCAACACGAACTCTACTCGATGTGACGTCACGCTGTACGAATCCGGCACGGTGGCCATCCAGGTCGTGTCAGGAG 1840
CAGCGTTCAGCCATGACATCTCAGCGCCATTTGCATCTTACCCTGACCATGAAGTCACATCTCCCTCCAGTAGGGGACA 1920
CAGGAGACTGTCGTAGCTTACCAACAGTGGAACTGTGAGTTACGACATAAAGATTTACGCTGTAAGCACACCAATTTAT 2000
TATGATCGAAACGAGAAATGTGTTGTAATTGAAGAGCGATATTTTCGTAAGGAGTAATTGTTGTGCAAGTATTTTGTATG 2080
TTTTCAAATTTTACGAGGTACATTACTAAATATTGATTCCGCTTGTGTTACAATGGTGAAGAAATGTGGTAAGAAAAAT 2160
TAGTTTGTGCTCAAATCTATGACGATACTTAAACAGACCAAGTAAATAATTAGTTCAATTTTTGCCTTTGGCTTCAGA 2240
AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA 2266

```

**Abbildung 6.2: Nukleinsäuresequenz des *Peadop2A*-Rezeptors.** Die Nukleotidabfolge ist in 5'-3'-Richtung dargestellt. Das Start-Kodon (ATG, Position 249-251) und das Stopp-Kodon (TAG, Position 1.787-1.789) sind grau unterlegt.

### Nukleinsäuresequenz des *Peadop2B*-Rezeptors

```

GTCGAACTAGAAATGTTCAAGATTTGTCAAAATAAATTATACGAATGTACGAAAATTTATATGACTGACTAAAAATTGGG 80
TAGTTGAAAATTTCACTTATTGTACGAAGTTTGGCAATATTCGTTCTTCAATCAGTCAGAGTGACTAGCAAACCTGGACAA 160
TGATATCTAAATTTGTTTTCTAAAAAAGCGCAAGTGCAGAGACATTTTAAACAGTTTACATGTTCTAGTTATCTAGATT 240
TTATCTTACTATGAACGGAAGCCTAGCAGATAGCCTTTGGGACGAAAAACAGCCCTGGGTGATGGCTCTGCTGATTGGA 320
ATTCCTGCTCCTGGGAGCCACCAAACTGGTTCGACGTCAGAAGATACATTCACTGAAGGCATTACGCTCGACAACAACCTC 400
ACTCTGGATGCCAACGCTTCCGACGAGAACGATGTGCCCTGGGAACGTTTGCAGAAGCGAGCCCCCTTGGCCGTTCTACT 480
GCTACTGTTCTCCGTGCCACCCTTTCCGGCAACATGCTCGTCATCCTCGCCGTCATCCGGGAGCGGTACCTCCACACAG 560
CCACCAATTACTTCTGCTCACTTCCCTAGCAGTGGCCGACTGCTTTGTTGGGTCTTGTCTGATGCCTTTTCACTGCCGTG 640
GAAGTCCTTGAAGAACAGGTGGTTTTTTGGGATGGATTGGTTCGACGCTGTGGAGGTCGTTAGACGTTCTGTTTCAAC 720
ATCTATCTTGAACCTGTGTGTGATCTCTTGGACCGGTACTGGGCTATTACCGACCCCTTACGTACCCACCAGAAATGA 800
GTGTGCGGAGAGCAGCGCTGTGATAGCGGCTGTGTGGGTGTGCTCCGGGCGATCTCCTTTCTGCGATTGCTGTGGTGG 880
AGAGCAGTCAGGACTGAAGTGGTGGCCGCTTTAAATGCCCTTACCGAAAACTCGGCTACTTGGTTTTTCTCTCAAC 960
AATATCCCTTCTATCTCCCGCTCCTTGTGATGGTGTTCACGTACTACAGAATATACAGAGCTGCAGTAATCCAGACGAGAT 1040
CCCTCAAGCTGGGATCGAAGCAGGTGATGATGGCTTCTGGTGAGCTTGAATTAACCCTCAGAATACACAGAGGTGGGAAT 1120
AACAGCAGTTCCACTAATAGTGGGAATACTGTAGTGGATGACAGACATATGTACAGTAGCGGAAGTGGAGGAACACCTGA 1200
TGAACCTCCGGGTGAAGTTCTAGATGCGGCTGATACTATGTCTCCTCCACATCACCATCATCATCACCATCATCACACC 1280
ACCACCATCATCAAAACAATGGACTAACAGACATGCATCAACTAGAATAATGGCCGGAACACGGCGAACAGTAAGGCG 1360
ATGTCTAAGAAATTTTTCGTTGAGTAGGAAAATTGCAAAATTCGCTAAAGAGAAGAAGGCGGCGAAAAACACTTGGGATCGT 1440
GATGGGAGTGTTCATTGTGTGTTGGTTGCCCTTCTTCGTGGTGAATCTTCTCTCCGGCTTCTGTCTGCGCTGCATCTGTA 1520
ACGAGGAGCTTGTGCTGCGGTTGTGACGTGGTTGGGCTGGATCAATTCAGTATGAATCCTGTATCTATGCCTGCTGG 1600
AGTCGAGATTTTCAAGGTAAGAATGACAGTGTAAACCAAACTTATCACAGAAAAGGTAAGACCAACTTTATTTTCTT 1680
TGG 1683

```

**Abbildung 6.3: Nukleinsäuresequenz des *Peadop2B*-Rezeptors.** Die Nukleotidabfolge ist in 5'-3'-Richtung dargestellt. Das Start-Kodon (ATG, Position 249-251) und das Stopp-Kodon (TAA, Position 1.519-1.521) sind grau unterlegt.

## 6.5 Antikörper

**Tabelle 6.4: Primäre Antikörper**

primäre Antikörper	Herkunft (Typ)	Bezugsquelle	Verdünnung	
			Western Blot	Immuncytochemie
anti-Pea-5HT1	Kaninchen (polyklonal)	Pineda (Berlin)	1:20.000	1:1.000
anti-PeaDop2	Kaninchen (polyklonal)	Pineda (Berlin)	1:8.000	1:500
anti-Serotonin	Ratte (monoklonal)	Chemicon (USA)		1:200
anti-HA High Affinity	Ratte (monoklonal)	Roche (Mannheim)	1:1.000	1:10.000

**Tabelle 6.5: Sekundäre Antikörper**

sekundäre Antikörper	Bezugsquelle	Verdünnung
goat anti rabbit HRP	American Qualex (USA)	1:20.000
goat anti rat HRP	Jackson ImmunoResearch (USA)	1:10.000
goat anti rabbit Cy3	Jackson ImmunoResearch	1:200
goat anti rabbit Alexa 488	Jackson ImmunoResearch	1:100
goat anti rat Cy3	Jackson ImmunoResearch	1:400

---

## Lebenslauf

### Persönliche Informationen

---

<b>NAME</b>	<b>Britta Troppmann</b>
GEBURTSDATUM	26. Februar 1981
GEBURTSORT	München

### Wissenschaftlicher Werdegang

---

05/2006 - 06/2009	Promotionsstudium im Fach "Molekulare Zoophysiologie" am Institut für Biochemie und Biologie der Universität Potsdam  Wissenschaftliche Mitarbeiterin des DFG-geförderten Projekts BL 469/4  Assoziiertes Mitglied des Graduiertenkollegs 837 "Functional Insect Science"
06/2005 - 02/2006	Diplomarbeit zum Thema: "Molekulare und pharmakologische Charakterisierung von Serotonin-Rezeptoren bei Insekten"
01/2004 - 02/2006	Studentische Hilfskraft in der AG Zoophysiologie am Institut für Biochemie und Biologie der Universität Potsdam
10/2000 - 02/2006	Studium der Biologie an der Universität Potsdam Abschluss: Diplom-Biologin

### Schul Ausbildung

---

08/1994 - 06/2000	Freiherr-vom-Stein-Gymnasium (Berlin) Abschluss: Abitur
09/1991 - 06/1994	Gymnasium Olching
09/1987 - 07/1991	St. Martin Grundschule (Olching)



## Publikationen

TROPPMANN B., BAUMANN A., BLENAU W. Inverse agonist and neutral antagonist actions of synthetic compounds at an insect 5-HT<sub>1</sub> receptor. (Manuskript zur Veröffentlichung eingereicht)

TROPPMANN B., KRACH C., BAUMANN A., BLENAU W. Molecular cloning and functional expression of a *Periplaneta americana* dopamine receptor (PeaDop2). (Manuskript in Vorbereitung)

TROPPMANN B., WALZ B. AND BLENAU W. (2007) Pharmacology of serotonin-induced salivary secretion in *Periplaneta americana*. *J. Insect Physiol.* 53, 774-781.

## Konferenzbeiträge

TROPPMANN B., BAUMANN A., BLENAU W. (2009) Molecular and pharmacological characterization of cockroach biogenic amine receptors. *8<sup>th</sup> Meeting of the German Neuroscience Society*, Göttingen. Poster T5-1C.

TROPPMANN B., BAUMANN A., BLENAU W. (2008) Molecular and Functional Characterization of Cockroach Serotonin Receptors. *XXIII International Congress of Entomology*, Durban (Südafrika). Poster, Abstract No. 1164.

TROPPMANN B., KRACH C., BAUMANN A., BLENAU W. (2007) Biogenic amine receptors in the cockroach *Periplaneta americana*. *100. Jahresversammlung der Deutschen Zoologischen Gesellschaft*, Köln. Poster N4.

TROPPMANN B. AND BLENAU W. (2007) Molecular cloning and Characterization of *Periplaneta americana* serotonin receptors. *31st Göttingen Neurobiology Conference*, Göttingen. Poster T10-2B.

TROPPMANN B. AND BLENAU W. (2006) Pharmacological and molecular characterization of *Periplaneta* serotonin receptors. *VIIIth European Congress of Entomology*, Izmir (Türkei). Poster PP1.09.

---

## **Danke!**

Ich danke PD Dr. Wolfgang Blenau für die Überlassung dieses interessanten Themas und die exzellente Betreuung.

Prof. Dr. Arnd Baumann, Prof. Dr. Joachim Erber und Prof. Dr. Peter Kloppenburg danke ich für die Bereitschaft zur Übernahme der Begutachtung dieser Arbeit. Ich danke Prof. Dr. Otto Baumann für die Anregungen und Hilfestellungen im Bereich der Immunocytochemie und Mikroskopie.

Bei Angela Hubig möchte ich mich für das toll organisierte Molekularbiologie-Labor, die jederzeit gewährte Unterstützung und die lustige Gesellschaft bedanken.

Der gesamten AG Zoophysiologie danke ich für die angenehme Arbeitsatmosphäre! Weiterhin danke ich auch allen ehemaligen und aktuellen Diplomanden und Doktoranden der AG Zoophysiologie, mit denen auch außerhalb des Labors viel zu erleben war. Den Mitgliedern des Graduiertenkollegs „Functional Insect Science“ danke ich für die Aufnahme als assoziiertes Mitglied und die Möglichkeit zur Teilnahme an zahlreichen Symposien, Vorträgen und Seminaren.

Der größte Dank gilt meiner Familie und meinen Freunden für die immer gewährte Unterstützung!

---

## **Eidesstattliche Erklärung**

Hiermit erkläre ich, die vorliegende Dissertation selbstständig, ohne die Hilfe Dritter und nur mit den angegebenen Quellen und Hilfsmitteln angefertigt zu haben. Diese Arbeit hat in gleicher oder ähnlicher Form noch keiner anderen Hochschule vorgelegen.

Potsdam, den 24.06.2009

---

Britta Troppmann