

Charakterisierung der Serotonin-Rezeptoren
in den Speicheldrüsen von
Calliphora vicina

- DISSERTATION -

zur Erlangung des akademischen Grades

"doctor rerum naturalium"

(Dr. rer. nat.)

in der Wissenschaftsdisziplin

„Zoophysologie“

eingereicht an der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der Universität Potsdam

von

CLAUDIA RÖSER

Potsdam, den 09.05.2012

Online veröffentlicht auf dem
Publikationsserver der Universität Potsdam:
URL <http://opus.kobv.de/ubp/volltexte/2012/6148/>
URN <urn:nbn:de:kobv:517-opus-61486>
<http://nbn-resolving.de/urn:nbn:de:kobv:517-opus-61486>

Zusammenfassung

Die Fähigkeit, mit anderen Zellen zu kommunizieren, ist eine grundlegende Eigenschaft aller lebenden Zellen und essentiell für die normale Funktionsweise vielzelliger Organismen. Die Speicheldrüsen der Schmeißfliege *Calliphora vicina* bilden ein ausgezeichnetes physiologisches Modellsystem um zelluläre Signaltransduktionsprozesse an einem intakten Organ zu untersuchen. Die Speichelsekretion wird dabei hormonell durch das biogene Amin Serotonin (5-Hydroxytryptamin; 5-HT) reguliert. 5-HT aktiviert in den sekretorischen Zellen der Drüsen über die Bindung an mindestens zwei membranständige G-Protein-gekoppelte Rezeptoren (GPCR) zwei separate Signalwege, den IP_3/Ca^{2+} - und den cAMP-Signalweg.

Zur Identifizierung und Charakterisierung der 5-HT-Rezeptoren in den Speicheldrüsen von *Calliphora* wurden unter Anwendung verschiedener Klonierungsstrategien zwei cDNAs (*Cv5-ht2a* und *Cv5-ht7*) isoliert, die große Ähnlichkeit zu 5-HT₂- und 5-HT₇-Rezeptoren aus Säugetieren aufweisen. Die Hydropathieprofile der abgeleiteten Aminosäuresequenzen postulieren die für GPCRs charakteristische heptahelikale Architektur. Alle Aminosäuremotive, die für die Ligandenbindung, die Rezeptoraktivierung und die Kopplung an G-Proteine essentiell sind, liegen konserviert vor. Interessanterweise wurde für den Cv5-HT₇-Rezeptor eine zusätzliche hydrophobe Domäne im N-Terminus vorhergesagt. Die *Cv5-HT2a* mRNA liegt in zwei alternativ gespleißten Varianten vor.

Mittels RT-PCR-Experimenten konnte die Expression beider Rezeptoren in Gehirn und Speicheldrüsen adulter Fliegen nachgewiesen werden. Ein Antiserum gegen den Cv5-HT₇-Rezeptor markiert in den Speicheldrüsen die basolaterale Plasmamembran.

Die Expression der Rezeptoren in einem heterologen System (HEK 293-Zellen) bestätigte diese als funktionelle 5-HT-Rezeptoren. So führte die Stimulation mit Serotonin für den Cv5-HT_{2a} zu einer dosis-abhängigen Erhöhung der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration ($[Ca^{2+}]_i$, $EC_{50} = 24$ nM). In Cv5-HT₇-exprimierenden Zellen löste 5-HT dosisabhängig ($EC_{50} = 4,1$ nM) einen Anstieg der intrazellulären cAMP-Konzentration ($[cAMP]_i$) aus. Für beide heterolog exprimierten Rezeptoren wurden pharmakologische Profile erstellt. Liganden, die eine Rezeptorsubtyp-spezifische Wirkung vermuten ließen, wurden daraufhin auf ihre Wirkung auf das transepitheliale Potential (TEP) intakter Speicheldrüsenpräparate getestet. Drei 5-HT-Rezeptoragonisten: AS 19, R-(+)-Lisurid und 5-Carboxamidotryptamin führten

zu einer cAMP-abhängigen Positivierung des TEP durch eine selektive Aktivierung der 5-HT₇-Rezeptoren. Eine selektive Aktivierung des Ca²⁺-Signalweges durch den Cv5-HT₂-Rezeptor ist mit Hilfe von 5-Methoxytryptamin möglich. Dagegen konnte Clozapin im TEP als selektiver Cv5-HT₇-Rezeptorantagonist bestätigt werden.

Die Kombination eines molekularen Ansatzes mit physiologischen Messungen ermöglichte somit die Identifikation selektiver Liganden für 5-HT₂- bzw. 5-HT₇-Rezeptoren aus *Calliphora vicina*. Dies ermöglicht zukünftig eine separate Aktivierung der 5-HT-gesteuerten Signalwege und erleichtert dadurch die weitere Erforschung der intrazellulären Signalwege und ihrer Wechselwirkungen.

Abstract

Cellular communication is a fundamental property of living cells and essential for normal functioning of multicellular organisms. The salivary glands of the blowfly *Calliphora vicina* are a well established physiological model system to study cellular signaling in an intact organ. Fluid secretion in this gland is hormonally regulated by the biogenic amine serotonin (5-hydroxytryptamine, 5-HT). In the secretory cells, 5-HT causes a parallel activation of the $\text{InsP}_3/\text{Ca}^{2+}$ - and the cAMP-signaling pathways through binding and stimulation of at least two G protein-coupled receptors (GPCR).

In order to characterize the respective 5-HT receptors on the secretory cells, we have cloned two cDNAs (*Cv5-ht2a*, *Cv5-ht7*) that share high similarity with mammalian 5-HT₂ and 5-HT₇ receptor classes. Analysis of the deduced amino acid sequences postulates the typical heptahelical architecture of GPCRs for both receptors. Sequence motifs that are essential for ligand binding, receptor activation and coupling to G-proteins are well conserved. Interestingly, a computer-based structural analysis of Cv5-HT₇ predicts an additional eighth hydrophobic region in the N-terminus of the receptor. We also found an alternative splice variant of the *Cv5-HT2a* mRNA.

Using RT-PCR experiments, transcripts of both receptor mRNAs could be detected in brain and salivary gland tissue. An antiserum raised against the Cv5-HT₇-receptor stained the basolateral region of the salivary glands.

Heterologous receptor expression in HEK 293 cells leads to a dose-dependent increase in the intracellular Ca^{2+} -concentration ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) for Cv5-HT_{2a} ($\text{EC}_{50} = 24 \text{ nM}$) and cAMP-concentration for Cv5-HT₇ ($\text{EC}_{50} = 4,1 \text{ nM}$) upon application of 5-HT. A pharmacological profile was established for both receptors. Ligands that appeared to act as specific ligands of either Cv5-HT_{2a} or Cv5-HT₇ in this approach, were then tested for their effect on the transepithelial potential (TEP) of intact blowfly salivary gland preparations. Three 5-HT receptor agonists: AS 19, R-(+)-lisuride and 5-carboxamidotryptamine showed a cAMP dependent positivation of the TEP, caused by a selective activation of the Cv5-HT₇ receptor. 5-methoxytryptamine exclusively activates the Ca^{2+} pathway via Cv5-HT_{2a}. Clozapine antagonizes the effects of 5-HT in blowfly salivary glands and was confirmed as a Cv5-HT₇ antagonist.

The combination of a molecular approach with physiological measurements enabled us to identify selective ligands for 5-HT₂ and 5-HT₇ receptors of *Calliphora vicina*. These results facilitate a selective activation of the intracellular signaling pathways

activated by 5-HT and will facilitate future research on different aspects of intracellular signaling and crosstalk mechanisms.

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	i
Abbildungsverzeichnis	iv
Tabellenverzeichnis	vi
1. Einleitung	1
1.1 Die Speicheldrüse von <i>Calliphora vicina</i> als Modellsystem	1
1.1.1 Morphologie und Physiologie	1
1.1.2 Synthese und Abbau von Serotonin	2
1.1.3 5-HT-aktivierte Signalwege in den sekretorischen Zellen der Speicheldrüsen	4
1.2 5-HT-Rezeptoren	5
1.2.1 Rezeptoraktivierung und Signaltransduktion	6
1.2.2 Konstitutive Aktivität und G-Protein-unabhängige Signaltransduktion	8
1.2.3 Signaltransduktion über 5-HT-Rezeptoren	8
1.2.4 Rezeptorinaktivierung	9
1.3 Zielsetzung der Arbeit	11
2. Material & Methoden	13
2.1 Bezugsquellen	13
2.2 Standardlösungen	13
2.3 Versuchstierhaltung und Präparation	14
2.4 Molekularbiologische Methoden	15
2.4.1 Gesamt-RNA-Isolierung	15
2.4.2 mRNA-Extraktion	15
2.4.3 cDNA-Synthese	16
2.4.4 Polymerase-Kettenreaktion (<i>polymerase chain reaction, PCR</i>)	18
2.4.5 RACE-PCR	19
2.4.6 RT-PCR (<i>reverse transcription PCR</i>)	21
2.4.7 Agarosegelelektrophorese	22
2.4.8 DNA-Isolierung aus Agarosegelen	22
2.4.9 DNA-Restriktion	23
2.4.10 Ligation	23
2.4.11 Transformation in <i>E. coli</i>	24
2.4.12 Isolierung von Plasmid-DNA	25
2.4.13 RNA-/DNA-Konzentrationsbestimmung	26
2.4.14 Sequenzierung	27
2.5 Biochemische Methoden	27
2.5.1 Protein-Konzentrationsbestimmung	27
2.5.2 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	27
2.5.3 Western-Blot	28

2.5.4	Immundetektion	29
2.5.5	Isolierung von Membranproteinen	30
2.5.6	Deglykosylierung von Membranproteinen	31
2.5.7	Klonierung, Expression und Reinigung von Fusionsproteinen	31
2.5.8	Generierung und Affinitätsreinigung polyklonaler Antiseren	33
2.5.9	Immunzytochemische Analysen	34
2.6	Mikroskopische Auswertung und Bildbearbeitung.....	35
2.7	Heterologe Expression der Rezeptoren und Funktionalitätsnachweis .	36
2.7.1	Konstruktion der Expressionsvektoren	36
2.7.2	Herstellung stabiler Zelllinien	37
2.7.3	Calciumfluorometrie an transfizierten HEK 293-Zellen und flpTM-Zellen	38
2.7.4	cAMP-Bestimmung	39
2.8	Messung des transepithelialen Potentials (TEP).....	39
2.9	Statistische und bioinformatische Analysen.....	41
3.	Ergebnisse	43
3.1	Der Cv5-HT₂-Rezeptor	43
3.1.1	Isolierung und Charakterisierung der Cv5-HT ₂ -Rezeptor-cDNA	43
3.1.2	Generelle Eigenschaften der <i>Cv5-ht2a</i> -cDNA	44
3.1.3	Eigenschaften der abgeleiteten Aminosäuresequenz.....	44
3.1.4	Expressionsmuster des <i>Cv5-ht2a</i> -Gens	49
3.1.5	Nachweis der Expression des Cv5-HT _{2α} -Rezeptorproteins in HEK 293-Zellen	50
3.1.6	Funktionelle Charakterisierung des Cv5-HT _{2αN} -Rezeptorproteins	51
3.2	Der Cv5-HT₇-Rezeptor	53
3.2.1	Isolierung und Charakterisierung der Cv5-HT ₇ -Rezeptor-cDNA	53
3.2.2	Generelle Eigenschaften der <i>Cv5-ht7</i> -cDNA	53
3.2.3	Eigenschaften der abgeleiteten Aminosäuresequenz.....	54
3.2.4	Expressionsmuster des <i>Cv5-ht7</i> -Gens	57
3.2.5	Nachweis der Expression des Cv5-HT ₇ -Rezeptorproteins in flpTM-Zellen	57
3.2.6	Nachweis des Cv5-HT ₇ -Rezeptorproteins in verschiedenen Geweben	59
3.2.7	Funktionelle Charakterisierung des Cv5-HT ₇ -Rezeptorproteins	62
3.3	Pharmakologische Charakterisierung des Cv5-HT_{2αN}- und des Cv5-HT₇-Rezeptors	64
3.3.1	Konzentrationsabhängigkeit der Ca ²⁺ - bzw. cAMP-Produktion	64
3.3.2	Wirkung von Agonisten.....	65
3.3.3	Wirkung von Antagonisten.....	67
3.4	Elektrophysiologische Untersuchungen zur Wirkung verschiedener 5-HT-Rezeptoragonisten und -antagonisten.....	71

4.	Diskussion	75
4.1	Strukturelle Eigenschaften der cDNAs sowie der Aminosäuresequenzen	75
4.1.1	Die heptahelikale Struktur	76
4.1.2	Betrachtungen zu einigen konservierten Sequenzmotiven	77
4.1.3	Alternatives Spleißen	79
4.1.4	Posttranslationale Modifikationen	80
4.2	Funktionelle Charakterisierung der heterolog exprimierten 5-HT-Rezeptoren	81
4.2.1	Der Cv5-HT _{2a} N-Rezeptor ist ein funktioneller Serotoninrezeptor	82
4.2.2	Der Cv5-HT ₇ -Rezeptor ist ein funktioneller Serotoninrezeptor	83
4.2.3	Pharmakologie der rekombinanten Rezeptoren	84
4.3	5-HT-Rezeptoren in der Speicheldrüse von <i>Calliphora vicina</i>	86
4.3.1	Lokalisation der 5-HT-Rezeptoren	86
4.3.2	Effekte der Agonisten und Antagonisten auf das TEP der Speicheldrüsen	88
4.4	Wie übertragbar sind die pharmakologischen Daten der heterologen Rezeptoren auf die <i>in vivo</i>-Pharmakologie?	90
4.5	Ausblick auf mögliche weiterführende experimentelle Aspekte dieses Projekts	93
5.	Literaturverzeichnis	96
6.	Anhang	A1
6.1	Abkürzungsverzeichnis	A1
6.2	Nukleotidsequenzen der untersuchten Rezeptoren	A3
6.3	Verwendete Bakterienstämme, Enzyme, Vektoren, Geräte, kommerzielle Kits und Rezeptorliganden	A5
6.4	Molekularbiologie	A8
	Curriculum Vitae	A10
	Publikationen	A11
	Danksagung	A12
	Eidesstattliche Erklärung	A13

Abbildungsverzeichnis

1.1	Die Speicheldrüsen von <i>Calliphora vicina</i>	2
1.2	Biosynthese und Metabolismus von Serotonin	3
1.3	Schematische Darstellung der 5-HT-induzierten intrazellulären Signalwege in den sekretorischen Zellen von <i>Calliphora vicina</i>	4
1.4	Schematische Darstellung eines G-Protein-gekoppelten Rezeptors.....	6
1.5	Signaltransduktion G-Protein-gekoppelter Rezeptoren	10
2.1	Vektorkarte des pMAL-c2X-Vektors	32
2.2	Ausschnitt aus der <i>multiple cloning site</i> des Vektors pcDNA3.1(+) zur Verdeutlichung der Klonierungsstrategie	37
2.3	Schematischer Versuchsaufbau für die TEP-Messungen.....	40
2.4	Verlauf eines TEP nach einer Stimulierung mit 30 nM 5-HT	41
3.1	Strukturelle Eigenschaften der abgeleiteten Aminosäuresequenz des Cv5-HT _{2α} -Rezeptors	45
3.2	Vergleich der Aminosäuresequenz des Cv5-HT _{2α} -Rezeptors mit orthologen 5-HT _{2α} -Rezeptoren.....	47
3.3	Stammbaumrekonstruktion von Serotonin-Rezeptoren verschiedener Organismen	49
3.4	Expression von <i>Cv5-ht2a</i> und <i>Cvactin</i> in verschiedenen Geweben von <i>Calliphora vicina</i>	50
3.5	Western-Blot-Analyse mit Membranproteinen von HEK 293-Zellen.....	51
3.6	Einfluss verschiedener biogener Amine auf die intrazelluläre Ca ²⁺ -Konzentration	52
3.7	Strukturelle Eigenschaften der abgeleiteten Aminosäuresequenz des Cv5-HT ₇ -Rezeptors.....	54
3.8	Vergleich der Aminosäuresequenz des Cv5-HT ₇ -Rezeptors mit orthologen 5-HT ₇ -Rezeptoren	56
3.9	Expression von <i>Cv5-ht7</i> und <i>Cvactin</i> in verschiedenen Geweben von <i>Calliphora vicina</i>	57
3.10	Immunzytochemischer Nachweis des Cv5-HT ₇ -Rezeptors in stabil transfizierten flpTM-Zellen	58
3.11	Western-Blot-Analyse mit Membranproteinen von flpTM-Zellen.....	59
3.12	Western-Blot-Analyse mit dem anti-Cv5-HT ₇ -Antikörper.....	60
3.13	Western-Blot-Analyse zur Glykosylierung des Cv5-HT ₇ -Rezeptors.....	61
3.14	Verteilung des Cv5-HT ₇ -Rezeptors in <i>Calliphora</i> -Speicheldrüsen.....	62

3.15 Einfluss verschiedener biogener Amine auf die intrazelluläre cAMP-Konzentration	63
3.16 Einfluss von 10 mM Histamin auf die intrazelluläre cAMP-Konzentration	63
3.17 Abhängigkeit der Ca ²⁺ bzw. cAMP-Produktion von der 5-HT-Konzentration	65
3.18 Dosisabhängige Effekte putativer 5-HT-Rezeptoragonisten auf die [Ca ²⁺] _i	66
3.19 Dosisabhängige Effekte putativer 5-HT-Rezeptorantagonisten die [Ca ²⁺] _i	69
3.20 Wirkung von AS 19, R-(+)-Lisuride, 5-CT, 5-MeOT und Methysergid auf den Verlauf des TEP in den Speicheldrüsen von <i>Calliphora vicina</i>	73
3.21 Wirkung einiger der 5-HT-Rezeptorantagonisten auf den Verlauf des TEP	74
6.1 Nukleinsäuresequenz des <i>Cv5-ht2a</i> -cDNA-Klons	A3
6.2 Nukleinsäuresequenz des <i>Cv5-ht2a</i> -cDNA-Klons	A4

Tabellenverzeichnis

2.1	Verwendete primäre Antikörper	30
2.2	Verwendete sekundäre Antikörper	30
3.1	Konservierte Aminosäurereste im Cv5-HT _{2α} -Rezeptorprotein.....	46
3.2	Konservierte Aminosäurereste im Cv5-HT ₇ -Rezeptorprotein	55
3.3	Pharmakologisches Profil putativer Agonisten des Cv5-HT _{2α} - und Cv5-HT ₇ -Rezeptors.....	67
3.4	Pharmakologisches Profil putativer Antagonisten des Cv5-HT _{2α} - und Cv5-HT ₇ -Rezeptors.....	70
6.1	Verwendete Bakterienstämme.....	A5
6.2	Verwendete Enzyme.....	A5
6.3	Verwendete Vektoren	A5
6.4	Geräte.....	A6
6.5	Verwendete kommerzielle Kits.....	A6
6.6	Verwendete Rezeptorliganden	A7
6.7	Primersequenzen	A8
6.8	mRNA-Expressionsprofil der Rezeptoren für biogene Amine in den Speicheldrüsen von <i>Drosophila melanogaster</i> laut Flyatlas.org.....	A9

1. Einleitung

Die Fähigkeit, auf Reize und Veränderungen der Umwelt zu reagieren, ist für jedes Lebewesen überlebenswichtig. Innere und äußere Reize werden dabei von Zellen über Rezeptoren wahrgenommen und daraufhin eine spezifische Reaktion ausgelöst. Dieser als Signaltransduktion bezeichnete Prozess ist jedoch äußerst komplex. Eine detaillierte Kenntnis der zugrunde liegenden Mechanismen und beteiligten molekularen Komponenten ist daher von grundlegender Bedeutung für das Verständnis der Funktionsweise von Zellen, Organen und Organismen. Intrazelluläre Signalwege werden vorwiegend an Bakterien, Hefen und Säugetierzelllinien untersucht (Cooper *et al.*, 1995; Bruce *et al.*, 2003; Brown *et al.*, 2004; Gunawardena, 2008). Diese besitzen jedoch einige Nachteile. Säugetierzelllinien brauchen zum Beispiel eine aufwendige Zellkultur. Außerdem geht bei Systemen aus kultivierten Einzelzellen zum Teil nicht nur die Polarität eines Epithelgewebes verloren, sondern es werden jegliche interzelluläre Aspekte vernachlässigt. Alternativ zu Säugetierzelllinien eignen sich Insekten zur Aufklärung der Wirkungsmechanismen intrazellulärer Signalwege. Aufgrund der Größe, der guten Zugänglichkeit und ihres einfachen Aufbaus können kleine intakte Organe wie z. B. die Speicheldrüsen präpariert werden. Dies bietet den Vorteil, dass verschiedene optophysiological und elektrophysiologische Untersuchungen an einem intakten Organ durchgeführt werden können.

1.1 Die Speicheldrüsen von *Calliphora vicina* als Modellsystem

1.1.1 Morphologie und Physiologie

Die Speicheldrüsen von Insekten sind entweder acinös oder tubulär aufgebaut (Ali, 1997). Acinöse Drüsen findet man beispielsweise in Heuschrecken und Schaben. Sie sind meist aus zwei oder drei Zelltypen zusammengesetzt und durch einen komplexen Aufbau gekennzeichnet (Kendall, 1969; Just & Walz, 1994). Dipteren wie *Drosophila melanogaster* und *Calliphora vicina* hingegen besitzen tubuläre Speicheldrüsen. Diese werden aus einem einschichtigen Epithel gebildet, das von einer Basalmembran umgeben wird (House & Ginsborg, 1985). Eine Innervierung der paarig angelegten Speicheldrüsen von *Calliphora* konnte nicht nachgewiesen werden (Oschman & Berridge, 1970). Bei *Calliphora vicina* durchspannen die blind

im Abdomen endenden Drüsen das gesamte Tier. Im Thorax vereinigen sie sich zu einem gemeinsamen Ausführungsgang, der in den Hypopharynx mündet (Oschman & Berridge, 1970). Die großen Zellen des abdominalen Teils der Drüsen sind pyramidenförmig und umgeben ein zentrales Lumen (Abb. 1.1). Im apikalen Bereich weisen die Zellen große Einstülpungen, die sogenannten Canaliculi, auf. Durch blättchenartige Ausstülpungen der Plasmamembran, den Microplacae, erfolgt im Bereich der Canaliculi eine zusätzliche Oberflächenvergrößerung. In den wesentlich flacheren Zellen des thorakalen Abschnittes der Drüse fehlen diese Canaliculi. Dafür besitzen sie kurze und relativ breite basale Einfaltungen (Oschman & Berridge, 1970; Rotte *et al.*, 2008).

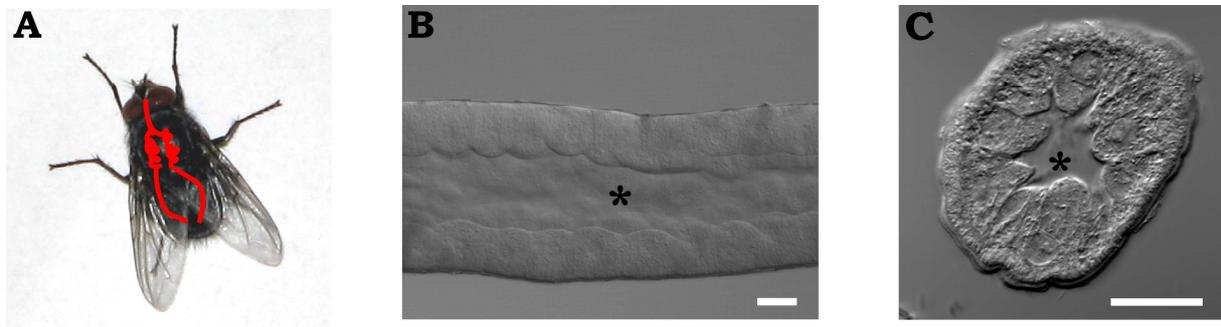


Abb. 1.1 Die Speicheldrüsen von *Calliphora vicina*

A Schematische Darstellung der Lage der Speicheldrüsen in einer Schmeißfliege. **B** Lichtmikroskopische Aufnahmen eines abdominalen Speicheldrüsenlängsschnitts und **C** Speicheldrüsenquerschnitts im differentiellen Interferenzkontrast (DIC). * markiert das Lumen der Speicheldrüsen. Der Maßstabsbalken entspricht 20 μm

Funktionell lassen sich die Drüsen in mehrere Abschnitte unterteilen. Während der abdominale Bereich und ein Teil des thorakalen Drüsenabschnittes sekretorisch aktiv sind, übernimmt der restliche thorakale Bereich resorptive Aufgaben (Oschman & Berridge, 1970). Die Speichelsekretion wird durch 5-Hydroxytryptamin (5-HT, Serotonin) kontrolliert (Berridge & Patel, 1968; Oschman & Berridge, 1970).

1.1.2 Synthese und Abbau von Serotonin

Als eines der phylogenetisch ältesten Signalmoleküle reguliert 5-HT eine Vielzahl von physiologischen, ontogenetischen und Verhaltensprozessen (Nichols & Nichols, 2008). Es lässt sich in den unterschiedlichsten Organismen darunter Einzeller, Pflanzen, Invertebraten und Vertebraten nachweisen (Blenau & Baumann, 2001;

Buznikov *et al.*, 2001). So ist 5-HT z. B. an der Regulation von Entwicklungsprozessen (Colas *et al.*, 1999; Buznikov *et al.*, 2001), von sekretorischen Prozessen (Just & Walz, 1996; Hansen & Witte, 2008), von Muskelkontraktionen (Takamori, 1977; Kahn *et al.*, 1992; Ram *et al.*, 1981), der circadianen Rhythmik (Eskin *et al.*, 1982; Yuan *et al.*, 2005) sowie von Lern- und Gedächtnisprozessen (Bicker & Menzel, 1989; Sitaraman *et al.*, 2008) beteiligt. Die biochemische Synthese von 5-HT erfolgt sowohl bei Vertebraten als auch bei Invertebraten in einem zweistufigen enzymatischen Prozess aus der Aminosäure L-Tryptophan (Abb. 1.2).

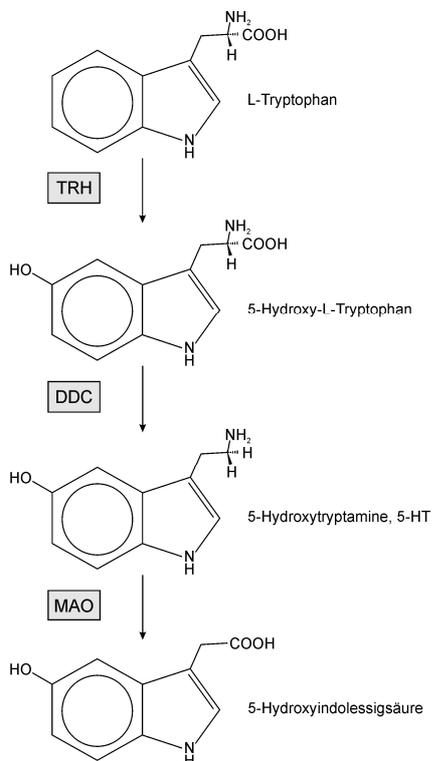


Abb. 1.2 Biosynthese und Metabolismus von Serotonin

Serotonin wird in einem zweistufigen Prozess aus der Aminosäure L-Tryptophan synthetisiert. Durch die Tryptophanhydroxylase (TRH) wird der Indolring hydroxyliert. Im zweiten Schritt wird 5-Hydroxy-L-Tryptophan durch die DOPA-Decarboxylase (DDC) zu Serotonin decarboxyliert. Der metabolische Abbau von 5-HT wird durch die Deaminierung mit Hilfe der Monoaminoxidase (MAO) initiiert.

Durch die Tryptophanhydroxylase wird zunächst an die 5' Position des Indolrings ein Hydroxylrest angefügt (Livingstone & Tempel, 1983; Neckameyer & White, 1992). Das entstandene 5-Hydroxytryptophan wird dann durch die DOPA-Decarboxylase (DDC) zu 5-Hydroxytryptamin (Serotonin, 5-HT) decarboxyliert (Hirsh & Davidson, 1981; Livingstone & Tempel, 1983). In Vertebraten wie auch in Invertebraten vermitteln Serotonintransporter (SERTs) die Wiederaufnahme des Serotonins und tragen so entscheidend zu Beendigung der 5-HT-Wirkung bei (Vallés & White, 1986; Murphy *et al.*, 2004).

1.1.3 5-HT-aktivierte Signalwege in den sekretorischen Zellen der Speicheldrüsen

In den sekretorischen Zellen der Fliegenspeicheldrüse aktiviert 5-HT wahrscheinlich über die Bindung an mindestens zwei metabotrope Rezeptoren zwei unterschiedliche Signalkaskaden (Berridge *et al.*, 1975; Berridge *et al.*, 1976; Berridge, 1981; Berridge & Heslop, 1981) (Abb. 1.3). Zum einen bewirkt die Bindung von 5-HT die Aktivierung einer Adenylylzyklase (AC) und führt zu einem Anstieg der intrazellulären cAMP-Konzentration ($[cAMP]_i$). Die cAMP-induzierte Aktivierung der Proteinkinase A (PKA) führt dann zur Assemblierung und Aktivierung einer vakuolären-Protonen ATPase (V-ATPase) (Zimmermann *et al.*, 2003; Dames *et al.*, 2006; Voss *et al.*, 2007). Durch die Aktivität der V-ATPase entsteht ein Protonengradient über der Apikalmembran, dessen Energie genutzt wird, um K^+ -Ionen über einen K^+/H^+ -Antiporter ins Drüsenlumen zu transportieren (Baumann & Walz, 2012).

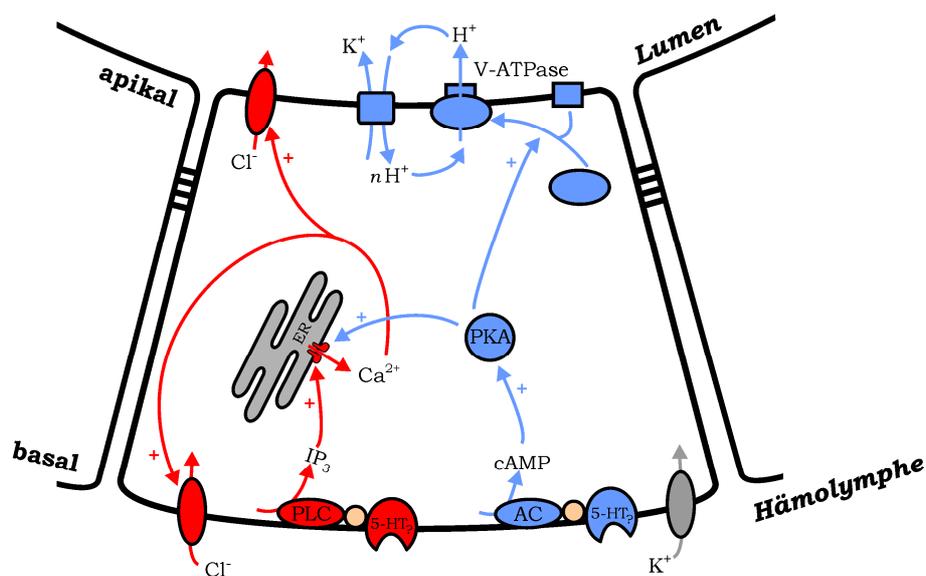


Abb. 1.3 Schematische Darstellung der 5-HT-induzierten intrazellulären Signalwege in den sekretorischen Zellen von *Calliphora vicina* (verändert nach Baumann & Walz, 2012)

Die Bindung des Neurohormons Serotonin an mindestens zwei 5-HT-Rezeptoren aktiviert parallel den IP_3/Ca^{2+} -Signalweg (rot) und den cAMP/PKA-Signalweg (blau), wodurch die Sekretion eines KCl -reichen Speichels in das Drüsenlumen induziert wird. Es sind die wichtigsten Komponenten beider Signalwege dargestellt: $5-HT_2$ - 5-HT-Rezeptorsubtypen, AC - Adenylylzyklase, ER - Endoplasmatisches Retikulum, PKA - Proteinkinase A, PLC - Phospholipase C, V-ATPase - vakuoläre H^+ -ATPase.

Zum anderen wird durch die Bindung von 5-HT eine Phospholipase C (PLC) aktiviert. Durch die Stimulierung der PLC wird Phosphatidylinositolbisphosphat (PIP₂) zu Inositoltrisphosphat (IP₃) und Diacylglycerin (DAG) gespalten. Die Bindung von IP₃ an IP₃-Rezeptoren in der Membran des Endoplasmatischen Retikulums (ER) führt zu einer Freisetzung von Ca²⁺ aus dem ER und einem Anstieg der intrazellulären Ca²⁺-Konzentration ([Ca²⁺]_i). Dieser Anstieg bewirkt die Öffnung von Ca²⁺-abhängigen Cl-Kanälen sowohl in der apikalen als auch in der basolateralen Membran. Die dadurch resultierende Erhöhung der Cl-Permeabilität der Plasmamembran ermöglicht einen transepithelialen Transport von Cl⁻ in das Drüsenlumen (Prince *et al.*, 1973).

Die intensive Forschung an den *Calliphora*-Speicheldrüsen in der letzten Dekade führte zu einer detaillierten Beschreibung der Signalkaskaden, die durch 5-HT ausgelöst werden (Dames *et al.*, 2006; Voss *et al.*, 2007; Rein *et al.*, 2008; Voss *et al.*, 2010; Heindorff *et al.*, 2012). Dabei konnte auch gezeigt werden, dass die beschriebenen Signalwege nicht getrennt voneinander wirken, sondern sich gegenseitig durch positive Wechselwirkungen beeinflussen (Schmidt *et al.*, 2008; Voss *et al.*, 2010). Die Identität der an der Signalübertragung maßgeblich beteiligten 5-HT-Rezeptoren ist hierbei erstaunlicherweise noch nicht untersucht worden.

1.2 5-HT-Rezeptoren

In Vertebraten sind 14 verschiedene 5-HT-Rezeptorsubtypen bekannt (Hoyer *et al.*, 1994; Hannon & Hoyer, 2008; Nichols & Nichols, 2008). Mit Ausnahme des 5-HT₃-Rezeptors, welcher einen Ionenkanal darstellt, sind alle 5-HT-Rezeptoren Rhodopsin-ähnliche G-Protein-gekoppelte Rezeptoren (GPCRs). Neben den Rhodopsin-ähnlichen Rezeptoren der Familie A werden GPCRs von Vertebraten aufgrund von Sequenzhomologien noch in vier weitere Familien unterteilt (Fredriksson *et al.*, 2003). G-Protein-gekoppelte 5-HT-Rezeptoren zeigen untereinander eine hohe Homologie in ihrer Primär- und Tertiärstruktur. Wie alle GPCRs bestehen sie aus einer Polypeptidkette mit sieben hydrophoben membrandurchspannenden Bereichen (Transmembrandomänen, TM). Diese TMs werden durch alternierende intra- und extrazelluläre Schleifen miteinander verbunden. Ebenfalls charakteristisch sind der extrazellulär lokalisierte N-Terminus sowie ein intrazellulärer C-Terminus (Abb 1.4).

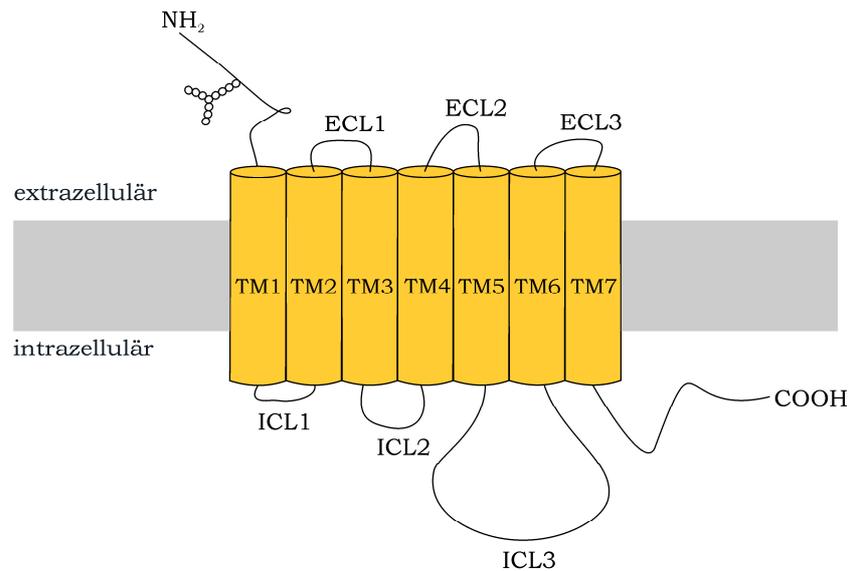


Abb. 1.4 Schematische Darstellung eines G-Protein-gekoppelten Rezeptors

An den extrazellulär gelegenen und teilweise glykosylierten N-Terminus schließen sich sieben hydrophobe membrandurchspannende Segmente an (TM1-7). Die Transmembrandomänen werden durch drei hydrophile extrazelluläre (ECL1-3) und drei hydrophobe intrazelluläre (ICL1-3) Schleifen miteinander verbunden. Der C-Terminus befindet sich intrazellulär.

1.2.1 Rezeptoraktivierung und Signaltransduktion

Laut klassischem Dogma vermitteln GPCRs nach der Bindung eines Agonisten die Aktivierung spezifischer heterotrimerer G-Proteine, welche daraufhin die Aktivität von Effektorproteinen modulieren (Abb. 1.5). Die an der Ligandenbindung beteiligten Rezeptordomänen sind dabei ebenso divers wie die chemischen Strukturen der Agonisten von GPCRs (Strader *et al.*, 1995; Schwartz & Rosenkilde, 1996; Ji *et al.*, 1998). Während kleine Liganden wie z. B. 5-HT innerhalb des durch die α -helikalen Transmembranbereiche gebildeten hydrophoben Kerns binden, werden die Bindungsstellen für Peptid- und Proteinagonisten auch durch den N-Terminus und extrazelluläre Schleifen gebildet (Wess, 1997; Schwartz & Rosenkilde, 1996). Für die Interaktion mit G-Proteinen sind dagegen die zweite und dritte intrazelluläre Schleife (ICL) sowie der C-Terminus essentiell (Wess, 1997).

Es existieren verschiedene Modelle, welche die Aktivierung eines GPCRs durch die Bindung eines Agonisten beschreiben (Gether & Kobilka, 1998). Die größte Akzeptanz besitzt das erweiterte Tertiärkomplexmodell (Gether, 2000). Laut diesem Modell befindet sich der Rezeptor in einem Gleichgewicht zwischen zwei funktionell unterschiedlichen Zuständen: Einer inaktiven Konformation (R) und einer aktiven Konformation (R*) (Abb. 1.5). In Abwesenheit eines Agonisten wird die basale Aktivität des Rezeptors durch das Gleichgewicht zwischen R und R* bestimmt. Die

Fähigkeit das Gleichgewicht zwischen diesen beiden Zuständen zu verschieben, ist Ausdruck der Effektivität eines Liganden. Natürliche und synthetische Liganden lassen sich daher in verschiedene Klassen unterteilen:

- (1) volle Agonisten – führen zu einer maximaler Stimulation des Rezeptors und verschieben das Gleichgewicht in Richtung R^* .
- (2) partielle Agonisten - diese Substanzen können auch in sättigenden Konzentrationen keine vollständige Rezeptoraktivierung auslösen.
- (3) neutrale Antagonisten - haben keinen Effekt auf die Aktivität des Rezeptors, hemmen jedoch die Wirkung von Agonisten.
- (4) inverse Agonisten – stabilisieren die inaktive R-Konformation und reduzieren die basale oder konstitutive Aktivität auf einen Wert, der geringer ist, als es für einen ligandenfreien Rezeptor beobachtet wird.

Bei der klassischen G-Protein Signalkaskade stabilisiert die Bindung eines Agonisten den Rezeptor in einer aktiven Konformation (R^*) und erlaubt die Interaktion zwischen den zytoplasmatischen Rezeptordomänen und einem heterotrimeren G-Protein (Farrens *et al.*, 1996; Sheikh *et al.*, 1996; Kobilka & Deupi, 2007; Scheerer *et al.*, 2008). Diese Interaktion vermittelt die Aktivierung des G-Proteins durch Austausch von GDP gegen GTP und führt zu einer Konformationsänderung des G-Proteins (Noel *et al.*, 1993; Lambright *et al.*, 1994). Das aktivierte G-Protein löst sich vom Rezeptor und dissoziiert in die aktive GTP-gebundene- α -Untereinheit und das $\beta\gamma$ -Dimer. Durch die intrinsische GTPase-Aktivität der G_α -Untereinheit wird GTP zu GDP hydrolysiert. Dies ermöglicht die Reassoziierung der α - mit der $\beta\gamma$ -Untereinheit, wodurch ein neuer Aktivierungszyklus gestartet werden kann.

Die klassische Annahme, dass ein GPCR mit nur einem bestimmten G-Protein koppelt und dies zur Aktivierung eines Effektors führt bzw. es daraus folgend zu einer spezifischen Einzelantwort kommt, konnte durch zahlreiche Experimente der letzten Jahrzehnte widerlegt werden. So koppeln α_{2A-C} -adrenerge Rezeptoren sowohl mit G_s - als auch mit G_i -Proteinen (Eason *et al.*, 1992). Zudem konnte gezeigt werden, dass neben der α -Untereinheit auch die $\beta\gamma$ -Untereinheit in der Lage ist, Effektorproteine zu aktivieren (Logothetis *et al.*, 1987; Whiteway *et al.*, 1988). Oft binden beide Untereinheiten sogar an denselben Effektor, haben dort aber eine gegensätzliche oder synergetische Wirkung (Tang & Gilman, 1991; Federman *et al.*, 1992; Wu *et al.*, 1993; Zhou *et al.*, 1999; Nishida *et al.*, 2002).

1.2.2 Konstitutive Aktivität und G-Protein-unabhängige Signaltransduktion

Zahlreiche Arbeiten haben gezeigt, dass die Aktivierung von GPCRs und G-Proteinen nicht zwingend die Bindung eines Liganden an den Rezeptor erfordert (Robinson *et al.*, 1992; Porter *et al.*, 1996; Kenakin, 2001; Seifert & Wenzel-Seifert, 2002). Nimmt der Rezeptor in Abwesenheit eines Agonisten eine aktive Konformation an und aktiviert G-Proteine, so wird dies als konstitutive Aktivität bezeichnet. Auch Mutationen im Rezeptor (Alewijne *et al.*, 2000; Clark *et al.*, 2004) und Trunkierungen der ICL3 und des C-Terminus können eine konstitutive Aktivität bewirken (Boone *et al.*, 1993; Lefkowitz *et al.*, 1993; Paavola *et al.*, 2011). Neben der Aktivierung von G-Proteinen sind viele GPCRs auch in der Lage, weitere lösliche oder membranständige GPCR-interagierende Proteine (GIPs) zu binden (Bockaert *et al.*, 2004). In verschiedenen Experimenten konnten Assoziationen von GPCRs mit Arrestinen, G-Protein-gekoppelten Rezeptorkinasen, Prolin-bindenden Proteinen, SH3- und PDZ-Domänen-Proteinen sowie monomeren G-Proteinen nachgewiesen werden (Lefkowitz, 1998; Premont & Gainetdinov, 2007; Oldenhof *et al.*, 1998; Hall *et al.*, 1998; Mitchell *et al.*, 1998). Die Bindung der Interaktionspartner findet dabei meist an der dritten intrazellulären Schleife und dem C-Terminus statt (Hall *et al.*, 1999). Durch die Aktivierung der GIPs können viele intrazelluläre Prozesse wie der Transport von GPCRs zum Bestimmungsort, die Assemblierung der Rezeptoren zu funktionellen Komplexen und die Signaltransduktion beeinflusst werden (Bockaert *et al.*, 2003; 2004).

Der enorme Erkenntniszuwachs der letzten Jahre lässt vermuten, dass jeder GPCR einen spezifischen Satz an intrazellulären Signalwegen aktiviert. Einige davon werden über G-Protein-gekoppelte andere über G-Protein-unabhängige Mechanismen aktiviert. Der physiologische Effekt eines GPCRs stellt somit die Summe der verschiedenen Signalwege dar (Hall *et al.*, 1999).

1.2.3 Signaltransduktion über 5-HT-Rezeptoren

Aufgrund ihrer Funktions- und Transduktionseigenschaften werden die 5-HT-Rezeptoren der Vertebraten in sieben Klassen eingeteilt (Hoyer *et al.*, 1994; Hannon & Hoyer, 2008; Nichols & Nichols, 2008). Die Mitglieder der 5-HT₁-Rezeptorklasse koppeln negativ über G_{i/o} an eine AC. 5-HT₄, 5-HT₆ und 5-HT₇ hingegen stimulieren die AC über G_s-Proteine. Für 5-HT₂-Rezeptoren konnte

eine Rekrutierung der PLC über $G_{q/11}$ -Proteine festgestellt werden (Millan *et al.*, 2008; Nichols & Nichols, 2008). Welchen Signalweg 5-HT_{5A}-Rezeptoren aktivieren, ist noch nicht vollständig geklärt. Vorrangig scheint die Kopplung aber über $G_{i/o}$ zu erfolgen (Bockaert *et al.*, 2006; Dutton *et al.*, 2008). Untersuchungen der letzten Jahre haben gezeigt, dass die Signaltransduktion über 5-HT-Rezeptoren wesentlich komplexer ist als bis dahin angenommen. 5-HT-Rezeptoren können zusätzlich zu den klassischen Signalwegen auch G-Protein-unabhängige Signalwege anschalten. So aktiviert der 5-HT₄-Rezeptor zum einen eine AC und cAMP/PKA-gesteuerte Signalwege, zum anderen aber auch den ERK-Signalweg über SRC (Barthet *et al.*, 2007). Außerdem konnte für einige Rezeptoren gezeigt werden, dass sie in der Lage sind, neben dem Haupteffektor noch weitere Proteine zu aktivieren. Dementsprechend kann der 5-HT_{2C}-Rezeptor neben der PLC auch noch weitere Phospholipasen aktivieren (Sanders-Bush *et al.*, 2003; Werry *et al.*, 2005). Bei Invertebraten konnten bisher nur je zwei verschiedene 5-HT₁- und 5-HT₂-Subtypen sowie 5-HT₇-Rezeptoren nachgewiesen werden (Tierney, 2001; Blenau & Baumann, 2001; Blenau & Thamm, 2011)

1.2.4 Rezeptorinaktivierung

Die Inaktivierung von GPCRs bzw. die Beendigung der Signaltransduktion erfolgt über verschiedene Mechanismen. Neben der Inaktivierung der verwendeten G-Proteine durch GTP-Hydrolyse, können GPCRs auch durch Phosphorylierung an Serin bzw. Threonin-Resten (Ser/Thr) in der ICL2, ICL3 und dem C-Terminus desensibilisiert werden (Bockaert *et al.*, 2003; Scheiner *et al.*, 2006). Nach einer Ligandenbindung findet häufig eine direkte Phosphorylierung des Rezeptors durch G-Protein-gekoppelte Rezeptorkinasen (GRKs) oder die PKA bzw. die Proteinkinase C (PKC) statt (Abb. 1.5). Ebenso können aber auch GRKs durch die PKA oder die PKC aktiviert werden und wiederum den Rezeptor phosphorylieren (Raymond, 1991; Freedman *et al.*, 1995; Willets *et al.*, 2003).

Diese Phosphorylierungen führen zu Konformationsänderungen und erhöhen dadurch die Affinität des Rezeptors für β -Arrestin (Leurs *et al.*, 1998). Bindet dieses Protein am C-Terminus des Rezeptors wird die Kopplung von G-Proteinen sterisch stark behindert und dadurch gleichzeitig die Internalisierung des Rezeptors über eine Clathrin-vermittelte Endozytose initiiert (Carman & Benovic, 1998; Luttrell & Lefkowitz, 2002). Der Rezeptor wird dann entweder zurück zur

Plasmamembran transportiert oder abgebaut (Leurs *et al.*, 1998; Oakley *et al.*, 2001).

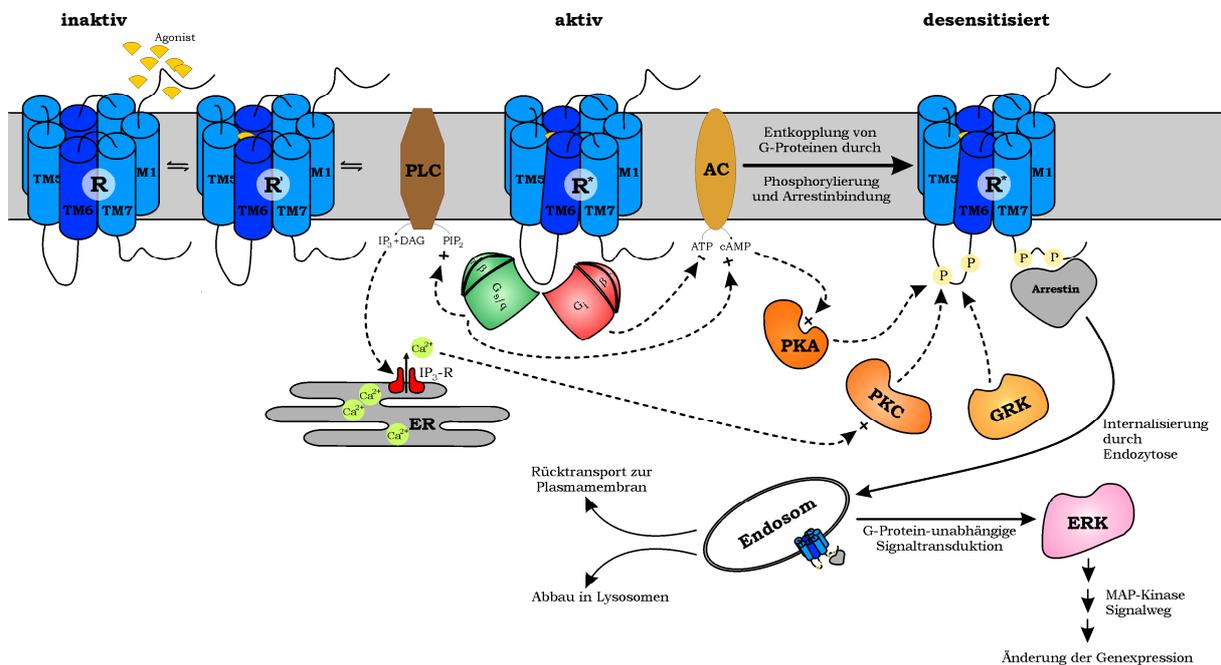


Abb. 1.5. Signaltransduktion G-Protein-gekoppelter Rezeptoren (verändert nach Rosenbaum *et al.*, 2009; Deupi & Standfuss, 2011)

GPCRs befinden sich in einem ständigen Gleichgewicht zwischen inaktiver (R, R') und aktiver Konformation (R*). Die Bindung eines Agonisten verschiebt das Gleichgewicht über eine niedrig-affine Konformation des Rezeptors (R') in Richtung des aktivierten Ligand-Rezeptorkomplexes (R*). Durch eine Verlagerung der Transmembranomänen 3 und 6 (dunkelblau) kann in der aktiven Konformation die Bindung von G-Proteinen erfolgen. Eine Signaltransduktion ist sowohl über G-Proteine als auch nach Bindung von Arrestinen über G-Protein-unabhängige Signalwege möglich. Aktivierte GPCRs können über G_{αs} bzw. G_{αi} die Aktivität einer Adenylylzyklase (AC) regulieren oder über G_{αq} die Phospholipase C (PLC) positiv beeinflussen. Die Aktivierung der GPCRs führt zu einer Phosphorylierung durch G-Protein-gekoppelte Rezeptorkinasen (GRKs) oder Proteinkinase A bzw. C (PKA bzw. PKC) und einer darauf folgenden Kopplung von Arrestin an den C-Terminus des Rezeptors. Durch die Bindung von Arrestin wird die Aktivierung G-Protein-unabhängiger Signalwege und eine Internalisierung des Rezeptors begünstigt. Internalisierte Rezeptoren werden nach der Abspaltung der Phosphorylierungen entweder wieder zur Plasmamembran transportiert oder in Lysosomen abgebaut.

1.3 Zielsetzung der Arbeit

In den sekretorischen Zellen der Speicheldrüse der Schmeißfliege *Calliphora vicina* reguliert Serotonin (5-HT) die Produktion eines KCl-reichen Speichels. In den Jahren 1968 bis 1983 haben Berridge und Kollegen am Modell der Fliegenspeicheldrüse grundlegende Aspekte zur Signalübertragung in tierischen Zellsystemen aufgeklärt (Berridge & Patel, 1968; Prince *et al.*, 1972; Heslop & Berridge, 1980; Berridge & Heslop, 1981; Berridge, 2005). Sie konnten zeigen, dass 5-HT sowohl den IP_3/Ca^{2+} - als auch den cAMP/PKA-Signalweg aktiviert. Ihre Arbeiten haben somit einen wesentlichen Beitrag zum Verständnis der molekularen Teilschritte beider Signalwege geliefert. Einige Aspekte ihrer Arbeit ließen vermuten, dass 5-HT über mehr als einen Rezeptor wirkt. Das von Ihnen entwickelte Konzept, dass mindestens zwei Rezeptoren die Signalwege in den Speicheldrüsen steuern, wird zwar in der aktuellen Forschung akzeptiert, jedoch war die molekulare Identität der 5-HT-Rezeptoren bislang erstaunlicherweise unbekannt. Zusätzlich belegen neue Erkenntnisse, dass die beiden von 5-HT aktivierten Signalwege in der Speicheldrüse nicht getrennt voneinander existieren, sondern miteinander wechselwirken (Schmidt *et al.*, 2008; Voss *et al.*, 2010; Heindorff *et al.*, 2012). Will man diese Wechselwirkungen und die daraus resultierenden physiologischen Konsequenzen besser verstehen, so ist es absolut notwendig, molekulare und/oder pharmakologische Werkzeuge zu entwickeln, die eine gezielte und effektive Aktivierung bzw. Inaktivierung des einen oder anderen Signalweges ermöglichen. Somit kann das Wissen über die molekulare Identität und die pharmakologischen Eigenschaften der 5-HT-Rezeptoren in der Speicheldrüse von *Calliphora vicina* dazu dienen, die Manipulierung der rezeptorspezifischen Signalwege wesentlich zu vereinfachen.

Ziel der vorliegenden Arbeit war daher, die in der Speicheldrüse von *Calliphora vicina* exprimierten Serotonin-Rezeptoren zu isolieren und pharmakologisch zu charakterisieren. Mit Hilfe bioinformatischer und molekularbiologischer Methoden sollte zunächst die cDNA G-Protein-gekoppelter 5-HT-Rezeptoren aus der Speicheldrüse amplifiziert werden. Anschließend sollten die Rezeptoren in einem heterologen Expressionssystem exprimiert werden und ihre funktionelle Kopplung an intrazelluläre Signalwege sowie ihre pharmakologischen Eigenschaften untersucht werden. Dabei war es von besonderem Interesse, Substanzen zu identifizieren, die selektiv auf einen Rezeptorsubtyp wirken. Substanzen die sich im heterologen System als rezeptorspezifisch erwiesen haben, sollten dann auf ihre

Wirkung in intakten *Calliphora*-Speicheldrüsenpräparaten getestet werden. Weiterhin sollte durch die Herstellung von rezeptorspezifischen Antikörpern die zelluläre Verteilung der Rezeptoren in den Speicheldrüsen untersucht werden.

2. Material & Methoden

2.1 Bezugsquellen

Chemikalien und Verbrauchsmaterialien

Die verwendeten Laborchemikalien wurden von den Firmen Merck (Darmstadt), Roth (Karlsruhe), Serva (Heidelberg), Sigma-Aldrich (Taufkirchen) und Tocris Biosciences (Bristol, UK) bezogen und hatten Analysequalität. Sofern nicht anders erwähnt, wurden die verwendeten Lösungen mit sterilem, bidestilliertem Wasser (ddH₂O) angesetzt. Weitere Angaben zu verwendeten Enzymen, Vektoren, Bakterienstämme, Laborgeräten und kommerziellen Kits befinden sich im Anhang (Abschnitt 6.3).

Verbrauchsmaterialien wie Spitzen, Küvetten und Reaktionsgefäße wurden von ABgene (Epsom), Amersham Bioscience (Freiburg), BIO-RAD (München), Brand (Wertheim), Eppendorf (Hamburg), Kodak (Stuttgart), Millipore (Schwalbach), Roth, VWR (Darmstadt) bezogen. Bei hiervon betroffenen Ausnahmen ist die Bezugsquelle im Text genannt.

2.2 Standardlösungen

<i>Calliphora</i> Ringer	Normal-Ringer	128 mM NaCl 10 mM KCl 2 mM CaCl ₂ 2,7 mM MgCl ₂ 3 mM Natriumglutamat 2,8 mM Maleinsäure 10 mM D-Glucose 10 mM Tris pH 7,2
DEPC-behandeltes Wasser		0,1 % (w/v) Diethylpyrocarbonat, über Nacht rühren, autoklavieren
Phosphat-gepufferte Salzlösung (PBS)		140 mM NaCl 2,6 mM KCl 8,1 mM Na ₂ HPO ₄ 1,5 mM KH ₂ PO ₄ pH 7,4
Tris-EDTA-Puffer (TE-Puffer)		10 mM Tris-HCl (pH 7,4) 1 mM EDTA

2.3 Versuchstierhaltung und Präparation

Als Versuchstiere wurden Schmeißfliegen *Calliphora vicina* (Robineau-Desvoidy) aus der institutseigenen Zucht verwendet. Die Haltung erfolgte bei 24-26 °C und 60 % Luftfeuchtigkeit mit einem Licht-Dunkel-Rhythmus von 12:12 Stunden. Die Tiere hatten freien Zugang zu Wasser und Futter (Vollkornroggenbrot). Für die Versuche wurden drei Tage bis drei Wochen alte Imagines beider Geschlechter verwendet.

Die Präparation aller für molekularbiologische oder biochemische Versuche eingesetzten Gewebe fand in gekühlter Ringerlösung statt. Die Gewebe wurden direkt im Anschluss in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80 °C gelagert. Speicheldrüsen, die für immunhistochemische Versuche vorgesehen waren, wurden direkt im Anschluss an die Präparation fixiert (siehe Abschnitt 2.5.9). Physiologische Experimente, d.h. TEP-Messungen (siehe Abschnitt 2.8), wurden mit frisch präparierten Speicheldrüsen durchgeführt. Für die Herstellung von cDNA für PCR-Versuche wurden ganze *Calliphora*-Köpfe verwendet. Für die molekularbiologischen und biochemischen Arbeiten wurden Gewebeproben von Gehirn, Speicheldrüsen, Malpighischen Gefäßen und Muskel benötigt. Die Präparation der Gewebe wurde wie folgt durchgeführt: Nach Dekapitation wurde der Kopf in eine mit Sylgard (Drawin Vertriebs-GmbH, Ottobrunn/Riemerling) ausgegossene und mit kaltem Ringer gefüllte Präparierschale überführt und mit Insektennadeln fixiert. Der Kopf wurde durch Schnitte unterhalb der Komplexaugen, entlang der Kopfperipherie und überhalb des Antennenansatzes geöffnet. Das Gehirn wurde mit einer Pinzette entnommen und von Tracheen gereinigt. Der dekapitierten Fliege wurden die Extremitäten entfernt und das Abdomen abgetrennt. Der Thorax wurde mit Insektennadeln fixiert und dann durch einen beiderseitigen Schnitt von anterior nach posterior unterhalb des Flügelansatzes geöffnet, wodurch Teile der Muskulatur entnommen werden konnten. Für die Präparation von Speicheldrüsen und Malpighischen Gefäßen wurde das abgetrennte Abdomen der Fliegen verwendet. Die Speicheldrüsen sind über Tracheen an den Luftsäcken befestigt und konnten vorsichtig mit einer Pinzette aus dem Abdomen herausgezogen werden. Danach konnten die Malpighischen Gefäße entnommen werden.

2.4 Molekularbiologische Methoden

2.4.1 Gesamt-RNA-Isolierung

Die Extraktion der Gesamt-RNA erfolgte mittels TRIzol™ LS-Reagenz (GIBCO-BRL, Eggenstein). Aus 40 Tieren wurden Gehirn, Speicheldrüsen, Malpighische Gefäße und Teile der Flugmuskulatur präpariert, mit je 750 µl TRIzol™ LS-Reagenz versetzt und mit einem Glas-Teflon-Homogenisator homogenisiert (1.000 UpM, 25 Streiche von je 5 s). Nach 5 min Inkubation bei Raumtemperatur (RT) wurden 200 µl Chloroform je 750 µl TRIzol™ LS-Reagenz zugeben. Nach kurzem kräftigem Schütteln erfolgte eine erneute Inkubation bei RT für 10 min. Bei der sich anschließenden Zentrifugation (12.000 x g für 10 min bei 4°C) erfolgte eine Trennung in drei Phasen. Die obere wässrige Phase enthält die RNA, die Interphase die DNA und in der unteren Phenolphase befinden sich die Proteine. Die wässrige Phase wurde in neues Eppendorfreaktionsgefäß (RG) überführt und durch Zugabe von 500 µl Isopropanol die RNA präzipitiert. Nach einer Inkubation von 10 min bei RT und einem sich anschließenden Zentrifugationschritt (12.000 x g für 10 min bei 4 °C) wurde der Überstand abgenommen und das entstandene Pellet durch Zugabe von 1 ml 75 % Ethanol (EtOH) gewaschen. Nach 10 min Lufttrocknen wurde das Pellet in 50 µl DEPC-Wasser gelöst und die Konzentration der extrahierten RNA mit dem Spektralphotometer GeneQuant 1300 bestimmt (siehe Abschnitt 2.4.13). Die Gesamt-RNA wurde entweder mit 1/10 Vol 4 M LiCl und 2,5 Vol 100 % EtOH gefällt und bis zur weiteren Verwendung bei -80 °C gelagert oder sofort für die RT-PCR verwendet (siehe Abschnitt 2.4.6).

2.4.2 mRNA-Extraktion

Zur Extraktion der mRNA aus Gesamt-RNA wurde das Micro-FastTrack™ 2.0 Kit nach dem Protokoll des Herstellers verwendet. Zuerst wurde die Gesamt-RNA 15 min bei 13.000 x g und 4 °C zentrifugiert und das RNA-Pellet dann mit 100 µl eiskaltem 75 % Ethanol gewaschen. Nach einer erneuten 15 minütigen Zentrifugation bei 13.000 x g und 4 °C wurde das Pellet dann für 5 min luftgetrocknet bevor es in 10 µl Elutionspuffer resuspendiert wurde. Es wurde 1 ml Lysepuffer zugegeben und der Ansatz 5 min bei 65 °C inkubiert. Nach kurzem Kühlen auf Eis wurde 63 µl 5 M NaCl zugegeben und vorsichtig gemischt. Die Gesamt-RNA-Lösung wurde dann zur Oligo-(dT)-Zellulose gegeben und für 30 min

langsam geschüttelt. Anschließend wurde die Zellulose für 5 min bei 4.000 x g zentrifugiert und der Überstand verworfen. Es folgten drei Waschschrte mit je 1,3 ml Bindungspuffer und anschließender Zentrifugation bei 4.000 x g für 5 min. Das Zellulosepellet wurde dann in 300 µl Bindungspuffer gelöst, auf eine Filtersäule übertragen und kurz zentrifugiert (4.000 x g für 10 s). Nach mehreren Waschrten mit 500 µl Bindungspuffer bzw. 200 µl Waschpuffer wurde die mRNA dann zweimal mit je 100 µl Elutionspuffer eluiert. Nach der spektralphotometrischen Bestimmung der RNA-Konzentration (siehe Abschnitt 2.4.13) wurde diese mit 30 µl 2 M Natriumacetat, 10 µl Glycogencarrier (2 mg/ml) und 600 µl 100 % Ethanol präzipitiert und dann bei -80 °C gelagert.

Lysepuffer:	20 µl Protein/RNase Degradier; 1 ml Stammpuffer
Stammpuffer:	200 mM NaCl; 1,5 mM MgCl ₂ ; 2 % (w/v) 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

2.4.3 cDNA-Synthese

cDNA Synthese mittels Superscript™III First-Strand Synthesis System for RT-PCR

Zur Synthese von cDNA aus gereinigter Gesamt-RNA oder mRNA wurde das SuperScript™ First-Strand Synthesis System for RT-PCR verwendet. Die cDNA-Synthese wurde immer in einem Doppelansatz mit Oligo(dT)-Primer (Ansatz I_{oligo}) und Random-Hexamer-Primer (Ansatz II_{random}) durchgeführt. Für die Reaktion wurden folgende Reagenzien zusammengegeben und vermischt:

Reagenz	I _{oligo}	II _{random}
RNA (0,5 µg/µl)	1 µl	1 µl
dNTP-Mix (10 mM je dATP, dCTP, dGTP, dTTP)	1 µl	1 µl
Oligo(dT)-Primer (20-mer, 50 µg)	1 µl	-
Random-Hexamers-Primer (6-mer 50 ng/µl)	-	1 µl
DEPC behandeltes Wasser	7 µl	7 µl

Nach einer Inkubtion für 5 min bei 65 °C und 1 min auf Eis wurde zu jedem Ansatz Folgendes hinzugefügt:

Reagenz	je Ansatz
Reverse-Transkriptase-Puffer (10 x)	2 µl
MgCl ₂ (25 mM)	4 µl
DTT (0,1 M)	2 µl
RNaseOUT™	1 µl
SuperScript™III Reverse Transkriptase (200 U/µl)	1 µl

Die cDNA-Synthese fand bei folgenden Bedingungen statt:

Ansatz I _{oligo}	50 °C, 50 min 85 °C, 5 min	Ansatz II _{random}	25 °C, 10 min 50 °C, 50 min 85 °C, 5 min
----------------------------------	-------------------------------	------------------------------------	--

Abschließend wurde die RNA mit 1 µl RNase H (2 U/µl) je Ansatz für 20 min bei 37 °C abgebaut. Die cDNA wurde entweder sofort weiterverwendet oder für maximal sechs Monate bei -20 °C gelagert.

cDNA Synthese mittels AccuScript™ HighFidelity1st Strand cDNA Synthesis

Kit

Für die Synthese von cDNA, die für PCR von vollständigen Rezeptor-cDNAs eingesetzt werden sollte, wurde die Accuscript™-Reverse-Transkriptase verwendet. Diese reverse Transkriptase aus dem Moloney-Maus-Leukämie-Virus (MMLV-RT) besitzt eine 3'-5'-Exonuklease-Aktivität und minimiert dadurch Basenaustausche bei der cDNA-Synthese. Die cDNA-Synthese fand auch hier mit dem Oligo(dT)-Primer (Ansatz I_{oligo}) und dem Random-Nonamer-Primer (Ansatz II_{random}) statt. Folgende Reagenzien wurden in der angegebenen Reihenfolge zusammen pipettiert und gut vermischt:

Reagenz	I _{oligo}	II _{random}
DEPC-behandeltes Wasser	12,2 µl	10,2 µl
AccuScript RT Puffer (10 x)	2 µl	2 µl
Oligo(dT)-Primer (18-mer, 0,5 µg/µl)	1 µl	-
Random-Nonamer-Primer (9-mer 0,1 µg/µl)	-	3 µl
dNTP-Mix (25 mM je dATP, dCTP, dGTP, dTTP)	0,8 µl	0,8 µl
RNA (0,5 µg/µl)	1 µl	1 µl

Der Reaktionsansatz wurde zunächst für 5 min bei 65 °C, danach für 5 min bei RT inkubiert. Anschließend wurde zu jedem Ansatz Folgendes zugegeben:

Reagenz	je Ansatz
DTT (100 mM)	2 µl
AccuScript Reverse Transkriptase	1 µl
RNase Block Ribonuklease Inhibitor (40 U/µl)	2 µl

Die reverse Transkription der RNA in cDNA wurde unter folgenden Bedingungen durchgeführt:

Ansatz I _{oligo}	42 °C, 60 min 70 °C, 15 min	Ansatz II _{random}	25 °C, 10 min 42 °C, 60 min 70 °C, 15 min
----------------------------------	--------------------------------	------------------------------------	---

/Abschließend wurde die RNA durch Zugabe von 1 µl RNase H (2 U/µl) je Ansatz für 20 min bei 37 °C verdaut und die cDNA entweder sofort weiterverwendet oder maximal 6 Monate bei -20 °C gelagert.

cDNA Synthese mittels SMART™ RACE cDNA Amplification Kit

Die Erststrang-cDNA Synthese für RACE-PCR Experimente (*rapid amplification of cDNA-ends with polymerase chain reaction*) erfolgte mit dem SMART™ RACE cDNA Amplification Kit nach Herstellerangaben. Das Kit ermöglicht die Synthese von cDNA die zur Aufklärung unbekannter Sequenzbereiche am 5'-Ende (5'-RACE-PCR) oder 3'-Ende (3'-RACE-PCR) eingesetzt werden kann. Für die cDNA-Synthese wurden folgende Reagenzien pipettiert und vermischt:

Reagenz	3'RACE	5'RACE
mRNA	1-3 µl	1-3 µl
3'-CDS-Primer	1 µl	-
5'-CDS-Primer	-	1 µl
BD SMART II A oligo	1 µl	-
DEPC behandeltes Wasser	ad 5 µl	ad 5 µl

Der Reaktionsansatz wurde für 2 min bei 70 °C inkubiert und dann auf Eis (ca. 2 min) abgekühlt. Anschließend wurde Folgendes zugegeben:

Reagenz	je Ansatz
5 x PowerScript Erststrang-Puffer	2 µl
DTT (20 mM)	1 µl
dNTP-Mix (10 mM je dNTP)	1 µl
BD PowerScript Reverse Transcriptase	1 µl

Nach vorsichtigem Mischen wurde der Ansatz bei 42 °C für 90 min inkubiert. Die synthetisierte cDNA wurde dann mit 250 µl TE-Puffer verdünnt und zur Hitze-Inaktivierung der Transkriptase für 7 min auf 72 °C erwärmt. Die cDNA wurde dann entweder sofort weiterverwendet oder maximal 3 Monate bei -20 °C gelagert.

2.4.4 Polymerase-Kettenreaktion (*polymerase chain reaction, PCR*)

Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) erlaubt es definierte DNA-Sequenzen *in vitro* zu vervielfältigen. Alle PCR-Experimente wurden in einem T3-Thermocycler durchgeführt. Tabellen mit den Sequenzen der verwendeten Primer befinden sich im Anhang (Tabelle 6.3). Als Matrize für die PCR wurde *Calliphora vicina*-cDNA (siehe Abschnitt 2.4.3) verwendet. Für die Amplifizierung wurden unterschiedliche Polymerasen verwendet, eine Taq DNA Polymerase aus *Thermus aquaticus*, die

Phusion® High-Fidelity DNA Polymerase und die BIO-X-ACT™ Short DNA Polymerase. Im Gegensatz zur Taq besitzen die Phusion® und die BIO-X-ACT™ Polymerase eine 3'-5'-Exonuklease-Aktivität, die die Häufigkeit von falsch eingebauten Basen verringert und somit zu einer geringeren Fehlerrate führt. Daher wurden diese Polymerasen für die Gewinnung der vollständigen cDNAs verwendet. Ein PCR-Ansatz bestand aus:

Reagenz	ohne proofreading		mit proofreading	
	Taq	Phusion®	Bio-X-Act™	
cDNA	0,5-5 µl	0,5-5 µl	0,5-5 µl	
10 x Ampli-Puffer B (roboklon)	5 µl	-	-	
5 x HF-Puffer (Finnzymes)	-	10 µl	-	
10 x Opti-Puffer (BIOLINE)	-	-	5 µl	
dNTP mix (25 mM je dNTP)	0,5 µl	0,5 µl	0,5 µl	
forward-Primer (10 µM)	1 µl	1 µl	1 µl	
reverse-Primer (10 µM)	1 µl	1 µl	1 µl	
Taq-Polymerase (5 U/µl, roboklon)	0,5 µl	-	-	
Phusion® (2 U/µl, Finnzymes)	-	0,5 µl	-	
Bio-X-Act™ (4 U/µl, BIOLINE)	-	-	1 µl	
Wasser (ddH ₂ O)	ad 50 µl	ad 50 µl	ad 50 µl	

Die PCRs wurden nach folgendem Protokoll durchgeführt:

	Taq		Phusion®		Bio-X-Act™		
Initiale Denaturierung	94 °C	150 s	98 °C	30 s	94 °C	150 s	
Denaturierung	94 °C	40 s	98 °C	10 s	94 °C	40 s	
Annealing	} 35 x	40-70 °C	30 s	55-70 °C	30 s	40-65 °C	30 s
Elongation		72 °C	150 s	72 °C	150 s	68 °C	150 s
Finale Elongation		72 °C	420 s	72 °C	600 s	68 °C	600 s

Zur Analyse wurden die PCR-Produkte elektrophoretisch aufgetrennt (siehe Abschnitt 2.4.7) und anschließend mit 1/10 Vol Natriumacetat und 2,5 Vol 100 % EtOH gefällt.

2.4.5 RACE-PCR

Zur Amplifizierung unbekannter Sequenzbereiche in 3'- oder 5'- Richtung eines DNA-Abschnittes, dessen Nukleotidsequenz bekannt ist, wurde das BD SMART™ RACE cDNA Amplification Kit nach Herstellerangaben verwendet. Es kamen dabei ein Universal-Primer-Mix und jeweils ein genspezifischer Primer zum Einsatz. Die Sequenz der Primer im Universal-Primer-Mix (siehe Tabelle 6.3) überlappte zum Teil mit dem des SMART-Oligonukleotides und ermöglichte somit die Anlagerung an die synthetisierte SMART™ RACE cDNA. Der genspezifische Primer wurde so gewählt,

dass er im Bereich der bereits bekannten Sequenz bindet und einen hohen GC-Gehalt sowie eine hohe Annealing-Temperatur besitzt. Wenn es die Länge der bekannten Sequenz erlaubte, wurde noch ein zweiter genspezifischer Primer verwendet, der innerhalb der Sequenz des ersten PCR-Produkts bindet und die Analyse des RACE-Produktes erleichterte. Ein RACE-PCR-Ansatz bestand aus:

Reagenz	3'RACE	5'RACE
5'-RACE cDNA	-	2,5 µl
3'-RACE cDNA	2,5 µl	-
10 x Advantage 2-PCR-Puffer	5 µl	5 µl
50 x Advantage 2 Polymerase Mix	1 µl	1 µl
dNTP-Mix (10 mM je dNTP)	1 µl	1 µl
10 x Universal-Primer-Mix	5 µl	5 µl
genspezifischer Primer (10 µM)	1 µl	1 µl
Wasser (ddH ₂ O)	34,5 µl	34,5 µl

Die PCR verlief nach folgendem Programm:

5 Zyklen	94 °C, 30 s
	72 °C, 180 s
5 Zyklen	94 °C, 30 s
	70 °C, 30 s
	72 °C, 180 s
30 Zyklen	94 °C, 30 s
	68 °C, 30 s
	72 °C, 180 s

Die erhaltenen PCR-Produkte wurden anschließend mit 1/10 Vol 3 M Natriumacetat und 2,5 Vol 100 % Ethanol gefällt. Eine sich anschließende verschachtelte PCR (*nested PCR*) erleichterte die Analyse der PCR-Produkte der RACE-PCR. Die Primer dieser *nested PCR* wurden so ausgewählt, dass sie innerhalb der Sequenz des RACE-PCR-Produkts binden. Die gefällten RACE-PCR-Produkte wurden in 15 µl TE-Puffer gelöst und als Matrize für die *nested PCR* verwendet. Der *nested PCR*-Ansatz enthielt:

Reagenz	
5'- oder 3'-RACE-PCR-Produkt	0,5 µl
10 x Ampli-Puffer B (roboklon)	5 µl
dNTP-Mix (20 mM je dNTP)	0,5 µl
<i>nested</i> Universal-Primer (10 µM)	1 µl
<i>nested</i> Primer (10 µM)	1 µl
Wasser (ddH ₂ O)	41,5 µl
Taq-Polymerase (5 U/µl, roboklon)	0,5 µl

Die PCR wurde unter folgenden Bedingungen durchgeführt:

Initiale Denaturierung		94 °C	150 s
Denaturierung	} 35 x	94 °C	40 s
Annealing		68 °C	30 s
Elongation		72 °C	120 s
Finale Elongation		72 °C	600 s

Alle Produkte der RACE-PCR-Experimente und *nested PCR*-Experimente wurden mittels Agarosegelelektrophorese aufgetrennt (siehe Abschnitt 2.4.7) und relevante DNA-Fragmente aus dem Agarosegel isoliert.

2.4.6 RT-PCR (*reverse transcription PCR*)

Mit Hilfe der RT-PCR-Methode kann semiquantitativ das Vorkommen bestimmter mRNA-Spezies in verschiedenen Geweben nachgewiesen werden. Dafür wurde zuerst Gesamt-RNA mit Hilfe des TRIzol™-LS Reagenz (siehe Abschnitt 2.4.1) isoliert. Für die RT-PCR wurde von jedem Gewebe 1,1 µg Gesamt-RNA für 30 min mit 2 U DNase I (Ambion, Austin, USA) bei 37 °C verdaut, um eine Kontamination mit genomischer DNA zu vermeiden. Die gleiche Menge RNA wurde als Negativkontrolle mit DNase I und RNase A bzw. T1 verdaut. Die DNase I-Behandlung wurde durch Zugabe von 1 µl DNase I Inaktivierungsreagenz und einer zweiminütigen Inkubation bei RT beendet. Die weiteren Schritte erfolgten entsprechend den Herstellerangaben des SuperScript One-Step RT-PCR mit Platinum Taq Systems. Für die Synthese der cDNA und anschließender PCR-Reaktion mit spezifischen Primern wurden 100 ng der vorbehandelten Gesamt-RNA-Präparationen eingesetzt. Ein Reaktionsansatz bestand aus:

Reagenz	
vorbehandelte Gesamt-RNA (100 ng/µl)	1 µl
2 x Reaktionspuffer	25 µl
Forward-Primer (10 µM)	1 µl
Reverse-Primer (10 µM)	1 µl
DEPC-behandeltes Wasser	21,5 µl
RT/Platinum-Taq-Mix	0,5 µl

Die PCR-Bedingungen waren:

1 Zyklus	50 °C,	30 min
	94 °C,	2 min
35 Zyklen	94 °C,	40 s

	55-60 °C,	40 s
	72 °C,	15 s
1 Zyklus	72 °C,	600 s

Zur Analyse wurden die amplifizierten PCR-Produkte dann abschließend in einem 1,2 % Agarosegel aufgetrennt.

DNase I-Puffer: 25 mM MgCl₂; 5 mM CaCl₂; 100 mM Tris; pH 7,5

2.4.7 Agarosegelelektrophorese

Die Auftrennung und Identifizierung von DNA-Fragmenten erfolgte in 1-1,2 %igen Agarosegelen. Sowohl dem Gel als auch dem 1 x TAE-Laufpuffer wurden 1 µg/ml Ethidiumbromid zugefügt. Die DNA wurde mit 0,2 Vol DNA-Ladepuffer versetzt und auf das Gel aufgetragen. Als Größenstandards wurden eine 100 bp- und eine 1 kb-DNA-Leiter (New England Biolabs, NEB, Frankfurt am Main) verwendet. Die elektrophoretische Trennung erfolgte bei einer Spannung von 70-80 V für ca. 90 min in der Hoefer HE 33 Mini Submarine Electrophoresis Unit.

50 x TAE-Puffer: 1,5 M Tris-Base; 60 mM EDTA; 5,71 % (v/v) Essigsäure

Gelladepuffer: 0,25 % (w/v) Bromphenolblau; 0,25 % (w/v) Xylencyanol; 30 % (v/v) Glycerol

2.4.8 DNA-Isolierung aus Agarosegelen

Für die Extraktion von DNA-Fragmenten aus einem Agarosegel wurde zunächst durch Fluoreszenzanregung die DNA visualisiert und dann mit einem Skalpell die gewünschte Bande vorsichtig aus dem Gel herausgeschnitten. Die Isolierung der DNA aus den Gelstücken erfolgte mittels zweier alternativer Methoden.

Bei der ersten Methode wurde die DNA unter Verwendung eines „Minisieb“ durch Zentrifugation aus dem Agarosegel-Stück mechanisch eluiert. Für die Herstellung des Siebes wurde ein 1,5 ml Eppendorfreaktionsgefäß (RG) halbiert, mit einer heißen Nadel ein Loch in den Boden gestochen und dieses dann mit silanisierter Glaswolle bedeckt. Die Minisiebkonstruktion wurde in ein intaktes 1,5 ml RG gesteckt und das ausgeschnittene Gelstück vorsichtig auf die Glaswolle überführt. Nach einer zweiminütigen Zentrifugation bei 6.000 UpM kann die DNA aus dem Eluat, welches sich im unteren intakten Eppi befindet, mit 0,1 Vol 3 M Natriumacetat und 2,5 Vol Ethanol (100 %) präzipitiert werden. Das zweite Verfahren wurde für die Aufreinigung von DNA-Fragmenten genutzt, die für die

Herstellung von Expressionsvektoren (siehe Abschnitt 2.7.1) weiterverwendet wurden. Hierfür wurde das High Pure PCR Product Purification Kit verwendet. Entsprechend den Herstellerangaben wurde das ausgeschnittene Agarosegel-Stück in 300 µl Binding-Puffer/100 mg Agarosegel für 10 min bei 56 °C aufgelöst. Pro 100 mg Agarosegel wurden dann 150 µl Isopropanol zugegeben, die Lösung durchmischt und auf ein High-Pure-Filtersäulchen gegeben. Nach einer einminütigen Zentrifugation bei 13.000 UpM wurde der Durchfluss verworfen und das Säulchen mit 700 µl Waschpuffer gewaschen. Danach wurde der High-Pure-Filter in ein neues RG überführt, mit 50 µl Elutionspuffer versetzt und 1 min bei 13.000 UpM zentrifugiert. Die im Eluat enthaltene DNA wurde abschließend durch die Zugabe von 1/10 Vol 3 M Natriumacetat und 2,5 Vol 100 % Ethanol präzipitiert.

Binding-Puffer: 3 M Guanidinthiocyanat; 10 mM Tris-HCl; 5 % (v/v) Ethanol; pH 6,6
Waschpuffer: 20 mM NaCl; 2 mM Tris-HCl; pH 7,5
Elutionpuffer: 10 mM Tris-HCl; pH 8,5

2.4.9 DNA-Restriktion

Für die Restriktion von PCR-Produkten und Plasmiden (100-1.000 ng) wurde mit dem/den gewünschten FastDigest® Enzym(en) und dem 1 x FastDigest®-Puffer bzw. *Bst*ZI, BSA (10 µg/µl) und 10 x Puffer für 1 h bei 37 °C bzw. 50 °C verdaut. Anschließend wurden die Fragmente mit Hilfe der Agarosegelelektrophorese aufgetrennt, analysiert und die gewünschten Fragmente isoliert (siehe Abschnitt 2.4.7 und 2.4.8).

2.4.10 Ligation

Für die Klonierung eines DNA-Fragments in einen Vektor erfolgte die Ligation je nach Konstrukt mit einem Vektor:Insert-Verhältnis von 3:1, 1:1 oder 1:3. Die Berechnung der entsprechenden DNA-Mengen erfolgte nach folgender Formel:

$$\text{Masse Insert (ng)} = \frac{\text{Länge Vektor (kb)}}{\text{Länge Insert (kb)}} * \text{Masse Vektor (ng)}$$

Aufgereinigte aber ungeschnittene PCR-Produkte wurden mit Hilfe des pGEM®-T-Vector-Systems direkt in den pGEM®-T Vektor ligiert. Hierfür wurden Vektor und Insert im entsprechenden Verhältnis gemischt, 5 µl *Rapid Ligation*-Puffer

(2 x), 1 µl T4-DNA-Ligase (3 Weiss units/ml) hinzugegeben und mit ddH₂O auf ein Endvolumen von 10 µl aufgefüllt.

Die Ligation von Vektoren und Fragmenten, die nach der Restriktion (siehe Abschnitt 2.4.9) passende kohäsive Enden besaßen, wurden ebenfalls im gewünschten Vektor:Insert-Verhältnis zusammengegeben. Dem Ligationsansatz wurden noch 1 µl T4-DNA-Ligase-Puffer (10x), 1 µl T4-DNA-Ligase (5 u/µl, Fermentas) zugefügt und mit ddH₂O auf ein Endvolumen von 10 µl ergänzt. Alle Ligationsreaktionen wurden entweder bei RT für 3 h oder bei 4 °C über Nacht durchgeführt.

2 x *Rapid Ligation*-Puffer: 20 mM MgCl₂; 20 mM DTT; 2 mM ATP; 10 % (v/v) Polyethylenglykol;
60 mM Tris-HCl; pH 7,8

10 x T4-DNA-Ligase-Puffer: 400 mM Tris-HCl; 100 mM MgCl₂; 100 mM DTT, 5 mM ATP; pH 7,8

2.4.11 Transformation in *E. coli*

Für die Transformation von Plasmid-DNA wurden zwei unterschiedliche *E. coli*-Stämme verwendet. Zur Vermehrung von Plasmiden wurden die transformationskompetenten *E. coli*-Zellen JM109-Zellen verwendet. Für die Expression rekombinanter Proteine wurden die Plasmide in *E. coli*-Zellen des Typs BL21 (T7 Express lys Y) transformiert.

Das Einschleusen der Fremd-DNA in die *E. coli*-Zellen erfolgte mit der Hitzeschockmethode (Hanahan, 1983). Ein 100 µl-Aliquot der zu transformierenden *E. coli*-Zellen (JM109 bzw. T7 Express lys Y) wurde vorsichtig mit 10 µl Ligationsansatz (siehe Abschnitt 2.4.10) vermischt. Der Ansatz wurde 30 min auf Eis, dann für 45 s bei 42 °C (Hitzeschock) und anschließend für 2 min auf Eis inkubiert. Dann wurde den Zellen 900 µl LB-Medium zugegeben und der Ansatz für ca. 1 h bei 37 °C unter Schütteln inkubiert. Die transformierten Zellen wurden anschließend 2 min bei 7.000 UpM pelletiert, in 100 µl LB-Medium resuspendiert und auf LB-Agarplatten mit entsprechendem Antibiotikum ausplattiert. Zur Vermehrung der Bakterien wurden die Platten für ca. 16 h bei 37 °C gelagert.

Antibiotikazusätze: Carbenicillin 100 µg/ml; Kanamycin 50 µg/ml; Chloramphenicol 34 µg/ml

2.4.12 Isolierung von Plasmid-DNA

Minipräparation mittels peqGOLD Plasmid Miniprep Kit I

Für die Isolierung von kleineren Mengen Plasmid-DNA wurden 5 ml LB-Medium, versetzt mit dem entsprechenden Antibiotikum, mit einer einzelnen Bakterienkolonie beimpft. Der Ansatz wurde dann über Nacht bei 37 °C im Warmluftschüttler bei 180-250 UpM inkubiert. Die Bakterienzellen der Übernachtskultur wurden durch einminütiges Zentrifugieren bei 13.000 UpM pelletiert und dann in 250 µl Lösung I/RNase A resuspendiert. Nach Zugabe von 250 µl Lösung II wurden durch Invertieren vermischt und gegebenenfalls noch 2 min bei RT inkubiert, bis ein klares Lysat entstand. Durch Zugabe von 350 µl Lösung III wurde der Ansatz dann neutralisiert und das nach mehrfachem Invertieren entstandene Präzipitat durch zehnminütiges Zentrifugieren bei 13.000 UpM sedimentiert. Der Überstand, welcher die DNA enthält, wurde in eine *PerfectBind* DNA-Säule überführt. Nach einminütigem Zentrifugieren bei 10.000 UpM und RT wurde der Durchlauf verworfen und die an der Säule gebundene DNA mit 500 µl PW Plasmid-Puffer gewaschen (10.000 UpM, 1 min, RT). Es folgten zwei weitere Waschschrte mit je 750 µl bzw. 500 µl DNA-Waschpuffer (10.000 UpM, 1 min, RT) von denen ebenfalls der Säulendurchlauf verworfen wurde. Vor der Elution der DNA wurde die Säule 1 min bei RT und 13.000 UpM zentrifugiert um sie vollständig zu trocknen. Die Plasmid-DNA wurde durch Zugabe von 70 µl DEPC-H₂O und anschließender Sedimentation (5.000 UpM, 1 min, RT) von der Säule in ein sauberes RG eluiert.

Präparation von Plasmid-DNA - mittels LiCl

Größere Mengen DNA wurden mit der im Folgenden beschriebenen Methode isoliert. Es wurden 50 ml LB-Medium mit Antibiotikum versetzt, mit einer Bakterienkolonie oder 100 µl einer Übernachtskultur angeimpft und über Nacht im Warmluftschüttler bei 180-250 UpM inkubiert. Die Kulturflüssigkeit wurde in ein 50 ml Falcon-Röhrchen (FR) überführt und die Zellen bei 4 °C für 10 min bei 5500 UpM sedimentiert. Der Überstand wurde dekantiert und das erhaltene Pellet in 4 ml Lösung I resuspendiert. Danach wurde die Suspension mit 8 ml der Lösung II versetzt und durch Invertieren vermischt. Zu der jetzt klaren und leicht viskosen Flüssigkeit wurden 8 ml Lösung III gegeben und durch Invertieren durchmischt. Das durch das Neutralisieren entstandene Präzipitat wurde durch fünfminütiges Zentrifugieren bei 4 °C und 5500 UpM sedimentiert. Der Überstand wurde dann

durch einen Faltenfilter in ein sauberes FR filtriert. Nach Zugabe von 25 ml Isopropanol und mehrfachem Invertieren wurde für 10 min bei 4 °C und 5500 UpM zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 1,45 ml ddH₂O gelöst. Danach wurden 2,5 ml LiCl (4 M) und 50 µl Tris-HCl (1 M, pH 7,5) zugegeben und alles gut vermischt. Nach einer erneuten Sedimentation (5500 UpM, 5 min, 4 °C) wurde der Überstand auf zwei saubere FR verteilt, diese mit je 5 ml absolutem Alkohol vermischt und für 1 h bei -20 °C inkubiert. Es folgte eine Sedimentation für 10 min bei 4 °C und 5500 UpM. Nach Abgießen des Überstandes wurden die Pellets in je 250 µl TE-Puffer resuspendiert und in ein RG überführt. Es wurde 2,5 µl RNase-Cocktail hinzugefügt und für ca. 30 min bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurde der Ansatz mit 1 Vol Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol versetzt, durchmischt und 1 min bei RT und 13.000 UpM zentrifugiert. Die obere wässrige Phase wurde einer weiteren Phenol/Chloroform-Extraktion unterzogen. Danach wurde die wässrige Phase zweimal mit je 1 Vol Chloroform versetzt und bei 13.000 UpM für 1 min bei RT zentrifugiert. Nach der Extraktion wurde die wässrige Phase wieder auf zwei 1,5 ml RGs verteilt und mit je 1/10 Vol LiCl (3 M) und 3 Vol absolutem Ethanol vermischt. Durch das anschließende Zentrifugieren (13.000 UpM, 5 min, RT) wurde die durch das Ethanol gefällte DNA sedimentiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet mit 200 µl 70 % Ethanol gewaschen. Nach einer einminütigen Zentrifugation bei RT und 13.000 UpM wurde der Überstand abgenommen und die Plasmid-DNA getrocknet. Abschließend wurde das Pellet in 200 µl TE-Puffer gelöst und die Reinheit und Konzentration der DNA spektralphotometrisch (siehe Abschnitt 2.4.13) ermittelt.

Lösung I:	50 mM Glukose; 10 mM EDTA; 25 mM Tris-HCl; pH 8,0
Lösung II:	0,2 M NaOH; 1 % (w/v) SDS
Lösung III:	60 % (v/v) 5 M Kaliumacetat; 11,5 % (v/v) Essigsäure; pH 4,8

2.4.13 RNA-/DNA-Konzentrationsbestimmung

Die Konzentration isolierter DNA bzw. RNA wurde spektralphotometrisch bestimmt. Dazu wurde die optische Dichte (OD) am Absorptionsmaximum für Nukleinsäuren bei 260 nm gemessen. Dabei entsprach eine Extinktion von 1 einer Konzentration von 50 µg/µl doppelsträngiger DNA bzw. 40 µg/µl RNA.

2.4.14 Sequenzierung

DNA-Sequenzierungen wurden von der Firma GATC Biotech (Konstanz) und LCG Genomics (Berlin) durchgeführt.

2.5 Biochemische Methoden

2.5.1 Protein-Konzentrationsbestimmung

Die Ermittlung der Proteinkonzentration erfolgte nach Angaben des Herstellers mit dem Roti®-NanoQuant-Reagenz, das auf der Proteinbestimmung nach Bradford (1976) beruht. Für die Kalibrierung wurde eine Rinderserumalbumin (BSA)-Konzentrationsreihe (1 µg-10 µg) verwendet. Die Proteinmenge wurde mit dem Spektralphotometer GeneQuant 1300 durch Messung der Extinktion bei 595 nm bestimmt.

2.5.2. SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) nach Laemmli (1970) erfolgte unter denaturierenden Bedingungen in diskontinuierlichen SDS-Polyacrylamid-Gelen (Trenngel 10–12 %, Sammelgel 4,5 %, 0,75 mm Dicke) oder in Gradientengelen (3-14 %, 1 mm).

diskontinuierliche SDS-Polyacrylamid-Gel:

Trenngel	10 %	12 %	Sammelgel	4,5 %
Acrylamidlösung	4 ml	4,8 ml	Acrylamidlösung	0,6 ml
Trenngel-Puffer	3 ml	3 ml	Sammelgel-Puffer	1 ml
ddH ₂ O	5 ml	4,2 ml	ddH ₂ O	2,4 ml
TEMED	12 µl	12 µl	TEMED	4 µl
APS	70 µl	70 µl	APS	30 µl

Die Herstellung der Gradientengele erfolgte unter Zuhilfenahme eines Gradientenmischers.

Gradientengel:

Reagenz	3 %	14 %
Gradientengelpuffer	0,45 ml	0,45 ml
Acrylamidlösung	0,36 ml	1,7 ml
ddH ₂ O	2,73 ml	-
Glycerol	-	1,41 ml
SDS	80 µl	80 µl
APS	32 µl	10 µl
TEMED	4 µl	2 µl

Für den Auftrag auf das Gel wurden die Gewebeproben direkt in reduzierendem 1 x Probenpuffer (Roti-Load) homogenisiert und große Zellfragmente durch Zentrifugation abgetrennt. Gereinigte Membranproteine oder Fusionsproteine (siehe Abschnitt 2.5.5 bzw. 2.5.7) wurden mit 1/3 Vol 4 x Probenpuffer versetzt. Alle Proben wurden vor dem Auftragen durch Erhitzen (60-95 °C) für 5 min denaturiert. Die Elektrophorese erfolgte in 1 x Kammerpuffer mit dem Mini-Protean II System für ca. 20 min bei einer Spannung von 80 V, danach bei 120 V. Abhängig von der Verwendung wurden die Gele nach erfolgter Trennung direkt mit Coomassie G250 gefärbt (30 min Coomassie-Lösung; 2 x 30 min Entfärber-Lösung) oder die Proteine auf eine Polyvinylidenfluorid-Membran (PVDF-Membran) übertragen (siehe Abschnitt 2.5.3). Als Molekulargewichtsstandard wurden LMW (Low Molecular Weight, 14-66 kDa, Sigma) und HMW (High Molecular Weight Standard Mixture, 30-200 kDa, Sigma) verwendet.

Trenngelpuffer:	1,5 M Tris ; 0,8 % (w/v) SDS; pH 8,8
Sammelgelpuffer:	500 mM Tris; 0,8 % (w/v) SDS; pH 6,8
Gradientengelpuffer:	3 M TRIS Ultra; pH 8.8
TEMED:	N,N,N',N'-Tetramethylethan-1,2-diamin
APS:	10 % (w/v) Ammoniumpersulfat
Kammerpuffer:	25 mM Tris; 192 mM Glycin; 0,1 % (w/v) SDS; pH 8,8
Coomassie-Lösung:	0,1 % (w/v) Coomassie G250; 50 % (v/v) Methanol; 10 % (v/v) Eisessig
Entfärber-Lösung:	10 % (v/v) Methanol; 7 % (v/v) Essigsäure
SDS:	10 % (w/v) Natriumdodecylsulfat
Glycerol:	60 % (v/v) Glycerol

2.5.3 Western-Blot

Mit der Western-Blot-Methode können die nach der SDS-PAGE aufgetrennten Proteine aus dem Gel auf die Oberfläche einer PVDF-Membran übertragen werden, wo sie mittels spezifischer Antikörper nachgewiesen werden können. Das Western-Blotting erfolgte nach dem *Semi-dry*-Verfahren mit einem

diskontinuierlichen Puffersystem unter Verwendung der Trans-Blot SD Cell. Auf der Anodenplatte beginnend wurde Folgendes in einem Sandwichaufbau übereinandergeschichtet:

- 6 in Anodenpuffer I getränkte Filterpapiere
- 3 in Anodenpuffer II getränkte Filterpapiere
- PVDF-Membran (5 min in 100 % Methanol und in Anodenlösung II äquilibriert)
- SDS-Gel mit aufgetrennten Proteinen
- 9 in Kathodenpuffer getränkte Filterpapiere

Der Proteintransfer erfolgte für 90 min bei 54 mA pro Gel. Die Effizienz des Transfers wurde durch reversible Proteinfärbung mit 0,2 % Ponceau-Rot S überprüft. Nach vollständiger Trocknung der Membran bei 60 °C wurde diese bis zur Immundetektion bei 4 °C aufbewahrt.

Anodenpuffer I: 300 mM Tris-Base; 20 % (v/v) Methanol; pH 10,4

Anodenpuffer II: 25 mM Tris-Base; 2 % (v/v) Methanol; pH 10,4

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

2.5.4 Immundetektion

Zur Immundetektion der auf die PVDF-Membran transferierten Proteine wurde die Membran auf einer Schüttelplattform nach folgendem Schema behandelt:

- 30 min RT Blockierlösung (Absättigung unspezifischer Bindungsstellen)
- ÜN 4°C Primärantikörper in TBST-Puffer
- 3 x 5 min RT Waschen in TBST-Puffer
- 1 x 3 min RT Waschen in Harnstoff-Puffer
- 1 x 5 min RT Waschen in TBST-Puffer
- 1 h RT Sekundärantikörper in TBST-Puffer
- 3 x 5 min RT Waschen in TBST-Puffer
- 1 x 10 s RT Waschen in ddH₂O
- 5 min RT Inkubation mit ECL-System

Die Entwicklung erfolgte auf X-OMAT-AR-Filmen (Kodak). Nachfolgend sind alle verwendeten Antikörper und deren Herkunft sowie die verwendete Verdünnung für die jeweilige Anwendung aufgelistet.

Tabelle 2.1 Verwendete primäre Antikörper

primäre Antikörper	Herkunft/(Typ)	Bezugsquelle	Verdünnung	
			Western-Blot	Immunzytochemie
anti-HA (0,1 mg/ml)	Ratte (monoklonal)	Roche	1:20.000	1:100
anti-6xHis (0,1 mg/ml)	Kaninchen (polyklonal)	Rockland	1:1.000	-
anti-Cv5-HT ₇ -Nterm (0,5 mg/ml)	Kaninchen (polyklonal)	Pineda	1:10.000	1:2.000
α5-IgG (0,4 mg/ml)	Maus (monoklonal)	DSHB	1:40	-

Tabelle 2.2 Verwendete sekundäre Antikörper

sekundäre Antikörper	Bezugsquelle	Verdünnung
<i>Goat-anti-mouse-Alexa 635</i>	Molecular Probes – Invitrogen	1:1.000
<i>Goat-anti-rabbit-HRP</i>	Jackson ImmunoResearch	1:20.000
<i>Goat-anti-rabbit-Cy3</i>	Jackson ImmunoResearch	1:200
<i>Goat-anti-rat-HRP</i>	American Qualex Antibodies	1:10.000
<i>Goat-anti-rat-Alexa 488</i>	Molecular Probes - Invitrogen	1:500

TBST-Puffer: 0,1 % (w/v) Tween 20; 10 mM Tris-Base; 150 mM NaCl; pH 7,5

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

2.5.5 Isolierung von Membranproteinen

Die im nachfolgenden beschriebene Methode wurde angewendet um heterolog exprimierte Membranproteine zu präparieren, die durch Western-Blotting und Immundetektion nachgewiesen werden sollten. Das Zellpellet einer konfluent bewachsenen 9 cm-Kulturschale wurde in 0,5 ml Puffer A (Lysispuffer) resuspendiert und mit einem Pistill homogenisiert. Nach einer zehninütigen Inkubation auf Eis wurde das Homogenat für 30 min bei 4 °C und 15.300 UpM zentrifugiert. Der Überstand, welcher die zytosolischen Proteine enthält, wurde abpipettiert und bei -20 °C aufbewahrt. Das Membran-Pellet wurde in 0,1 ml Puffer B vollständig resuspendiert und anschließend mit 0,1 ml einer 2 % (w/w) CHAPS-Lösung vermischt. Zum Solubilisieren der Membranproteine wurde 10 min auf Eis inkubiert und anschließend 10 min bei 4 °C und 10.100 UpM sedimentiert. Der Überstand, der die Membranproteine enthält, wurde in ein sauberes RG pipettiert und die Proteinkonzentration mittels Bradfordbestimmung (siehe Abschnitt 2.5.1) ermittelt.

2.5.6 Deglykosylierung von Membranproteinen

Je 20 µg Membranproteine wurden in zwei Reaktionsgefäße überführt und mit 10 x Denaturierungspuffer versetzt. Nach einer zehnmütigen Inkubation bei 100 °C wurden jeweils 1/10 Vol G7-Reaktionspuffer (10 x) und 1/10 Vol 10 % NP-40 zugegeben. Ein Ansatz wurde dann mit 500 U PNGase F (500.000 U/ml), der andere mit dem entsprechenden Volumen an ddH₂O versetzt. Die Deglykosylierung fand für 1 h bei 37 °C statt.

2.5.7 Klonierung, Expression und Reinigung von Fusionsproteinen

Mit Hilfe des Vektors pMAL-c2X wurden in *E. coli*-Zellen Fusionsproteine exprimiert, die später zu Herstellung und Reinigung polyklonaler Antikörper genutzt wurden. Durch Klonierung der gewünschten Sequenz in den pMAL-c2X Vektor werden Proteine exprimiert, die aus einem rezeptorspezifischen Proteinbereich und dem Maltose-Bindeprotein (MBP) bestehen. Das angefügte MBP ermöglicht eine Affinitätschromatographie des Proteins mittels Amylose.

Klonierung

Es sollten zwei verschiedene Fusionsproteine für jeden Rezeptor hergestellt werden, je einen Bereich aus dem N-Terminus bzw. der dritten zytoplasmatischen Schleife repräsentierten. Mit sequenzspezifischen Primern bei denen der *forward* Primer eine *EcoR* I-Schnittstelle und der *reverse*-Primer eine *Hind* III-Schnittstelle besaßen, wurden die jeweiligen Rezeptorbereiche amplifiziert (Abb. 2.1).

Die Fusionsproteine für den Cv5-HT₇ Rezeptor umfassen im N-Terminus den Sequenzbereich von T₁₃₀ bis P₂₇₀ und in der ICL 3 von A₄₇₁ bis R₅₄₂. Für den Cv5-HT_{2α} repräsentieren die jeweiligen Fusionsproteine den N-terminalen Bereich von Q₄₁₁ bis L₅₂₄ und einen Abschnitt der ICL 3 von Y₇₆₇ bis S₁₀₇₈.

polylinker:

malE...ATC GAG GGA AGG ATT TCA GAA TTC spezifische Sequenz der Fusionsproteine A AGC TTG... *lacZα*

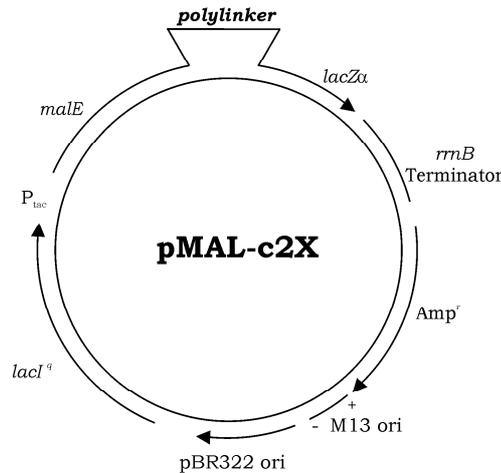


Abb. 2.1 Vektorkarte des pMAL-c2X-Vektors

Die rezeptorspezifische Sequenz der Fusionsproteine wurde über die Restriktionsschnittstellen *EcoRI* und *Hind III* in die *polylinker*-Sequenz eingefügt.

Expression von Fusionsproteinen

E.coli-Zellen des Typs BL21 wurden mit den prokaryotischen Expressionsvektoren (s. o.) transformiert. Ausgehend von einer Übernachtskultur wurden 250 ml LB-Medium (mit entsprechendem Antibiotikum) angeimpft und bis zu einer optischen Dichte (OD_{600}) von 0,6-0,9 bei 37 °C schüttelnd inkubiert. Die Proteinexpression wurde durch Zugabe von 250 µl IPTG (1 M) induziert und die Zellen je nach Anspruch des Konstrukts für weitere 4 h bei 37 °C oder ÜN bei 22 °C kultiviert. Der Kulturansatz wurde dann für 10 min bei 5.500 UpM und 4 °C sedimentiert. Mittels SDS-PAGE wurde überprüft ob sich das Fusionsprotein nach dem Sonifizieren im Überstand (löslich) oder im Zellpellet (unlöslich) befand.

Reinigung von Maltose-Bindeprotein-Fusionsproteinen

Das Pellet des 250 ml Kulturansatzes wurde 1 ml TE-Puffer mit 1:500 Proteaseinhibitor resuspendiert und mit einem Stabsonifizierer durch Ultraschall 5 x 30 s aufgeschlossen. Zur Trennung der löslichen von den unlöslichen Bestandteilen wurde für 10 min bei 15.000 UpM und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein FR überführt und mit 5 Vol Säulenpuffer versetzt. Für die Affinitätsreinigung wurde eine leere BioRad-Fertigsäule (Poly-Prep Chromatography Columns) mit 6 ml eines 50 %igem Amylosegranulat befüllt. Das Säulenmaterial wurde mit 15 ml Säulenpuffer äquilibriert und das Solubilisat auf die Säule gegeben. Die Säule wurde dann mit 10 Vol Säulenpuffer gewaschen. Abschließend

wurde das gebundene Fusionsprotein mit 5 ml Elutionspuffer vom Säulenmaterial eluiert. Der Erfolg der Proteinreinigung wurde auf einem SDS-Gel überprüft.

Säulenpuffer:	200 mM NaCl; 10 mM β -Mercaptoethanol; 1 mM EDTA; 20 mM Tris-HCl; pH 7,4; 1:500 Proteaseinhibitor
Elutionspuffer:	200 mM NaCl; 10 mM β -Mercaptoethanol; 1 mM EDTA; 20 mM Tris-HCl; pH 7,4; 20 mM Maltose; 1:500 Proteaseinhibitor

2.5.8 Generierung und Affinitätsreinigung polyklonaler Antiseren

Generierung polyklonaler Antiseren

Ziel war es, für jeden Rezeptor Antikörper gegen Abschnitte im N-Terminus und der dritten zytoplasmatischen Schleife herzustellen. Dafür wurden Meerschweinchen mit MBP-Fusionsproteinen, die eine spezifische Sequenz des N-Terminus und der ICL3 des Cv5-HT₂-Rezeptors aufweisen, immunisiert. Gleiches geschah mit Kaninchen und den Fusionsproteinen für den Cv5-HT₇-Rezeptor. Die Immunsierung und Versorgung der Tiere übernahm die Firma Pineda (Berlin). Der Verlauf der Immunsierung wurde jeweils durch Western-Blot-Analysen und Immundetektion am 61. und 90. Tag nach der ersten Immunsierung verfolgt.

Affinitätschromatographie polyklonaler Antiseren

Zur Affinitätsreinigung der Antiseren wurden die MBP-Fusionsproteine an *HiTrap-NHS-activated-HP*-Säulen gebunden. Hier fungierten sie als Antigen an dem die spezifischen Antikörper der Meerschweinchen- bzw. Kaninchen-Antiseren binden sollten. Das gereinigte Antigen (1-5 mg in Kopplungspuffer) wurde nach Entfernen der Ventilkappe und Auftropfen von einem Tropfen eiskaltem HCl (1 M) auf die Säule gegeben. Anschließend wurde die Säule mit je 6 ml Puffer A, Puffer B und wieder Puffer A gewaschen. Nach einer 30 minütigen Inkubation der Säule bei RT wurden erneut je 6 ml Puffer B, Puffer A und Puffer B injiziert um ungekoppelte und unspezifisch gebundene Liganden von der Säule zu spülen. Dann wurde mit 13 ml Bindungspuffer äquilibriert. Bevor diese Säule zum Einsatz kam, wurde das Antiserum 1:10 mit Bindungspuffer versetzt. Danach wurde das Serum für 5 h oder über Nacht mit Hilfe einer Peristaltikpumpe über eine *HiTrap-NHS-activated-HP*-Säulen gegeben an der ein anderes MBP-fusioniertes Protein gekoppelt war. Mit diesem zusätzlichen Schritt wurde ein Großteil der Antikörper, die gegen das MBP gerichtet sind, aus dem Serum entfernt. Der Durchfluss dieser Säule wurde dann für 5 h über die Säule mit dem spezifischen Antigen geleitet. Während dieser Phase erfolgte die Bindung der spezifisch gegen den Rezeptor gerichteten Antikörper.

Durch einen Waschschrift mit 10 ml Bindungspuffer wurden unspezifisch gebundene Antikörper entfernt. Mit 3 ml Elutionspuffer wurden die spezifisch gebundenen Antikörper von der Säule eluiert. Zur Neutralisierung der Elutionsfraktionen (6 x 500 µl) wurde tropfenweise Neutralisationspuffer zugegeben, bis ein neutraler pH-Wert erreicht war. Nach einem erneuten Waschschrift und Äquilibrierungsschrift mit 10 ml Bindungspuffer wurde die Säule in Lagerpuffer bei 4 °C aufbewahrt.

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

2.5.9 Immunzytochemische Analysen

Herstellung von Schnittpräparaten und Immunzytochemie

Zur Herstellung von Kryostatschnitten wurden präparierte *Calliphora* Speicheldrüsen in Fixativ überführt und darin für 1 h bei RT inkubiert. Anschließend wurden die Drüsen dreimal 10 min mit Phosphat-gepufferter Salzlösung (PBS) auf Eis inkubiert. Nach der Fixierung wurde den Drüsen zur Kryoprotektion stufenweise das Wasser entzogen, zuerst 1 h in einer 10 % (w/v) Saccharose-Lösung, gefolgt von einer Inkubation über Nacht in 25 % (w/v) Saccharoselösung bei 4 °C. Die Drüsen wurden dann mittels Tissue-TEK® (Sakura Finetek) auf einem Stück gekochter Schweineleber fixiert und in Methylbutan eingefroren, das mit flüssigem Stickstoff auf -160 °C abgekühlt wurde. Bis zu ihrer weiteren Verwendung wurden die Präparate bei -80 °C gelagert. An dem Gefriermikrotom HM 500 OM wurden 8 µm dicke Gefrierschnitte angefertigt und auf Poly-L-Lysin beschichtete Deckgläschen übertragen. Die luftgetrockneten Präparate wurden bei 4 °C aufbewahrt oder sofort weiter verwendet. Für die Immunzytochemie wurden die Gefrierschnitte mit einem Fettstift umrandet und wie folgt behandelt: 5 min Waschen mit 0,01% (v/v) Tween, 5 min NH₄Cl-Lösung, 5 min Waschen mit PBS, 10 min Inkubation mit Blockierlösung, ÜN 3 h bei RT in einer feuchten Kammer mit dem primären Antikörper (in Blockierlösung), 3 x 5 min Waschen mit PBS, 1 h Inkubation mit sekundärem Antikörper (in PBS) und 3 x 5 min Waschen mit PBS. Abschließend wurden die Schnitte kurz in ddH₂O

getaucht, abgetupft und in Mowiol eingedeckelt. Nachdem das Mowiol ausgehärtet war, wurden die Deckgläschen mit Nagellack versiegelt und analysiert.

Fixierlösung:	3 % (w/v) Paraformaldehyd; 0,1 M Phosphatpuffer; 1 mM DSP
PBS:	0,14 M NaCl; 2,7 mM KCl; 1,5 mM KH ₂ PO ₄ ; 8 mM Na ₂ HPO ₄ ; pH 7,4
Sucroselösung:	10 % / 25 % (w/v) Saccharose in 0,1 M PBS
NH ₄ Cl-Lösung:	50 mM NH ₄ Cl in PBS
Blockierlösung:	1 % (w/v) <i>normal goat serum</i> ; 0,8 % (v/v) BSA; 0,5 % (w/v) Triton-X-100
Mowiol:	33,3 % (v/v) Glycerol, 16,7 % (v/v) Mowiol 4-88, 2 % (v/v) n-Propyl-Galat in PBS

Immunzytochemische Analysen an fixierten HEK 293-Zellen

Diese Methode diente dem Nachweis heterolog exprimierter Proteine in ihren Wirtszellen. Es wurden dazu transfizierte HEK-Zellen in 24-well-Mikrotiterplatten ausgesät. Nach dem Heranwachsen der Zellen wurde das Kulturmedium abgesaugt, mit PBS gewaschen und die Zellen für 30 min bei RT mit 4 % (w/v) Paraformaldehyd fixiert. Die fixierten Zellen wurden mit Präinkubationslösung versetzt und für 30 min bei RT inkubiert. Anschließend erfolgte eine einstündige Inkubation mit dem primären Antikörper (anti-HA-Antikörper oder Anti-6xHis-Antikörper). Dann wurde dreimal mit PBS gewaschen und für 45 min mit dem an Alexa488-markierten sekundären Antikörper inkubiert. Zuletzt wurden die Deckgläschen nach mehrfachem Waschen in PBS auf einem Objektträger mit Aqua Poly/Mount (Polysciences, Warrington) eingebettet und analysiert.

PBS:	0,14 M NaCl; 2,7 mM KCl; 1,5 mM KH ₂ PO ₄ ; 8 mM Na ₂ HPO ₄ ; pH 7,4
Präinkubationslösung:	10 % (w/v) <i>normal goat serum</i> ; 0,5 % (w/v) Triton-X-100, gelöst in PBS
Inkubationslösung:	5 % (w/v) <i>normal goat serum</i> ; 0,5 % (w/v) Triton-X-100, gelöst in PBS

2.6 Mikroskopische Auswertung und Bildbearbeitung

Die Analyse immunzytochemischer Präparate erfolgte am Konfokalmikroskop LSM 510 (Carl Zeiss, Jena). Zur Bildbearbeitung sowie Änderung von Kontrast und Helligkeit wurde das Programm ImageJ 1.42l (Wayne Rasband, National Institutes of Health, USA) genutzt. Die Anordnung und Gestaltung der Abbildungen erfolgte mit Corel Draw 14 (Corel Cooperation, Unterschleißheim).

2.7 Heterologe Expression der Rezeptoren und Funktionalitätsnachweis

Für die funktionelle und pharmakologische Charakterisierung der in der Speicheldrüse von *Calliphora vicina* vorkommenden 5-HT-Rezeptoren wurden die Rezeptoren in HEK 293-Zellen bzw. flpTM-Zellen exprimiert. FlpTM-Zellen sind HEK 293 Zellen die mit dem Gen, das für eine Variante der A2 Untereinheit des olfaktorischen CNG-Kanals kodiert, stabil transfiziert wurden (Ludwig *et al.*, 1990). Ein Aminosäureaustausch eines Methioninrestes (M, Position 537) gegen einen Threoninrest erhöht die Affinität des Kanalproteins für cAMP. Diese Arbeiten (speziell die Herstellung stabiler Zelllinien, die Zellkultur, die cAMP-Bestimmungen und die Calciumfluorometrie) fanden in Kooperation mit Prof. Dr. Arnd Baumann (Forschungszentrum Jülich, Institut für Strukturbiologie und Biophysik 1) statt.

2.7.1 Konstruktion der Expressionsvektoren

Für die Expression der Rezeptorproteine in eukaryotischen Zellen wurden die Rezeptor-kodierenden DNAs modifiziert. In einer PCR-Reaktion mittels entsprechender Primer wurde eine Kozak-Konsensus-Sequenz (Kozak, 1984) vor dem Start-Codon eingefügt, das Stopp-Codon entfernt und jeweils an den 5'- und 3'-Enden Restriktionsschnittstellen eingefügt. Zusätzlich wurden für den Cv5-HT₇-Rezeptor komplementäre Oligonukleotide synthetisiert, welche für einen Hämagglutinin A (HA)-Tag (abgeleitete Aminosäuresequenz: YPYDVPDYA) und ein sich anschließendes Stopp-Codon kodieren. Die 5'- und 3'-Enden der Oligonukleotide weisen jeweils Endonuklease-Schnittstellen auf. Dieses Epitop-Tagging ermöglicht den Nachweis der heterologen Expression des Proteins mit Hilfe eines kommerziell erhältlichen anti-HA-Antikörpers. Die komplementären Oligonukleotide wurden in äquimolaren Konzentrationen in Hybridisierungspuffer vereint und 5 min auf 95 °C erhitzt. Anschließend erfolgte bei langsamem Abkühlen auf RT die Hybridisierung beider Nukleotide. Die modifizierte Cv5-HT₇-Rezeptor-cDNA und die hybridisierten Nukleotide wurden dann über die eingefügten Schnittstellen in den eukaryotischen Expressionsvektor pcDNA3.1(+) (Abb. 2.2) ligiert (pcCv5-ht7-HA).

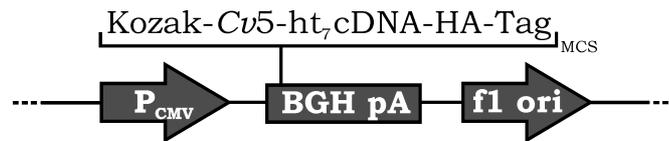


Abb. 2.2 Ausschnitt aus der *multiple cloning site* des Vektors pcDNA3.1(+) zur Verdeutlichung der Klonierungsstrategie

Die Cv5-HT₇-Rezeptor-cDNA mit Kozaksequenz und angefügtem HA-Tag wurde in die multiple cloning site eingefügt.

Für den Cv5-HT_{2a}-Rezeptor wurde eine N-terminal verkürzte Variante (neues Startcodon bei M₄₆₈) in das Expressionsplasmid pcDNA 6/myc-His A ligiert (pcCv5-ht2aN-His). Dieser Vektor fügt der Proteinsequenz N-terminal einen Polyhistidin-Tag an, wodurch das zusätzliche Epitop-Tagging durch einen HA-tag entfiel.

Hybridisierungspuffer: 50 mM NaCl; 1 mM EDTA; 10 mM Tris; pH 7,5

2.7.2 Herstellung stabiler Zelllinien

Zunächst wurden Zelllinien, welche die *5-ht2aN*- bzw. *5-ht7*-Gene konstitutiv exprimieren durch stabile Transfektion von HEK 293- bzw. flpTM-Zellen hergestellt. Die HEK 293-Zellen wurden mit 12 µg des Konstruktes pcCv5-ht2aN-His und flpTM-Zellen mit 15 µg DNA des Expressionskonstruktes pcCv5-ht7-HA (siehe Abschnitt 2.7.1) durch Calciumphosphatpräzipitation (Chen & Okayama, 1987) transfiziert. Hierfür wurden die DNA-Lösungen jeweils mit ddH₂O auf 124 µl aufgefüllt und 41 µl CaCl₂ sowie 165 µl 2 x Borat-gepufferte Salzlösung (BBS) zugegeben. Der Transfektionsansatz wurde dann 20 min bei RT inkubiert und danach zu den Zellen pipettiert (~4 x 10⁵ Zellen/Ø 5 cm-Schale). Die Zellen wurden 20 h bei 37 °C, 5 % CO₂ und 95 % Luftfeuchtigkeit inkubiert. Das Präzipitat wurde durch Waschen mit 1 x PBS/EDTA-Lösung entfernt und die Zellen mit 300 µl Trypsin/EDTA-Lösung vom Schalenboden gelöst (~5 min bei 37 °C). Die Zellen wurden dann in 4,7 ml M10-Medium resuspendiert und auf jeweils sechs 9 cm-Schalen verteilt. Am nächsten Tag erfolgte ein Wechsel gegen frisches Medium, welches zur Selektion für die HEK 293-Zellen Blasticidin (120 µg/ml) und für die flpTM-Zellen G418 (Geneticin; 1 mg/ml) enthielt. Nach einer Inkubation über Nacht wurde das M10-Medium erneut gewechselt, wobei G418 jetzt in einer Konzentration von 1,2 mg/ml eingesetzt wurde. Während weiterer Medienwechsel

jeweils im Abstand von drei Tagen (M10-Medium mit G418, 1 mg/ml bzw. Blastocidin 120 µg/ml) erfolgte in den folgenden 14 Tagen die Selektion der Zellklone. Anschließend wurden einzelne Kolonien mit einer Pipettenspitze abgelöst und in Multiwellschalen mit M10-Medium vermehrt. Bei eindeutig stabil transfizierten Linien wurde das Antibiotikum G418 auf 0,8 mg/ml und Blastocidin auf 100 µg/ml reduziert. Die stabile Expression der gewünschten Proteine wurde mittels Western-Blot und immunzytochemischer Analysen an fixierten Zellen überprüft.

Für den Cv5-HT_{2αN}-Rezeptor konnten mangels selektiver Antikörper mit den genannten Nachweismethoden keine eindeutige Aussage über „positive Zellklone“ getroffen werden, daher wurde mittels Calciumfluorometrie (siehe Abschnitt 2.7.3) auf eine funktionelle Expression des Rezeptorproteins untersucht.

BBS:	50 mM N,N-Bis-(2-hydroxyethyl)-2-aminoethansulfonsäure; 280 mM NaCl; 1,5 mM Na ₂ HPO ₄ ; pH 6,95
PBS/EDTA-Lösung:	PBS; 2g/l EDTA
Trypsin/EDTA-Lösung:	0,05 % Trypsin; 0,2 g/l EDTA
M10-Medium:	MEM GlutaMAX I (Invitrogen, Karlsruhe); 10 %, fetales Rinderserum; 1 % (v/v) Antibiotika/Antimykotika; 1 % MEM nicht essentielle Aminosäuren

2.7.3 Calciumfluorometrie an transfizierten HEK 293-Zellen und flpTM-Zellen

Die Methode des Ca²⁺-Imaging wurde angewendet, um Änderungen in der intrazellulären [Ca²⁺]_i nach Aktivierung eines GPCRs zu verfolgen. Für G_s-gekoppelte Rezeptoren (Cv5-HT₇) wird eine solche Änderung der [Ca²⁺]_i indirekt als Folge der Aktivierung eines cNMP-gesteuerten Ca²⁺-Kanals (CNG-Kanal) durch das gebildete cAMP detektiert. Für die Messungen wurde der Ca²⁺-sensitive Farbstoff Fluo-4-AM (Molecular Probes-Invitrogen, Karlsruhe) verwendet. Die zu untersuchenden Zellen (nicht-transfizierte, Cv5-HT_{2αN}- und Cv5-HT₇-exprimierende Zellen) wurden in 96er Multiwellplatten bis zu einer Dichte von 1 x 10⁴ Zellen pro *well* vermehrt. Nach Entfernen des Zellmediums wurden die Zellen mit 50 µl Beladungslösung für ca. 1 h bei Raumtemperatur inkubiert. Die Beladungslösung wurde gegen 90 µl ES-Lösung ausgetauscht und die Multiwellplatten zur Messung in das Fluoreszenzlesegerät FluoStar Galaxy (BMG Labtech, Ortenberg) überführt. Hier erfolgte eine weitere Inkubation der Zellen für 15 min bei 37 °C. Der Farbstoff Fluo-4 wurde dann bei 485 nm angeregt und die emittierte Fluoreszenz bei 520 nm gemessen, um die basale Fluo-4-Fluoreszenz zu ermitteln (Gee *et al.*, 2000).

Sobald das Fluoreszenzsignal konstant war, wurden in jedes *well* 10 µl Testlösung hinzugegeben. Die Aufzeichnung der Änderungen der Fluoreszenz erfolgte automatisch mit der Omega Software (BMG Labtech, Ortenberg). Für den Photomultiplier wurde ein Verstärkungsfaktor von 48 verwendet und ein *Required Value* von 90 % festgelegt. Alle Messungen wurden als Achtfach-Bestimmung durchgeführt. Eine erste Auswertung erfolgte mit der MARS Data Analysis Software (BMG Labtech, Ortenberg).

Beladelösung:	3 mM Probenecid; 2 mM Fluo-4 AM; 0,02 % (w/v) Pluronic® F127; in ES-Lösung;
ES-Lösung:	120 mM NaCl; 5 mM KCl; 2 mM MgCl ₂ ; 2 mM CaCl ₂ ; 10 mM HEPES; 10 mM Glucose; pH 7,4
Testlösung:	ES-Lösung mit unterschiedlichen Agonistenkonzentrationen bzw. ES-Lösung mit 100 nM 5-HT (Cv5-HT _{2a}) oder 6 nM 5-HT (Cv5-HT ₇) und unterschiedlichen Antagonistenkonzentrationen (siehe Tabelle 2.3)

2.7.4 cAMP-Bestimmung

Für die Bestimmung der gebildeten cAMP-Konzentration wurden flpTM-Cv5-HT₇-Zellen mit 10 µM NKH 477 bzw. 1 µM verschiedener biogener Amine in Anwesenheit von 100 µM IBMX 30 min bei 37°C inkubiert. Nach der Inkubation wurden die Zellen durch Zugabe von eiskaltem Ethanol lysiert. Nach 1 h bei 4°C wurden die Lysate in ein RG überführt und getrocknet. Die cAMP-Konzentration wurde mit dem cAMP Screen System (Applied Biosystems, Darmstadt) nach Herstellerangaben bestimmt. Zur Normierung auf den Gesamtproteingehalt wurde die Proteinmenge in vier *wells* bestimmt.

2.8 Messung des transepithelialen Potentials (TEP)

Die Messung des TEP wurde nach einer von Berridge und Prince (1972) erstmals beschriebenen Methode durchgeführt. Hierfür wurden die Speicheldrüsen nach der Präparation in ein Versuchswännchen überführt, bei dem zwei mit Ringerlösung gefüllte Kammern durch Vaseline elektrisch voneinander isoliert waren (Abb. 2.3). Während das geschlossene Ende der Drüse kontinuierlich mit Ringerlösung bzw. Versuchslösung umspült wurde (Durchflussgeschwindigkeit ca. 2 ml/min), befand sich das offene Ende in Ringerlösung, die im Verlauf des Experiments nicht ausgetauscht wurde. Die Kammern wurden über eine KCl-Agar-Brücke (3 M KCl) und einem AgCl-Pellet (Mikroelektrodenhalter, WPI International, Berlin) mit einem DPA-2F Differenzverstärker (npi-electronics, Tamm) verbunden. Die

Potentialunterschiede wurden mit einer Frequenz von 1 Hz mit Hilfe einer A/D-Wandlerkarte digitalisiert (KUSB-3102 Modul für A/D-Wandlung; Keithley, Germering). Zur Datenaufnahme und Speicherung wurde die Software TESTPOINT (CAPITAL EQUIPMENT COOPERATION, 1995) verwendet.

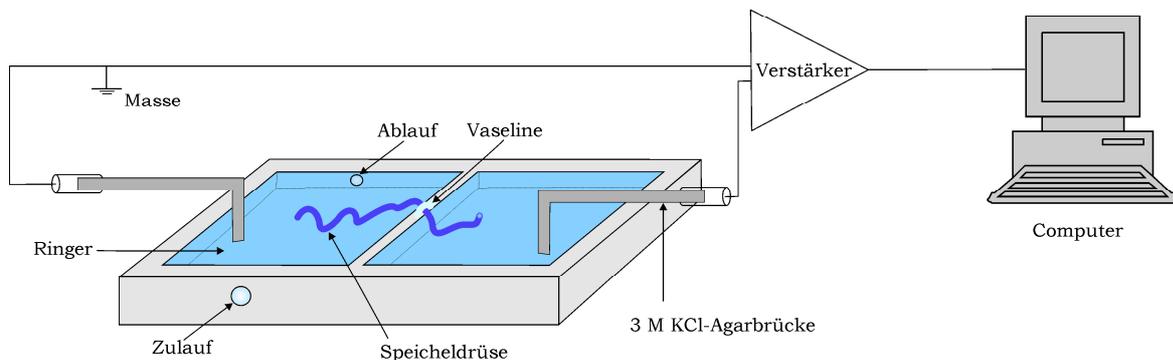


Abb. 2.3 Schematischer Versuchsaufbau für die TEP-Messungen

Die Drüse wurde in das Versuchswännchen gelegt. Die beiden Ringerlösungen sind durch Vaseline elektrisch voneinander isoliert. Das geschlossene Ende der Drüse wird permanent mit Versuchslösung umspült. Die Messung des TEP erfolgt über die Elektroden, die über einen Differenzverstärker verbunden sind.

Versuchsdurchführung

Die Drüsen wurden wie oben beschrieben in der Versuchsanordnung platziert und kontinuierlich mit Ringer umspült. Zu Beginn jedes Experiments wurde durch Stimulierung mit 30 nM 5-HT für 1 min die Reaktionsfähigkeit der Drüsen getestet. 30 nM Serotonin induziert in den Speicheldrüsen eine typische biphasische TEP-Antwort: Eine negative Phase während der 5-HT-Applikation gefolgt von einer positiven Phase beim Abspülen des 5-HT (Berridge & Patel, 1968; Berridge, 1970; Berridge *et al.*, 1975; Rapp & Berridge, 1981). Die Negativierung beruht auf dem Ca^{2+} -induzierten transepithelialen Transport von Chloridionen (Cl^-), wohingegen die sich anschließende positive Phase durch einen cAMP-vermittelten Kationentransport über die Apikalmembran hervorgerufen wird. Die zeitlich verzögerten Änderungen des TEP liegen in der sehr schnellen Aktivierung und Inaktivierung des Ca^{2+} -Signalweges und die verzögerte Aktivierung und Inaktivierung des cAMP-Signalweges (Berridge & Prince, 1971; 1972) begründet. Speicheldrüsen, die nicht das in Abbildung 2.4 dargestellte biphasische Verhalten zeigten, wurden verworfen. Das Messprotokoll für putative 5-HT-Rezeptoragonisten sah standardmäßig wie folgt aus:

Kontrollstimulation	Auswaschphase	Teststimulation	Auswaschphase	Kontrollstimulation	Auswaschphase
30 nM 5-HT	Ringer	Agonist	Ringer	30 nM 5-HT	Ringer
1 min	5 min	1 min	5-30 min	1 min	5 min

Für 5-HT-Rezeptorantagonisten kam folgendes Protokoll zum Einsatz:

Kontrollstimulation	Auswaschphase	Teststimulation	Auswaschphase	Kontrollstimulation	Auswaschphase
30 nM 5-HT	Ringer	Antagonist 30 nM 5-HT	Ringer	30 nM 5-HT	Ringer
1 min	5 min	3 min 1 min	2 min 5-30 min	1 min	5 min

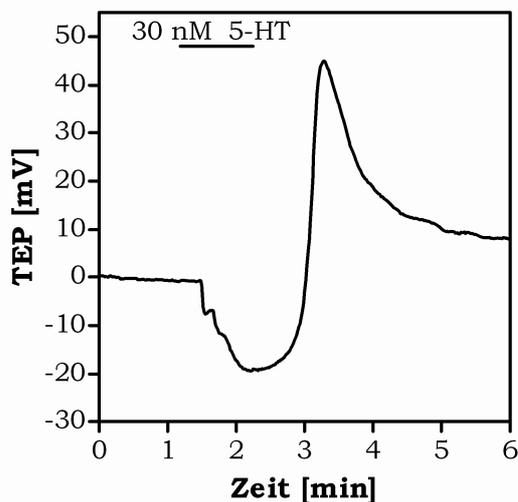


Abb. 2.4: Verlauf des TEP nach einer Stimulierung mit 30 nM 5-HT

Eine Stimulierung mit einer sättigenden 5-HT-Konzentration führt zunächst über die Erhöhung der Cl⁻-Leitfähigkeit zu einer Negativierung des TEP. Beim Ausspülen von 5-HT führt der Beitrag des aktivierten K⁺-Transportes zu einer Positivierung.

2.9 Statistische und Bioinformatische Analysen

Die Analyse und Darstellung von Sequenzdaten erfolgte mit der Software BioEdit Version 7.0.8.0 (Hall, 1999). Für Sequenzvergleiche sowie Motivsuchen wurde das in BioEdit implementierte ClustalW (Thompson *et al.*, 1994) genutzt. Zur Suche nach Datenbankeinträgen und BLAST-Analysen (Altschul *et al.*, 1997) wurden die online verfügbaren Datenbanken des National Center of Biotechnology Information (NCBI, <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) verwendet. Eine Analyse und Vorhersage von putativen Transmembrandomänen geschah mit ProtScale (<http://web.expasy.org/protscale/>) und dem TMHMM Server Version 2.0 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/>). Für die Stammbaumrekonstruktion nach der distanzbasierten Neighbor-Joining-Methode (Saitou & Nei, 1987) wurde

MEGA v5.05 (Tamura *et al.*, 2011) genutzt. Die Auswertung aller erhobenen Daten sowie statistische Analysen wurden mit der Software PRISM (Version 5.01; GraphPad, San Diego, USA) durchgeführt.

3. Ergebnisse

Im Mittelpunkt dieser Arbeit standen die molekulare Identifizierung und pharmakologische Charakterisierung der Serotonin-Rezeptoren in den Speicheldrüsen von *Calliphora vicina*. Die Analyse der Geneexpression der verschiedenen 5-HT-Rezeptoren in *Drosophila melanogaster* mit Hilfe von Flyatlas (<http://flyatlas.org/>) sollte zunächst einen allgemeinen Überblick vermitteln, welche Rezeptorsubtypen in Speicheldrüsen von Dipteren vorkommen. Dabei zeigte sich, dass in der Speicheldrüse von *Drosophila* die mRNA für 5-HT₇ und 5-HT_{2α/β}-Rezeptoren im Vergleich zu den 5-HT_{1A/B}-Rezeptoren aber auch zu anderen Rezeptoren für biogene Amine stark angereichert vorliegt (Tabelle 6.7, Anhang). Die Dipteren *Drosophila* und *Calliphora* sind phylogenetisch nah verwandt. Daher kann vermutet werden, dass bei *Calliphora* ein ähnliches Expressionsmuster der 5-HT-Rezeptoren in der Speicheldrüse vorliegt. Das Genom der Schmeißfliege ist leider bisher noch nicht sequenziert. Erste Sequenzinformationen über den Cv5-HT₇ und Cv5-HT_{2α}-Rezeptor wurden deshalb durch PCR-Experimente mit degenerierten Oligonukleotid-Primern erhalten. Hierfür wurden hoch-konservierte Sequenzbereiche, die zur Konstruktion geeigneter degenerierter Primer nötig sind, durch Sequenzvergleich bekannter Serotonin-Rezeptoren verschiedener Dipteren identifiziert. Die Primer wurden so gestaltet, dass sie in stark konservierten Bereichen der Transmembrandomänen sowie des C-Terminus lagen.

3.1 Der Cv5-HT₂-Rezeptor

3.1.1 Isolierung und Charakterisierung der Cv5-HT₂-Rezeptor-cDNA

In PCR-Experimente mit den degenerierten Primern 5'Cv5-HT2-F2 und 3'Cv5-HT2-R3 (Tabelle 6.6, Anhang), welche in welche in Bereichen annealen, die für TM 2 und TM 6 des Rezeptors kodieren (an den entsprechenden konservierten Aminosäuren VSL(F/I)VMP und VATEQKA), wurde ein 1193 bp langes Fragment amplifiziert. Dieses wies eine hohe Sequenzähnlichkeit mit 5-HT₂-Rezeptoren anderer Spezies auf und diente als Grundlage für die Konstruktion spezifischer Primer, die in der sich anschließenden RACE-PCR verwendet wurden. Die RACE-PCR-Experimente erfolgten mit dem SMARTTM RACE cDNA Amplification Kit

und ermöglichten es, die fehlenden cDNA-Sequenzbereiche des Rezeptors zu vervollständigen (verwendete RACE-Primer siehe Tabelle 6.6, Anhang). Mit den spezifischen Primern fullCv5-HT2-F und fullCv5-HT2-R konnte die vollständige Rezeptor-cDNA amplifiziert werden.

3.1.2 Generelle Eigenschaften der *Cv5-ht2a*-cDNA

Die vollständige *Cv5-ht2a*-cDNA besteht aus 4.114 Nukleotiden (Sequenz siehe Abb. 6.1, Anhang). Der längste offene Leserahmen (*open reading frame*, ORF) wird von einem Start-Kodon (ATG, Position 214-216) eingeleitet, vor welchem Stopp-Kodons in allen Leserahmen auftreten. Im Bereich des Translationsstarts wird für eukaryotische Gene meist eine charakteristische Nukleotidabfolge beobachtet. Diese Konsensussequenz lautet bei *Drosophila melanogaster* (C/A)AA(C/A)**ATG** (Cavener, 1987) bzw. CAAC**ATG**GCCG (Weir & Rice, 2010). Im Vergleich zu dieser Sequenz ist die Nukleotidabfolge welche das ATG-Triplett von *Cv5-ht2a* (ATGAA**ATG**GATT) umgibt, nur teilweise konserviert. Das Stopp-Kodon (TAA) des ORF befindet sich an Position 3.826-3.828. Die Rezeptorsequenz wird von einer 213 bp langen 5'- und einer 286 bp langen 3'-nichtkodierenden Region eingerahmt. Die *Cv5-ht2a*-cDNA Sequenz weist zwei Polyadenylierungssignale (AATAAA, 3.904-3.909 und 3.946-3.951) und einen Poly-(dA)-Schwanz (Position 4.082-4.112) auf. Neben der in dieser Arbeit beschriebenen und näher untersuchten 4.114 bp langen *Cv5-ht2a*-cDNA konnte noch eine weitere verkürzte cDNA-Variante identifiziert werden. Diese umfasst insgesamt 3.469 bp und besitzt eine um 645 bp verkürzte dritte zytoplasmatische Schleife, sonst sind beide Sequenzen identisch. In der Sequenz der längeren cDNA-Variante konnte ein konserviertes Spleiß-Donor (C_{2.415}TTGG|gtg) und -Akzeptor (g₃₀₅₅|GATA)-Motiv (siehe Abb. 6.1, Anhang) nachgewiesen werden, welches bei Exzision einer Intronssequenz zu genau der verkürzten Variante führen würde.

3.1.3 Eigenschaften der abgeleiteten Aminosäuresequenz

Der längste offene Leserahmen der *Cv5-ht2a*-cDNA umfasst 3.615 bp und kodiert für ein 1204 Aminosäuren (AS) langes Protein mit einem Molekulargewicht von 134,1 kDa (Cv5-HT_{2a}). Ein Hydropathieprofil nach Kyte und Doolittle (1982) und eine Transmembrandomänenvorhersage mit dem TMHMM-Server Version 2.0 (Abb. 3.1) zeigen einen 533 AS langen extrazellulären N-Terminus. Daran schließen sich sieben hydrophobe Domänen an, welche die Membran durchspannen können.

Diese hydrophoben Bereiche sind alternierend durch intrazelluläre und extrazelluläre Schleifen miteinander verbunden. Im Gegensatz zu den anderen relativ kurzen Schleifen ist die dritte intrazelluläre Schleife mit 413 AS besonders lang. An die TM 7 schließt sich ein 18 AS langer intrazellulär lokalisierter C-Terminus an.

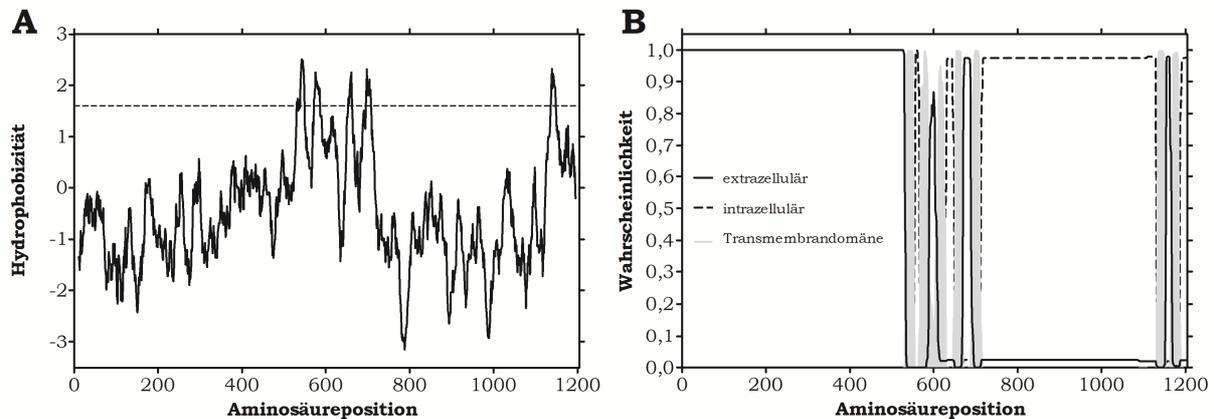


Abb. 3.1: Strukturelle Eigenschaften der abgeleiteten Aminosäuresequenz des Cv5-HT_{2α}-Rezeptors

A Hydrophathieprofil nach Kyte und Doolittle (1982) (<http://www.expasy.ch/tools/protscale.html>). Die Fensterweite betrug 19 AS. Hydrophobizitätswerte >1,6 deuten auf mögliche Transmembrandomänen hin.
B Die putative Transmembrantopologie wurde mit Hilfe des TMHMM-Servers Version 2.0 erstellt (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/>). Die vorhergesagten Transmembranbereiche sind hellgrau hinterlegt.

Die translatierte Rezeptorsequenz weist viele der für 5-HT-Rezeptoren hoch-konservierten Aminosäuren (Tabelle 3.1) auf. Interessanterweise liegt das in GPCRs konservierte DRY-Motiv, welches wichtig für die Aufrechterhaltung der dreidimensionalen Struktur (Wang *et al.*, 1993) und die Kopplung an G-Proteine ist (Ohyama *et al.*, 1992; Moro *et al.*, 1993), bei Cv5-HT_{2α} als GRY vor. In den nur gering konservierten Bereichen im N-Terminus, C-Terminus und in der ICL3 lassen sich einige Motive finden, die postranslationell modifiziert werden können. Im N-Terminus sind 17 Konsensusstellen für potentielle N-Glykosylierung (N-x-S/T) zu finden: N₁₉₂NT, N₁₉₃TT, N₂₁₄ST, N₂₂₁LS, N₂₃₈ET, N₂₄₅SS, N₂₅₈NT, N₃₄₅SS, N₃₆₅LS, N₃₇₅SS, N₄₀₃LS, N₄₄₃AS, N₄₇₀QS, N₄₉₂ST, N₄₉₇SS, N₅₁₁MT und N₅₁₄LT. In der 413 AS langen ICL3 befinden sich zehn Konsensussequenzen (S/T-x-R/K) für die Phosphorylierung durch eine Proteinkinase C: T₇₄₀IR, S₇₇₄NR, T₈₀₉SR, S₈₁₆GR, T₈₄₉CR, S₈₆₈LR, S₈₇₅FK, S₉₅₆VR, S₁₀₀₉LR, T₁₀₈₁RR. Zudem existieren zwei Konsensusstellen (R-R/K-S/T) für die Phosphorylierung durch die PKA: R₈₉₂RIS und R₁₀₁₁RNS. Zusätzlich finden sich Konsensusstellen für die Phosphorylierung durch die PKC in der ICL2 (S₆₄₁TK, T₆₄₂KR) und dem C-Terminus (T₁₁₈₉FR). Auffällig ist die Häufung von kurzen Poly-AS-Bereichen in der dritten intrazellulären

Schleife: Q₇₈₈QQQ, S₇₉₇SSSS, D₈₃₅DDD, A₈₄₂AAA, S₈₆₄SSSS, H₉₂₅HHHH, N₉₇₇NKNKNNNNINSNSNNNNN und H₁₀₅₆HHHH. Im C-Terminus befindet sich ein Cysteinrest (C₁₂₀₀), welcher palmitoyliert werden könnte.

Tabelle 3.1: Konservierte Aminosäurereste im Cv5-HT_{2α}-Rezeptorprotein

Die einzelnen Aminosäurereste innerhalb der Transmembrandomänen wurden nach der Nomenklatur von Ballesteros & Weinstein (1995) bezeichnet. TM - Transmembrandomäne; ECL - extrazelluläre Schleife; ICL - intrazelluläre Schleife

Domäne	As/-Motiv	As-Position	Domäne	As/-Motiv	As-Position
TM1	G _{1.49} N _{1.50} V _{1.53}	546-547 550	TM5	F _{5.47} xxP _{5.50} Y _{5.58}	698-701 709
TM2	S _{2.45} L _{2.46} A _{2.47} D _{2.50} V _{2.57} M _{2.58} P _{2.59}	570-572 575 582-584	ICL3	ExKAxxxL	1.124-1.131
ECL1	W	595	TM6	F _{6.44} C _{6.47} W _{6.48} P _{6.50} F _{6.51} F _{6.52}	1.138 1.141-1.142 1.144-1.146
TM3	D _{3.32} S _{3.39} I _{3.40}	609 616-617	ECL3	C	1.155
ICL2	R _{3.50} Y _{3.51}	627-628	TM7	W _{7.40} L _{7.41} G _{7.42} Y _{7.43}	1.170-1.172 1.173
TM4	W _{4.50}	654		S _{7.46}	1.176
ECL2	C	682		N _{7.49} P _{7.50} xxY _{7.53}	1.179-1.182

Abb. 3.2: Vergleich der Aminosäuresequenz des Cv5-HT_{2α}-Rezeptors mit orthologen 5-HT_{2α}-Rezeptoren

Dargestellt ist der Vergleich der Aminosäuresequenz des Cv5-HT_{2α}-Rezeptors mit den Sequenzen orthologer Rezeptoren aus *Drosophila melanogaster* (Dm5-HT_{2α}, CAA57429) und *Apis mellifera* (Am5-HT_{2α}, CBX90120). Identische Aminosäurereste wurden schwarz hinterlegt, konservativ ausgetauschte Reste wurden grau hinterlegt. Die putativen Transmembrandomänen (TM) sind durch graue Balken oberhalb der Sequenz gekennzeichnet. Die Position des letzten Aminosäurerestes jeder Zeile entspricht der rechts angegebenen Zahl. Potentielle N-Glykosylierungsstellen (▼) und putative Phosphorylierungsstellen für die PKC (•) und die PKA (○) sind über der Sequenz markiert. Lücken, die zur Maximierung der Homologien eingeführt wurden, sind durch schwarze Bindestriche gekennzeichnet. Die unterstrichenen Sequenzbereiche im N-Terminus sowie in der ICL3 wurden als Antigene für die Antikörperherstellung verwendet. Rote Aminosäuren fehlen in der kürzeren Cv5-HT_{2α}-Rezeptorvariante.

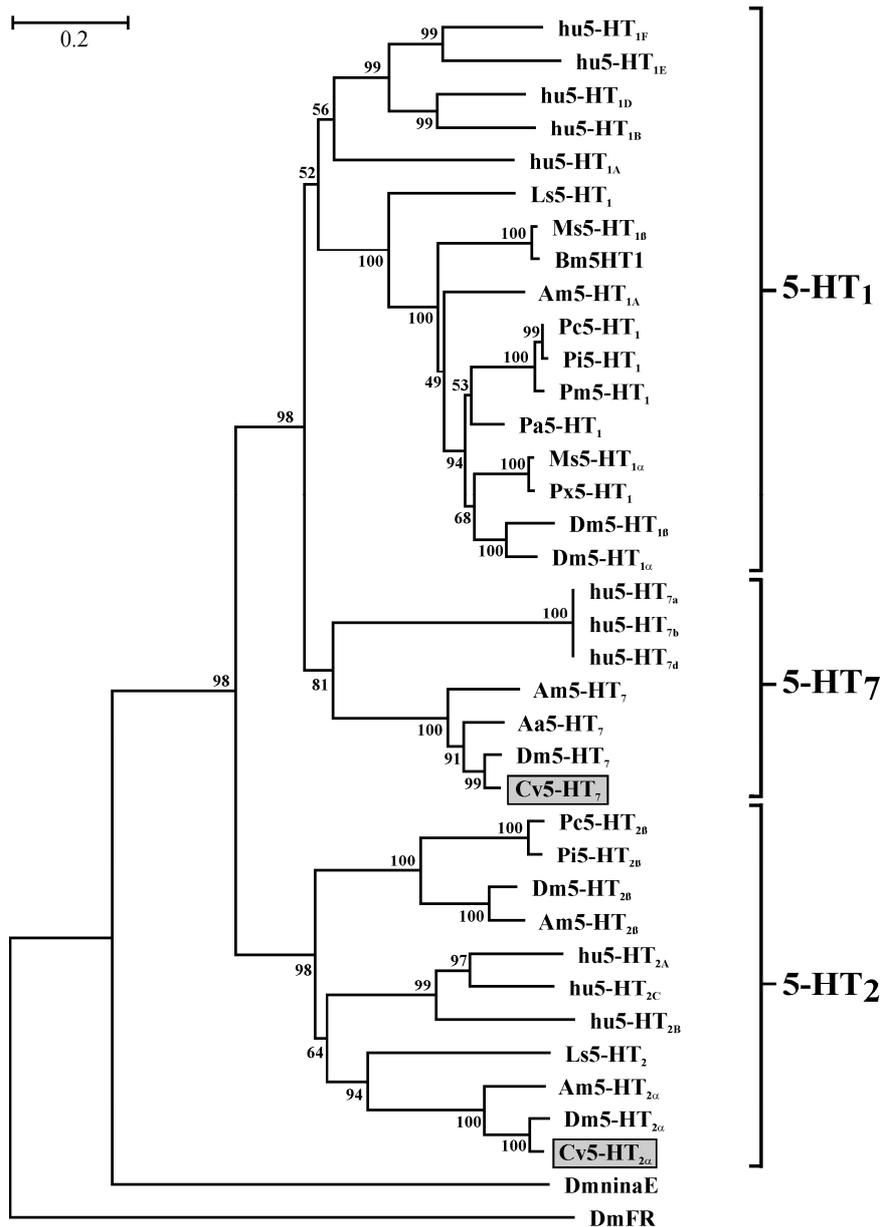
Cv5-HT2α	MDLQQRRLGPRPTTTTTRASESETATASRTTASLLYDTKAATKHTSAFQTLHKLSTTSNSFATTATPATTTTTNAPNSASN	80
Cv5-HT2α	NKNNEEFYDTCWQETKTDMDVNDNDNAENEVLAREQEHEQKESLFKIWCEQAAGTSPMENDETERPEITRHYADDDKDK	160
Cv5-HT2α	PGVEEGATKSLAQTFRCILETFETTAAKTTTNNNTIQYSCYNTDMPDYLYYPSNSTSNTNNLSSFTHQHEHQQLQFVNET	240
Cv5-HT2α	ERNVNSSISSISNISNNTILPSFNSEHEQQQSTTTNTFLQCRTHIKLIVEDVAEPIKEFQISLKSQPHQERLHPPL	320
Dm5-HT2α	MEMQSYSGRGPSTGTSETATATAAVASASASDTAATFTRLRFNCRLEEDWPGPRQPFIDCEGSHNTNSTSYT	72
Cv5-HT2α	QQHLYAATEATQSWQTDHYSTATSNSSSSFLTPSDTFINPNQPNLSDSQIILQNSSFESLIPAAFNSPSSSLANRCQPV	400
Dm5-HT2α	PSSLPTSKNLIIEGPNNTFQCARQAIDEAEHNAFYSCDGEPLSENCTLRKARLLRWPYEAYEHIRLAINGALSDYASDK	152
Am5-HT2α	MEGLDIASWTG	11
Cv5-HT2α	VQNLSIYCQPSAIFSSLPSTNIIHPHKVKCFLTNTLTELTTNASYSAQLQDYLP TLGLASVANAEDHMNQSLYSSSNWL	480
Dm5-HT2α	LSDSSSCDEGGMVLQCKLQAHELLLCHLQQLEREPLREVGSAEESFSNDSLLQAFQIELGAERDGLWSFLNLSSELMEPD	232
Am5-HT2α	NLTAMLHHLPCNDTFLHGCAEECGIASSGFDMHCTAEKGSFASSMTLLCTPCDYSNCDVNVSLVLSGLSEVGVFLSRLP	91
Cv5-HT2α	EDPWPMMAVMNSTLVNSSSTLSALSSADTNMNTLLDGLTVPKGF	560
Dm5-HT2α	HGFLGIMNVNTSLDMFLALNTTSTASTADMATEFAVTKSFLDYSFHGYDELFLFVVFVIFAGGLGNILVCLAVLDRRL	312
Am5-HT2α	RFECNETDFPDQILECTATTENATTEDLTI SCSHRAKGLNPAGSRGRL	171
Cv5-HT2α	QNV TNYFLSLA IADLLVSLFVMP LGAIP AFLGYWPLGFTWCNIYVTCDVMACSSSILHMCFISLGRYLGIRNPLGSRHR	640
Dm5-HT2α	QNV TNYFLSLA IADLLVSLFVMP LGAIP AFLGYWPLGFTWCNIYVTCDV LACSSSILHMCF IGLGRYMGIRNPLGSRHR	392
Am5-HT2α	HNV TNYFLSLA VADLLVSLFVMP LGAIP CFLGYWPLGFTWCNIYVTCDV LACSSSILHMCF ISLGRYLGIRNPLTRHT	251
Cv5-HT2α	STKRLAGMKIAIVWLMAMTVSSSITVLGLVNEKNIMPQSNVCVINNRAFFVFGSLVAFYIPMMVMVITYALTIPLLRKKK	720
Dm5-HT2α	STKRLTGKIAIVWVMAMTVSSSITVLGLVNEKSI MPEPNCVINNRAFFVFGSLVAFYIPMLMMVITYALTIPLLRKKK	472
Am5-HT2α	STKRMVGFKIAAVWLLAMTVSSSITVLGLIINPLNIMPRGACVINNRAFFVFGSLVAFYIPMIVMVAITYALTIPVQLLRKKA	331
Cv5-HT2α	RF AAEHPESLFRRLGGRF TIRPQHSQQQLQMHSSFSNSSYKCYLGGGASDSNRNFNNDYNDKQHQQQYQHHRSSSS	800
Dm5-HT2α	RF AAEHPESLFRRLGGRF TLRPQHSQQQLQMFSSFSG--SNNKFLSMG---DGNRFNFTEGEMEEGGAPSRRSVGEPAE	547
Am5-HT2α	RF IAAEHPERDQFRRLGGRFSTRASS-----	357
Cv5-HT2α	SNF SNGTAT SRLGAGSGRNGRQNGSNCGGIVGNDDDGPMAAAATANTCRNAANFRSGILRHSSSSSLRNKPTSFKVIV	880
Dm5-HT2α	RPLMQORTASSRSMGTVSFRNVVNGTSG-----AAGSGRRTTGTAHSSFRFSG--AGILRHSSSS-----	605
Am5-HT2α	-----TATSTVETATPSSSRYTWRTSG-----GVGSDSLTKLNAEALCRKH-----	399
Cv5-HT2α	ASPTNERNNDKRRISSHTSHQOHSQLOQQTNNLSTSSALLTPHHHHQETNNYWRSSHAGNANLMDSHPNRSSSVRIN	960
Dm5-HT2α	PASSCHSTSTRSSSFWRKHGGYPNMDRLAIHLRLS---LVPP-----SSHPNRRASVRYT	659
Am5-HT2α	-----NRCRGARSA	408
Cv5-HT2α	RSNNLTQLGFASSSTPNKNNKNNNINSNNNNNNKRNKTSLSMQPLRFLSRRNSPDERGGGRVGVADVGIATLTGNSNMGN	1040
Dm5-HT2α	ISQ--POLGYPTNVGGNGGRTVVGATEVVGAGGNGS-----SAGRTSNSSLGG---TSLMKIATIQG----PI	716
Am5-HT2α	AKSQ--POLNFAVNGASN-----PAGSG-----TGATRLATKVD-----	440
Cv5-HT2α	CPSVMADGHHTSFQHHHHHLHYSTTCEQSTQTFENSISRETRNRKLVKLVRFNFKVATPTLNLRF LNRRNKRNNLSANA	1120
Dm5-HT2α	LNQSQAAAGGNH-----MVQKVKPTALKPEEPQRNKVRPFKFAFNRVATPTLNLRF LNRRSKRNNLSANA	780
Am5-HT2α	-----QATQTPENIGRETR-NFTLKALKQLN-VTPNTLNLRF LPGRTRKRSLSANA	490
Cv5-HT2α	VATEQKATIKVLGLVFFTFVLCWSPFFILNIIFAACPECEVPEHVNTCLWLGYVSSSTINPTIYITFNRTFRAAFIRLLKC	1200
Dm5-HT2α	VATEQKATIKVLGLVFFTFVLCWSPFFILNIIFAACPECEVPEHVNTCLWLGYVSSSTINPTIYITFNRTFRAAFIRLLKC	860
Am5-HT2α	VATEQKASIKVLGLVFFTFVLCWAPFFILNIIFAACPECSVPEHVNVNTCLWLGYVSSSTINPTIYITFNRTFRAAFIRLLKC	570
Cv5-HT2α	NCKR	1204
Dm5-HT2α	NCKR	864
Am5-HT2α	KCSR SARPRHRSVTESGRNAMSLCTPTALPLVISLQGTPLLTPTPNPTAATPASATSYVTMMHRTPTSLYRDTFHQHEHD	650
Am5-HT2α	QNC	653

Vergleicht man die abgeleitete Aminosäuresequenz von Cv5-HT_{2α} mit den Sequenzen anderer 5-HT-Rezeptoren (insbesondere 5-HT₂-Rezeptoren) aus Datenbanken, zeigt sich eine ausgeprägte Homologie zu Insekten-Serotonin-Rezeptoren (Abb. 3.2). Höchste Identität und Ähnlichkeit (ID/S) konnte zu den 5-HT₂-Rezeptoren der holometabolen Insekten *Drosophila melanogaster* (Dm5-HT_{2α}, ID/S 36 %/46 %) und *Apis mellifera* (Am5-HT_{2α}, 25 %/30 %) festgestellt werden. Aber auch zu den 5-HT₂-Rezeptoren von *Aplysia californica* (Ac5-HT₂, 20 %/32 %), *Lymnaea stagnalis* (Lym5-HT₂, 19 %/30 %) und *Caenorhabditis elegans* (Ce5-HT₂, 13 %/23 %) besteht große Sequenzähnlichkeit.

Analysiert man die Aminosäuren verschiedener Serotonin-Rezeptoren von Vertebraten und Invertebraten phylogenetisch, zeigt sich das der Cv5-HT_{2α}-Rezeptor mit allen ausgewählten 5-HT₂-Rezeptoren eine gemeinsame Gruppe bildet (Abb. 3.3). Dabei formt er mit den 5-HT_{2α}-Rezeptoren von *Drosophila* und *Apis* eine gemeinsame Untergruppe.

Abb. 3.3: Stammbaumrekonstruktion von Serotonin-Rezeptoren verschiedener Organismen

Zur Erstellung der phylogenetischen Analyse mit der Neighbor-Joining-Methode wurden die stark konservierten Regionen der Aminosäuresequenzen verwendet. Die nachfolgenden Rezeptorsequenzen, aufgelistet in ihrer dargestellten Reihenfolge, wurden für die Analyse verwendet: human 5-HT_{1F} (NP_000857), human 5-HT_{1E} (NP_000856), human 5-HT_{1D} (NP_000855), human 5-HT_{1B} (NP_000854), human 5-HT_{1A} (NP_000515), *Lymnaea stagnalis* (Ls5-HT₁, AAA29290), *Manduca sexta* (Ms5-HT_{1B}, DQ840516), *Bombyx mori* (Bm5-HT₁, CAA64862), *Apis mellifera* (Am5-HT₁, CBI75449), *Procambarus clarkii* (Pc5-HT₁, ABX10973), *Panulirus interruptus* (Pi5-HT₁, AAS18607), *Penaeus monodon* (Pm5-HT₁, AAV48573), *Periplaneta americana* (Pa5-HT₁, CAX65666), Ms5-HT_{1α} (ABI338269), *Papilio xuthus* (Px5-HT₁, BAD72868), *Drosophila melanogaster* (Dm5-HT_{1B}, CAA77571; Dm5-HT_{1A}, CAA77570), human 5-HT_{7a} (NP_000863), human 5-HT_{7b} (NP_062874), human 5-HT_{7d} (NP_062873), Am5-HT₇ (CAJ28210), *Aedes aegypti* (Aa5-HT₇, AAG49292), Dm5-HT₇ (AAF57104), *Calliphora vicina* (Cv5-HT₇, CCF77366), Pi5-HT_{2β} (AAS57919), Pc5-HT_{2B} (ABX10972), Dm5-HT_{2B} (AAN13390), Am5-HT_{2β} (CBX90121), human 5-HT_{2A} (NP_000612), human 5-HT_{2C} (NP_000859), human 5-HT_{2B} (NP_000858), Ls5-HT₂ (ACC16969), Am5-HT_{2α} (CBX90120), Dm5-HT_{2α} (CAA57429), Cv5-HT_{2α} (CCF77376), *Drosophila melanogaster* ninaE-encoded rhodopsin 1 (DmninaE, AFF55712) und *Drosophila melanogaster* FMRFamide receptor (DmFR, AAF47700). Die Nummern an den Verzweigungen repräsentieren den Bootstrap-Prozentsatz aus 10.000 Bootstrap-Replikationen, mit dem jede Verzweigung unterstützt wird. Mit Hilfe der Skalenangabe kann die Länge der einzelnen Verzweigungen in eine genetische Distanz umgerechnet werden.



3.1.4 Expressionsmuster des *Cv5-ht2a*-Gens

Die Expression der *Cv5-ht2a*-mRNA in verschiedenen Geweben wurde semiquantitativ mittels RT-PCR untersucht. Hierfür wurden Primer (RT-Cv5-HT2-F; RT-Cv5-HT2-R, siehe Tabelle 6.6, Anhang) verwendet mit denen ein Fragment, das für einen Teil der dritten intrazellulären Schleife des Rezeptors kodiert, amplifiziert wird. Diese Region ist außerordentlich variabel und weist nur sehr geringe Homologien zu anderen aminergen Rezeptoren auf, wodurch die Spezifität gewährleistet ist. Das Transkript des *Cv5-ht2a*-Gens wird im Gehirn stark und in der Speicheldrüse wesentlich schwächer exprimiert (Abb. 3.4). In den Proben der Malpighischen Gefäße und der Flugmuskulatur hingegen konnte das Transkript des *Cv5-ht2a*-Gens nicht detektiert werden (Abb. 3.4). Als Kontrolle für die

Intaktheit der RNA-Proben und der eingesetzten RNA-Mengen dienten Kontroll-Experimente mit dem konstitutiv exprimierten Gen β -Actin (*Cvactin*; Primer: RT-*Cv*-Actin-F, RT-*Cv*-Actin-R, siehe Tabelle 6.6, Anhang). In Proben, die mit RNase behandelt wurden, konnte erwartungsgemäß kein Transkript nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt).

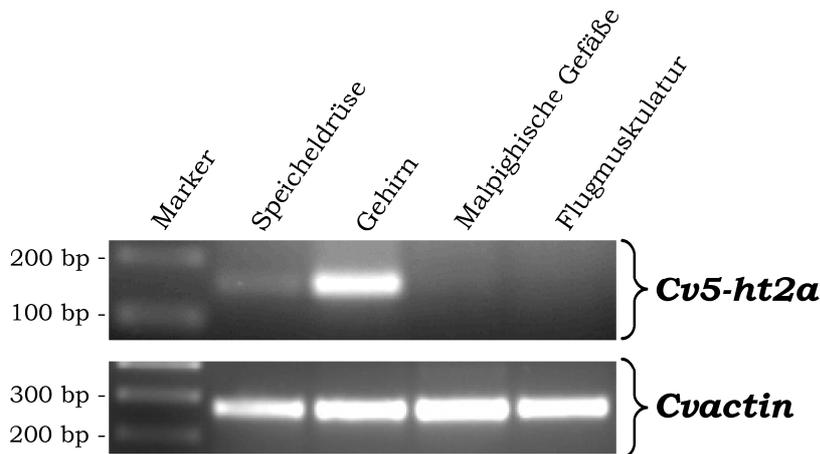


Abb. 3.4: Expression von *Cv5-ht2a* und *Cvactin* in verschiedenen Geweben von *Calliphora vicina*

Die elektrophoretische Analyse der RT-PCR-Produkte, die mit RNA-Präparationen aus verschiedenen Geweben erhalten wurden, ermöglicht eine semiquantitative Auswertung der Transkriptionsstärke. Die amplifizierte Fragmente haben die erwartete Größe von 150 bp für *Cv5-ht2a* und 269 bp für *Cvactin*. Das hier abgebildete Expressionsmuster wurde in drei unabhängigen Experimenten bestätigt. Marker: 100 bp DNA-Leiter

3.1.5 Nachweis der Expression des Cv5-HT_{2a}-Rezeptorproteins in HEK 293-Zellen

Die Expression des Cv5-HT_{2a}-Rezeptors in stabil transfizierten HEK 293-Zellen sollte sowohl immunozytochemisch an fixierten Zellen als auch mittels Western-Blot-Analyse an Membranproteinpräparationen überprüft werden. Aufgrund von Schwierigkeiten bei der Expression des vollständigen Rezeptors wurde für die pharmakologischen Experimente eine verkürzte Version des Rezeptors (Cv5-HT_{2aN}, neuer Start des Rezeptors jetzt bei M₄₆₈) in HEK 293-Zellen exprimiert. Das Protein, für das die modifizierte cDNA kodiert, ist 744 Aminosäuren lang und besitzt ein berechnetes Molekulargewicht von 82,94 kDa. Die Immundetektion des Cv5-HT_{2aN} sollte über den durch den Vektor angefügten His-Tag stattfinden. Wie in Abbildung 3.5 ersichtlich, konnte mit Hilfe des anti-6x-His-Antikörpers in Membranpräparationen von transfizierten und

nicht-transfizierten Zellen nur ein komplexes Bandenmuster detektiert werden. Dies lässt auf eine starke Kreuzreaktion des anti-6x-His-Antikörpers mit anderen Membranproteinen, die ebenfalls multiple Histidine besitzen, schließen.

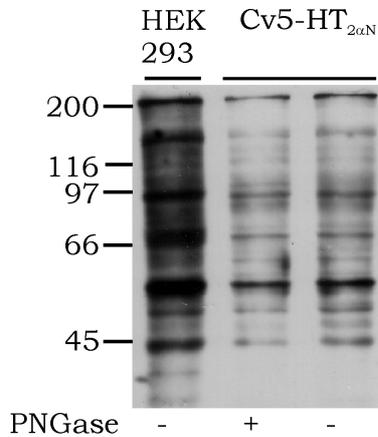


Abb. 3.5: Western-Blot-Analyse mit Membranproteinen von HEK 293-Zellen

Es wurden pro Spur 20 µg Membranprotein aufgetragen. Die Proben wurden vor der Auftragung mit (+) oder ohne (-) PNGase F behandelt. Zur Immundetektion wurde mit dem anti-6xHis- (1:1.000) und dem sekundären Antikörper Goat-anti-rabbit-HRP (1:20.000) inkubiert. Die Angabe des Markers befindet sich links (in kDa).

Aufgrund der uneindeutigen Daten in den Western-Blot-Analysen bzw. der geringen Spezifität des anti-6x-His-Antikörpers wurde auf eine immunzytochemische Analyse der transfizierten Zellen verzichtet.

3.1.6 Funktionelle Charakterisierung des Cv5-HT_{2αN}-Rezeptorproteins

Die Aktivierung von GPCRs führt in der Regel über die Kopplung an G-Proteine zu einer Konzentrationsänderung intrazellulärer Botenstoffe wie zum Beispiel Ca²⁺ und cAMP. Solche GPCRs binden entweder inhibitorische (G_{i/o}) oder aktivierende G-Proteine (G_s, G_q, G₁₁). 5-HT₂-Rezeptoren koppeln an G_{q/11}-Proteine und führen zu einer Aktivierung einer PLC, welche dann über IP₃ eine Freisetzung von Ca²⁺ aus dem ER bewirkt (Blenau & Baumann, 2001). Aufgrund der hohen Sequenzähnlichkeit des Cv5-HT_{2αN} zu bereits charakterisierten 5-HT₂-Rezeptoren wurde angenommen, dass dieser sich funktionell ebenso verhält. Zum Nachweis der Funktionalität werden die Zellen mit einem Agonisten inkubiert. HEK 293-Zellen, die stabil mit dem Expressionsvektor pcCv5-ht2α-His transfiziert wurden, sollten daher bei einer Inkubation mit Serotonin oder einem anderen Agonisten zu einer Freisetzung von Ca²⁺ aus intrazellulären Speichern führen, welche über Calciumfluorometrie (siehe Abschnitt 2.7.3) detektiert werden kann.

Bei den Untersuchungen zeigte sich, dass die Expression von Cv5-HT_{2N} die basale intrazelluläre Ca²⁺-Konzentration [Ca²⁺]_i der Zellen nicht beeinflusst (Abb. 3.6).

Zur Überprüfung der Ligandenspezifität wurden sowohl nicht-transfizierte als auch den Cv5-HT_{2αN}-Rezeptor-exprimierende HEK 293-Zellen mit 1 µM der biogenen

Amine Serotonin, Octopamin, Tyramin, Dopamin und Histamin inkubiert. Dabei löste 1 μM 5-HT eine signifikante Änderung der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ in den transfizierten Zellen aus, welche in den nicht-transfizierten Zellen nicht zu beobachten war (Abb. 3.6). Eine Inkubation mit Octopamin, Tyramin und Dopamin führte in Cv5-HT_{2 α N}-exprimierenden Zellen zu einer schwach signifikanten Abnahme des Fluoreszenzsignals im Vergleich zur Kontrollbehandlung. In der HEK 293-Kontrollzelllinie resultierte die Inkubation ebenfalls in einer geringeren Ca^{2+} -Freisetzung im Vergleich zu den Basalwerten. Dies galt auch für die Inkubation mit 1 μM 5-HT. Interessanterweise führte die Applikation von 1 μM Histamin sowohl in HEK 293-Zellen als auch Cv5-HT_{2 α N}-exprimierenden Zellen zu einer stark signifikanten Erhöhung der $[\text{Ca}^{2+}]_i$. In der Literatur finden sich Hinweise für die Expression einer Reihe endogener Rezeptoren in HEK-Zellen, darunter sind auch einige aminerge Rezeptoren (Atwood *et al.*, 2011). So wurde gezeigt, dass HEK 293 Zellen endogene H₁-Histamin-Rezeptoren besitzen, welche eine Änderung in der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ hervorrufen können (Vetter & Lewis, 2010).

Die beschriebenen Ergebnisse zeigen eindeutig, dass die Cv5-HT_{2 α N}-exprimierenden Zellen spezifisch durch 5-HT aktiviert werden und der Rezeptor somit als funktioneller Serotonin-Rezeptor klassifiziert werden kann.

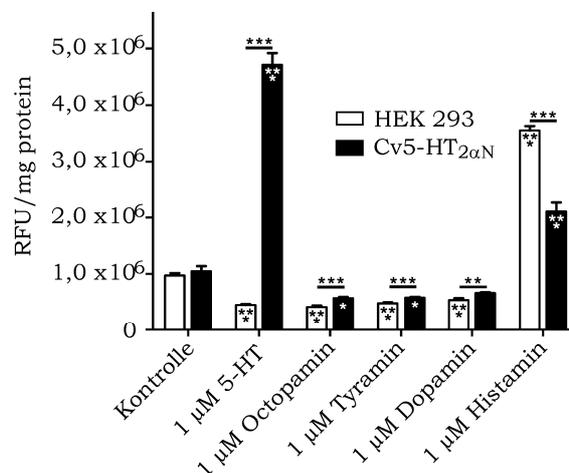


Abb. 3.6: Einfluss verschiedener biogener Amine auf die intrazelluläre Ca^{2+} -Konzentration

Nicht-transfizierte (in weiß dargestellt) und Cv5-HT_{2 α N}-exprimierende (in schwarz dargestellt) HEK 293-Zellen wurden mit 1 μM verschiedener biogener Amine inkubiert und der Effekt auf die Änderung der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ (*relative fluorescence units*, RFU/mg protein) verfolgt. Die dargestellten Daten repräsentieren den Mittelwert aus einer Messung mit acht Replikaten. Die Fehlerbalken stellen den Standardfehler dar. Die statistisch signifikanten Unterschiede zwischen transfizierten und nicht-transfizierten Zellen werden durch Sternchen über den Balken angezeigt (ungepaarter t-Test). Statistisch signifikante Unterschiede (*one way* ANOVA, gefolgt von Tamhane Test) zur Kontrollbehandlung der jeweiligen Zelllinie sind durch Sternchen innerhalb der Balken gekennzeichnet. ***P < 0,001; **P < 0,01; *P < 0,05

3.2 Der Cv5-HT₇-Rezeptor

3.2.1 Isolierung und Charakterisierung der Cv5-HT₇-Rezeptor-cDNA

Serotonin löst in der Speicheldrüse von *Calliphora* nicht nur die Aktivierung des Ca²⁺-Signalweges aus, sondern aktiviert auch den cAMP-Signalweg und die V-ATPase. Daher war es von Interesse, neben dem 5-HT_{2α}-Rezeptor auch den 5-HT₇-Rezeptor aus *Calliphora vicina* zu klonieren, um die physiologischen Effekte mit den spezifischen Rezeptoren in Verbindung zu bringen. Analog zu dem Cv5-HT_{2α}-Rezeptor wurden zu Beginn PCR-Experimente mit degenerierten Primern durchgeführt. Mit Hilfe der Primer 5'Cv5-HT7-F1 und 3'Cv5-HT7-R1 (Tabelle 6.6, Anhang), welche in Bereichen annealen, die für die für Abschnitte innerhalb der TM 2 (CVA(L/V)LVM) bzw. des C-Terminus (DFRKPF) kodieren, konnte ein 857 bp langes Fragment amplifiziert werden. BLAST-Analysen offenbarten eine hohe Sequenzähnlichkeit mit 5-HT₇-Rezeptoren anderer Spezies. Daher diente das Fragment als Grundlage für die Konstruktion spezifischer Primer für sich anschließende RACE-PCR-Experimente. Unter Verwendung des 5'RACE-Cv5HT7-R- und des 3'RACE-Cv5HT7-F-Primers konnten die fehlenden cDNA-Sequenzbereiche in 5'- und 3'- Richtung vervollständigt werden. Die vollständige Rezeptor-cDNA konnte mit den spezifischen Primern fullCv5-HT7-F und fullCv5-HT7-R (Tabelle 6.6, Anhang) amplifiziert werden.

3.2.2 Generelle Eigenschaften der Cv5-ht7-cDNA

Die vollständige *Cv5-ht7*-cDNA besteht aus 2.363 Nukleotiden (Sequenz siehe Anhang, Abb. 6.2). Vor dem Start des längsten offenen Leserahmens, beginnend mit dem Start-Kodon ATG (Position 146-148), befinden sich Stopp-Kodons in allen Leserahmen. Der Translationsstart der *Cv5-ht7*-cDNA (TTTAT**ATGG**) ist im Vergleich zur Konsensussequenz aus *Drosophila* und ähnlich zur *Cv5-ht2a*-cDNA, nur teilweise konserviert. Das Stopp-Kodon (TGA) des ORF befindet sich an Position 2.144-2.146. Eingerahmt wird die Rezeptorsequenz von einer 145 bp langen 5'- und einer 217 bp langen 3'- nichtkodierenden Region. Die *Cv5-ht7*-cDNA Sequenz weist kein Polyadenylierungssignal auf. Allerdings findet sich zwischen Position 2.291-2.316 ein 26 bp-langer Poly-(dA) Bereich.

3.2.3 Eigenschaften der abgeleiteten Aminosäuresequenz

Die *Cv5-ht7*-cDNA besitzt einen 2.001 bp langen ORF, der für ein 666 AS langes Protein mit einem Molekulargewicht von 73,1 kDa kodiert (Cv5-HT₇) kodiert. Das Hydrophathieprofil und die Transmembrandomänenvorhersage (Abb. 3.7) identifizieren neben sieben hydrophoben Bereichen, die ausreichend groß sind, um die Membran zu durchspannen, einen 276 AS langen N-Terminus der eine weitere hydrophobe Region enthält. Die Transmembrandomänen sind alternierend durch intrazelluläre und extrazelluläre Schleifen miteinander verbunden. An die TM 7 schließt sich ein 54 AS langer intrazellulär lokalisierter C-Terminus an.

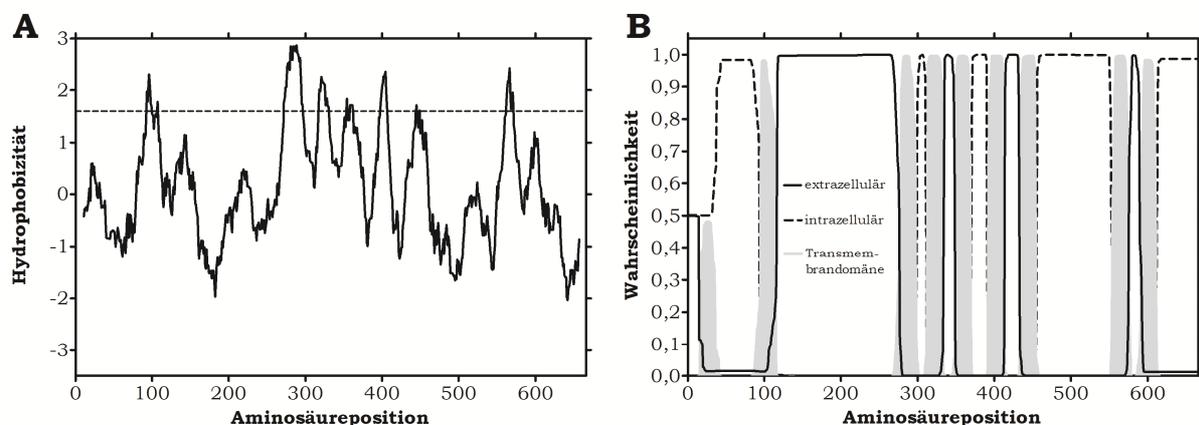


Abb. 3.7: Strukturelle Eigenschaften der abgeleiteten Aminosäuresequenz des Cv5-HT₇-Rezeptors

A Hydrophathieprofil nach Kyte und Doolittle (1982) (<http://www.expasy.ch/tools/protscale.html>). Die Fensterweite betrug 19 AS. Hydrophobizitätswerte >1,6 deuten auf mögliche Transmembrandomänen hin.

B Die putative Transmembrantopologie wurde mit Hilfe des TMHMM-Servers Version 2.0 erstellt (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/>). Die vorhergesagten Transmembranbereiche sind hellgrau hinterlegt.

Viele der hoch-konservierten und für 5-HT-Rezeptoren typischen Aminosäuren konnten in der Cv5-HT₇-Aminosäuresequenz identifiziert werden (Tabelle 3.2).

In den nur gering konservierten Bereichen im N-Terminus, C-Terminus und in der dritten intrazellulären Schleife sind einige Motive vorhanden, an denen eine postranslationale Modifizierung stattfinden könnte. Insgesamt 11 Konsensstellen für potentielle N-Glykosylierung (N-x-S/T: N₁₀KS, N₃₅TS, N₄₁AT, N₅₄AT, N₆₁FS, N₁₂₇IS, N₁₆₁FT, N₁₆₅KT, N₁₇₄ST, N₁₈₅GS, N₂₄₁LS) lassen sich N-terminal vor der TM 1 beiderseits der zusätzlichen hydrophoben Region finden. In der ICL2 (T₃₈₇PR) und im C-Terminus (S₆₄₉QR) ist jeweils eine Konsensusstelle für die Phosphorylierung durch die PKC vorhanden. Im C-Terminus befindet sich ein konservierter

Cysteinrest (C₆₂₈) welcher palmitoyliert werden könnte. Auffällig ist auch eine Häufung von Glycinresten in der ICL3: G₅₁₃GLSASQAGGGGGSGSSGLLG₅₃₄.

Tabelle 3.2: Konservierte Aminosäurereste im Cv5-HT₇-Rezeptorprotein

Die einzelnen Aminosäurereste innerhalb der Transmembrandomänen wurden nach der Nomenklatur von Ballesteros & Weinstein (1995) bezeichnet. TM - Transmembrandomäne; ECL - extrazelluläre Schleife; ICL - intrazelluläre Schleife

Domäne	As/-Motiv	As-Position	Domäne	As/-Motiv	As-Position	
TM1	G _{1.49} N _{1.50}	291-292	TM5	F _{5.47} xxP _{5.50}	443-446	
	V _{1.53}	295		Y _{5.58}	454	
TM2	S _{2.45} L _{2.46} A _{2.47}	315-317	ICL3	ExKAxxxL	548-555	
	D _{2.50}	320		TM6	F _{6.44}	562
	V _{2.57} M _{2.58} P _{2.59}	327-329			C _{6.47} W _{6.48}	565-566
ECL1	W	340	TM7	P _{6.50} F _{6.51} F _{6.52}	568-570	
TM3	D _{3.32}	354		W _{7.40} L _{7.41} G _{7.42}	596-598	
	S _{3.39} I _{3.40}	361-362		Y _{7.43}	599	
ICL2	R _{3.50} Y _{3.51}	372-373		S _{7.46}	602	
TM4	W _{4.50}	399		N _{7.49} P _{7.50} xxY _{7.53}	605-609	
ECL2	C	426				

Des Weiteren zeigt der Cv5-HT₇-Rezeptor große Sequenzübereinstimmungen mit dem orthologen Rezeptor aus *Drosophila melanogaster* (Dm5-HT₇, Identität 58%/Ähnlichkeit 64%; Witz *et al.*, 1990), *Aedes aegypti* (Aa5-HT₇, 47%/55%; Pietrantonio *et al.*, 2001) und *Apis mellifera* (Am5-HT₇, 37%/45%; Schlenstedt *et al.*, 2006) nachweisen (Abb. 3.8). Auch zu 5-HT-Rezeptoren von Mollusken wie *Helisoma trivolvis* (Ht5-HT₇, 28%/40%; Mapara *et al.*, 2008) und Säugetieren wie dem Menschen (h5-HT_{7b}, 23%/35%; Bard *et al.*, 1993) und *Mus musculus* (Mm5-HT₇, 24%/35%; Gellynck *et al.*, 2008) sind erstaunliche Sequenzhomologien erkennbar. Diese hohen Sequenzhomologien innerhalb der Rezeptorklasse sind typisch für 5-HT₇-Rezeptoren. Zu anderen 5-HT-Rezeptorklassen weisen sie nur geringe Ähnlichkeit auf (Hannon & Hoyer, 2008). So besitzen alle charakterisierten 5-HT₇-Rezeptoren der Insekten einen identischen C-Terminus (ESFL). Möglicherweise stellt dieses Motif eine PDZ-Bindedomäne dar. Die Aminosäuren Glu-Ser-Phe-Leu passen gut zur Konsensussequenz für Klasse I PDZ-Domänen (X-Ser/Thr-X-Φ, X=unspezifische Aminosäure, Φ=hydrophobe Aminosäure, oft Val oder Leu; Hung & Sheng, 2002). Bei einer phylogenetischen Analyse verschiedener Serotonin-Rezeptoren von Vertebraten und Invertebraten fügt sich der Cv5-HT₇-Rezeptor in den Zweig der 5-HT₇-Rezeptoren ein und bildet mit den anderen Insekten-5-HT₇-Rezeptoren eine gemeinsame Untergruppe (Abb. 3.3).

Cv5-HT7	MDSLVENKLNKSLKFSSSLHASGVFYTTTTIATTTTNTSKAINATTTYAHKSSSTSNATNAVKNFNFNTNHRQLSTKVILRNI	80
Cv5-HT7	CEKFKHCILTIIVRFLFYIFLILSLTDGFNLGTVLAVNEIKSRPDFLNI [▼] STASSSLLTALSSSQLPVEALILEANTNLDVH	160
Dm5-HT7	MALSGQDWRRHQSHRQHRNHRTQGNHQKLI [▼] STATLTLFVFLSSWIA	47
Cv5-HT7	NFTSNK [▼] TANN [▼] GF [▼] SNSTYHKLHSNNNGSSNNNIMFNTDTAVHGSTFSNSNTINSITSTLSSLSLSP [▼] LP [▼] PP [▼] ASSSSSSYLQHD	240
Dm5-HT7	YAAGKATVPAPLVEGETESATSQDFNSSSAFLGAIASASSTGSGSGSGSGSGSGSGSYGLASMNSSPIAIVSYQGITS	127
Aa5-HT7	MDPTVFLLSLLQQSSAQVLP [▼] IGD [▼] GPTSTVASGVAEVAIINATATINFLEYLLTGNSSSSASVSATAIATSLPALVD	77
Am5-HT7	MEGKDAI	7
Cv5-HT7	NLSSTLYSSTTFEPASPSASSEASVEFTMPAVHTVLVCI [▼] VLLFVIL [▼] GTIVGNVLCI [▼] AVCMVRKLRPCNYLLVSLALSD	320
Dm5-HT7	SNLGD [▼] SNTLVPLSDTPLLLEFAAGFVLPPLT [▼] SIFVSTVLLIVIL [▼] GTIVGNVLCI [▼] AVCMVRKLRPCNYLLVSLALSD	207
Aa5-HT7	RLTPTSS [▼] SSLDEL [▼] GGTSESSPAEPVNLTIQTIVISIVLLAVI [▼] IGTIVGNVLCVAVCLV [▼] RKLRPCNYLLVSLALSD	157
Am5-HT7	TTEDILLNLTQDVDFLQGFPGKNSPYVTQA [▼] LLIALV [▼] LSI [▼] IVGTIVGNILVCVAVFLV [▼] RKLRPCNYLLVSLAVSD	87
Cv5-HT7	LCVAVLVMPMALLYEVLEKWNFGPVLCDI [▼] IWVSFDVLCCTASILNLCAISVDRYLAI [▼] TKPLEYGVKRTPRRMMLCV [▼] ALVWL	400
Dm5-HT7	LCVALLVMPMALLYEVLEKWNFGPVLCDI [▼] IWVSFDVLCCTASILNLCAISVDRYLAI [▼] TKPLEYGVKRTPRRMMLCV [▼] GI [▼] VWL	287
Aa5-HT7	LCVAVLVMPMALLYEVLEKWNFGVFCDI [▼] IWVSFDVLSCTASILNLCAISVDRYLAI [▼] TKPLEYGVKRTPRRMMLCV [▼] ALVWL	237
Am5-HT7	LCVALLVMPMALLYEISGNWISFGTIMCDI [▼] IWVSFDVLSCTASILNLCAISVDRYLAI [▼] TKPLEYGVKRTPRRMMLCV [▼] ALVWL	167
Cv5-HT7	AAACISLPLLLILGNEH-EDEHG [▼] NPMCSV [▼] QNFAYQIYATLGSFYIPLAVMLFVYYQIFRAARRIVLEEKRAQ [▼] THLQH--	477
Dm5-HT7	AAACISLPLLLILGNEH-EDEEG [▼] QPICTV [▼] QNFAYQIYATLGSFYIPLAVMLFVYYQIFRAARRIVLEEKRAQ [▼] THLQQ--	364
Aa5-HT7	VAACISLPLLLILGNEH-MTN-GQPS [▼] CSV [▼] QNFAYQIYATLCAFYIPLAVMLFVYYQIFRAARRIVNEEKRAQ [▼] KHLET--	313
Am5-HT7	GAAACISLPLLLIMGNEHTYSETG [▼] PSHC [▼] VVQNFAYQIYATLGSFYIPLAVMLFVYYQIFRAARRIVLEEKRAQ [▼] SHLEAHC	247
Cv5-HT7	-----ALN-----GTGSP-----PGHTDLGGNGQ-HRHSSYGNTSLNYSTCGGLSAS-	518
Dm5-HT7	-----ALN-----GTGSPSAPQAPP-----LGHTE [▼] LASSNGQRHSSVGNSTLYSTCGGLSSGG	414
Aa5-HT7	-----AIN-----GSATT-----PEKLS--	327
Am5-HT7	YFDIEPTVQQHPVTN [▼] RQLNSDVQP [▼] GHGSP [▼] VPVQHRSSASTTCSGH [▼] TVRCFTGGPRKSHESQCPMLQKLEKPVLSST	327
Cv5-HT7	-----QAGGGGGSGSSGLLGS [▼] PHQK [▼] KLRF [▼] OLAKEK [▼] KASTTLGIIMSAFTI [▼] CWLPFFILALV [▼] RPFVENETHVPO	588
Dm5-HT7	GALA-----GHGSGGGVSGSTGLLGS [▼] PHH [▼] KLRF [▼] OLAKEK [▼] KASTTLGIIMSAFTI [▼] CWLPFFILALV [▼] RPF---ETMHVPA	485
Aa5-HT7	-----AGGTVLVATP [▼] QHK [▼] KLRF [▼] OLAKEK [▼] KASTTLGIIMSAFTI [▼] CWLPFFILALV [▼] RPFLG-EDHHL--	386
Am5-HT7	TTSPMTSTKSTIVRNHLNSTCSV [▼] TNSP [▼] HQK [▼] KLRF [▼] HLAKEK [▼] KASTTLGIIMSAFTI [▼] CWLPFFV [▼] LALV [▼] RPFLK-NPDAIPA	406
Cv5-HT7	SLSSLFLWLGYANSLNPIIYATLN [▼] RDFR [▼] KPFOEILYFRCS [▼] SLN [▼] MMRENYQDQYGEPPSQR-VMLGDE-----	657
Dm5-HT7	SLSSLFLWLGYANSLNPIIYATLN [▼] RDFR [▼] KPFOEILYFRCS [▼] SLN [▼] MMRENYQDQYGEPPSQR-VMLGDE-----	554
Aa5-HT7	-LSSLFLWLGYANSLNPIIYATLN [▼] RDFR [▼] KPFOEILFFRCS [▼] SLN [▼] MMREDFYHSQYGDGPGSQRLVMAAND-----	455
Am5-HT7	FLSSLFLWLGYANSLNPIIYATLN [▼] RDFR [▼] KPFR [▼] EILYFRCS [▼] SLN [▼] MMREFFYQSQYGDPI [▼] NCEIKAGEIDAERLN [▼] NOGI	486
Cv5-HT7	-----RHGARE [▼] SFL	666
Dm5-HT7	-----RHGARE [▼] SFL	563
Aa5-HT7	-----GGGARE [▼] SFL	464
Am5-HT7	ESIDIAANAPNE [▼] SFL	501

Abb. 3.8: Vergleich der Aminosäuresequenz des Cv5-HT7-Rezeptors mit orthologen 5-HT7-Rezeptoren

Dargestellt ist der Vergleich der Aminosäuresequenz des Cv5-HT7-Rezeptors mit orthologen Rezeptoren aus *Drosophila melanogaster* (Dm5-HT7, AAF57104), *Aedes aegypti* (Aa5-HT7, AAG49292) und *Apis mellifera* (Am5-HT7, AAM19330). Alle identischen Aminosäurereste wurden schwarz hinterlegt, konservativ ausgetauschte Reste wurden grau hinterlegt. Die Transmembrandomänen (TM) sind durch graue Balken oberhalb der Sequenz gekennzeichnet. Die zusätzliche achte hydrophobe Region im N-Terminus wurde mit einem schraffierten Balken über der Sequenz markiert. Die Position des letzten Aminosäurerestes jeder Zeile entspricht der rechts angegebenen Zahl. Lücken, die zur Maximierung der Homologien eingeführt wurden, sind durch schwarze Bindestriche gekennzeichnet. Die unterstrichenen Sequenzbereiche im N-Terminus sowie in der ICL3 wurden als Antigene für die Antikörperherstellung verwendet.

3.2.4 Expressionsmuster des *Cv5-ht7*-Gens

Für das *Cv5-ht7*-Gen wurde das gewebsspezifische Expressionsmuster ebenfalls semiquantitativ mit Hilfe von RT-PCR-Experimenten untersucht. Die hierfür verwendeten Primer (RT-*Cv5-HT7-F*; RT-*Cv5-HT7-R*, siehe Tabelle 6.6, Anhang), amplifizieren ein 256 bp langes Fragment, welches einen Bereich der dritten intrazellulären Schleife des Rezeptors kodiert. Das Transkript des *Cv5-ht7*-Gens wird im Gehirn stark und in der Speicheldrüse wesentlich schwächer exprimiert (Abb. 3.9). In den Proben der Malpighischen Gefäße und der Flugmuskulatur konnte das Transkript des *Cv5-ht7*-Gens nur sehr schwach detektiert werden (Abb. 3.9). Die Intaktheit der verwendeten RNA-Proben wurde durch Kontroll-Experimente mit dem konstitutiv exprimierten Gen *Cvactin* bestätigt. Für Negativkontrollen wurden die RNA-Proben mit RNase behandelt (Daten nicht gezeigt).

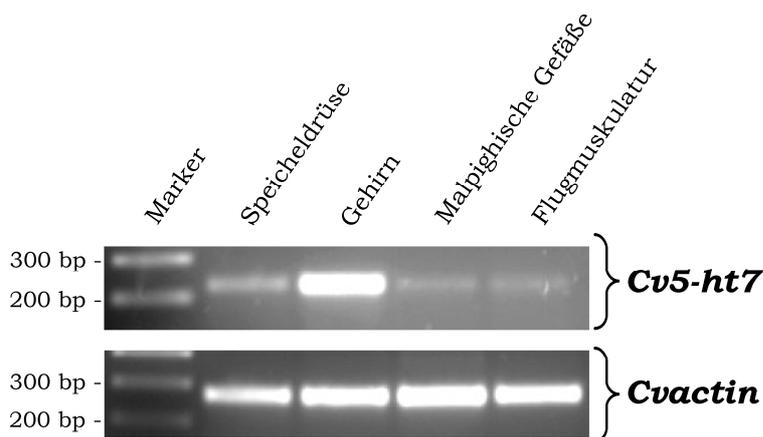


Abb. 3.9 Expression von *Cv5-ht7* und *Cvactin* in verschiedenen Geweben von *Calliphora vicina*

Die Abbildung zeigt die elektrophoretische Analyse der RT-PCR-Produkte, die mit RNA-Präparationen aus verschiedenen Geweben erhalten wurden. Die amplifizierten Fragmente haben die erwartete Größe von 256 bp für *Cv5-ht7* und 269 bp für *Cvactin*. Das hier abgebildete Expressionsmuster wurde in drei unabhängigen Experimenten bestätigt. Marker: 100 bp Leiter

3.2.5 Nachweis der Expression des *Cv5-HT7*-Rezeptorproteins in flpTM-Zellen

Für die pharmakologische Charakterisierung des *Cv5-HT7*-Rezeptors wurde dieser in flpTM-Zellen (modifizierte HEK 293-Zellen, siehe Abschnitt 2.7) transfiziert und exprimiert. Der Nachweis einer erfolgreichen Expression im heterologen Zellsystem erfolgte sowohl immunozytochemisch an fixierten Zellen als auch mittels

Western-Blot-Analyse an Membranproteinpräparationen. Für die immunzytochemische Analyse wurden Cv5-HT₇-Rezeptor-exprimierende sowie nicht-transfizierte flpTM-Zellen fixiert und mit dem anti-HA-Antikörper inkubiert (Abb. 3.10). Der Antikörper erkennt das Rezeptorprotein in der Cv5-HT₇-Zelllinie und markiert Bereiche in der Peripherie der Zellen. Der Rezeptor liegt vorwiegend in der Zellmembran aber auch im Zytoplasma vor. In Kontrolleexperimenten mit nicht-transfizierten Zellen, welche unter vergleichbaren Bedingungen aufgenommen wurden, konnten keine Markierungen detektiert werden.

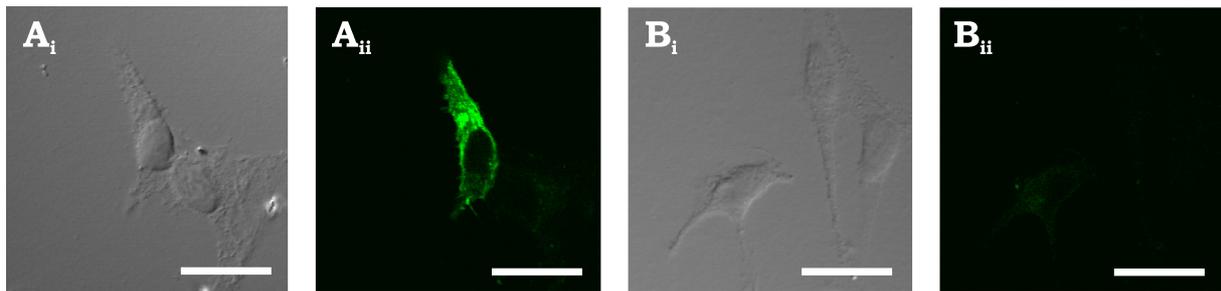


Abb. 3.10: Immunzytochemischer Nachweis des Cv5-HT₇-Rezeptors in stabil transfizierten flpTM-Zellen

Die identisch fixierten Zellen der Cv5-HT₇-Zelllinie (A_i und A_{ii}) und nicht-transfizierte flpTM-Zellen (B_i und B_{ii}) wurden mit anti-HA (1:100) und *Goat-anti-rat-Alexa488* (1:500) inkubiert und mit differentiellem Interferenzkontrast (A_i und B_i) und Fluoreszenz (A_{ii} und B_{ii}) analysiert. Der Alexa488-konjugierte sekundäre Antikörper wurde durch Blaulicht-Anregung sichtbar gemacht (in der Abbildung grün, A_{ii} bzw. B_{ii}). Der angegebene Maßstabsbalken entspricht 20 µm.

Zum Nachweis der Expression des Cv5-HT₇-Rezeptors im Western-Blot kamen der anti-HA-Antikörper und anti-Cv5-HT₇-Antikörper zu Einsatz (Abb. 3.11). Somit konnte der Rezeptor über den angefügten HA-Tag und durch einen spezifischen Antikörper, welcher am N-Terminus des Rezeptors bindet, detektiert werden. Zur Herstellung des anti-Cv5-HT₇-Antikörpers wurde ein polyklonales Antiserum, welches gegen den N-Terminus des Cv5-HT₇-Rezeptor gerichtet war, generiert und dann affinitätschromatographisch aufgereinigt (anti-Cv5-HT₇-Antikörper, siehe Abschnitt 2.5.8). Für die Immundetektion wurden die Membranproteine transfizierter und nicht-transfizierter Zellen präpariert und ein Teil der Proteine mit PNGase F inkubiert. Beide Antikörper markieren auf den Blots deglykosylierter Membranproteine der Cv5-HT₇-Zelllinie einen Bereich zwischen 60 und 80 kDa (errechnetes Molekulargewicht des Cv5-HT₇-Rezeptors: 73,1 kDa), der aus mindestens drei Einzelbanden besteht. Desweiteren markieren sowohl der anti-HA- als auch der anti-Cv5-HT₇-Antikörper eine Proteinbande bei ~50 kDa in Blots

sowohl von glykosylierten als auch deglykosylierten Proteinfractionen. Der anti-HA-Antikörper markiert noch eine weitere Proteinbande bei ~32 kDa, unabhängig davon, ob die Proben einer PNGase F Behandlung unterzogen wurden oder nicht. Während der anti-HA-Antikörper in der nicht deglykosylierten Fraktion einen Proteinbereich bei ~100 kDa markiert, welcher nach der Deglykosylierung auf ein Molekulargewicht von 60-80 kDa schrumpft, erkennt der anti-Cv5-HT₇-Antikörper dort keine Proteinbanden. In nicht-transfizierten flpTM-Zellen sind diese Markierungen nicht zu erkennen, lediglich eine Proteinbande bei ~50 kDa wird vom anti-HA-Antikörper erkannt. Alle Ergebnisse deuten darauf hin, dass der Rezeptor im heterologen Zellsystem stark glykosyliert vorliegt.

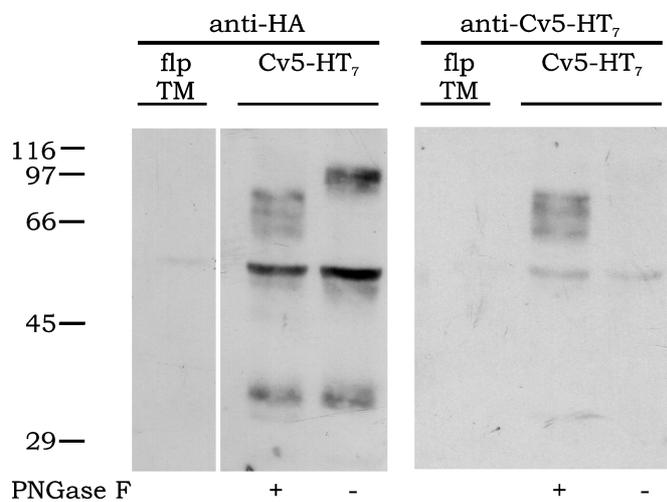


Abb. 3.11: Western-Blot-Analyse mit Membranproteinen von flpTM-Zellen

Es wurden pro Spur 20 µg Membranprotein aufgetragen. Die Proben wurden vor dem Auftragen mit (+) oder ohne (-) PNGase F behandelt. Zur Immundetektion wurde mit dem anti-HA- (1:1.000) und dem anti-Cv5-HT₇-Antikörper (1:10.000) inkubiert. Als sekundäre Antikörper wurden der *Goat-anti-rat*-HRP (1:10.000) und der *Goat-anti-rabbit*-HRP (1:20.000) verwendet. Die Größenangabe des Markers befindet sich links (in kDa). Cv5-HT₇ - mit dem Cv5-HT₇-Rezeptor transfizierte flpTM-Zellen; flpTM - nicht-transfizierte Zellen

3.2.6 Nachweis des Cv5-HT₇-Rezeptorproteins in verschiedenen Geweben

Nachdem die heterologe Expression des Cv5-HT₇-Rezeptorproteins in flpTM-Zellen überzeugend nachgewiesen werden konnte, sollte nun überprüft werden, ob der spezifische anti-Cv5-HT₇-Antikörper den Rezeptor auch im nativen Gewebe (Speicheldrüse) erkennt. Hierfür wurden transfizierte und nicht-transfizierte flpTM-Zellen, sowie Speicheldrüsen und Gehirne von *Calliphora* homogenisiert und

einer Western-Blot-Analyse mit dem anti-HA- und dem anti-Cv5-HT₇-Antikörper unterzogen. Im Vergleich zur Cv5-HT₇-Zelllinie, bei der der glykosylierte Rezeptor bei etwa 100 kDa detektiert wird, markiert der anti-Cv5-HT₇-Antikörper in den Speicheldrüsen zwei Proteinbanden. Während das Signal bei ca. 130 kDa sehr stark ist, wird bei etwa 70 kDa eine wesentlich schwächere Bande erkannt (Abb. 3.12 A). Allerdings variierten die Signalstärken der beiden Banden zwischen verschiedenen Western-Blot-Analysen sehr stark. Gehirn- und Speicheldrüsenhomogenate zeigten identische Markierungen (Abb. 3.12 A, B).

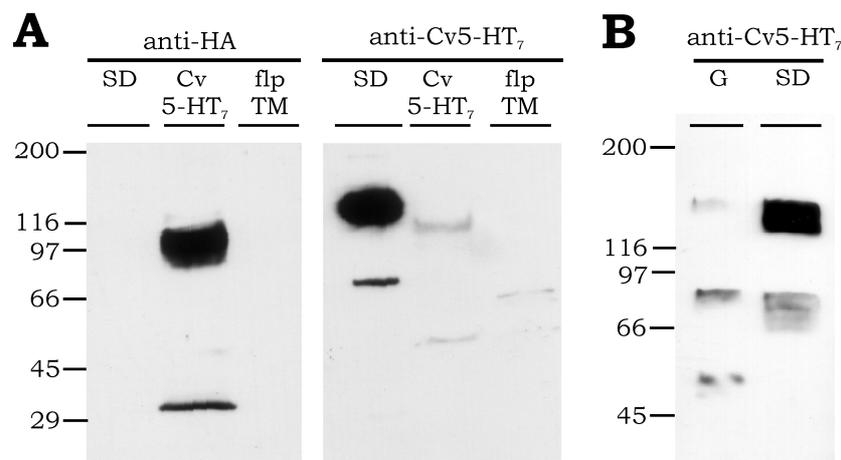


Abb. 3.12: Western-Blot-Analyse mit dem anti-Cv5-HT₇-Antikörper

A Es wurden pro Spur jeweils Proteinhomogenate aus vier Speicheldrüsen-äquivalenten bzw. 80 µg Gesamtprotein aus heterologen Zellen aufgetragen.

B Proteinhomogenat eines 1/10 *Calliphora*-Gehirns. Zur Immundetektion wurde mit dem anti-HA- (1:1.000) und dem anti-Cv5-HT₇-Antikörper (1:10.000) inkubiert. Als sekundärer Antikörper wurden der *Goat-anti-rat*-HRP (1:10.000) und der *Goat-anti-rabbit*-HRP (1:20.000) verwendet. Die Größenangabe des Markers befindet sich jeweils links (in kDa). SD - Speicheldrüsen, Cv5-HT₇ - mit dem Cv5-HT₇-Rezeptor transfizierte flpTM-Zellen, flpTM - nicht-transfizierte Zellen, G - Gehirn

Die in den Speicheldrüsen und im Gehirn detektierte etwa 70 kDa große Proteinbande korrespondiert gut mit dem errechneten Molekulargewicht des Rezeptors von 73,1 kDa, die zweite Bande ist jedoch schwerer zu interpretieren. Das apparente Molekulargewicht ist mit ca. 130 kDa geringer als es für ein Rezeptordimer zu erwarten wäre. Da für den heterolog exprimierten Rezeptor eine Glykosylierung nachgewiesen werden konnte, liegt die Vermutung nahe, dass auch native Rezeptoren glykosyliert vorliegen. Wenn es sich um eine Glykosylierung handelt, ist diese allerdings stärker ausgeprägt als bei heterolog exprimierten Rezeptoren. In einigen Experimenten, in denen die Speicheldrüsenproteine mit PNGase F deglykosyliert wurden, verschwand die 130 kDa-Bande zum Teil vollständig und es wurde nur noch die ca. 70 kDa große Proteinbande detektiert

(Abb. 3.13). Zumeist konnte aber kein Unterschied zwischen glykosylierten und deglykosylierten Proben festgestellt werden. Beide Banden lagen weiterhin mit gleicher Intensität und identischem Molekulargewicht vor. Insgesamt verdeutlichen die Ergebnisse jedoch, dass der anti-Cv5-HT₇-Antikörper den nativen Rezeptor erkennt und dieser wahrscheinlich stark glykosyliert vorliegt.

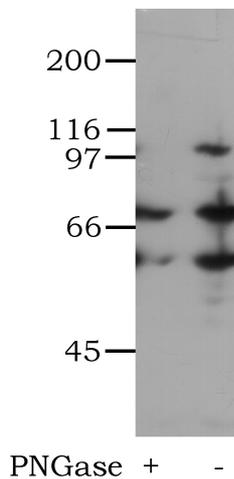


Abb. 3.13: Western-Blot-Analyse zur Glykosylierung des Cv5-HT₇-Rezeptors

Es wurden pro Spur 60 µg Gesamtprotein eines Speicheldrüsenhomogenats bzw. einer Membranproteinisolierung aufgetragen. Die Proben wurden vor der Auftragung mit (+) oder ohne (-) PNGase F behandelt. Zur Immundetektion wurde mit dem anti-Cv5-HT₇-Antikörper (1:10000) inkubiert. Als sekundärer Antikörper wurden der *mouse-anti-rabbit*-HRP (1:20000) verwendet. Die Größenangabe des Markers befindet sich links (in kDa).

Nachdem gezeigt wurde, dass der anti-Cv5-HT₇-Antikörper den nativen Rezeptor im Western-Blot detektieren kann, sollte nun die Verteilung des Cv5-HT₇-Rezeptors immunzytochemisch in Speicheldrüsen untersucht werden. Abbildung 3.14 zeigt konfokalmikroskopische Aufnahmen der immunzytochemischen Markierung von F-Aktin, der Na⁺/K⁺-ATPase und dem Cv5-HT₇-Rezeptor. Die Aktinmarkierung zeigt die Organisation des Zytoskeletts mit den tiefen Einfaltungen der Apikalmembran in Form von Canaliculi. Der Cv5-HT₇-Antikörper markiert in den Drüsen ausschließlich die basolaterale Plasmamembran (Abb. 3.14 A_i und A_{ii}). Zum Vergleich ist in Abbildung 3.14 C_i und C_{ii} die Na⁺/K⁺-ATPase markiert. Wie in Zimmermann *et al.* (2003) gezeigt, werden hier die basolaterale Membran und laterale Bereiche der Plasmamembran gefärbt. Für keinen der beiden Antikörper konnte eine Immunreaktivität in der Apikalmembran nachgewiesen werden. Die gezeigten Ergebnisse konnten in mehreren unabhängigen Experimenten repliziert werden.

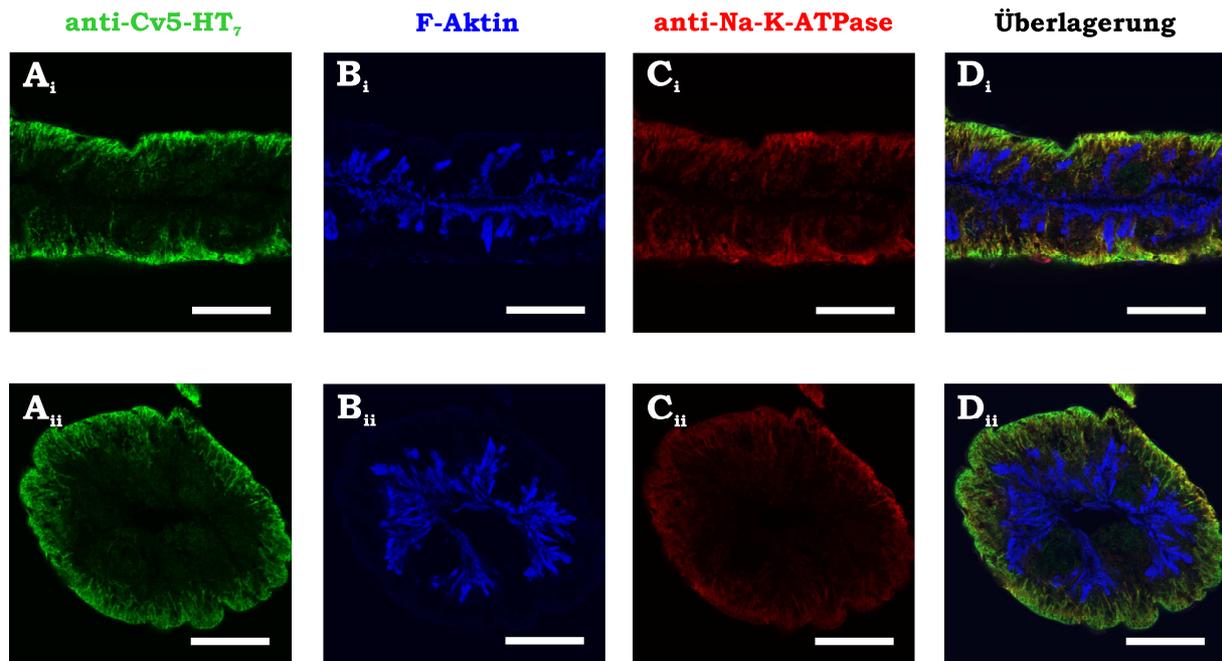


Abb. 3.14: Verteilung des Cv5-HT₇-Rezeptors in *Calliphora*-Speicheldrüsen

Dargestellt sind konfokalmikroskopische Aufnahmen von immunzytochemisch-gefärbten Längs- und Querschnitten der Speicheldrüsen von *Calliphora*. Es wurden Antikörper gegen den Cv5-HT₇-Rezeptor (1:2.000, grün, A_i, A_{ii}, D_i, D_{ii}) und die Na⁺/K⁺-ATPase (10 µg/ml, rot, C_i, C_{ii}, D_i, D_{ii}) verwendet. Als sekundäre Antikörper wurden der *Goat-anti-rabbit-Cy3* (1:200) und *Goat-anti-mouse-Alexa 635* (1:1.000) verwendet. Das AlexaFluor-488-markierte Phalloidin markiert F-Aktin (1:40, blau, B_i, B_{ii}, D_i, D_{ii}). Die Immunfluoreszenz der Basallamina, die das Drüsenepithel umgibt, wird durch nicht spezifische Bindung der sekundären Antikörper hervorgerufen. Der Maßstabsbalken entspricht 20 µm.

3.2.7 Funktionelle Charakterisierung des Cv5-HT₇-Rezeptorproteins

Für 5-HT₇-Rezeptoren ist bekannt, dass diese über G_s-Proteine Adenylylzyklen aktivieren können und somit zu einer Erhöhung der intrazellulären cAMP-Konzentration ([cAMP]_i) führen (Hoyer, 2002). Um festzustellen, ob die Cv5-HT₇-cDNA für einen funktionellen Rezeptor kodiert, wurden flpTM-Zellen stabil mit dem Expressionsvektor pcCv5-ht7-HA transfiziert. Die Inkubation mit einem Agonisten (z. B. 5-HT) sollte daher zu einer messbaren Erhöhung der [cAMP]_i führen.

Die Ligandenspezifität des Cv5-HT₇-Rezeptors sollte mit Hilfe verschiedener biogener Amine ermittelt werden. Es zeigte sich, dass bei einer Konzentration von 1 µM nur Serotonin zu einer signifikanten Erhöhung der [cAMP]_i in der Cv5-HT₇-Zelllinie führt (Abb. 3.15). Octopamin, Tyramin, Dopamin und Histamin zeigten keine Wirkung.

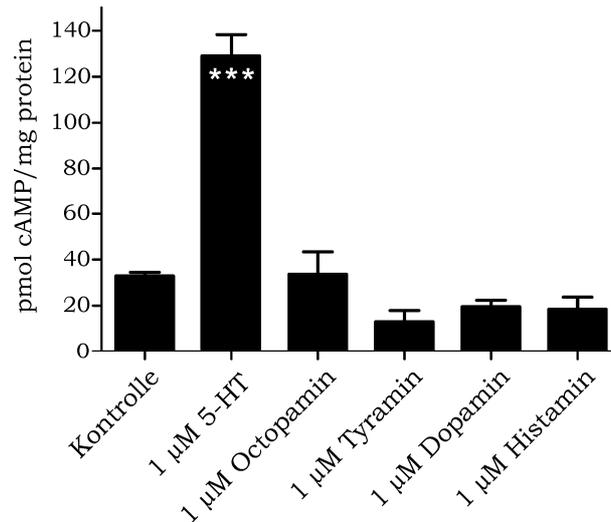


Abb. 3.15: Einfluss verschiedener biogener Amine auf die intrazelluläre cAMP-Konzentration

Cv5-HT₇-exprimierende flpTM-Zellen wurden mit verschiedenen biogenen Aminen inkubiert und die Menge an gebildetem cAMP pro mg/Protein ermittelt. Alle Messungen erfolgten in Gegenwart von 100 µM IBMX. Die basale [cAMP]_i wurde in Abwesenheit jeglicher Liganden ermittelt. Alle dargestellten Daten repräsentieren den Mittelwert aus einer Messung, die als Vierfachbestimmung durchgeführt wurde. Die Fehlerbalken stellen den Standardfehler dar. Statistisch signifikante Unterschiede (*one way* ANOVA, gefolgt von *Dunnett's multiple comparison* Test) zur Kontrollbehandlung der Zelllinie sind durch Sternchen innerhalb der Balken gekennzeichnet. ***P < 0,001

Interessanterweise löste 10 mM Histamin ebenfalls einen signifikanten Anstieg der [cAMP]_i in Cv5-ht7-transfizierten Zellen aus (Abb. 3.16). Die verwendete Konzentration ist jedoch unphysiologisch hoch und wurde deshalb zur Einschätzung der Ligandenspezifität nicht weiter beachtet.

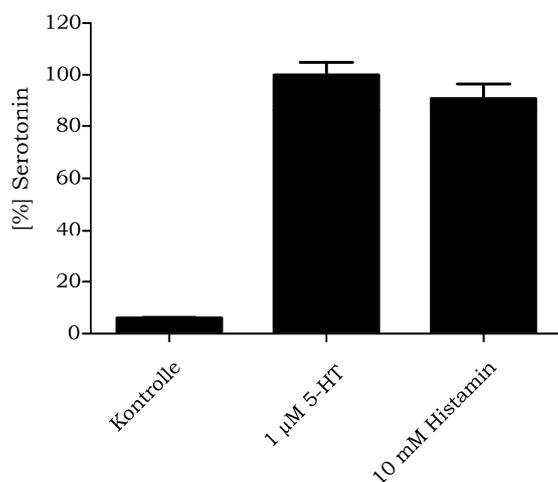


Abb. 3.16: Einfluss von 10 mM Histamin auf die intrazelluläre cAMP-Konzentration

Cv5-HT₇-exprimierende flpTM-Zellen wurden in Gegenwart von 10 µM IBMX mit 10 mM Histamin und 1 µM 5-HT inkubiert und die Menge an gebildetem cAMP ermittelt. Es ist der Mittelwert aus einer Vierfachbestimmung dargestellt. Die Fehlerbalken geben den Standardfehler an.

Auch für den Cv5-HT₇ konnte somit eine Spezifität für 5-HT gezeigt werden. Daher kann dieser Rezeptor als funktioneller Serotonin-Rezeptor angesehen werden.

3.3 Pharmakologische Charakterisierung des Cv5-HT_{2a/N}- und des Cv5-HT₇-Rezeptors

Für die klonierten und heterolog exprimierten Rezeptoren aus *Calliphora vicina* konnte gezeigt werden, dass es sich um funktionelle 5-HT_{2a}- bzw. 5-HT₇-Rezeptoren handelt. Im Rahmen dieser Arbeit war die genauere pharmakologische Charakterisierung dieser Rezeptoren von besonderem Interesse. Dazu wurde zunächst zur Untersuchung der Konzentrationsabhängigkeit der Ca²⁺- bzw. cAMP-Produktion Dosis-Wirkungskurven für Serotonin erstellt (siehe Abschnitt 3.3.1) und danach die Wirkungen verschiedener Agonisten (siehe Abschnitt 3.3.2) und Antagonisten (siehe Abschnitt 3.3.3) getestet.

3.3.1 Konzentrationsabhängigkeit der Ca²⁺- bzw. cAMP-Produktion

Zur Untersuchung der 5-HT-Wirkung auf die Erhöhung der intrazellulären Ca²⁺- bzw. cAMP-Konzentration wurden Dosis-Wirkungskurven erstellt, bei denen 5-HT-Konzentrationen zwischen 10⁻¹⁰ M und 10⁻⁴ M untersucht wurden (Abb. 3.17). Für beide Rezeptoren konnte dabei eine sigmoidale Konzentrationsabhängigkeit festgestellt werden. Die halbmaximale relative Fluoreszenzänderung (EC₅₀) für den Cv5-HT_{2a/N}-Rezeptor wurde bei 24 nM beobachtet. Für eine maximale 5-HT-Antwort waren etwa 1 μM 5-HT nötig. Bei dem Cv5-HT₇-Rezeptor hingegen ruft 4,1 nM eine halbmaximale relative Fluoreszenzänderung hervor. Die Sättigung wird bei etwa 100 nM erreicht. Die getesteten 5-HT-Konzentrationen zeigten keinen Einfluss auf nicht-transfizierte Zellen.

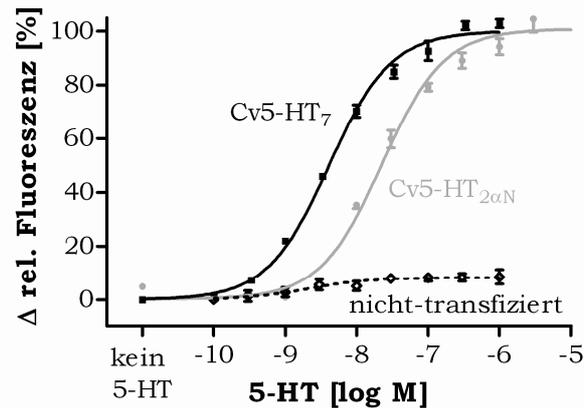


Abb. 3.17: Abhängigkeit der Ca^{2+} - bzw. cAMP-Produktion von der 5-HT-Konzentration

Die Cv5-HT_{2αN}- und Cv5-HT₇-Rezeptor-exprimierenden Zelllinien sowie nicht-transfizierte Zellen wurden mit verschiedenen 5-HT-Konzentrationen (10^{-10} M bis 10^{-4} M) inkubiert. Die angegebenen Werte repräsentieren die Mittelwerte und mittleren Standardfehler aus zwei unabhängigen Experimenten mit Achtfachbestimmungen, normiert auf die maximale relative Fluoreszenzänderung für den jeweiligen Rezeptor.

3.3.2 Wirkung von Agonisten

In weiteren Experimenten wurden verschiedene 5-HT-Rezeptoragonisten auf ihre Wirkung bezüglich des Cv5-HT_{2αN}- bzw. Cv5-HT₇-Rezeptors untersucht und verglichen (Abb. 3.18 und Tabelle 3.3).

Von den unterschiedlichen getesteten Agonisten sind die 5-HT-Derivate 5-Methoxytryptamin (5-MeOT), ein nicht selektiver 5-HT-Rezeptoragonist, und 5-Carboxamidotryptamin (5-CT), ein selektiver Agonist für 5-HT₁- und 5-HT₇-Rezeptoren in Säugetieren (Hoyer *et al.*, 1994), in der Lage beide *Calliphora*-Rezeptoren zu aktivieren. Während für den Cv5-HT_{2αN}-Rezeptor ein EC₅₀-Wert von 67 nM für 5-MeOT und 51 μM für 5-CT ermittelt werden konnte, zeigte der Cv5-HT₇-Rezeptor nahezu gleiche EC₅₀-Werte für beide Substanzen, 0,95 μM für 5-MeOT und 0,43 μM für 5-CT. 8-Hydroxy-2-(di-n-propylamino)tetralin (8-OH-DPAT) ein 5-HT₁-Rezeptoragonist (Arvidsson *et al.*, 1981) mit moderater Affinität für 5-HT₇-Rezeptoren (Hoyer, 2002) wirkte an beiden Rezeptorsubtypen nur schwach agonistisch mit EC₅₀-Werten von 62,2 μM für Cv5-HT_{2αN} und 7,87 μM für Cv5-HT₇. Für AS 19 hingegen, einen selektiven 5-HT₇-Rezeptoragonist bei Säugetieren (Sanin *et al.*, 2003) konnte ein agonistischer Effekt nur für Cv5-HT₇ beobachtet werden. Allerdings war die Wirksamkeit der Substanz dort nur moderat und der EC₅₀-Wert mit 30,3 μM recht hoch. Methysergid und R-(+)-Lisurid lösten ebenfalls nur in den Cv5-HT₇-exprimierenden Zellen eine cAMP-induzierte

Ca²⁺-Antwort aus. Obwohl der ermittelte EC₅₀-Wert für R-(+)-Lisurid mit 1,8 nM sehr niedrig ist, war die Effektivität dieses Agonisten nur gering (Abb. 3.18 C und Tabelle 3.3). Interessanterweise zeigte Methysergid, welches eigentlich als Antagonist für 5-HT₁- und 5-HT₂-Rezeptoren der Säugetiere beschrieben wird, einen agonistischen Effekt für Cv5-HT₇ mit einem EC₅₀-Wert von 0,77 nM. Auch diese Substanz besaß nur eine geringe Effektivität im Vergleich zu 5-HT.

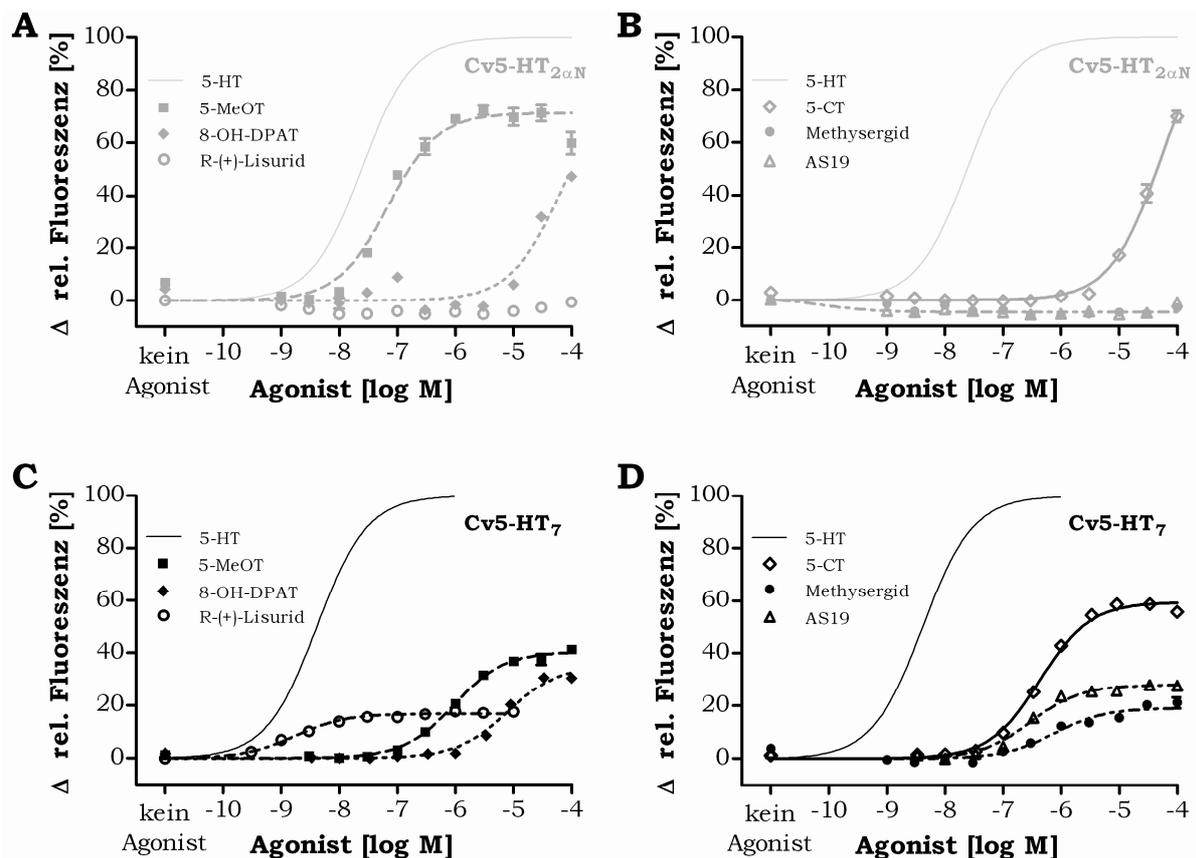


Abb. 3.18: Dosisabhängige Effekte putativer 5-HT-Rezeptoragonisten auf die [Ca²⁺]_i

Cv5-HT_{2 α N}-exprimierende HEK 293-Zellen (A und B) und Cv5-HT₇-exprimierende flpTM-Zellen (C und D) wurden für 10 min mit verschiedenen Konzentrationen (3×10^{-10} bis 10^{-4} M) der putativen Agonisten inkubiert. Alle Messungen für die flpTM-Zellen fanden in Gegenwart von 100 μ M IBMX statt. Die dargestellten Werte repräsentieren die Mittelwerte und mittleren Standardfehler aus zwei bis vier unabhängigen Experimenten mit Achtfachbestimmungen, normiert auf die maximale relative Fluoreszenzänderung des jeweiligen Rezeptors. Zum besseren Vergleich der Dosis-Wirkungskurven wurde in jedem Graph die 5-HT-Antwort mit einer dünnen durchgehenden Linie eingefügt.

Tabelle 3.3: Pharmakologisches Profil putativer Agonisten des Cv5-HT_{2αN}- und Cv5-HT₇-Rezeptors

EC₅₀-Wert und logEC₅₀-Wert verschiedener Agonisten für heterolog exprimierte 5-HT_{2αN}- und 5-HT₇-Rezeptoren von *Calliphora vicina*. Die angegebenen Werte stellen Mittelwerte von einem Experiment mit Achtfachbestimmungen dar. Die Zelllinien wurden mit ansteigenden Agonistkonzentrationen (3×10^{-10} – 1×10^{-4} M) inkubiert.

Agonist	Cv5-HT _{2αN}		Cv5-HT ₇	
	EC ₅₀ (μM)	logEC ₅₀	EC ₅₀ (μM)	logEC ₅₀
5-HT	0,024	-7,62 ± 0,03	0,004	-8,39 ± 0,03
8-OH-DPAT	62	-4,21 ± 0,11	7,9	-5,10 ± 0,04
AS 19	kein Effekt		0,30	-6,52 ± 0,04
5-MeOT	0,067	-7,17 ± 0,05	0,95	-6,02 ± 0,04
5-CT	51	-4,29 ± 0,05	0,43	-6,37 ± 0,02
R(+)-Lisurid	kein Effekt		0,002	-8,75 ± 0,05
Methysergid	kein Effekt		0,77	-6,11 ± 0,09

Bezogen auf die pharmakologischen Ergebnisse der heterolog exprimierten Rezeptoren scheinen AS 19, R(+)-Lisurid und Methysergid selektive Agonisten des Cv5-HT₇-Rezeptors zu sein, allerdings mit nur niedriger bis moderater Effektivität. 5-CT hingegen könnte diesen möglicherweise bei Konzentrationen von $\leq 3 \mu\text{M}$ selektiv und relativ effizient aktivieren. Der Cv5-HT_{2αN}-Rezeptor könnte vielleicht durch 5-MeOT in Konzentrationen von $\leq 100 \text{ nM}$ aktiviert werden.

3.3.3 Wirkung von Antagonisten

Zur weiteren pharmakologischen Charakterisierung wurden auch die Wirkungen verschiedener Antagonisten auf den Cv5-HT_{2αN}- bzw. den Cv5-HT₇-Rezeptor untersucht und gegenübergestellt (Abb. 3.19 und Tabelle 3.4.). Sowohl Ketanserin, Mianserin und Cyproheptadin, welche als 5-HT₂-Rezeptorantagonisten bei Säugetieren wirken (Hoyer *et al.*, 1994), blockierten effektiv die 5-HT-induzierte [Ca²⁺]_i-Antwort in den Cv5-HT_{2αN}-exprimierenden HEK 293-Zellen (Abb. 3.19 A, B, E). Allerdings wirken sie ebenfalls antagonistisch auf den in flpTM-Zellen exprimierten Cv5-HT₇-Rezeptor (Abb. 3.19 C, D, F), hier sogar mit etwas niedrigeren IC₅₀-Werten als sie für Cv5-HT_{2αN} ermittelt wurden (Tabelle 3.4). Prazosin und Phentolamin stellen für beide Rezeptortypen nur schlechte Antagonisten mit hohen IC₅₀-Werten und nur geringer Effektivität dar. Der in Säugetieren selektive 5-HT₇-Antagonist SB269970 (Hagan *et al.*, 2000) zeigt auch für den 5-HT₇-Rezeptor aus

Calliphora vicina eine antagonistische Wirkung mit einem äußerst niedrigen IC_{50} -Wert von 9 nM. Für Cv5-HT_{2αN} liegt der IC_{50} -Wert mit 53 μM deutlich höher. Die Effektivität, mit der die 5-HT-Antwort blockiert werden konnte, war allerdings für beide Rezeptoren nur gering. Die durch Serotonin induzierte cAMP-Produktion konnte in den Cv5-HT₇-exprimierenden Zellen durch Clozapin, Cinanserin und Spiperon effektiv inhibiert werden (Clozapin: IC_{50} = 0,08 μM; Cinanserin: IC_{50} =0,40 μM; Spiperon: IC_{50} = 0,28 μM). Für den gleichen inhibitorischen Effekt in Cv5-HT_{2αN}-exprimierenden Zellen werden etwa 70 bis 200mal höhere Konzentrationen von Cinanserin (IC_{50} = 30 μM) und Clozapin (IC_{50} = 15 μM) benötigt. Spiperon hingegen hatte keinen antagonistischen Effekt auf Cv5-HT_{2αN} (Abb. 3.19 A). Für Methiothepin, Methysergid und Yohimbin konnte eine höhere Affinität für Cv5-HT_{2αN} als für Cv5-HT₇ festgestellt werden. Im Vergleich zu den Cv5-HT_{2αN}-exprimierenden Zellen ist die Dosis-Wirkungskurve für Methiothepin in Cv5-HT₇-exprimierenden Zellen weit nach rechts verschoben (Abb. 3.19 C, D). Yohimbin blockierte den Cv5-HT_{2αN}-Rezeptor (IC_{50} = 2,9 μM) schon bei Konzentrationen die 150mal niedriger sind, als sie für den Cv5-HT₇-Rezeptor (IC_{50} = 192 μM) benötigt werden. Die Effektivität dieser Substanz ist aber ebenfalls nur sehr gering. Methysergid wirkte als moderater Antagonist auf den Cv5-HT_{2αN}-Rezeptor (IC_{50} = 20 μM) und zeigte auf den Cv5-HT₇-Rezeptor keine antagonistische Wirkung (Abb. 3.19 E, F). Im Gegenteil, dort konnte eher ein agonistischer Effekt nachgewiesen werden (Abb. 3.19 F und 3.18 D, Tabelle 3.3). Vergleicht man die Effektivitäten der einzelnen Substanzen miteinander, so lässt sich für Cv5-HT_{2αN} folgendes Profil erstellen:

Methiothepin > Clozapin > Mianserin > Cyproheptadin > Methysergid > Cinanserin >> Ketanserin ≈ Phentolamin ≈ SB26997 > Prazosin ≈ Yohimbin >>> Spiperon.

Für den Cv5-HT₇-Rezeptor lassen sich die putativen Antagonisten nach absteigender Effektivität wie folgt einordnen:

Clozapin > Cinanserin > Spiperone > Prazosin > Phentolamin ≈ Mianserin ≈ Cyproheptadin > Yohimbin >> Methiothepin > SB26997 ≈ Ketanserin >>> Methysergid.

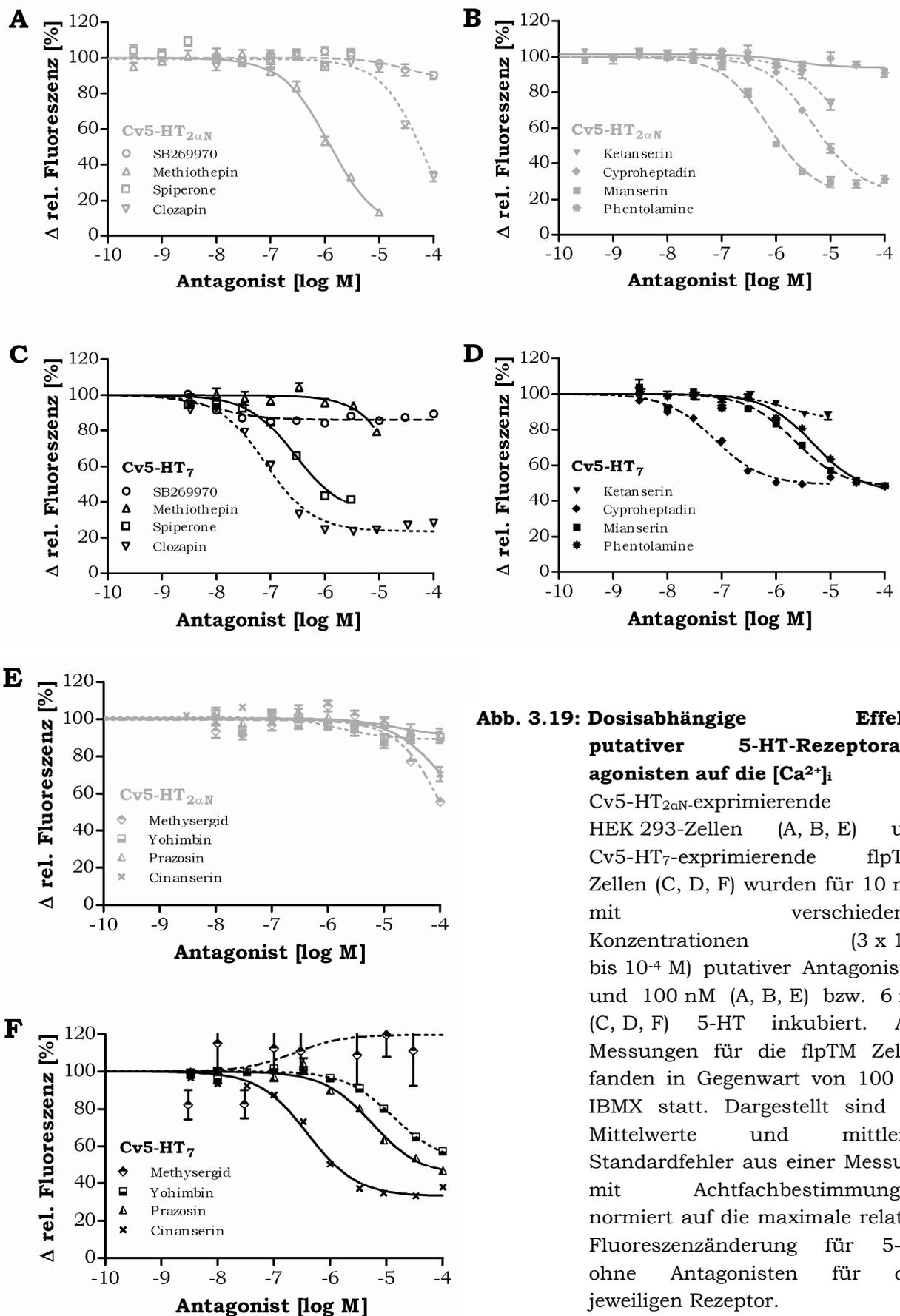


Abb. 3.19: Dosisabhängige Effekte putativer 5-HT-Rezeptorantagonisten auf die $[Ca^{2+}]_i$

Cv5-HT_{2αN}-exprimierende HEK 293-Zellen (A, B, E) und Cv5-HT₇-exprimierende flpTM-Zellen (C, D, F) wurden für 10 min mit verschiedenen Konzentrationen (3×10^{-9} bis 10^{-4} M) putativer Antagonisten und 100 nM (A, B, E) bzw. 6 nM (C, D, F) 5-HT inkubiert. Alle Messungen für die flpTM Zellen fanden in Gegenwart von 100 μ M IBMX statt. Dargestellt sind die Mittelwerte und mittleren Standardfehler aus einer Messung mit Achtfachbestimmungen, normiert auf die maximale relative Fluoreszenzänderung für 5-HT ohne Antagonisten für den jeweiligen Rezeptor.

Tabelle 3.4: Pharmakologisches Profil putativer Antagonisten des Cv5-HT_{2a}N- und Cv5-HT₇-Rezeptors

IC₅₀-Wert und log IC₅₀-Wert verschiedener Antagonisten auf die heterolog exprimierten 5-HT_{2a}N- und 5-HT₇-Rezeptoren von *Calliphora vicina*. Die angegebenen Werte stellen Mittelwerte von einem Experiment mit Achtfachbestimmungen dar. Die Zelllinien wurden mit ansteigenden Antagonistenkonzentrationen (3×10^{-10} - 1×10^{-4}) inkubiert. n. b. - nicht berechenbar

Antagonist	Cv5-HT _{2a} N		Cv5-HT ₇	
	IC ₅₀ (μM)	log IC ₅₀	IC ₅₀ (μM)	log IC ₅₀
Cinanserin	30	-4,53 ± 0,16	0,40	-6,40 ± 0,04
Clozapin	15	-4,82 ± 0,07	0,080	-7,10 ± 0,03
Cyproheptadin	1,6	-5,80 ± 0,05	0,073	-7,14 ± 0,08
Ketanserin	14	-4,85 ± 0,32	1,5	-5,84 ± 0,33
Methiothepin	1,2	-5,92 ± 0,06	n. b.	
Methysergid	20	-4,71 ± 0,12	agonistische Wirkung	
Mianserin	0,73	-6,14 ± 0,05	0,067	-7,17 ± 0,07
Phentolamin	198	-3,70 ± 0,58	4,7	-5,33 ± 0,08
Prazosin	29	-4,54 ± 0,35	5,7	-5,25 ± 0,13
SB269970	53	-4,27 ± 0,30	0,009	-8,06 ± 0,21
Spiperon	kein Effekt		0,28	-6,56 ± 0,06
Yohimbin	2,9	-5,54 ± 0,28	192	-3,72 ± 0,10

Zusammenfassend scheint Spiperon ein selektiver Antagonist für den Cv5-HT₇-Rezeptor zu sein. Außerdem können Clozapin bei Konzentrationen ≤ 1 μM und Cinanserin bei Konzentrationen ≤ 10 μM für diesen Rezeptor als selektive und relativ effiziente Antagonisten betrachtet werden. Methiothepin hingegen scheint selektiv den Cv5-HT_{2a}N-Rezeptor zu inhibieren.

3.4 Elektrophysiologische Untersuchungen zur Wirkung verschiedener 5-HT-Rezeptoragonisten und -antagonisten

Mit Hilfe der pharmakologischen Experimente an den heterolog exprimierten 5-HT-Rezeptoren von *Calliphora vicina* konnte ein erster Eindruck über die Eigenschaften und potentielle Möglichkeiten zur selektiven Beeinflussung der einzelnen Rezeptoren erhalten werden. Um festzustellen, ob diese Ergebnisse auch auf native Rezeptoren bzw. auf ein intaktes Insektenorgan übertragen werden können, wurden TEP-Messungen an *Calliphora*-Speicheldrüsen durchgeführt. Das unmittelbare Ziel dieser Arbeit war es, Substanzen oder Möglichkeiten zu finden, in einem Gewebe, in dem beide Rezeptorsubtypen vorliegen, selektiv entweder den Cv5-HT_{2α}- oder den Cv5-HT₇-Rezeptor zu aktivieren bzw. zu inhibieren. Daher wurden für die folgenden Experimente solche Substanzen ausgewählt, die sich bei den pharmakologischen Untersuchungen im heterologen System als subtypspezifisch herausgestellt hatten (siehe Abschnitt 3.3.2 und 3.3.3). Nach Applikation von 30 nM Serotonin zeigten die Speicheldrüsen bei den TEP-Messungen die typische biphasische Antwort (Abb. 2.4 und 3.30 A-E). Diese besteht aus einer negativen Phase, die während der 5-HT-Applikation vorliegt, und einer positiven Phase, die nach dem Auswaschen von 5-HT eintritt (Berridge & Prince, 1972). Die negative Phase wird durch den Ca²⁺-induzierten transepithelialen Transport von Cl⁻-Ionen ins Drüsenlumen hervorgerufen. Die positive Phase wird hingegen durch den cAMP-aktivierten Transport von Kationen über die Apikalmembran ausgelöst und hält auch noch für eine Weile nach dem Auswaschen von Serotonin an. Während die selektive Aktivierung des IP₃/Ca²⁺-Signalweges über Cv5-HT_{2α} bzw. Hemmung des cAMP/PKA-Signalweges via Cv5-HT₇ im TEP zu einer negative Phase führen sollte, würde man bei der selektiven Aktivierung des Cv5-HT₇-Rezeptors bzw. Inaktivierung des Cv5-HT_{2α}-Rezeptors nur die positive Phase erwarten.

Die Applikation der putativen Cv5-HT₇-Agonisten AS 19 bzw. R-(+)-Lisurid lösen im TEP nur eine Positivierung aus (Abb. 3.20 A, B). Obwohl die Substanzen in einer Konzentration appliziert wurden, die in den Cv5-HT₇-exprimierenden flpTM-Zellen eine sättigende Antwort ausgelöst haben, fällt die TEP-Antwort geringer aus als bei Applikation von 30 nM 5-HT. Außerdem sind die Antworten (besonders bei AS 19) in ihrer Amplitude äußerst variabel und im Fall von R-(+)-Lisurid irreversibel. Die Applikation von 300 nM 5-CT löst im TEP ebenfalls nur eine Positivierung aus. Dies lässt vermuten, dass 5-CT in der Lage ist, bei dieser Konzentration den

Cv5-HT₇-Rezeptor selektiv zu aktivieren. Die von 5-CT induzierte TEP-Antwort war reversibel, mit De- und Repolarisationsgeschwindigkeiten, die denen von 5-HT-induzierten Antwort vergleichbar waren (Abb. 3.20 C). Bei Konzentrationen $\geq 1 \mu\text{M}$ löste 5-CT eine biphasische TEP-Antwort aus (Abb. 3.20 D). 30 und 100 nM 5-MeOT lösten in den Speicheldrüsen lediglich eine Negativierung aus (Abb. 3.20 E). Methysergid (3 μM) produzierte hingegen eine sehr komplexe TEP-Antwort in den Speicheldrüsen (Abb. 3.20 F). Ausgehend von den pharmakologischen Daten, die mit den heterolog exprimierten Rezeptoren erhalten wurden, sollte Methysergid bei dieser Konzentration lediglich einen agonistischen Effekt auf den Cv5-HT₇-Rezeptor ausüben. In den Speicheldrüsen konnte jedoch eine negative Phase beobachtet werden, die beim Auswaschen der Substanz über Oszillationen in eine transiente Positivierung übergeht. Interessanterweise konnte bei einer nachfolgenden Stimulation mit 30 nM 5-HT ausnahmslos eine vergrößerte negative TEP-Phase beobachtet werden, während die positive Phase anscheinend unverändert blieb (Abb. 3.20 F).

Die pharmakologischen Untersuchungen mit den heterolog exprimierten Cv5-HT_{2a/N}- und Cv5-HT₇-Rezeptoren deuteten für einige Antagonisten eine Rezeptorsubtypen-Selektivität an. Es wurden verschiedene Substanzen getestet (Clozapin, Cyproheptadin, Methysergid, Methiothepin und Spiperon). Von allen getesteten Substanzen war lediglich Clozapin (1 μM) in der Lage, die positive TEP-Phase vollständig und selektiv zu blockieren (Abb. 3.21 A). Die Hemmung war zwar reversibel, es dauerte allerdings etwa 40 min bis die biphasische Antwort auf den Teststimulus mit 30 nM 5-HT wieder vollständig hergestellt war. Für Spiperon konnte bei einer Konzentration von 1 μM , welche im heterologen System die vom Cv5-HT₇-Rezeptor induzierte Antwort vollständig blockierte, eine geringe Hemmung der positiven Phase beobachtet werden (Abb. 3.21 B). Die Stärke der Inhibition war zwischen den einzelnen Drüsen sehr variabel. Cyproheptadin (1 μM) zeigte einen ausgeprägten inhibitorischen Effekt auf beide TEP-Phasen (Abb. 3.21 C). Die Applikation von 1 μM Methiothepin, welches im heterologen System als Cv5-HT_{2a/N}-Antagonist wirkte, hemmte die positive TEP-Phase der 5-HT induzierten Antwort vollständig. Auf die negative Phase hingegen hatte Methiothepin keinen oder nur einen geringen Einfluss (Abb. 3.21 D). Die Speicheldrüsen zeigten aber auf nachfolgende 5-HT-Stimuli keine Antwort.

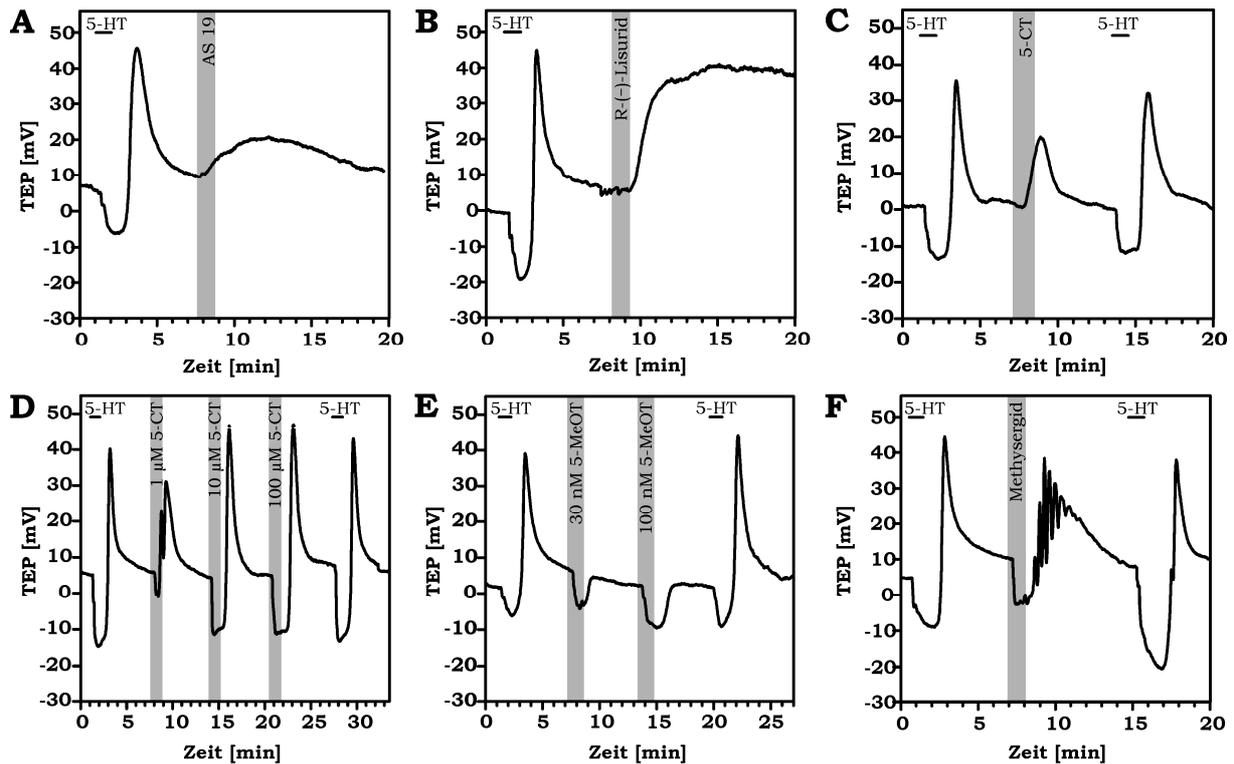


Abb. 3.20: Wirkung von AS 19, R-(+)-Lisurid, 5-CT, 5-MeOT und Methysergid auf den Verlauf des TEP in den Speicheldrüsen von *Calliphora vicina*

Eine initiale Perfusion der Drüsen mit 30 nM 5-HT löste die typische biphasische TEP-Antwort aus. Die Zeitpunkte und die Dauer der Applikation der einzelnen Substanzen jeweils durch Balken gekennzeichnet. Die gezeigten TEP-Antworten konnten in mindestens drei unabhängigen Experimenten repliziert werden. Alle Experimente wurden in Normal-Ringer durchgeführt.

A Die Applikation von 100 μM AS 19 führte zu einer reversiblen Positivierung. **B** 30 nM R-(+)-Lisurid löste eine irreversible TEP-Positivierung aus. **C** Während 300 nM 5-CT eine reversible Positivierung auslöst, wird bei **D** Konzentrationen von $\geq 1\mu\text{M}$ 5-CT ein biphasisches TEP ausgelöst. **E** Eine Negativierung im TEP ließ sich nach der Applikation von 30 und 100 nM 5-MeOT beobachten. **F** Wenn 3 μM Methysergid appliziert wurde, kam es zu einer biphasischen Antwort mit Oszillationen.

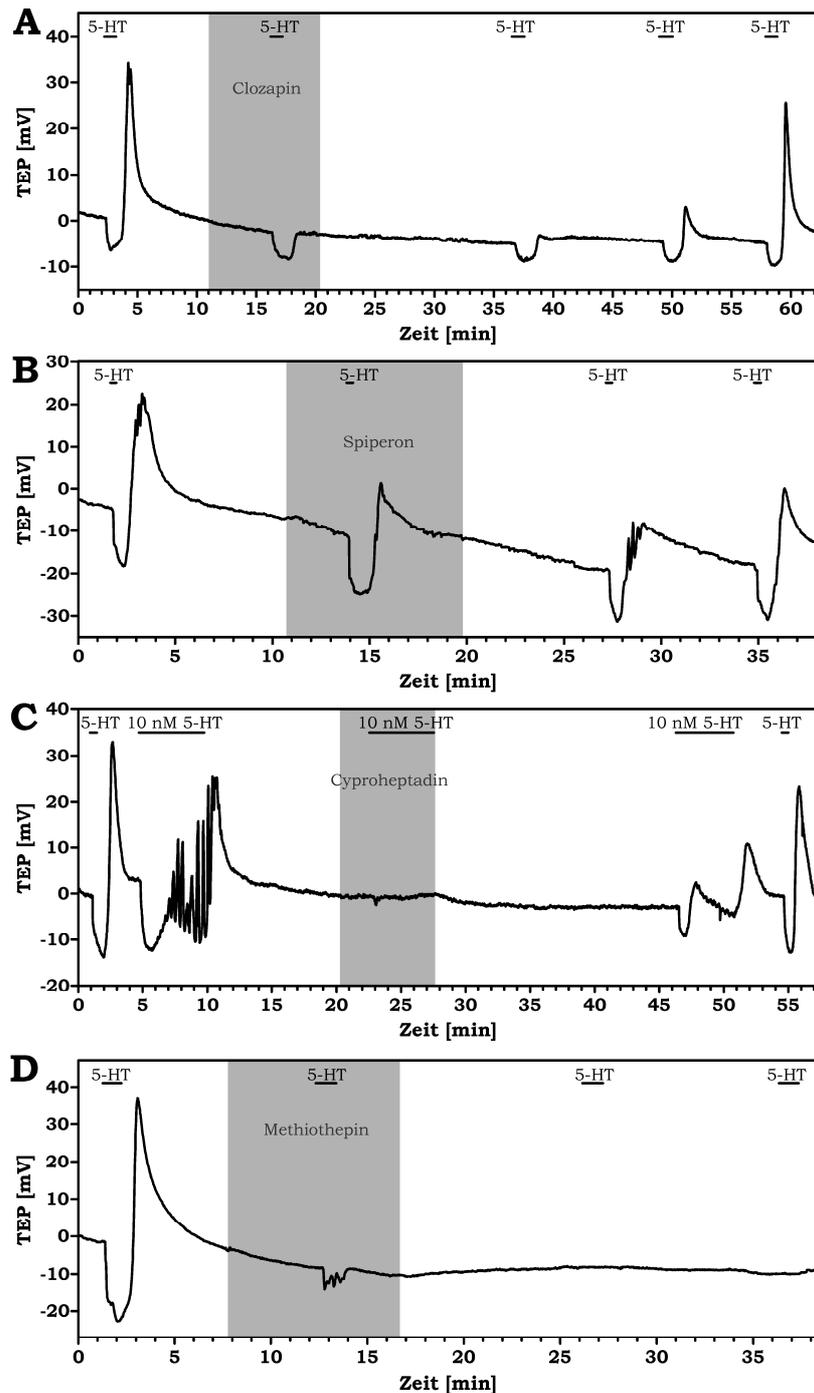


Abb. 3.21 Wirkung einiger der 5-HT-Rezeptorantagonisten auf den Verlauf des TEP

Dargestellt sind die Wirkungen verschiedener Antagonisten auf den Verlauf der durch 30 nM 5-HT ausgelösten TEP-Änderungen in Speicheldrüsen von *Calliphora vicina*. Die Dauer der Applikation der einzelnen Substanzen ist jeweils durch Balken gekennzeichnet. Die gezeigten TEP-Antworten konnten in mindestens vier unabhängigen Experimenten repliziert werden. Alle Experimente wurden in Normal-Ringer durchgeführt.

A 1 μM Clozapin führte zu einer kompletten, aber reversiblen Hemmung der positiven Phase der 5-HT-induzierten TEP-Antwort.
B Spiperon (1 μM) verringerte die Positivierung der 5-HT-Antwort.
C 1 μM Cyproheptadin blockierte beide Phasen des TEP.
D Die Applikation von 3 μM Methiothepin blockierte irreversibel beide Phasen der 5-HT-Antwort.

4. Diskussion

In der Schmeißfliege *Calliphora vicina* stimuliert 5-HT als Neurohormon die Elektrolyt- und Flüssigkeitssekretion in den Speicheldrüsen (Berridge & Patel, 1968). Sir Michael Berridge und Kollegen untersuchten in den 1970igern und 80igern die intrazellulären Vorgänge, die zwischen der Aktivierung der Oberflächenrezeptoren durch 5-HT und der Aktivierung der Ionen-transportmechanismen stattfinden. Dabei vermuteten sie, dass der gleichzeitige Anstieg der $[Ca^{2+}]_i$ und $[cAMP]_i$ in den sekretorischen Zellen durch die Aktivierung von mindestens zwei verschiedenen Serotoninrezeptorsubtypen ausgelöst wird. Während einer über die Phospholipase C den IP_3/Ca^{2+} -Signalweg aktiviert, ist der andere über eine Adenylylzyklase an den cAMP/PKA-Signalweg gekoppelt (Berridge, 1981; Berridge & Heslop, 1981). Neuere Studien (Schmidt *et al.*, 2008; Voss *et al.*, 2010; Heindorff *et al.*, 2012) lassen zudem vermuten, dass die beiden Signalwege nicht unabhängig voneinander agieren, sondern sich gegenseitig durch positive Crosstalk-Mechanismen beeinflussen. Berridge und Heslop beschrieben schon 1981 Substanzen, mit denen sich vornehmlich entweder eine Ca^{2+} -vermittelte oder cAMP-vermittelte Antwort auslösen lassen. Trotz der intensiven Arbeit zur Aufklärung der intrazellulären Signalwege in den Speicheldrüsen von *Calliphora vicina* war bislang die molekulare Identität der 5-HT-Rezeptorsubtypen unbekannt. Das Ziel der vorliegenden Arbeit war es daher, die cDNAs serotonerger Rezeptoren aus *Calliphora* Speicheldrüsen zu klonieren, die Rezeptoren funktionell zu charakterisieren und Substanzen zur selektiven Aktivierung oder Inaktivierung eines Rezeptorsubtypes zu identifizieren.

In der folgenden Diskussion sollen zunächst die strukturellen Eigenschaften der cDNAs und Aminosäuresequenzen dieser Rezeptoren betrachtet werden. Weiterhin wird diskutiert, ob durch alternatives Spleißen die Vielfalt an 5-HT-Rezeptorvarianten weiter erhöht wird. Neben der Expression der Rezeptor-mRNAs und der Verteilung der Rezeptorproteine in der Speicheldrüse wird die funktionelle Kopplung der Rezeptoren an intrazelluläre Signalwege sowie die Pharmakologie der Rezeptoren ausführlich diskutiert und verglichen. Dabei soll besonders auf die Übertragbarkeit der pharmakologischen Daten, die mit Hilfe des heterologen Expressionssystems erhalten wurden, auf native Gewebe eingegangen werden. Abschließend werden in einem Ausblick Ansatzmöglichkeiten für weiterführende Experimente aufgezeigt.

4.1 Strukturelle Eigenschaften der cDNAs sowie der Aminosäuresequenzen

Im Gegensatz zu vielen anderen Modellorganismen (z. B. *Apis mellifera*, *Caenorhabditis elegans*, *Drosophila melanogaster* und *Tribolium castaneum*) ist das Genom von *Calliphora vicina* bis zum jetzigen Zeitpunkt noch nicht sequenziert. Zur Identifizierung von Rezeptorsequenzen konnte deshalb keine Genomanalyse genutzt werden, sondern die Sequenzen mussten alternativ ermittelt werden. In PCR-Experimenten mit degenerierten Primern konnten erste rezeptorspezifische Fragmente amplifiziert werden. Mit dem Einsatz weiterer PCR-Techniken gelang dann die Amplifikation der vollständigen cDNAs eines 5-HT_{2a}- und eines 5-HT₇-Rezeptors. In der abgeleiteten Aminosäuresequenz beider Rezeptoren finden sich viele konservierte Aminosäurereste bzw. Sequenzbereiche, die für die strukturelle Stabilität, die Aktivierung und die Signaltransduktion von G-Proteingekoppelten 5-HT-Rezeptoren essentiell sind. Einige davon sollen im Folgenden näher betrachtet werden.

4.1.1 Die heptahelikale Struktur

Ein grundlegendes Merkmal aller GPCRs ist das Vorhandensein von sieben hydrophoben, membrandurchspannenden α -Helices. Diese Transmembrandomänen sind durch alternierende intra- und extrazelluläre Schleifen verbunden. Der N-Terminus liegt extrazellulär und der C-Terminus ist im Zytosol lokalisiert. Strukturelle Analysen bestätigten das Vorhandensein dieser charakteristischen Merkmale sowohl für den Cv-5HT_{2a}- als auch den Cv5-HT₇-Rezeptor und erlauben somit die Einordnung der Rezeptoren in die GPCR-Supergenfamilie.

Interessanterweise offenbarte die Hydrophathieanalyse für den Cv5-HT₇-Rezeptor im N-Terminus die Existenz einer weiteren hydrophoben Domäne. Diese Besonderheit lässt sich auch bei anderen GPCRs mit langem N-Terminus nachweisen. So besitzen der Dm5-HT₇ (Witz *et al.*, 1990) und der Aa5-HT₇ (Pietrantonio *et al.*, 2001) aber auch eine Vielzahl anderer GPCRs der Klasse A, wie der Tyraminrezeptor aus *Drosophila melanogaster* (Saudou *et al.*, 1990) oder der Thyrotropinrezeptor aus *Canis lupus* (Parmentier *et al.*, 1989) einen achten hydrophoben Bereich in ihrer Aminosäuresequenz. Die Funktion dieser zusätzlichen hydrophoben Region ist unbekannt. Es wird spekuliert, dass dieser Bereich eine Signalsequenz darstellt, die möglicherweise abgespalten wird (Baxter & Barker, 1999; Saudou *et al.*, 1992).

Als weitere strukturelle Besonderheiten sollen noch die ungewöhnliche lange dritte zytoplasmatische Schleife des Cv5-HT_{2α} sowie die überdurchschnittlich langen N-Termini beider Rezeptoren erwähnt werden. Während die ICL3 bei den meisten GPCRs eine Länge von etwa 70-80 Aminosäureresten aufweist, umfasst sie beim Cv5-HT_{2α} 413 Reste. Eine ähnlich lange ICL3 besitzen auch die 5-HT₂-Rezeptoren von *Lymnaea stagnalis* (Gerhardt *et al.*, 1996) und *Drosophila melanogaster* (Colas *et al.*, 1995). Mutationsstudien an muskarinischen Rezeptoren zeigten, dass nur die N- und C-terminalen Bereiche der Schleife für eine funktionelle Kopplung an G-Proteine notwendig sind (Wess *et al.*, 1997). Lange Schleifen können zahlreiche Phosphorylierungsstellen enthalten. An diesen kann eine Agonist- oder second-messenger-abhängige Phosphorylierung stattfinden (Liggett *et al.*, 1992; Lembo & Albert, 1995; Namkung & Sibley, 2004), welche zur Desensitisierung des Rezeptors führt (Tsuga *et al.*, 1998; Haga *et al.*, 2002). Möglicherweise enthält der zentrale Bereich der ICL3 auch Interaktionsstellen für regulatorische Proteine, welche die Signalübertragung beeinflussen. So wurde nachgewiesen, dass RGS-Proteine (*regulators of G-protein signalling*) und G_{βγ} direkt an die ICL3 von 5-HT_{1A}- und 5-HT_{2A}-Rezeptoren (Ghavami *et al.*, 2004) und G_{βγ} an die ICL2 von 5-HT_{1A}-Rezeptoren (Kushwaha *et al.*, 2006) binden und dadurch die Signalweiterleitung über G_α-Proteine modulieren.

Beide *Calliphora*-5-HT-Rezeptoren besitzen eine relativ lange N-terminale Region, die bei Cv5-HT_{2α} 533 Aminosäurereste und bei Cv5-HT₇ 276 Aminosäurereste umfasst. Dies ist ungewöhnlich, da aminerge Rezeptoren zumeist einen kurzen N-Terminus besitzen (Strader *et al.*, 1995; Probst *et al.*, 1992). Allerdings weisen auch die 5-HT₂-Rezeptoren von *Lymnaea stagnalis* und *Drosophila melanogaster* einen äußerst langen N-Terminus auf. Möglicherweise enthalten diese Bereiche Signalpeptide, die abgespalten werden.

4.1.2 Betrachtungen zu einigen konservierten Sequenzmotiven

Vergleicht man die Aminosäuresequenzen der beiden Rezeptoren mit denen von anderen bekannten Serotoninrezeptoren, lassen sich in den TM 2, 5 und 7 viele der bei 5-HT-Rezeptoren konservierten Aminosäurereste identifizieren. Diese konservierten Aminosäuren spielen unter anderem für die Rezeptorstabilität, die Ligandenbindung und die G-Protein-Aktivierung eine wichtige Rolle. Das bei GPCRs hoch-konservierte NPXXY-Motiv am zytoplasmatischen Ende der TM7 besitzt eine

Schlüsselfunktion bei der Rezeptoraktivierung. Erwartungsgemäß lässt sich dieses Motiv auch in beiden Rezeptoren nachweisen.

Erstaunlicherweise enden alle bislang charakterisierten Insekten-5-HT₇-Rezeptoren auf der Aminosäurenabfolge Glu-Ser-Phe-Leu. Dieses Motiv konnte auch in der Sequenz des Cv5-HT₇ identifiziert werden und stellt möglicherweise ein Klasse I Bindemotiv für PDZ-Domänen-Proteine dar (Sheng & Sala, 2001). Dies lässt vermuten, dass der Rezeptor als Adapter fungiert und Signalmoleküle zu einem Signaltransduktionskomplex organisiert (Sheng & Sala, 2001; Bockaert *et al.*, 2003). PDZ-Domänen Proteine beeinflussen die Lokalisation, die Signaltransduktion sowie die Desensibilisierung und Internalisierung von GPCRs (Sheng & Sala, 2001; Bockaert *et al.*, 2003). Bechamel *et al.* (2004) konnten für humane 5-HT_{2A/C}-Rezeptoren eine PDZ-Bindedomäne im C-Terminus und deren Interaktion mit PDZ-Proteinen nachweisen. Für Insekten-5-HT₇-Rezeptoren wurde eine solche Interaktion noch nicht untersucht.

Die zytoplasmatischen Bereiche der TM 3 und TM 6 sind in inaktiven GPCRs in räumlicher Nähe, bei Rezeptoraktivierung findet eine Konformationsänderung statt, welche die TM auseinanderrücken lässt (Kroeze *et al.*, 2002; Shapiro *et al.*, 2002). Das konservierte DRY-Motiv an der Grenze der TM 3 zur ICL2 ist an der Vermittlung dieses Vorgangs maßgeblich beteiligt. Der konservierte Argininrest (R) in TM 3 interagiert dabei mit dem benachbarten Aspartatrest (D) und einem konservierten Glutamat in der TM 6. Mutationen, die diese Triade verändern, lösten in Säugetierrezeptoren konstitutive Aktivität aus (Shapiro *et al.*, 2002). Die Konservierung der einzelnen Aminosäurereste dieses Motivs ist sehr unterschiedlich. Für das Arginin ist die Konservierung mit 96 % am höchsten. Die Positionen des Aspartats und Tyrosins sind dagegen nur mit 66 bzw. 67 %iger Wahrscheinlichkeit konserviert (Mirzadegan *et al.*, 2003). Während im Cv5-HT₇-Rezeptor das DRY-Motiv unverändert vorliegt, ist beim Cv5-HT_{2a}-Rezeptor der Asparaginrest durch einen Glycinrest (G₆₂₆) ersetzt. Eine ähnliche Substitution wurde auch für den Dm5-HT_{2a} und den Am5-HT_{2a} berichtet und ist möglicherweise ein typisches Merkmal für Insekten-5-HT_{2a}-Rezeptoren. Interessanterweise findet man das QIYATL-Motiv aus der TM 5 des Cv5-HT₇-Rezeptors ausschließlich in Invertebraten-5-HT₇ Rezeptoren (Lee *et al.*, 2009). Welche Funktion dieses stark konservierte Motiv haben könnte, ist bisher unbekannt.

4.1.3 Alternatives Spleißen

Die Gene für Serotoninrezeptoren lassen sich in zwei Gruppen unterteilen: Solche, die durch ein einzelnes Exon kodiert werden wie z.B. die 5-HT_{1a-f}-Rezeptoren des Menschen (Kobilka *et al.*, 1987; Fargin *et al.*, 1988) und solche, die durch Introns unterbrochen werden wie z. B. der menschliche 5-HT₂-Rezeptor (Chen *et al.*, 1992). Für Rezeptoren die Introns enthalten, können durch alternatives Spleißen der prä-mRNA verschiedene Spleißvarianten eines Rezeptorsubtypes produziert werden (Heidmann *et al.*, 1997). Bei dieser posttranslationalen Modifikation können aus der prä-mRNA ein oder mehrere komplette Exons entfernt werden, Introns beibehalten werden oder auch alternative Exons verwendet werden (Black, 2003). Durch diesen Prozess wird die Rezeptorvariabilität entscheidend erhöht. Alternatives Spleißen wurde für eine Vielzahl von Vertebraten-Rezeptor-mRNAs beschrieben (Matthes *et al.*, 1993; Monsma *et al.*, 1993; Canton *et al.*, 1996; Heidmann *et al.*, 1997), aber auch bei Invertebraten konnte diese Form der mRNA-Prozessierung nachgewiesen werden. So werden zum Beispiel die Am5-HT_{2α}- und Am5-HT_{2β}-Rezeptoren (Thamm, 2009) sowie der PeaDop2-Rezeptor (Troppmann, 2009) alternativ gespleißt. Für Cv5-HT_{2α} konnten zwei verschiedene Varianten des Rezeptors kloniert werden, die sich in der Länge der ICL3 unterscheiden. In der kürzen Variante des Cv5-HT_{2α}-Rezeptors fehlt ein Bereich aus der Mitte der ICL3. Alle für die Struktur und Funktion wichtigen Aminosäuren sind jedoch vorhanden. Daher ist davon auszugehen, dass diese Variante funktionsfähig ist. Die ICL3 der langen Cv5-HT_{2α}-Variante ist mit 413 Aminosäureresten überdurchschnittlich lang. Es kann daher vermutet werden, dass es sich um eine unvollständig prozessierte Rezeptorvariante handelt. Bei PCR-Experimenten wurde die längere Variante durchgängig deutlich stärker amplifiziert. Möglicherweise ist die Synthese der Rezeptor-prä-mRNA deutlich schneller als die mRNA-Editierung, wodurch die längere Variante der Rezeptor-mRNA akkumuliert.

Für den Cv5-HT₇-Rezeptor wurden keine alternativ gespleißten mRNAs gefunden. Dies ist kongruent zu den Ergebnissen für den Am5-HT₇-Rezeptor. Obwohl dieser aus mehreren Exons gebildet wird, konnte für diesen Rezeptor ebenfalls kein alternatives Spleißen nachgewiesen werden (Schlenstedt, 2005).

4.1.4 Posttranslationale Modifikationen

In lebenden Zellen unterliegen synthetisierte Proteine oft vielfältigen posttranslationalen Veränderungen wie zum Beispiel Glykosylierungen, Palmitoylierungen, Methylierungen, Ubiquitinierungen und Phosphorylierungen. Diese Proteinmodifikationen können unter anderem die Funktionalität und Aktivität von Membranproteinen maßgeblich beeinflussen.

Bei der Glykosylierung werden einem Protein an bestimmten Aminosäureresten Oligosaccharidketten hinzugefügt. Man unterscheidet dabei, je nachdem an welchem Aminosäurerest dies geschieht, O- und N-Glykosylierung. N-Glykosylierungen finden an Asparaginresten innerhalb konservierter Konsensussequenzen statt. Es wird vermutet, dass diese Modifikation eine wichtige Rolle für Proteinfaltung, -stabilität, -targeting sowie für Zell-Zellkontakte spielt und möglicherweise auch eine regulatorische Rolle bei der Signaltransduktion übernimmt (Rands *et al.*, 1990; Davis *et al.*, 1995). Für beide in dieser Arbeit untersuchten Rezeptoren konnten im N-Terminus Konsensusstellen für N-Glykosylierungen (17 für Cv5-HT_{2a} und 11 für Cv5-HT₇) identifiziert werden. In Western-Blot-Analysen konnte eine Glykosylierung des heterolog exprimierten Cv5-HT₇ nachgewiesen werden. Über den Glykosylierungsstatus des Cv5-HT_{2a}-Rezeptors ist keine Aussage möglich. In Ermangelung eines selektiven Antikörpers konnte der Rezeptor weder in HEK-Zellen noch im nativen Gewebe eindeutig identifiziert werden. Aufgrund der vielen putativen N-Glykosylierungsstellen liegt aber die Vermutung nahe, dass auch dieser Rezeptor glykosyliert wird.

Eine andere weit verbreitete posttranslationale Modifikation stellt das Anfügen von langen Fettsäureketten, meist Palmitinsäure, im C-Terminus dar. Über eine kovalente Thioesterbindung wird die Fettsäure an konservierte Cysteinreste des Proteins gebunden. Im C-Terminus von Cv5-HT_{2a} und Cv5-HT₇ befinden sich konservierte Cysteine, die möglicherweise palmitoyliert werden könnten. Über eine Palmitoylierung würde der C-Terminus in der Plasmamembran verankert werden. Dies würde zur Bildung einer zusätzlichen intrazellulären Schleife führen (Ponimaskin *et al.*, 2002). Funktionell kann eine solche Palmitoylierung die Kopplung an G-Proteine (Moffett *et al.*, 1993; Hayashi & Haga, 1997; Papoucheva *et al.*, 2004) und den korrekten Transport der Rezeptorproteine zur Plasmamembran beeinflussen (Ng *et al.*, 1994; Renner *et al.*, 2007). Weiterhin konnte für die Cystein-Palmitoylierung eine modulierende Funktion auf Desensitisierungsvorgänge (Moffett *et al.*, 1993; Ponimaskin *et al.*, 2005) oder die

Rezeptoroligomerisierung (Kobe *et al.*, 2008) nachgewiesen werden. Ob die in dieser Arbeit untersuchten 5-HT-Rezeptoren von *Calliphora* palmitoyliert werden und welche Funktion diese Palmitoylierung erfüllt, müsste in weiterführenden Experimenten untersucht werden.

Zusätzlich werden GPCRs häufig durch unterschiedliche Kinasen (second messenger-abhängige Proteinkinasen wie PKA und PKC sowie GRKs) phosphoryliert. Eine solche Phosphorylierung wird meist als Antwort auf die Bindung eines Agonisten ausgelöst (Ferguson, 2001). Die Analyse der Aminosäuresequenz des Cv5-HT_{2a} und Cv5-HT₇ ergaben eine Vielzahl von Konsensussequenzen für die Phosphorylierung. Im Rahmen dieser Arbeit wurde experimentell nicht untersucht, ob und durch welche Enzyme Phosphorylierungen stattfinden. Funktionell wirkt eine Phosphorylierung meist regulatorisch auf die Rezeptordesensibilisierung (Raymond & Olsen, 1994) und -internalisierung (Ferguson & Caron, 1998). Es wäre aber auch möglich, dass Agonist-induzierte Phosphorylierungen die Rezeptoren von den G-Protein-abhängigen Signalkaskaden entkoppeln. Dadurch können G-Protein-unabhängige Signalwege aktiviert werden, wie für den β_2 -adrenergen Rezeptor gezeigt werden konnte (Luttrell & Lefkowitz, 2002).

4.2 Funktionelle Charakterisierung der heterolog exprimierten 5-HT-Rezeptoren

Für die funktionelle Charakterisierung und pharmakologische Analyse wurden die *Cv5-ht2a*- und *Cv5-ht7*-cDNAs stabil in das Genom von HEK 293-Zellen integriert. Dieser experimentelle Ansatz wurde in der Vergangenheit schon erfolgreich in mehreren anderen Studien zur Charakterisierung verschiedener aminergerezeptoren von Insekten angewendet (Blenau *et al.*, 1998; 2000; Grohmann *et al.*, 2003; Schlenstedt *et al.*, 2006; Rotte *et al.*, 2009; Troppmann *et al.*, 2010; Thamm *et al.*, 2010). Für den Cv5-HT_{2a}-Rezeptor gestaltete sich die Transfektion und stabile Expression des Rezeptors in seiner gesamten Länge als äußerst schwierig. Möglicherweise beeinflusst der lange N-Terminus des Rezeptors eine erfolgreiche Expression. Für andere Serotoninrezeptoren mit einem überdurchschnittlich langen N-Terminus wurden ebenfalls Expressionsprobleme berichtet (Saudou *et al.*, 1992; Gerhardt *et al.*, 1996). Eine Verkürzung der N-terminalen Bereiche führte sowohl für die 5-HT_{1A}- und 5-HT_{1B}-Rezeptoren aus *Drosophila* als auch für den 5-HT₂-Rezeptor aus *Lymnaea stagnalis* zu einer deutlichen Erhöhung der

Expressionsraten (Saudou *et al.*, 1992; Gerhardt *et al.*, 1996). Es wurde daher für den Cv5-HT_{2α}-Rezeptor eine trunkierte Variante konstruiert, bei welcher der Rezeptor N-terminal um 468 Aminosäuren verkürzt wurde. Der noch verbliebene Bereich vor Beginn der ersten Transmembrandomäne entsprach nun in etwa der Länge anderer 5-HT₂-Rezeptoren. Mit der trunkierten Rezeptorvariante Cv5-HT_{2αN} gelang letztlich die stabile Expression des Rezeptorproteins in HEK 293-Zellen. Studien an D1-Rezeptoren von *Drosophila* (Gotzes & Baumann, 1996) und 5-HT₂-Rezeptoren der Ratte (Buck, 1991) zeigten, dass eine Deletion der N-terminalen Bereiche bis kurz vor Beginn der ersten Transmembrandomäne die funktionellen und pharmakologischen Eigenschaften der Rezeptoren nicht maßgeblich beeinflusst. Beim Dm5-HT_{2α} hingegen führte eine einzelne Punktmutation (Schaerlinger *et al.*, 2007) oder die vollständige Trunkierung des N-Terminus (Colas *et al.*, 1997) zu einer signifikanten Zunahme der Affinität für Serotonin. Dies lässt vermuten, dass der N-Terminus indirekt an der Ligandbindung beteiligt ist, z. B. durch die Beeinflussung der Konformation der Ligandenbindungstasche für Serotonin.

Im heterologen System konnte die Rezeptorexpression nur für Cv5-HT₇ durch Western-Blot-Analysen und immunzytochemisch nachgewiesen werden. Der Nachweis der Expression von Cv5-HT_{2αN} konnte in Ermangelung eines geeigneten Antikörpers nur über einen funktionellen Assay erfolgen. Mit Hilfe von Calcium-Imaging wurde daher überprüft, ob die untersuchten Zellen auf die Gabe eines Agonisten mit einer Erhöhung der [Ca²⁺]_i reagierten.

4.2.1 Der Cv5-HT_{2αN}-Rezeptor ist ein funktioneller Serotoninrezeptor

Rezeptoren der 5-HT₂-Klasse koppeln über G_{q/11}-Proteine an die PLC und lösen bei Aktivierung IP₃-vermittelt eine Erhöhung der [Ca²⁺]_i aus (Hoyer, 2002).

Eine spezifische Erhöhung der [Ca²⁺]_i konnte in Cv5-HT_{2αN}-exprimierenden Zellen nur von 5-HT ausgelöst werden. Interessanterweise verursachte Histamin in transfizierten und nicht transfizierten HEK-Zellen ebenfalls einen signifikanten Anstieg der [Ca²⁺]_i. Dies ist höchstwahrscheinlich auf die Aktivierung von endogenen Rezeptoren in den HEK 293-Zellen zurückzuführen. Die von Atwood *et al.* (2011) untersuchten Expressionsprofile endogener Rezeptoren in HEK 293-Zellen zeigten, dass u. a. auch aminerge Rezeptoren (verschiedene Dopamin-, Serotonin- und Histaminrezeptoren) exprimiert werden. Eine Erhöhung der [Ca²⁺]_i kann in HEK 293-Zellen z. B. durch die Aktivierung des endogenen H₁-

Histamin-Rezeptor hervorrufen werden (Vetter & Lewis, 2010). Zusätzlich sind die HEK 293-Zellen in der Lage sich aufgrund des geringen Selektionsdrucks zu verändern (Friedman *et al.*, 2002, Clark & Baro, 2007) und neben den bekannten endogenen Rezeptoren noch weitere Rezeptoren zu exprimieren (A. Baumann, persönliche Mitteilung). Dies kann zum Beispiel auch zur Expression von endogenen aminergen Rezeptoren führen, welche einen Dopamin- bzw. Octopamin-induzierten Anstieg der $[cAMP]_i$ verursachen (Rotte *et al.*, 2009). Auf nicht transfizierte HEK 293-Zellen der in dieser Arbeit verwendeten Zellcharge zeigte Serotonin keinerlei Wirkung. Die beobachtete selektive Affinität für 5-HT ermöglichte eine pharmakologische Analyse der transfizierten Cv5-HT_{2αN}-Zelllinie. Serotonin bewirkt eine konzentrationsabhängige Zunahme der $[Ca^{2+}]_i$ mit einem EC₅₀-Wert von 24 nM. Cv5-HT_{2αN} kann daher als funktioneller 5-HT₂-Rezeptor eingestuft werden. Der ermittelte EC₅₀-Wert des Cv5-HT_{2αN}-Rezeptors liegt im Bereich der EC₅₀-Werte, die für 5-HT₂-Rezeptoren anderer Invertebraten beschrieben wurden. Die Werte der Rezeptoren aus *Panulirus interruptus* (5-HT_{2βPan}) und *Procambarus clarkii* (5-HT_{2βPro}) sind mit 52 bzw. 27 nM (Spitzer *et al.*, 2008) dem für *Calliphora* sehr ähnlich. *Lymnaea stagnalis* besitzt mit 113,9 nM (Gerhardt *et al.*, 1996) einen 4-mal so hohen EC₅₀-Wert. Am5-HT_{2α} und Am5-HT_{2β} mit EC₅₀-Werten mit 27 nM und 17 nM werden bei ähnlichen Konzentrationen wie Cv5-HT_{2αN} halbmaximal aktiviert (M. Thamm, persönliche Mitteilung).

4.2.2 Der Cv5-HT₇-Rezeptor ist ein funktioneller Serotoninrezeptor

Es konnte gezeigt werden, dass der Cv5-HT₇-Rezeptor spezifisch auf Serotonin mit einer Erhöhung der $[cAMP]_i$ reagiert, wobei der EC₅₀-Wert für 5-HT bei 4,1 nM liegt. Dieser Wert ist rund sechsfach geringer als der für den Cv5-HT_{2αN}-Rezeptor, ist aber mit den EC₅₀-Werten anderer 5-HT₇-Rezeptoren aus Vertebraten und Invertebraten vergleichbar. Von allen bisher charakterisierten Invertebraten-5-HT₇-Rezeptoren liegt der EC₅₀-Wert für *Apis mellifera* mit 1,06 nM (Schlenstedt *et al.*, 2006) am niedrigsten. Der 5-HT₇-Rezeptor von *Aedes aegypti* zeigt eine halbmaximale Stimulierung bei 39,5 nM 5-HT (Lee & Pietrantonio, 2003). Für den orthologen Rezeptor von *Drosophila* wurde ein Wert von 60 nM 5-HT ermittelt (Witz *et al.*, 1990). Die EC₅₀-Werte für den 5-HT₂ Rezeptor des Nematoden *Caenorhabditis elegans* und der Meeresschnecke *Aplysia californica* sind mit 7,53 nM (Hobson *et al.*, 2003) bzw. 6 nM (Lee *et al.*, 2009) sogar fast identisch mit dem für *Calliphora vicina* ermittelten Wert. 5-HT₇-Rezeptoren aus Säugetieren

hingegen scheinen erst bei wesentlich höheren 5-HT-Konzentrationen halbmaximal aktiviert zu werden (Bard *et al.*, 1993; Shen *et al.*, 1993; Adham *et al.*, 1998).

Physiologische Untersuchungen an der Speicheldrüse von *Calliphora vicina* haben gezeigt, dass Histamin in millimolaren Konzentrationen sowohl den cAMP-Weg als auch den $[Ca^{2+}]_i$ -Weg aktiviert (Schmidt, 2006). Interessanterweise löste Histamin in den Cv5-HT₇-exprimierenden Zellen in der unphysiologisch hohen Konzentration von 10 mM eine signifikante Erhöhung der $[cAMP]_i$ aus, die in etwa der durch 1 μ M 5-HT ausgelösten Antwort entspricht. Der in den Speicheldrüsen beobachtete Histamineffekt könnte über die Aktivierung eines spezifischen Histaminrezeptor erfolgen. Bislang wurde jedoch noch kein metabotroper Histaminrezeptor von Invertebraten kloniert und charakterisiert. Die extrem hohe Histaminkonzentration, die zur Auslösung einer Ca^{2+} -Antwort nötig ist und die Tatsache, dass bisher keine Histaminrezeptoren in den Speicheldrüsen von *Calliphora* nachgewiesen werden konnten, spricht allerdings dafür, dass Histamin unspezifisch über die 5-HT-Rezeptoren wirkt.

Viele 5-HT-Rezeptoren der Vertebraten und Invertebraten zeigen konstitutive Aktivität (Krobert & Levy, 2002; Seifert & Wenzel-Seifert, 2002; Hobson *et al.*, 2003; Schlenstedt *et al.*, 2006; Troppmann *et al.*, 2010). Die im Rahmen dieser Arbeit gewonnen Ergebnisse lassen jedoch keinen Rückschluss auf eine konstitutive Aktivität zu.

4.2.3 Pharmakologie der rekombinanten Rezeptoren

Für beide rekombinanten Rezeptoren wurde ein umfangreiches pharmakologisches Profil erstellt. Bei den getesteten Rezeptorliganden handelt es sich hauptsächlich um bekannte Agonisten und Antagonisten von 5-HT-Rezeptoren der Vertebraten, die teilweise auch schon zur Charakterisierung von 5-HT-Rezeptoren verschiedener Invertebraten eingesetzt wurden.

Agonisten

Von den verwendeten synthetischen Agonisten zeigen nur 5-CT, 5-MeOT und 8-OH-DPAT eine deutliche agonistische Wirkung am Cv5-HT_{2 α N}-Rezeptor. Im Vergleich zu Serotonin besitzen sie allerdings eine geringe Affinität und Effektivität. Untersuchungen an 5-HT₂-Rezeptoren aus *Apis mellifera* (Am5-HT_{2 α} ; Thamm, 2009), *Panulirus interruptus* (5-HT_{2 β Pan}) und *Procambarus clarkii* (5-HT_{2 β Pro}) ermittelten ähnliche Affinitäten für diese Rezeptorliganden (Spitzer *et al.*, 2008).

Keine der getesteten Substanzen scheint als selektiver Agonist für den Cv5-HT_{2αN}-Rezeptor zu wirken. Allerdings zeigt 5-MeOT eine höhere Affinität für Cv5-HT_{2αN} als für Cv5-HT₇. Konzentrationen von ≤100 nM würden daher nur den 5-HT₂-Rezeptor aktivieren.

Auf den Cv5-HT₇-Rezeptor wirkten alle getesteten Substanzen aktivierend. Die Effektivitäten waren jedoch äußerst niedrig. Während für 5-HT und R-(+)-Lisurid nanomolare EC₅₀-Werte ermittelt wurden, liegt die Affinität des Rezeptors für alle weiteren Substanzen deutlich niedriger, mit 10 bis 1500fach höheren EC₅₀-Werten. Alle bisher charakterisierten 5-HT₇-Rezeptoren der Wirbeltiere besitzen eine höhere Affinität für 5-CT als für 5-HT (Gerhardt & van Heerikhuizen, 1997). Bei 5-HT₇-Rezeptoren von Invertebraten hingegen ist die Affinität für 5-HT am höchsten (Witz *et al.*, 1990; Lee & Pietrantonio, 2003; Schlenstedt *et al.*, 2006). Dies konnte auch für den Cv5-HT₇ ermittelt werden.

Für den Cv5-HT₇-Rezeptor konnten die 5-HT-Rezeptorliganden AS 19, R-(+)-Lisurid und Methysergid als selektive Agonisten identifiziert werden. Der 5-HT₇-Rezeptor zeigte für 5-CT eine höhere Affinität als der 5-HT_{2N}-Rezeptor. Bei Konzentrationen ≤1 μM sollte deshalb eine selektive Aktivierung des 5-HT₇-Rezeptor möglich sein.

Interessanterweise wirken alle getesteten Agonisten für beide Rezeptoren als partielle Agonisten.

Antagonisten

Der durch Serotonin induzierte Effekt auf den heterolog exprimierten Cv5-HT_{2αN}-Rezeptor kann durch Methiothepin, Mianserin und Cyproheptadin deutlich inhibiert werden. Während Mianserin und Cyproheptadin den 5-HT-Effekt um ca. 70 % reduzieren, inhibiert Methiothepin den Effekt fast vollständig.

Im Vergleich mit anderen Invertebraten weist der 5-HT_{2αN}-Rezeptor für Antagonisten ein nahezu identisches pharmakologisches Profil wie die 5-HT_{2α}-Rezeptoren aus *Drosophila melanogaster*, *Lymnaea stagnalis* und *Apis mellifera* auf (Colas *et al.*, 1995; Gerhardt *et al.*, 1996; Thamm, 2009).

Eine selektive antagonistische Wirkung auf Cv5-HT_{2αN}-Rezeptoren zeigten nur Methiothepin und Methysergid. Im Vergleich ist Methiothepin schon in viel geringeren Konzentrationen wirksam und zudem deutlich effektiver als Methysergid. In höheren Konzentrationen (≥10 μM) wirkt Methiothepin allerdings auch auf den Cv5-HT₇-Rezeptor leicht inhibierend.

Der stimulierende Effekt von 5-HT am heterolog exprimierten Cv5-HT₇-Rezeptor lässt sich durch Clozapin, Cinanserin, Prazosin und Spiperon, SB269970 blockieren. Die stärkste inhibitorische Wirkung wurde mit Clozapin erzielt (Reduzierung der Serotonin-Antwort um 77 %). Obwohl Methysergid normalerweise bei Säugtieren als 5-HT₂- und 5-HT₁-Rezeptorantagonist wirkt, ist auf den Cv5-HT₇-Rezeptor erstaunlicherweise eine agonistische Wirkung zu beobachten. Solche agonistischen Effekte wurden auch schon für verschiedene 5-HT-Rezeptorsubtypen beschrieben (Colpaert *et al.*, 1979).

Das pharmakologische Profil des Cv5-HT₇-Rezeptors unterscheidet sich deutlich von dem anderer Invertebraten. So zeigen z. B. der Am5-HT₇ und Ce5-HT₇ eine deutlich höhere Affinität für Methiothepin, wohingegen Clozapin am Am5-HT₇ keine Wirkung zeigte (Schlenstedt *et al.*, 2006, Hobson *et al.*, 2003).

In Konzentrationen von $\leq 1 \mu\text{M}$ sollten Cinanserin, Spiperon und Clozapin nur den Cv5-HT₇-Rezeptor blockieren. Der in Säugetieren hochwirksame 5-HT₇-Antagonist SB269970 wirkt zwar schon bei nanomolaren Konzentrationen inhibierend auf Cv5-HT₇, die Effektivität ist allerdings äußerst gering. Daher wurde diese Substanz nicht als putativer Antagonist im nativen System getestet.

4.3 5-HT-Rezeptoren in den Speicheldrüsen von *Calliphora vicina*

4.3.1 Lokalisation der 5-HT-Rezeptoren

In RT-PCR-Analysen konnte die *Cv5-ht2a*-mRNA im Gehirn und in den Speicheldrüsen von *Calliphora vicina* nachgewiesen werden. Die *Cv5-ht7*-mRNA ließ sich zusätzlich noch in den Malpighischen Gefäßen und der Flugmuskulatur detektieren. Bei *Periplaneta americana* und *Apis mellifera* konnten in diesen Geweben ebenfalls die Transkripte orthologer Rezeptoren nachgewiesen werden (Schlenstedt *et al.*, 2006; Troppmann, 2009). Im Gegensatz zur *Cv5-ht2a*-mRNA konnten allerdings auch geringe Mengen der *Am5-ht2a*-mRNA in den Malpighischen Gefäßen und der Flugmuskulatur identifiziert werden (Schlenstedt *et al.*, 2006).

Im Rahmen dieser Arbeit sollten spezifische Antiseren gegen Teilstücke des N-Terminus und der ICL3 der Cv5-HT-Rezeptoren generiert werden. Mit Hilfe dieser Antikörper sollte die Verteilung der Rezeptorproteine in der Speicheldrüse untersucht werden. Es konnte jedoch nur ein Antiserum genutzt werden, da nur dieses spezifisch das Cv5-HT₇-Protein in transfizierten HEK 293-Zellen und

Speicheldrüsen- bzw. Gehirnhomogenaten erkennt. Das Antiserum gegen Epitope im N-Terminus von Cv5-HT₇ markiert in den HEK-Zellen mehrere Proteinbanden zwischen 60-80 kDa und eine weitere Bande bei etwa 50 kDa. Identische Banden werden von einem anti-HA-Tag-Antikörper detektiert. Dagegen wird in Speicheldrüsen- bzw. Gehirnhomogenaten sehr prominent ein Protein mit einem Molekulargewicht von ca. 130 kDa detektiert. Wesentlich schwächer wird eine weitere Proteinbande bei ca. 70 kDa markiert. In Gehirnhomogenaten findet man zusätzlich noch eine Bande bei ca. 50 kDa. Die 70 kDa Proteinbande entspricht dabei in etwa dem errechneten Molekulargewicht des Rezeptors (73,1 kDa). Es ist nicht ungewöhnlich, dass GPCRs bei Western-Blot-Analysen aufgrund zahlreicher posttranslationaler Modifikationen einen Größenunterschied zu ihrem erwarteten Molekulargewicht aufweisen. Die Glykosylierung der 11 putativen N-Glykosylierungsstellen im N-Terminus des Rezeptors könnte die beobachtete Größenzunahme erklären. Meist wird das Molekulargewicht durch Glykosylierungen um etwa 20-40 kDa erhöht. Die N-Glykosylierung des orthologen 5-HT₇-Rezeptors aus *Apis mellifera* führte zu einer Molekulargewichtszunahme von ca. 14 kDa (Schlenstedt *et al.*, 2006). Obwohl es ungewöhnlich ist, dass Proteine so stark glykosyliert sind, dass ihr Molekulargewicht verdoppelt wird, kann diese Möglichkeit nicht vollends ausgeschlossen werden. Allerdings konnte durch ein PNGase F-Verdau keine Verringerung des Molekulargewichts oder die Abnahme der Intensität der hochmolekularen Bande festgestellt werden, wie es nach einer Deglykosylierung zu erwarten wäre.

Eine Oligomerisierung des Rezeptors könnte gegebenenfalls die größere Proteinbande erklären. Dabei wäre eine Homodimerisierung mit einem weiteren Cv5-HT₇-Rezeptormolekül oder eine Heterodimerisierung mit einem anderen Rezeptor (z. B. Cv5-HT_{2a}) denkbar. Erst kürzlich wurde die Heterodimerisierung eines 5-HT₇-Rezeptors mit einem 5-HT_{1A}-Rezeptor beschrieben (Renner *et al.*, 2012). Für andere 5-HT-Rezeptorsubtypen sind Homo- und Heterodimerisierungen ebenfalls beschrieben worden (Xie *et al.*, 1999; Herrick-Davis *et al.*, 2004; 2005). Trotz verschiedenster Behandlungen und Präparationsvarianten konnte bei den Western-Blot-Analysen keine Veränderung in der Intensität der 130- und der 70-kDa-Bande detektiert werden. Oft sind GPCR-Aggregate, deren Molekulargewicht dem eines Dimers entspricht, nach einer SDS-Gelelektrophorese noch im Gel detektierbar (Milligan, 2004). Falls dies auch hier der Fall wäre, müsste man ausgehend vom detektierten Verhältnis der beiden Banden annehmen, dass der Großteil des Rezeptors als SDS-resistentes Dimer vorliegt.

In Gewebeschnitten markiert derselbe Antikörper ausschließlich die basolaterale Plasmamembran und entspricht der Markierung für die ebenfalls basolateral lokalisierte Na⁺-K⁺-ATPase (Zimmermann *et al.*, 2003). Diese Verteilung war so zu erwarten.

4.3.2 Effekte der Agonisten und Antagonisten auf das TEP der Speicheldrüsen

Durch die pharmakologischen Experimente an den heterolog exprimierten 5-HT-Rezeptoren konnten Substanzen identifiziert werden, mit denen eine selektive Aktivierung oder Inaktivierung des Cv5-HT_{2a} bzw. Cv5-HT₇-Rezeptors möglich ist. Es galt nun herauszufinden, inwieweit sich diese Ergebnisse auch auf ein intaktes Insektenorgan übertragen lassen. Dies wurde über Messungen des transepithelialen Potentials der Speicheldrüsen von *Calliphora vicina* realisiert. Das Ziel war einen Wirkstoff zu finden, der in einem Gewebe, in dem beide Rezeptorsubtypen vorliegen, selektiv entweder auf den Cv5-HT_{2a}- oder den Cv5-HT₇-Rezeptor wirkt. Von den getesteten Pharmaka wurden deshalb für die TEP-Messungen nur solche ausgewählt, die an den heterolog exprimierten Rezeptoren subtypspezifisch wirkten.

In Folge einer Stimulation mit 30 nM 5-HT zeigt das TEP von Schmeißfliegen-Speicheldrüsen einen typischen biphasischen Verlauf.

Durch die 5-HT-Applikation wird zunächst eine Ca²⁺-abhängige Erhöhung der Cl⁻-Leitfähigkeit des Epithels ausgelöst und führt zu einer Negativierung des TEPs. Die sich anschließende Positivierung, welche beim Auswaschen der Liganden zu beobachten ist, wird durch den cAMP-gesteuerten Kationentransport über die Apikalmembran ausgelöst. Diese zeitlich verzögerte Änderung wird durch die schnelle Aktivierung und Inaktivierung des Ca²⁺-Signalweges und die verzögerte Aktivierung und Inaktivierung des cAMP-Signalweges hervorgerufen (Berridge & Prince, 1971; 1972).

Agonisten

Die Pharmakologie der heterologen Rezeptoren ließ vermuten, dass 5-MeOT in nanomolaren Konzentrationen eine selektive Aktivierung des Cv5-HT_{2a} Rezeptors ermöglicht. Mit Hilfe der TEP-Messungen an Speicheldrüsen konnte diese Vermutung bestätigt werden. In Konzentrationen von 30-100 nM führt 5-MeOT ausschließlich zu einer Negativierung des TEPs.

AS 19 (100 μM) und R-(+)-Lisurid (30 nM), die im heterologen System als Cv5-HT₇-Agonisten identifiziert wurden, führten zu einer Positivierung des TEP. Dies ist im Einklang mit einer selektiven Aktivierung des cAMP/PKA-Signalweges über Cv5-HT₇. Obwohl diese Substanzen in Konzentrationen appliziert wurden, die in den Cv5-HT₇-exprimierenden HEK 293-Zellen eine sättigende Antwort hervorgerufen haben, war die beobachtete TEP-Antwort geringer als nach Stimulation mit 30 nM 5-HT. Ebenso wie im heterologen System wirken beide Substanzen nur als partielle Agonisten der Rezeptoren in den Speicheldrüsen.

Die pharmakologischen Ergebnisse in HEK 293-Zellen ließen vermuten, dass 5-CT in niedrigen Konzentrationen selektiv den Cv5-HT₇-Rezeptor aktiviert. Dies konnte so auch in den Speicheldrüsen beobachtet werden. Bei Konzentrationen von $\leq 3 \mu\text{M}$ war nur ein positives TEP messbar, während bei höheren Konzentrationen durch Aktivierung beider Rezeptoren ein biphasisches TEP beobachtet wurde.

Während AS 19 und 5-CT als reversible Agonisten wirken, löst R-(+)-Lisurid eine irreversible TEP-Positivierung aus. Bei Sekretionsmessungen an den Speicheldrüsen von Schaben führte R-(+)-Lisurid ebenfalls zu einer dauerhaften Aktivierung der Speichelsekretion (Marg *et al.*, 2004). Dies lässt vermuten, dass R-(+)-Lisurid den Rezeptor entweder in einer permanent aktiven Konformation stabilisiert oder die Ligandenbindung nahezu irreversibel ist.

Antagonisten

Methiothepin und Methysergid ermöglichen in HEK 293-Zellen eine selektive Hemmung des heterologen Cv5-HT_{2a/N}-Rezeptors. In den Speicheldrüsen führt die Applikation von 1 μM Methiothepin zu einer nahezu vollständigen Blockierung der positiven Phase der 5-HT-induzierten TEP-Antwort und zur partiellen Inhibierung der negativen Phase. Bei nachfolgenden 5-HT-Applikationen konnte keine Positivierung mehr nachgewiesen werden. Dies lässt vermuten, dass Methiothepin entweder irreversibel bindet oder aber schädigende Einflüsse auf die Speicheldrüsen ausübt. Eine inhibitorische Wirkung von Methiothepin wurde auch für die orthologen 5-HT₇-Rezeptoren aus *Caenorhabditis elegans* (Hobson *et al.*, 2003), *Apis mellifera* (Schlenstedt *et al.*, 2006) und dem Menschen (Knight *et al.*, 2009) gezeigt. Wider Erwarten führt die alleinige Applikation von Methysergid in den Speicheldrüsen von *Calliphora vicina* zu einer raschen Negativierung, die in Oszillationen übergeht und zu einer langsamen Positivierung führt. Dies lässt sich nur durch eine agonistische Wirkung der Substanz auf die beiden nativen Rezeptoren erklären und stellt einen deutlichen Widerspruch zu den an heterolog exprimierten Rezeptoren etablierten pharmakologischen Profilen dar.

Ausgehend von den pharmakologischen Profilen der Rezeptoren im heterologen System sollten Clozapin, Cinanserin und Spiperon als spezifische Antagonisten des Cv5-HT₇-Rezeptors wirken. Von diesen Substanzen zeigte jedoch nur Clozapin (1 µM) eine vollständige und selektive Hemmung der cAMP-induzierten Positivierung des TEP. In Konzentrationen, die im heterologen System zu einer vollständigen Inhibierung der Serotonin-Antwort führten, bewirkten Spiperon und Cinanserin in der Speicheldrüse nur eine partielle Inhibition der positiven Phase des TEP und zeigten mitunter auch schwache inhibitorische Effekte auf die Negativierung des TEP.

Berridge und Heslop (1981) haben für eine Reihe von Antagonisten deren Wirkung auf die Sekretionsrate und IP₃-Freisetzung bei *Calliphora*-Speicheldrüsen getestet. Die dabei verwendeten Substanzen ließen sich in zwei Gruppen unterteilen. Antagonisten der einen Gruppe, z. B. Phentolamin, Cinanserin und Spiperon, beeinflussten vornehmlich Rezeptoren, die über den cAMP-Weg wirken, während die andere Gruppe von Antagonisten, z. B. Methysergid und Yohimbin, hauptsächlich die Aktivität der Rezeptoren verringerten, die Ca²⁺-Signale auslösen. Die in dieser Arbeit etablierten pharmakologischen Profile der heterolog exprimierten 5-HT-Rezeptoren sowie die Ergebnisse der TEP-Experimente bestätigen die Beobachtungen der klassischen Arbeit von Berridge und Heslop (1981) weitestgehend.

4.4 Wie übertragbar sind die pharmakologischen Daten der heterologen Rezeptoren auf die *in vivo*-Pharmakologie?

In den Speicheldrüsen von *Calliphora vicina* lösen 1-6 nM 5-HT eine halbmaximale Antwort der cAMP-Produktion, der elektrischen Antwort und der Flüssigkeitssekretion aus (Berridge & Prince, 1972; Heslop & Berridge, 1980; Rein *et al.*, 2006). Dieser Wert ist in guter Übereinstimmung mit den EC₅₀-Wert von 4,1 nM, der für die Stimulation der cAMP-Synthese durch den heterolog exprimierten Cv5-HT₇-Rezeptors ermittelt wurde. Im Gegensatz dazu benötigt die halbmaximale Aktivierung der 5-HT-induzierten Ca²⁺-Antworten in Cv5-HT_{2αN}-exprimierenden HEK-Zellen etwa 10mal mehr Serotonin (EC₅₀=24 nM) als in Speicheldrüsen (EC₅₀=2,8 nM; Zimmermann & Walz, 1997). Die Expression eines weiteren 5-HT₂-Rezeptor mit einer höheren Affinität für 5-HT wäre als Erklärung für diese Unterschiede durchaus denkbar. In vielen Zellen und Geweben

konnten Wechselwirkungen zwischen dem IP_3/Ca^{2+} - und dem cAMP-Signalweg nachgewiesen werden (Rasmussen, 1980; Mons *et al.*, 1998; Bruce *et al.*, 2003). Zahlreiche Indizien deuten darauf hin, dass auch in den sekretorischen Zellen der Speicheldrüsen von *Calliphora* eine Interaktion der beiden Signalwege auf unterschiedlichen Stufen stattfindet (Heslop & Berridge, 1980; Schmidt *et al.*, 2008; Voss *et al.*, 2010). So sensibilisiert z. B. cAMP über die PKA die IP_3 -regulierte Ca^{2+} -Freisetzung (Schmidt *et al.*, 2008). Auch in Abwesenheit von 5-HT führt die Erhöhung der $[Ca^{2+}]_i$ zu einer Aktivierung des cAMP/PKA-Signalweges (Voss *et al.*, 2010). Eine Kopplung der beiden Signalwege, möglicherweise über ein komplexes Netz von biochemischen Signalkaskaden, kann somit zu einer Potenzierung oder Abschwächung der durch 5-HT oder andere Agonisten ausgelösten Signale führen.

Häufig sind die pharmakologischen Eigenschaften heterolog exprimierter Rezeptoren nicht 1:1 auf komplexe physiologische Effekte in intakten Geweben, Organen oder im Gesamtorganismus übertragbar. Dies wurde unter anderem auch für den menschlichen 5-HT_{1D}-Rezeptor (Zgombick *et al.*, 1996) gezeigt. Für die beobachteten pharmakologischen Unterschiede der in dieser Arbeit untersuchten nativen und heterolog exprimierten 5-HT-Rezeptoren lassen sich verschiedene Gründe diskutieren. So könnte die für die Expression in den HEK-Zellen benötigte N-terminale Verkürzung des Cv5-HT_{2a} die Pharmakologie des heterolog exprimierten Rezeptors beeinflusst haben. Eine einzelne Punktmutation im N-terminalen Bereich, aber auch die vollständige Deletion des N-Terminus eines Rezeptors können z. B. zu einer deutlichen Zunahme der Serotonin-Affinität führen (Colas *et al.*, 1997, Schaerlinger *et al.*, 2007).

Auch Rezeptoroligomerisierungen in nativen Geweben können die Pharmakologie eines Rezeptors maßgeblich beeinflussen. Renner *et al.* (2012) zeigten, dass die Heteromerisierung von 5-HT_{1A} und 5-HT₇ die Internalisierungsgeschwindigkeit und die G-Protein-Aktivierung des 5-HT_{1A}-Rezeptors beeinflusst. Dies wurde auch in einem nativen Gewebe, in welchem beide Rezeptoren gemeinsam vorkommen, nachgewiesen (Renner *et al.*, 2012). Für die beiden *Calliphora*-Rezeptoren konnte bislang allerdings noch keine Dimerisierung nachgewiesen werden.

Es ist bekannt, dass *Drosophila melanogaster* (Brody & Cravchik, 2000; Hauser *et al.*, 2006; Blenau & Thamm, 2011), *Apis mellifera* (Thamm, 2009) und *Panulirus interruptus* (Clark *et al.*, 2004) neben dem 5-HT_{2a} noch einen zweiten 5-HT₂-Rezeptorsubtyp exprimieren. Die Existenz eines zweiten 5-HT₂-Rezeptors wäre auch bei *Calliphora vicina* denkbar und könnte ebenfalls zu den beobachteten Unterschieden in den Affinitäten für die verschiedenen Rezeptorliganden beitragen.

Jedoch konnte bisher trotz Verwendung geeigneter PCR-Strategien, durch die theoretisch auch mRNA eines putativen Cv5-HT_{2β}-Rezeptors zu amplifiziert werden kann, die Existenz eines solchen Rezeptors nicht nachgewiesen werden. Leider sind die pharmakologischen Eigenschaften der 5-HT_{2β}-Rezeptoren von *Drosophila* und *Apis* noch nicht untersucht worden. Im Gegensatz dazu sind für *Panulirus* und *Procambarus* nur die pharmakologischen Eigenschaften der 5-HT_{2β}-Rezeptoren publiziert. Eine Aussage darüber, ob sich die jeweiligen 5-HT₂-Subtypen pharmakologisch unterscheiden, ist daher zurzeit nicht möglich. Die wäre durchaus denkbar, da die zwei 5-HT₁-Rezeptoren der Fruchtfliege zwar grundsätzlich ein ähnliches pharmakologisches Profil besitzen, sich jedoch in den Affinitäten für einzelne Substanzen, wie z. B. 5-HT oder Dihydroergocryptin unterscheiden (Saudou *et al.*, 1992; Gerhardt & van Heerikhuizen, 1997).

Die meisten Liganden können mehrere Rezeptorsubtypen aktivieren. Es ist daher durchaus denkbar, dass bisher uncharakterisierte *Calliphora*-Rezeptoren an den beobachteten Effekten in den Speicheldrüsen beteiligt sind.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die pharmakologischen Profile der heterolog exprimierten Cv5-HT_{2α}- und Cv5-HT₇-Rezeptoren ein wichtigen Schritt auf dem Weg zur Identifizierung von Rezeptorliganden zur selektiven Manipulation von Signalwegen *in vivo* darstellen. Vielversprechende Substanzen sollten jedoch immer auch auf ihren Effekt und die Spezifität in einem nativem System überprüft werden. Dieser kann zuweilen stark von dem im heterologen System beobachteten Effekt abweichen.

Durch Anwendung dieses zweistufigen Ansatzes konnte gezeigt werden, dass 5-MeOT in Konzentrationen von 30 – 100 nM als selektiver 5-HT_{2α}-Agonist in den Speicheldrüsen von *Calliphora vicina* wirkt. In Konzentrationen bis zu 300 nM wirkt 5-CT als selektiver 5-HT₇-Agonist, wohingegen 1 μM Clozapine effektiv den Effekt von 5-HT auf den Cv5-HT₇-Rezeptor inhibiert.

Die Ergebnisse dieser Arbeit ermöglichen zukünftig präzisere Untersuchungen der Rezeptoren und den Wechselwirkungen zwischen den intrazellulären Signalwegen.

4.5 Ausblick auf mögliche weiterführende experimentelle Aspekte dieses Projekts

Diese Arbeit beschreibt die Klonierung der Serotoninrezeptoren Cv5-HT_{2α} und Cv5-HT₇, deren Expression im Speicheldrüsengewebe nachgewiesen werden konnte. Durch Kombination einer molekularen Charakterisierung der heterolog exprimierten Rezeptoren mit physiologischen Messungen *in vivo* konnten selektive Rezeptorliganden identifiziert werden. Die beschriebenen Eigenschaften der beiden Rezeptoren erklären weitestgehend die von 5-HT ausgelösten physiologischen Effekte in der Speicheldrüse. Einige Diskrepanzen zwischen den Eigenschaften der heterologen Rezeptoren und den nativen Serotoninrezeptoren in den Speicheldrüsen ließen sich jedoch nicht abschließend erklären.

Zukünftige Arbeiten müssen daher klären, ob noch weitere 5-HT-Rezeptorsubtypen in der Speicheldrüse vorkommen. Möglicherweise liegt neben dem Cv5-HT_{2α}- noch ein 5-HT_{2β}-Rezeptor vor. Nach einem Sequenzvergleich von 5-HT_{2β}-Rezeptoren anderer Insekten könnte über eine PCR-Strategie mit degenerierten Primern möglicherweise die cDNA dieses Rezeptors isoliert werden.

Bei der Klonierung des Cv5-HT_{2α}-Rezeptors konnte eine Variante des Rezeptors identifiziert werden, die im Bereich der dritten zytoplasmatischen Schleife deutlich kürzer ist. Die Bedeutung dieser Spleißvariante ist noch unklar. Ob die Verkürzung zu einer veränderten Pharmakologie führt, könnte durch eine heterologe Expression dieser Variante geklärt werden.

Die Fähigkeit, Oligomere zu bilden, wurde bislang *in vitro* und *in vivo* für 5-HT₁- und 5-HT₂-Rezeptoren nachgewiesen. Es wäre spannend herauszufinden, ob auch der Cv5-HT_{2α}- und Cv5-HT₇-Rezeptor oligomerisieren. Wie von Renner *et al.* (2012) gezeigt, kann dies die Rezeptorpharmakologie und die Signaltransduktion über G-Proteine maßgeblich beeinflussen. Eine mögliche Oligomerisierung könnte mittels Immunopräzipitations- und FRET-Experimenten experimentell besonders gut in einem heterologen System nachgewiesen werden. In der Speicheldrüse könnte eine Dimerisierung über Ko-Immunopräzipitation mit spezifischen Antikörpern gegen die verschiedenen Rezeptoren nachgewiesen werden.

Für den anti-Cv5-HT₇-Antikörper sollte unbedingt die Identität der beiden in der Speicheldrüse detektierten Proteinbanden geklärt werden. Mit Hilfe einer 2D-Gelelektrophorese und anschließender Massenspektrometrie könnten die Proteine identifiziert werden. Sollten die beiden Banden den Rezeptor

(als Monomer/Homodimer) oder den Rezeptor im Komplex mit einem weiteren Protein repräsentieren, könnte der Antikörper eingesetzt werden, um genauere Einblicke in die Rezeptorverteilung bzw. -expression in anderen Geweben zu erhalten.

Mit der Speicheldrüse von *Calliphora* liegt ein System vor, in dem Serotonin mindestens zwei Serotoninrezeptoren aktiviert. Eine ähnliche Situation könnte man auch im heterologen System simuliert werden, indem man Cv5-HT_{2a} und Cv5-HT₇ ko-exprimiert. Durch den Vergleich der Ligandeneffekte kann möglicherweise geklärt werden, ob in der Speicheldrüse noch weitere Rezeptoren vorhanden sind oder eventuell noch weitere Komponenten der Signalkaskade beeinflusst werden.

Die in dieser Arbeit identifizierten Rezeptorsubtyp-spezifischen Agonisten bzw. Antagonisten könnten zukünftig helfen, Fragen bezüglich der Wechselwirkungen zwischen den beiden 5-HT-aktivierten Signalwegen aufzuklären. Durch Blockierung des cAMP-Signalweges oder selektive Aktivierung des selbigen könnten genauere Informationen über den Einfluss von cAMP auf den Ca²⁺-Signalweg und *vice versa* erhalten werden. Durch Kombination mit Inhibitoren nachgeschalteter Enzyme bzw. Proteine wie z. B. U73122 für PLC, H-89 oder KT 5720 für PKA und Bafilomycin A1 für die V-ATPase kann der Einfluss der einzelnen Komponenten auf den *crossstalk* beider Signalwege besser verstanden werden.

Es wäre ebenfalls interessant zu überprüfen, ob noch weitere posttranslationale Modifikationen, wie z. B. Phosphorylierungen, vorliegen. Dabei wäre es spannend zu klären, ob die PKA über die Phosphorylierung des Cv5-HT_{2a}-Rezeptors modulierend auf die Rezeptoraktivität und den IP₃⁺/Ca²⁺-Signalweg wirkt. Dies könnte über die Färbung der phosphorylierten Serin-, Threonin- und Tyrosin-Reste mit dem Fluoreszenzfarbstoff ProQ Diamond und der Applikation eines PKA-Inhibitors bzw. die gerichtete Mutation der PKA-Phosphorylierungsstellen untersucht werden.

Eine Palmitoylierung würde sowohl Cv5-HT₇ als auch Cv5-HT_{2a} in *lipid rafts* positionieren und somit die Wahrscheinlichkeit einer Interaktion mit anderen Proteinen sehr wahrscheinlich machen. Desweiteren besitzt der Cv5-HT₇-Rezeptor eine PDZ-Bindedomäne wodurch eine G-Protein-unabhängige Regulation verschiedener intrazellulärer Signalwege möglich ist bzw. der Rezeptor in größere Signalkomplexe eingebunden sein kann. Die Identifizierung möglicher Interaktionspartner des Rezeptors wäre über einen Hefe-Doppelhybrid-Assay oder

eine Ko-Immunopräzipitation möglich. Dies könnte bei der weiteren Aufklärung der Signalkomplexe in der Speicheldrüse helfen.

5. Literaturverzeichnis

- ADHAM N., ZGOMBICK J. M., BARD J. & BRANCHEK T. A. (1998) Functional characterization of the recombinant human 5-hydroxytryptamine_{7(a)} receptor isoform coupled to adenylate cyclase stimulation. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* **287**, 508-514.
- ALEWIJNSE A. E., TIMMERMAN H., JACOBS E. H., SMIT M. J., ROOVERS E., COTECCHIA S. & LEURS R. (2000) The effect of mutations in the DRY motif on the constitutive activity and structural instability of the histamine H-2 receptor. *Molecular Pharmacology* **57**, 890-898.
- ALI D. W. (1997) The aminergic and peptidergic innervation of insect salivary glands. *Journal of Experimental Biology* **200**, 1941-1949.
- ALTSCHUL S. F., MADDEN T. L., SCHAFFER A. A., ZHANG J. H., ZHANG Z., MILLER W. & LIPMAN D. J. (1997) Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Research* **25**, 3389-3402.
- ARVIDSSON L. E., HACKSELL U., NILSSON J. L., HJORTH S., CARLSSON A., LINDBERG P., SANCHEZ D. & WIKSTROM H. (1981) 8-Hydroxy-2-(di-n-propylamino)tetralin, a new centrally acting 5-hydroxytryptamine receptor agonist. *Journal of Medicinal Chemistry* **24**, 921-923.
- ATWOOD B., LOPEZ J., MILLER J., MACKIE K. & STRAIKER A. (2011) Expression of G protein-coupled receptors and related proteins in HEK293, AtT20, BV2, and N18 cell lines as revealed by microarray analysis. *BMC Genomics* **12**, 14
- BALLESTEROS J. A. & WEINSTEIN H. (1995) Integrated methods for the construction of three-dimensional models and computational probing of structure-function relations in G protein-coupled receptors. In *Methods in Neurosciences* **25** 366-428.
- 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. *Journal of Biological Chemistry* **268**, 23422-23426.
- BARTHET G., FRAMERY B., GAVEN F., PELLISSIER L., REITER E., CLAEYSEN S., BOCKAERT J. & DUMUIS A. (2007) 5-Hydroxytryptamine(4) receptor activation of the extracellular signal-regulated kinase pathway depends on src activation but not on G protein or beta-arrestin signaling. *Molecular Biology of the Cell* **18**, 1979-1991.
- BAUMANN O. & WALZ B. (2012) The blowfly salivary gland - A model system for analyzing the regulation of plasma membrane V-ATPase. *Journal of Insect Physiology* **58**, 450-458.
- BAXTER G. D. & BARKER S. C. (1999) Isolation of a cDNA for an octopamine-like, G-protein coupled receptor from the cattle tick, *Boophilus microplus*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* **29**, 461-467.
- BECAMEL C., GAVARINI S., CHANRION B., ALONSO G., GALEOTTI N., DUMUIS A., BOCKAERT J. & MARIN P. (2004) The serotonin 5-HT_{2A} and 5-HT_{2C} receptors interact with specific sets of PDZ proteins. *Journal of Biological Chemistry* **279**, 20257-20266.
- BERRIDGE M. J. (1970) The role of 5-Hydroxytryptamine and cyclic AMP in control of fluid secretion by isolated salivary glands. *Journal of Experimental Biology* **53**, 171-186
- BERRIDGE M. J. (1981) Electrophysiological evidence for the existence of separate receptor mechanisms mediating the action of 5-hydroxytryptamine. *Molecular and Cellular Endocrinology* **23**, 91-104.
- BERRIDGE M. J. (2005) Unlocking the secrets of cell signaling. *Annual Review of Physiology* **67**, 1-21.
- BERRIDGE M. J. & HESLOP J. P. (1981) Separate 5-hydroxytryptamine receptors on the salivary gland of the blowfly are linked to the generation of either cyclic adenosine 3',5'-monophosphate or calcium signals. *British Journal of Pharmacology* **73**, 729-738.

- BERRIDGE M. J. & PATEL N. G. (1968) Insect salivary glands: stimulation of fluid secretion by 5-hydroxytryptamine and adenosine-3',5'-monophosphate. *Science* **162**, 462-463.
- BERRIDGE M. J. & PRINCE W. T. (1971) The electrical response of isolated salivary glands during stimulation with 5-hydroxytryptamine and cyclic AMP. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London -Biological Sciences* **262**, 111-120
- BERRIDGE M. J. & PRINCE W. T. (1972) Transepithelial potential changes during stimulation of isolated salivary glands with 5-hydroxytryptamine and cyclic AMP. *The Journal of Experimental Biology* **56**, 139-153.
- BERRIDGE M. J., LINDLEY B. D. & PRINCE W.T. (1975) Membrane permeability changes during stimulation of isolated sSalivary Glands of *Calliphora* by 5-hydroxytryptamine. *Journal of Physiology-London* **244**, 549-567.
- BERRIDGE M.J., LINDLEY B.D. & PRINCE W.T. (1976) Studies on the mechanism of fluid secretion by isolated salivary glands of *Calliphora*. *The Journal of Experimental Biology* **64**, 311-322.
- BICKER G. & MENZEL R. (1989) Chemical codes for the control of behavior in arthropods. *Nature* **337**, 33-39.
- BLACK D. L. (2003) Mechanisms of alternative pre-messenger RNA splicing. *Annual Review of Biochemistry* **72**, 291-336.
- BLENAU W. & BAUMANN A. (2001) Molecular and pharmacological properties of insect biogenic amine receptors: Lessons from *Drosophila melanogaster* and *Apis mellifera*. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology* **48**, 13-38.
- BLENAU W. & THAMM M. (2011) Distribution of serotonin (5-HT) and its receptors in the insect brain with focus on the mushroom bodies: lessons from *Drosophila melanogaster* and *Apis mellifera*. *Arthropod Structure & Development* **40**, 381-394.
- BLENAU W., ERBER J. & BAUMANN A. (1998) Characterization of a dopamine D1 receptor from *Apis mellifera*: cloning, functional expression, pharmacology, and mRNA localization in the brain. *Journal of Neurochemistry* **70**, 15-23.
- BLENAU W., BALFANZ S. & BAUMANN A. (2000) Amtyr1: characterization of a gene from honeybee (*Apis mellifera*) brain encoding a functional tyramine receptor. *Journal of Neurochemistry* **74**, 900-908.
- BOCKAERT J., MARIN P., DUMUIS A. & FAGNI L. (2003) The 'magic tail' of G protein-coupled receptors: an anchorage for functional protein networks. *FEBS Letters* **546**, 65-72.
- BOCKAERT J., CLAEYSEN S., BECAMEL C., DUMUIS A. & MARIN P. (2006) Neuronal 5-HT metabotropic receptors: fine-tuning of their structure, signaling, and roles in synaptic modulation. *Cell and Tissue Research* **326**, 553-572.
- BOCKAERT J., ROUSSIGNOL G., BECAMEL C., GAVARINI S., JOUBERT L., DUMUIS A., FAGNI L. & MARIN P. (2004) GPCR-interacting proteins (GIPs): nature and functions. *Biochemical Society Transactions* **32**, 851-855.
- BOONE C., DAVIS N. G. & SPRAGUE G. F. (1993) Mutations that alter the third cytoplasmic loop of the a-factor receptor lead to a constitutive and hypersensitive phenotype. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **90**, 9921-9925.
- BRADFORD M. M. (1976) Rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* **72**, 248-254.
- BRODY T. & CRAVCHIK A. (2000) *Drosophila melanogaster* G protein-coupled receptors. *Journal of Cell Biology* **150**, F83-F88
- BROWN D. A., BRUCE J. I. E., STRAUB S. V. & YULE D. I. (2004) cAMP potentiates ATP-evoked calcium signaling in human parotid acinar cells. *Journal of Biological Chemistry* **279**, 39485-39494.

- BRUCE J. I. E., STRAUB S. V. & YULE D. I. (2003) Crosstalk between cAMP and Ca²⁺ signaling in non-excitabile cells. *Cell Calcium* **34**, 431-444.
- BUCK F. (1991) Characterization of N- and C-terminal deletion mutants of the rat serotonin HT2 receptor in *Xenopus laevis* oocytes. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **178**, 1421-1428.
- BUZNIKOV G. A., LAMBERT H. W. & LAUDER J. J. (2001) Serotonin and serotonin-like substances as regulators of early embryogenesis and morphogenesis. *Cell and Tissue Research* **305**, 177-186.
- CANTON H., EMESON R. B., BARKER E. L., BACKSTROM J. R., LU J. T., CHANG M. S. & SANDERSBUSH E. (1996) Identification, molecular cloning, and distribution of a short variant of the 5-hydroxytryptamine(2C) receptor produced by alternative splicing. *Molecular Pharmacology* **50**, 799-807.
- CARMAN C. V. & BENOVIC J. L. (1998) G-protein-coupled receptors: turn-ons and turn-offs. *Current Opinion in Neurobiology* **8**, 335-344.
- CAVENER D. R. (1987) Comparison of the consensus sequence flanking translational start sites in *Drosophila* and Vertebrates. *Nucleic Acids Research* **15**, 1353-1361.
- CHEN C. & OKAYAMA H. (1987) High-efficiency transformation of mammalian cells by plasmid DNA. *Molecular and Cellular Biology* **7**, 2745-2752.
- CHEN K., YANG W., GRIMSBY J. & SHIH J. C. (1992) The human 5-HT₂ Receptor is encoded by a multiple intron exon gene. *Molecular Brain Research* **14**, 20-26.
- CLARK M. & BARO D. (2007) Arthropod D2 receptors positively couple with cAMP through the G_{i/o} protein family. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology* **146**, 9-19
- CLARK M., DEVER T., DEVER J., XU P., REHDER V., SOSA M. & BARO D. (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. *Journal of Neuroscience* **24**, 3421-3435.
- COLAS J. F., CHOI D. S., LAUNAY J.M. & MAROTEAUX L. (1997) Evolutionary Conservation of the 5-HT_{2B} Receptors. *Annals of the New York Academy of Sciences* **812**, 149-153.
- COLAS J. F., LAUNAY J. M., KELLERMANN O., ROSAY P. & MAROTEAUX L. (1995) *Drosophila* 5-HT₂ serotonin receptor: coexpression with fushi-tarazu during segmentation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **92**, 5441-5445.
- COLAS J. F., LAUNAY J. M., VONESCH J. L., HICKEL P. & MAROTEAUX L. (1999) Serotonin synchronises convergent extension of ectoderm with morphogenetic gastrulation movements in *Drosophila*. *Mechanisms of Development* **87**, 77-91.
- COLPAERT F. C., NIEMEGEREERS C. J. E. & JANSSEN P. A. J. (1979) *In vivo* evidence of partial agonist activity exerted by purported 5-hydroxytryptamine antagonists. *European Journal of Pharmacology* **58**, 505-509.
- COOPER D. M. F., MONS N. & KARPEN J. W. (1995) Adenylyl cyclases and the interaction between Calcium and cAMP signaling. *Nature* **374**, 421-424.
- DAMES P., ZIMMERMANN B., SCHMIDT R., REIN J., VOSS M., SCHEWE B., WALZ B. & BAUMANN O. (2006) cAMP regulates plasma membrane vacuolar-type H⁺-ATPase assembly and activity in blowfly salivary glands. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **103**, 3926-3931.
- DAVIS D., LIU X. & SEGALOFF D.L. (1995) Identification of the sites of N-linked glycosylation on the follicle-stimulating hormone (FSH) receptor and assessment of their role in FSH receptor function. *Molecular Endocrinology* **9**, 159-170.

- DEUPI X. & STANDFUSS J. (2011) Structural insights into agonist-induced activation of G-protein-coupled receptors. *Current Opinion in Structural Biology* **21**, 541-551.
- DUTTON A. C., MASSOURA A. N., DOVER T. J., ANDREWS N. A. & BARNES N. M. (2008) Identification and functional significance of N-glycosylation of the 5-HT_{2A} receptor. *Neurochemistry International* **52**, 419-425.
- EASON M. G., KUROSE H., HOLT B. D., RAYMOND J. R. & LIGGETT S. B. (1992) Simultaneous coupling of alpha-2-adrenergic receptors to two G-proteins with opposing effects - Subtype-selective coupling of alpha_{2C10}, alpha_{2C4}, and alpha_{2C2} adrenergic receptors to G_i and G_s. *Journal of Biological Chemistry* **267**, 15795-15801.
- ESKIN A., CORRENT G., LIN C. Y. & MCADOO D. J. (1982) Mechanism for shifting the phase of a circadian rhythm by serotonin: involvement of cAMP. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **79**, 660-664.
- FARGIN A., RAYMOND J. R., LOHSE M. J., KOBILKA B. K., CARON M. G. & LEFKOWITZ R. J. (1988) The genomic clone G-21 which resembles a beta-adrenergic receptor sequence encodes the 5-HT_{1A} Receptor. *Nature* **335**, 358-360.
- 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**, 768-770.
- FEDERMAN A. D., CONKLIN B. R., SCHRADER K. A., REED R. R. & BOURNE H. R. (1992) Hormonal stimulation of adenylyl cyclase through G_i-Protein beta gamma subunits. *Nature* **356**, 159-161.
- FERGUSON S. S. G. (2001) Evolving concepts in G protein-coupled receptor endocytosis: the role in receptor desensitization and signaling. *Pharmacological Reviews* **53**, 1-24.
- FERGUSON S. S. G. & CARON M. G. (1998) G protein-coupled receptor adaptation mechanisms. *Seminars in Cell & Developmental Biology* **9**, 119-127.
- FREDRIKSSON R., LAGERSTROM M. C., LUNDIN L. G. & SCHIOTH H. B. (2003) The G-protein-coupled receptors in the human genome form five main families. Phylogenetic analysis, paralogon groups, and fingerprints. *Molecular Pharmacology* **63**, 1256-1272.
- FREEDMAN N. J., LIGGETT S. B., DRACHMAN D. E., PEI G., CARON M. G. & LEFKOWITZ R. J. (1995) Phosphorylation and desensitization of the human beta(1)-adrenergic receptor: involvement of G-protein-coupled receptor kinases and cAMP-dependent protein kinase. *Journal of Biological Chemistry* **270**, 17953-17961.
- 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. *Molecular Pharmacology* **62**, 1094-1102.
- GEE K. R., BROWN K. A., CHEN W. N., BISHOP-STEWART J., GRAY D. & JOHNSON I. (2000) Chemical and physiological characterization of fluo-4 Ca²⁺-indicator dyes. *Cell Calcium* **27**, 97-106.
- GELLYNCK E., LAENEN K., ANDRESSEN K. W., LINTERMANS B., DE MARTELAERE K., MATTHYS A., LEVY F. O., HAEGEMAN G., VAN HOENACKER P. & VAN CRAENENBROECK K. (2008) Cloning, genomic organization and functionality of 5-HT₇ receptor splice variants from mouse brain. *Gene* **426**, 23-31.
- GERHARDT C. C. & VAN HEERIKHUIZEN H. (1997) Functional characteristics of heterologously expressed 5-HT receptors. *European Journal of Pharmacology* **334**, 1-23.
- GERHARDT C. C., LEYSEN J. E., PLANTA R., VREUGDENHIL E. & VAN HEERIKHUIZEN H. (1996) Functional characterisation of a 5-HT₂ receptor cDNA cloned from *Lymnaea stagnalis*. *European Journal of Pharmacology* **311**, 249-258.

- GETHER U. (2000) Uncovering molecular mechanisms involved in activation of G protein-coupled receptors. *Endocrine Reviews* **21**, 90-113.
- GETHER U. & KOBILKA B. K. (1998) G protein-coupled receptors - II. Mechanism of agonist activation. *Journal of Biological Chemistry* **273**, 17979-17982.
- GHAVAMI A., HUNT R.A., OLSEN M. A., ZHANG J., SMITH D. L., KALGAONKAR S., RAHMAN Z. & YOUNG K. H. (2004) Differential effects of regulator of G protein signaling (RGS) proteins on serotonin 5-HT_{1A}, 5-HT_{2A}, and dopamine D₂ receptor-mediated signaling and adenylyl cyclase activity. *Cellular Signalling* **16**, 711-721.
- GOTZES F. & BAUMANN A. (1996) Functional properties of *Drosophila* dopamine D₁-receptors are not altered by the size of the N-Terminus. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **222**, 121-126.
- GROHMANN L., BLENAU W., ERBER J., EBERT P., STRÜNKER T. & BAUMANN A. (2003) Molecular and functional characterization of an octopamine receptor from honeybee (*Apis mellifera*) brain. *Journal of Neurochemistry* **86**, 725-735.
- GUNAWARDENA J. (2008) Signals and systems: Towards a system biology of signal transduction. *Proceedings of the IEEE* **96**, 1386-97
- HAGA T., HAGA K., KAMEYAMA K., TSUGA H. & YOSHIDA N. (2002) Regulation of G protein-coupled receptor kinase 2. *Methods Enzymology* **343**, 559-577.
- HAGAN J. J., PRICE G. W., JEFFREY P., DEEKS N. J., STEAN T., PIPER D., SMITH M. I., UPTON N., MEDHURST A. D., MIDDLEMISS D. N., RILEY G. J., LOVELL P. J., BROMIDGE S. M. & THOMAS D. R. (2000) Characterization of SB-269970-A, a selective 5-HT₇ receptor antagonist. *British Journal of Pharmacology* **130**, 539-548.
- HALL R. A., PREMONT R. T. & LEFKOWITZ R. J. (1999) Heptahelical receptor signaling: Beyond the G protein paradigm. *Journal of Cell Biology* **145**, 927-932.
- HALL R. A., PREMONT R. T., CHOW C. W., BLITZER J. T., PITCHER J. A., CLAING A., STOFFEL R. H., BARAK L. S., SHENOLIKAR S., WEINMAN E. J., GRINSTEIN S. & LEFKOWITZ R. J. (1998) The beta(2)-adrenergic receptor interacts with the Na⁺/H⁺-exchanger regulatory factor to control Na⁺/H⁺ exchange. *Nature* **392**, 626-630.
- HALL T. A. (1999) BioEdit: A user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium.Series* **41**, 95-98.
- HANAHAHAN D. (1983) Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *Journal of Molecular Biology* **166**, 557-580.
- HANNON J. & HOYER D. (2008) Molecular biology of 5-HT receptors. *Behavioural Brain Research* **195**, 198-213.
- HANSEN M. B. & WITTE A. B. (2008) The role of serotonin in intestinal luminal sensing and secretion. *Acta Physiologica* **193**, 311-323.
- HAUSER F., CAZZAMALI G., WILLIAMSON M., BLENAU W. & GRIMMELIKHUIJZEN C. J. P. (2006) A review of neurohormone GPCRs present in the fruitfly *Drosophila melanogaster* and the honey bee *Apis mellifera*. *Progress in Neurobiology* **80**, 1-19.
- HAYASHI M. K. & HAGA T. (1997) Palmitoylation of muscarinic acetylcholine receptor m2 subtypes: Reduction in their ability to activate G proteins by mutation of a putative palmitoylation site, cysteine 457, in the carboxyl-terminal tail. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **340**, 376-382.
- HEIDMANN D. E. A., METCALF M. A., KOHEN R. & HAMBLIN M. W. (1997) Four 5-hydroxytryptamine(7) (5-HT₇) receptor isoforms in human and rat produced by alternative splicing: Species differences due to altered intron-exon organization. *Journal of Neurochemistry* **68**, 1372-1381.

- HEINDORFF K., BLENAU W., WALZ B. & BAUMANN O. (2012): Characterization of a Ca²⁺/calmodulin-dependent AC1 adenylyl cyclase in a non-neuronal tissue, the blowfly salivary gland. Bei *Cell Calcium* eingereicht & akzeptiert
- HERRICK-DAVIS K., GRINDE E. & MAZURKIEWICZ J. E. (2004) Biochemical and biophysical characterization of serotonin 5-HT_{2C} receptor homodimers on the plasma membrane of living cells. *Biochemistry* **43**, 13963-13971.
- HERRICK-DAVIS K., GRINDE E., HARRIGAN T. & MAZURKIEWICZ J. (2005) Inhibition of serotonin 5-Hydroxytryptamine_{2C} receptor function through heterodimerization. *Journal of Biological Chemistry* **280**, 40144-40151.
- HESLOP J. P. & BERRIDGE M. J. (1980) Changes in cyclic AMP and cyclic GMP concentrations during the action of 5-hydroxytryptamine on an insect salivary gland. *The Biochemical Journal* **192**, 247-255.
- HIRSH J. & DAVIDSON N. (1981) Isolation and characterization of the dopa decarboxylase gene of *Drosophila melanogaster*. *Molecular and Cellular Biology* **1**, 475-485.
- HOBSON R., GENG J., GRAY A. & KOMUNIECKI R. (2003) SER-7b, a constitutively active Galphas coupled 5-HT₇-like receptor expressed in the *Caenorhabditis elegans* M4 pharyngeal motorneuron. *Journal of Neurochemistry* **87**, 22-29.
- HOYER D. (2002) Molecular, pharmacological and functional diversity of 5-HT receptors. *Pharmacology Biochemistry and Behavior* **71**, 533-554.
- HOYER D., CLARKE D. E., FOZARD J. R., HARTIG P. R., MARTIN G. R., MYLECHARANE E. J., SAXENA P. R. & HUMPHREY P. P. (1994) International Union of Pharmacology classification of receptors for 5-hydroxytryptamine (Serotonin). *Pharmacological Reviews* **46**, 157-203.
- HUNG A. Y. & SHENG M. (2002) PDZ domains: Structural modules for protein complex assembly. *Journal of Biological Chemistry* **277**, 5699-5702.
- JI T.H., GROSSMANN M. & JI I. (1998) G Protein-coupled receptors. *Journal of Biological Chemistry* **273**, 17299-17302.
- JUST F. & WALZ B. (1994) Salivary glands of the cockroach, *Periplaneta americana* - new data from light and electron microscopy. *Journal of Morphology* **220**, 35-46.
- JUST F. & WALZ B. (1996) The effects of serotonin and dopamine on salivary secretion by isolated cockroach salivary glands. *Journal of Experimental Biology* **199**, 407-413.
- KAHN A. M., BISHARA M., CRAGOE E. J., ALLEN J. C., SEIDEL C. L., NAVRAN S. S., O'NEIL R. G., MCCARTY N. A. & SHELAT H. (1992) Effects of serotonin on intracellular pH and contraction in vascular smooth muscle. *Circulation Research* **71**, 1294-1304.
- KENAKIN T. (2001) Inverse, protean, and ligand-selective agonism: matters of receptor conformation. *FASEB Journal* **15**, 598-611.
- KENDALL M. D. (1969) The fine structure of the salivary glands of the desert locust *Schistocerca gregaria* Forskål. *Cell and Tissue Research* **98**, 399-420.
- KNIGHT J., SMITH C., TOOHEY N., KLEIN M. & TEITLER M. (2009) Pharmacological analysis of the novel, rapid, and potent inactivation of the human 5-Hydroxytryptamine₇ receptor by risperidone, 9-OH-Risperidone, and other inactivating antagonists. *Molecular Pharmacology* **75**, 374-380.
- KOBE F., RENNER U., WOEHLE A., WLODARCZYK J., PAPUSHEVA E., BAO G., ZEUG A., RICHTER D. W., NEHER E. & PONIMASKIN E. (2008) Stimulation- and palmitoylation-dependent changes in oligomeric conformation of serotonin 5-HT_{1A} receptors. *Biochimica et Biophysica Acta-Molecular Cell Research* **1783**, 1503-1516.
- KOBILKA B. K. & DEUPI X. (2007) Conformational complexity of G-protein-coupled receptors. *Trends in Pharmacological Sciences* **28**, 397-406.

- KOBILKA B. K., FRIELLE T., COLLINS S., YANGFENG T., KOBILKA T. S., FRANCKE U., LEFKOWITZ R. J. & 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.
- KOZAK M. (1984) Compilation and analysis of sequences upstream from the translational start site in eukaryotic mRNAs. *Nucleic Acids Research* **12**, 857-872.
- KROBERT K. & LEVY F. (2002) The human 5-HT₇ serotonin receptor splice variants: constitutive activity and inverse agonist effects. *British Journal of Pharmacology* **135**, 1563-1571.
- KROEZE W., KRISTIANSEN K. & ROTH B. (2002) Molecular biology of serotonin receptors structure and function at the molecular level. *Current Topics in Medicinal Chemistry* **2**, 507-528.
- KUSHWAHA N., HARWOOD S. C., WILSON A. M. & ALBERT P. R. (2006) Specific residues of the 5-HT_{1A} receptor second and third intracellular domain C-terminal determine G beta gamma or G alpha i coupling specificity, respectively. *FASEB Journal* **20**, A918
- KYTE J. & DOOLITTLE R. F. (1982) A simple method for displaying the hydropathic character of a protein. *Journal of Molecular Biology* **157**, 105-132.
- LAEMMLI U. K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680-685
- LAMBRIGHT D. G., NOEL J. P., HAMM H. E. & SIGLER P. B. (1994) Structural determinants for activation of the alpha-subunit of a heterotrimeric G protein. *Nature* **369**, 621-628.
- LEE D. W. & PIETRANTONIO P. V. (2003) In vitro expression and pharmacology of the 5-HT₇-like receptor present in the mosquito *Aedes aegypti* tracheolar cells and hindgut-associated nerves. *Insect Molecular Biology* **12**, 561-569.
- LEE Y. S., CHOI S. L., LEE S. H., KIM H., PARK H., LEE N., LEE S. H., CHAE Y. S., JANG D. J., KANDEL E. R. & KAANG B. K. (2009) Identification of a serotonin receptor coupled to adenylyl cyclase involved in learning-related heterosynaptic facilitation in *Aplysia*. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **106**, 14634-14639.
- LEFKOWITZ R. J. (1998) G protein-coupled receptors III. New roles for receptor kinases and beta-arrestins in receptor signaling and desensitization. *Journal of Biological Chemistry* **273**, 18677-18680.
- LEFKOWITZ R. J., COTECCHIA S., SAMAMA P. & COSTA T. (1993) Constitutive activity of receptors coupled to guanine nucleotide regulatory proteins. *Trends in Pharmacological Sciences* **14**, 303-307.
- LEMBO P. M. C. & ALBERT P. R. (1995) Multiple phosphorylation sites are required for pathway-selective uncoupling of the 5-hydroxytryptamine(1A) receptor by protein kinase C. *Molecular Pharmacology* **48**, 1024-1029.
- LEURS R., SMIT M. J., ALEWIJNSE A. E. & TIMMERMAN H. (1998) Agonist-independent regulation of constitutively active G-protein-coupled receptors. *Trends in Biochemical Sciences* **23**, 418-422.
- LIGGETT S. B., OSTROWSKI J., CHESNUT L. C., KUROSE H., RAYMOND J. R., CARON M. G. & LEFKOWITZ R. J. (1992) Sites in the third intracellular loop of the alpha-2A-adrenergic receptor confer short term agonist-promoted desensitization. Evidence for a receptor kinase-mediated mechanism. *Journal of Biological Chemistry* **267**, 4740-4746.
- LIVINGSTONE M. S. & TEMPEL B. L. (1983) Genetic dissection of monoamine neurotransmitter synthesis in *Drosophila*. *Nature* **303**, 67-70.
- LOGOTHETIS D. E., KURACHI Y., GALPER J., NEER E. J. & CLAPHAM D. E. (1987) The beta gamma-subunits of GTP-binding proteins activate the muscarinic K⁺ channel in heart. *Nature* **325**, 321-326.
- LUDWIG J., MARGALIT T., EISMANN E., LANCET D. & KAUPP U. B. (1990) Primary structure of cAMP-gated channel from bovine olfactory epithelium. *FEBS Letters* **270**, 24-29.

- LUTTRELL L. M. & LEFKOWITZ R. J. (2002) The role of beta-arrestins in the termination and transduction of G-protein-coupled receptor signals. *Journal of Cell Science* **115**, 455-465.
- MAPARA S., PARRIES S., QUARRINGTON C., AHN K. C., GALLIN W. J. & GOLDBERG J. I. (2008) Identification, molecular structure and expression of two cloned serotonin receptors from the pond snail, *Helisoma trivolvis*. *Journal of Experimental Biology* **211**, 900-910.
- MARG S., WALZ B. & BLENAU W. (2004) The effects of dopamine receptor agonists and antagonists on the secretory rate of cockroach (*Periplaneta americana*) salivary glands. *Journal of Insect Physiology* **50**, 821-830.
- MATTHES H., BOSCHERT U., AMLAIKY N., GRAILHE R., PLASSAT J.L., MUSCATELLI F., MATTEI M.G. & HEN R. (1993) Mouse 5-Hydroxytryptamine_{5A} and 5-Hydroxytryptamine_{5B} receptors define a new family of serotonin receptors: cloning, functional expression and chromosomal localization. *Molecular pharmacology* **43**, 313-319.
- MILLAN M., MARIN P., BOCKAERT J. & LA COUR C. M. (2008) Signaling at G-protein-coupled serotonin receptors: recent advances and future research directions. *Trends in Pharmacological Sciences* **29**, 454-464.
- MILLIGAN G. (2003) Constitutive activity and inverse agonists of G protein-coupled receptors: a current perspective. *Molecular Pharmacology* **64**, 1271-1276.
- MILLIGAN G. (2004) G protein-coupled receptor dimerization: Function and ligand pharmacology. *Molecular Pharmacology* **66**, 1-7.
- MIRZADEGAN T., BENKÖ G., FILIPEK S. B. & PALCZEWSKI K. (2003) Sequence analyses of G-protein-coupled receptors: similarities to rhodopsin. *Biochemistry* **42**, 2759-2767.
- MITCHELL R., MCCULLOCH D., LUTZ E., JOHNSON M., MACKENZIE C., FENNEL M., FINK G., ZHOU W. & SEALFON S. C. (1998) Rhodopsin-family receptors associate with small G proteins to activate phospholipase D. *Nature* **392**, 411-414.
- MOFFETT S., MOUILLAC B., BONIN H. & BOUVIER M. (1993) Altered phosphorylation and desensitization patterns of a human beta 2-adrenergic receptor lacking the palmitoylated Cys341. *The EMBO Journal* **12**, 349-356.
- MONS N., DECORTE L., JAFFARD R. & COOPER D. M. F. (1998) Ca²⁺-sensitive adenylyl cyclises: key integrators of cellular signalling. *Life Sciences* **62**, 1647-1652.
- MONSMA F. J., SHEN Y., WARD R. P., HAMBLIN M. W. & SIBLEY D. R. (1993) Cloning and expression of a novel serotonin receptor with high affinity for tricyclic psychotropic drugs. *Molecular Pharmacology* **43**, 320-327.
- MORO O., LAMEH J., HÖGGER P. & SADÉE W. (1993) Hydrophobic amino acid in the i2 loop plays a key role in receptor-G protein coupling. *Journal of Biological Chemistry* **268**, 22273-22276.
- MURPHY D. L., LERNER A., RUDNICK G. & LESCH K. P. (2004) Serotonin transporter: gene, genetic disorders, and pharmacogenetics. *Molecular Interventions* **4**, 109-123.
- NAMKUNG Y. & SIBLEY D. R. (2004) Protein kinase C mediates phosphorylation, desensitization and trafficking of the D-2 dopamine receptor. *Journal of Biological Chemistry* **279**, 49533-49541.
- NECKAMEYER W. S. & WHITE K. (1992) A single locus encodes both phenylalanine hydroxylase and tryptophan hydroxylase activities in *Drosophila*. *Journal of Biological Chemistry* **267**, 4199-4206.
- NG G. Y. K., MOUILLAC B., GEORGE S. R., CARON M., DENNIS M., BOUVIER M. & ODOWD B. F. (1994) Desensitization, phosphorylation and palmitoylation of the human dopamine D1 receptor. *European Journal of Pharmacology-Molecular Pharmacology Section* **267**, 7-19.
- NICHOLS D. & NICHOLS C. (2008) Serotonin receptors. *Chemical Reviews* **108**, 1614-1641.

- NISHIDA M., TAKAGAHARA S., MARUYAMA Y., SUGIMOTO Y., NAGAO T. & KUROSE H. (2002) G beta gamma counteracts G alpha(q) signaling upon alpha(1)-adrenergic receptor stimulation. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **291**, 995-1000.
- NOEL J. P., HAMM H. E. & SIGLER P. B. (1993) The 2.2 Å crystal structure of transducin- α complexed with GTP γ S. *Nature* **366**, 654-663.
- OAKLEY R. H., LAPORTE S. A., HOLT J. A., BARAK L. S. & CARON M. G. (2001) Molecular determinants underlying the formation of stable intracellular G protein-coupled receptor-beta-arrestin complexes after receptor endocytosis. *Journal of Biological Chemistry* **276**, 19452-19460.
- OHYAMA K., YAMANO Y., CHAKI S., KONDO T. & INAGAMI T. (1992) Domains for G-protein coupling in angiotensin II receptor type I: Studies by site-directed mutagenesis. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **189**, 677-683.
- OLDENHOF J., VICKERY R., ANAFI M., OAK J., RAY A., SCHOOTS O., PAWSON T., VON ZASTROW M. & VAN TOL H. H. M. (1998) SH3 binding domains in the dopamine D4 receptor. *Biochemistry* **37**, 15726-15736.
- OSCHMAN J. & BERRIDGE M. J. (1970) Structural and functional aspects of salivary fluid secretion in *Calliphora*. *Tissue and Cell* **2**, 281-310.
- PAAVOLA K. J., STEPHENSON J. R., RITTER S. L., ALTER S. P. & HALL R. A. (2011) The N terminus of the adhesion G Protein-coupled receptor GPR56 controls receptor signaling activity. *Journal of Biological Chemistry* **286**, 28914-28921.
- PAPOUCHEVA E., DUMUIS A., SEBEN M., RICHTER D. & PONIMASKIN E. (2004) The 5-Hydroxytryptamine(1A) receptor is stably palmitoylated, and acylation is critical for communication of receptor with G_i Protein. *The Journal of Biological Chemistry* **279**, 3280-3291.
- PARMENTIER M., LIBERT F., MAENHAUT C., LEFORT A., GÉRARD C., PERRET J., VAN SANDE J., DUMONT J. E. & VASSART G. (1989) Molecular cloning of the thyrotropin receptor. *Science* **246**, 1620-1622.
- PIETRANTONIO P. V., JAGGE C. & MCDOWELL C. (2001) Cloning and expression analysis of a 5HT7-like serotonin receptor cDNA from mosquito *Aedes aegypti* female excretory and respiratory systems. *Insect Molecular Biology* **10**, 357-369.
- PONIMASKIN E.G., HEINE M., JOUBERT L., SEBEN M., BICKMEYER U., RICHTER D. W. & 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. *Journal of Biological Chemistry* **277**, 2534-2546.
- PONIMASKIN E. G., DUMUIS A., GAVEN F., BARTHET G., HEINE M., GLEBOV K., RICHTER D. W. & OPPERMAN M. (2005) Palmitoylation of the 5-hydroxytryptamine(4a) receptor regulates receptor phosphorylation, desensitization, and beta-arrestin-mediated endocytosis. *Molecular Pharmacology* **67**, 1434-1443.
- PORTER J. E., HWA J. & PEREZ D. M. (1996) Activation of the alpha(1b)-adrenergic receptor is initiated by disruption of an interhelical salt bridge constraint. *Journal of Biological Chemistry* **271**, 28318-28323.
- PREMONT R. T. & GAINETDINOV R. R. (2007) Physiological roles of G protein-coupled receptor kinases and arrestins. *Annual Review of Physiology* **69**, 511-534.
- PRINCE W. T., BERRIDGE M. J. & RASMUSSEN H. (1972) Role of calcium and adenosine-3':5'-cyclic monophosphate in controlling fly salivary gland secretion. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **69**, 553-557
- PRINCE W. T., RASMUSSEN H. & BERRIDGE M. J. (1973) The role of calcium in fly salivary gland secretion analyzed with the ionophore A-23187. *Biochimica et Biophysica Acta* **329**, 98-107.

- PROBST W. C., SNYDER L. A., SCHUSTER D. I., BROSIUS J. & SEALFON S. C. (1992) Sequence alignment of the G-protein coupled receptor superfamily. *DNA and Cell Biology* **11**, 1-20.
- RAM J. L., SHUKLA U. A. & AJIMAL G. S. (1981) Serotonin has both excitatory and inhibitory modulatory effects on feeding muscles in *Aplysia*. *Journal of Neurobiology* **12**, 613-621.
- RANDS E., CANDELORE M. R., CHEUNG A. H., HILL W. S., STRADER C. D. & DIXON R. A. (1990) Mutational analysis of beta-adrenergic receptor glycosylation. *Journal of Biological Chemistry* **265**, 10759-10764.
- RAPP P. E. & BERRIDGE M. J. (1981) The control of transepithelial potential oscillations in the salivary gland of *Calliphora erythrocephala*. *Journal of Experimental Biology* **93**, 119-132.
- RASMUSSEN H. (1980) Calcium and cAMP in stimulus-response coupling. *Annals of the New York Academy of Sciences* **356**, 346-353.
- RAYMOND J. R. (1991) Protein kinase C induces phosphorylation and desensitization of the human 5-HT_{1A} Receptor. *Journal of Biological Chemistry* **266**, 14747-14753.
- RAYMOND J. R. & OLSEN C. L. (1994) Protein kinase A induces phosphorylation of the human 5-HT_{1A} receptor and augments its desensitization by protein kinase C in CHO-K1 cells. *Biochemistry* **33**, 11264-11269.
- REIN J., VOSS M., BLENAU W., WALZ B. & BAUMANN O. (2008) Hormone-induced assembly and activation of V-ATPase in blowfly salivary glands is mediated by protein kinase A. *American Journal of Physiology-Cell Physiology* **294**, C56-C65
- REIN J., ZIMMERMANN B., HILLE C., LANG I., WALZ B. & BAUMANN O. (2006) Fluorescence measurements of serotonin-induced V-ATPase-dependent pH changes at the luminal surface in salivary glands of the blowfly *Calliphora vicina*. *The Journal of Experimental Biology* **209**, 1716-1724.
- RENNER U., GLEBOV K., LANG T., PAPUSHEVA E., BALAKRISHNAN S., KELLER B., RICHTER D. W., JAHN R. & PONIMASKIN E. G. (2007) Localization of the mouse 5-hydroxytryptamine(1A) receptor in lipid microdomains depends on its palmitoylation and is involved in receptor-mediated signaling. *Molecular Pharmacology* **72**, 502-513.
- RENNER U., ZEUG A., WOEHLE A., NIEBERT M., DITYATEV A., DITYATEVA G., GORINSKI N., GUSEVA D., ABDEL-GALIL D., FRÖHLICH M., DÖRING F., WISCHMEYER E., RICHTER D. W., NEHER E. & PONIMASKIN E.G. (2012) Heterodimerization of serotonin receptors 5-HT_{1A} and 5-HT₇ differentially regulates receptor signalling and trafficking. *Journal of Cell Science*, advanced online publication
- ROBINSON P. R., COHEN G. B., ZHUKOVSKY E. A. & OPRIAN D. D. (1992) Constitutively active mutants of rhodopsin. *Neuron* **9**, 719-725.
- ROSENBAUM D., RASMUSSEN S. & KOBILKA B. (2009) The structure and function of G-protein-coupled receptors. *Nature* **459**, 356-363.
- ROTTE C., WALZ B. & BAUMANN O. (2008) Morphological and functional characterization of the thoracic portion of blowfly salivary glands. *Arthropod Structure & Development* **37**, 372-382.
- ROTTE C., KRACH C., BALFANZ S., BAUMANN A., WALZ B. & BLENAU W. (2009) Molecular characterization and localization of the first tyramine receptor of the American cockroach (*Periplaneta americana*). *Neuroscience* **162**, 1120-1133.
- SAITOU N. & NEI M. (1987) The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution* **4**, 406-425.
- SANDERS-BUSH E., FENTRESS H. & HAZELWOOD L. (2003) Serotonin 5-HT₂ receptors: molecular and genomic diversity. *Molecular Interventions* **3**, 319-330.
- SANIN A., BRISANDER M., ROSQVIST S., MOHELL N. & MALMBERG Å. (2003) 5-aryl substituted (S)-2-(dimethylamino)-tetralins: novel serotonin 5-HT₇ receptor ligands. *Proceedings of the 14th Camerino-Noordwijkerhout Symposium, Ongoing Progress in the Receptor Chemistry* **27**

- SAUDOU F., AMLAIKY N., PLASSAT J. L., BORRELLI E. & HEN R. (1990) Cloning and characterization of a *Drosophila* tyramine receptor. *The EMBO Journal* **9**, 3611-3617.
- SAUDOU F., BOSCHERT U., AMLAIKY N., PLASSAT J. L. & HEN R. (1992) A family of *Drosophila* serotonin receptors with distinct intracellular signalling properties and expression patterns. *The EMBO Journal* **11**, 7-17.
- SCHAERLINGER B., LAUNAY J. M., VONESCH & MAROTEAUX L. (2007) Gain of affinity point mutation in the serotonin receptor gene 5-HT_{2Dro} accelerates germband extension movements during *Drosophila* gastrulation. *Developmental Dynamics* **236**, 991-999.
- SCHEERER 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-U30
- SCHEINER R., BAUMANN A. & BLENAU W. (2006) Aminergic control and modulation of honeybee behaviour. *Current Neuropharmacology* **4**, 259-276.
- SCHLENSTEDT J. (2005) Molekulare und pharmakologische Charakterisierung von Serotonin-Rezeptoren der Honigbiene *Apis mellifera*. Dissertation, Universität Potsdam
- SCHLENSTEDT J., BALFANZ S., BAUMANN A. & BLENAU W. (2006) Am5-HT₇: molecular and pharmacological characterization of the first serotonin receptor of the honeybee (*Apis mellifera*). *Journal of Neurochemistry* **98**, 1985-1998.
- SCHMIDT R. (2006) Signalwege und Steuermechanismen in den Speicheldrüsen von Dipteren. Dissertation, Universität Potsdam
- SCHMIDT R., BAUMANN O. & WALZ B. (2008) cAMP potentiates InsP₃-induced Ca²⁺ release from the endoplasmic reticulum in blowfly salivary glands. *BMC Physiology* **8**, 10
- SCHWARTZ T. W. & ROSENKILDE M. M. (1996) Is there a 'lock' for all agonist 'keys' in 7TM receptors? *Trends in Pharmacological Sciences* **17**, 213-216.
- SEIFERT R. & WENZEL-SEIFERT K. (2002) Constitutive activity of G-protein-coupled receptors: cause of disease and common property of wild-type receptors. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology* **366**, 381-416.
- SHAPIRO D. A., KRISTIANSEN K., WEINER D. M., KROEZE W. K. & 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. *Journal of Biological Chemistry* **277**, 11441-11449.
- SHEIKH S. P., ZVYAGA T. A., LICHTARGE O., SAKMAR T. P. & BOURNE H. R. (1996) Rhodopsin activation blocked by metal-ion-binding sites linking transmembrane helices C and F. *Nature* **383**, 347-350.
- SHEN Y., MONSMA F. J., METCALF M. A., JOSE P. A., HAMBLIN M. W. & SIBLEY D. R. (1993) Molecular cloning and expression of a 5-hydroxytryptamine₇ serotonin receptor subtype. *Journal of Biological Chemistry* **268**, 18200-18204.
- SHENG M. & SALA C. (2001) PDZ domains and the organization of supramolecular complexes. *Annual Review of Neuroscience* **24**, 1-29.
- SITARAMAN D., ZARS M., LAFERRIERE H., CHEN Y. C., SABLE-SMITH A., KITAMOTO T., ROTTINGHAUS G. E. & ZARS T. (2008) Serotonin is necessary for place memory in *Drosophila*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **105**, 5579-5584.
- SPITZER N., EDWARDS D. H. & BARO D. J. (2008) Conservation of structure, signaling and pharmacology between two serotonin receptor subtypes from decapod crustaceans, *Panulirus interruptus* and *Procambarus clarkii*. *Journal of Experimental Biology* **211**, 92-105.
- STRADER C.D., FONG T.M., GRAZIANO M.P. & TOTA M.R. (1995) The Family of G-Protein-Coupled Receptors. *Faseb Journal* **9**, 745-754.

- TAKAMORI M. (1977) Nerve, muscle, and serotonin. *Journal of Neurology Neurosurgery and Psychiatry* **40**, 89-96.
- TAMURA K., PETERSON D., PETERSON N., STECHER G., NEI M. & KUMAR S. (2011) MEGA5: Molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Molecular Biology and Evolution* **28**, 2731-2739.
- TANG W. J. & GILMAN A.G. (1991) Type-specific regulation of adenylyl cyclase by G protein beta gamma subunits. *Science* **254**, 1500-1503.
- THAMM M. (2009) Charakterisierung der Serotonin-Rezeptoren der Honigbiene *Apis mellifera*. 2009. Dissertation, Universität Potsdam
- THAMM M., BALFANZ S., SCHEINER R., BAUMANN A. & BLENAU W. (2010) Characterization of the 5-HT_{1A} receptor of the honeybee (*Apis mellifera*) and involvement of serotonin in phototactic behavior. *Cellular and Molecular Life Sciences* **67**, 2467-2479.
- THOMPSON J. D., HIGGINS D. G. & GIBSON T. J. (1994) Clustal W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Research* **22**, 4673-4680.
- TIERNEY A. (2001) Structure and function of invertebrate 5-HT receptors: a review. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A* **128**, 791-804
- TROPPMANN B. (2009) Klonierung und Charakterisierung aminergerezeptoren der amerikanischen Schabe *Periplaneta americana*. Dissertation, Universität Potsdam
- TROPPMANN B., BALFANZ S., BAUMANN A. & BLENAU W. (2010) Inverse agonist and neutral antagonist actions of synthetic compounds at an insect 5-HT₁ receptor. *British Journal of Pharmacology* **159**, 1450-1462.
- TSUGA H., KAMEYAMA K., HAGA T., HONMA T., LAMEH J. & SADEE W. (1998) Internalization and down-regulation of human muscarinic acetylcholine receptor m2 subtypes. Role of third intracellular m2 loop and G protein-coupled receptor kinase 2. *Journal of Biological Chemistry* **273**, 5323-5330.
- VALLÉS A. M. & WHITE K. (1986) Development of serotonin-containing neurons in *Drosophila* mutants unable to synthesize serotonin. *Journal of Neuroscience* **6**, 1482-1491.
- VETTER I. & LEWIS R. (2010) Characterization of endogenous calcium responses in neuronal cell lines. *Biochemical Pharmacology* **79**, 908-920.
- VOSS M., BLENAU W., WALZ B. & BAUMANN O. (2009) V-ATPase deactivation in blowfly salivary glands is mediated by protein phosphatase 2C. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology* **71**, 130-138.
- VOSS M., FECHNER L., WALZ B. & BAUMANN O. (2010) Calcineurin activity augments cAMP/PKA-dependent activation of V-ATPase in blowfly salivary glands. *American Journal of Physiology* **298**, 1047-1056
- VOSS M., VITAVSKA O., WALZ B., WIECZOREK H. & BAUMANN O. (2007) Stimulus-induced phosphorylation of vacuolar H⁺-ATPase by protein kinase a. *Journal of Biological Chemistry* **282**, 33735-33742.
- WANG C. D., GALLAHER T. K. & SHIH J. C. (1993) Site-directed mutagenesis of the serotonin 5-hydroxytryptamine₂ receptor: identification of amino acids necessary for ligand binding and receptor activation. *Molecular Pharmacology* **43**, 931-940.
- WEIR M. P. & RICE M. D. (2010) TRII: a probabilistic scoring of *Drosophila melanogaster* translation initiation sites. *EURASIP Journal on Bioinformatics and Systems Biology* **2010**, 814127
- WERRY T. D., GREGORY K. J., SEXTON P. M. & CHRISTOPOULOS A. (2005) Characterization of serotonin 5-HT_{2C} receptor signaling to extracellular signal-regulated kinases 1 and 2. *Journal of Neurochemistry* **93**, 1603-1615.

- WESS J. (1997) G-protein-coupled receptors: molecular mechanisms involved in receptor activation and selectivity of G-protein recognition. *FASEB Journal* **11**, 346-354.
- WESS J., LIU J., BLIN N., YUN J., LERCHE C. & KOSTENIS E. (1997) Structural basis of receptor G protein coupling selectivity studied with muscarinic receptors as model systems. *Life Sciences* **60**, 1007-1014.
- WHITEWAY M., HOUGAN L., DIGNARD D., BELL L., SAARI G., GRANT F., OHARA P., MACKAY V. L. & THOMAS D.Y. (1988) Function of the Ste4 and Ste18 genes in mating pheromone signal transduction in *Saccharomyces cerevisiae*. *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology* **53**, 585-590.
- WILLETS J. M., CHALLISS R. A. J. & NAHORSKI S. R. (2003) Non-visual GRKs: are we seeing the whole picture? *Trends in Pharmacological Sciences* **24**, 626-633.
- WITZ P., AMLAIKY N., PLASSAT J. L., MAROTEAUX L., BORRELLI E. & HEN R. (1990) Cloning and characterization of a *Drosophila* serotonin receptor that activates adenylate cyclase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **87**, 8940-8944.
- WU D. Q., KATZ A. & SIMON M. I. (1993) Activation of phospholipase C beta 2 by the alpha and beta gamma subunit of trimeric GTP-binding protein. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **90**, 5297-5301.
- XIE X. D., LEE S. P., O'DOWD B. F. & GEORGE S. R. (1999) Serotonin 5-HT1B and 5-HT1D receptors form homodimers when expressed alone and heterodimers when co-expressed. *FEBS Letters* **456**, 63-67.
- YUAN Q., LIN F., ZHENG X. & SEHGAL A. (2005) Serotonin modulates circadian entrainment in *Drosophila*. *Neuron* **47**, 115-127.
- ZGOMBICK J. M., SCHECHTER L. E., ADHAM N., KUCHARWICZ S. A., WEINSHANK R. L. & BRANCHEK T. A. (1996) Pharmacological characterizations of recombinant human 5-HT1D alpha and 5-HT1D beta receptor subtypes coupled to adenylate cyclase inhibition in clonal cell lines: apparent differences in drug intrinsic efficacies between human 5-HT1D subtypes. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology* **354**, 226-236.
- ZHOU J., ARORA M. & STONE D. (1999) The yeast pheromone-responsive G alpha protein stimulates recovery from chronic pheromone treatment by two mechanisms that are activated at distinct levels of stimulus. *Cell Biochemistry and Biophysics* **30**, 193-212.
- ZIMMERMANN B. & WALZ B. (1997) Serotonin-induced intercellular calcium waves in salivary glands of the blowfly *Calliphora erythrocephala*. *The Journal of Physiology* **500**, 17-28.
- ZIMMERMANN B., DAMES P., WALZ B. & BAUMANN O. (2003) Distribution and serotonin-induced activation of vacuolar-type H⁺-ATPase in the salivary glands of the blowfly *Calliphora vicina*. *The Journal of Experimental Biology* **206**, 1867-1876.

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	Adenylylzyklase
ANOVA	<i>Analysis of Variance</i>
APS	Ammoniumpersulfat
AS	Aminosäure
ADP	Adenosindiphosphat
ATP	Adenosintriphosphat
BLAST	<i>Basic Local Alignment Search Tool</i>
bp	Basenpaare
BSA	<i>bovine serum albumin</i> , Rinder-Serumalbumin
[Ca ²⁺] _i	freie, intrazelluläre Ca ²⁺ -Konzentration
cAMP	cyclisches Adenosinmonophosphat
[cAMP] _i	intrazelluläre cAMP-Konzentration
CCD	<i>Charge-coupled Device</i>
cDNA	complementary DNA, komplementäre DNA
CHAPS	3-[(3-Cholamidopropyl)dimethylammonio]-1-propansulfonat
C-Terminus	Carboxylterminus
DAG	Diacylglycerol
DDC	DOPA-Decarboxylase
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DIC	differentieller Interferenzkontrast
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphate
DTT	Dithiothreitol
EC ₅₀	mittlere effektive Konzentration
ECL	<i>extracellular loop</i> , extrazelluläre Schleife
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamin-Tetraessigsäure
ER	Endoplasmatisches Reticulum
FRET	Fluoreszenz Resonanz Energie Transfer
GDP	Guanosindiphosphat
GIP	GPCR interagierende Proteine
GRK	GPCR-regulierende Kinase
G-Protein	Guaninnukleotid-bindendes Protein
GPCR	<i>G protein-coupled receptor</i> , G-Protein-gekoppelter Rezeptor
GTP	Guanosintriphosphat
HRP	<i>Horseradish Peroxidase</i> , Meerrettich-Peroxidase
IBMX	3-Isobutyl-1-methylxanthin
ICL	<i>intracellular loop</i> , intrazelluläre Schleife
IP ₃ /InsP ₃	Inositol-1,4,5-triphosphat
IPTG	Isopropyl-Thio-D-Galaktopyranosid

kb	Kilobasenpaare
MAO	Monoaminoxidase
MBP	Maltosebindeprotein
MQ-H ₂ O	bidestilliertes Wasser in Millipore-Qualität
mRNA	messenger RNA
NCBI	<i>National Center of Biotechnology Information</i>
N-Terminus	Aminoterminus
OD	optische Dichte
ORF	<i>open reading frame</i> , offener Leserahmen
PBS	<i>phosphate buffered saline</i> , Phosphat gepufferte Salzlösung
PCR	<i>polymerasechain reaction</i> , Polymerasekettenreaktion
PIP ₂	1-Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat
PKA	Proteinkinase A, cAMP-abhängige Proteinkinase
PKC	Proteinkinase C, Ca ²⁺ -abhängige Proteinkinase
PLC	Phospholipase C
PVDF	Polyvinylidenfluorid
RACE-PCR	<i>rapid amplification of cDNA ends-PCR</i>
RG	Reaktionsgefäß
RNA	<i>ribonucleic acid</i> , Ribonukleinsäure
RT	Raumtemperatur (~23 °C)
RT-PCR	<i>reverse transcription PCR</i>
SDS	<i>sodium dodecyl sulfate</i> , Natrium-Dodecyl-Sulfat
SDS-PAGE	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese
Ser	Serin
SERT	Serotonintransporter
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
TEP	transepitheliales Potential
Thr	Threonin
TM	Transmembrandomäne
TRH	Tryptophan-Hydroxylase
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-Aminomethan
Tween	Polyoxyethylensorbitanmonolaureat
U	Units
UpM	Umdrehungen pro Minute
V-ATPase	vakuoläre H ⁺ -ATPase
Vol	Volumen

6.2. Nukleotidsequenzen der untersuchten Rezeptoren

```

1   ATTGGAACATTACTGACACCCCTCAGAAACAAAAATTTTGTCAATTTGGCAGCTAAAAACAATTAACCTCAATTGCTATT
81  GTTACAATTAATAATATACTGATTTATTTCTGGCTGTTTAAACAAGCAAAAAAACAATTTGATTACGAAAGATTTAAACCAT
161 AAAGGAGAGAAAAGAAATTCATTTACAGCTTGTCAAACAGCTTTAGAATGAAATGGATTTGCAACAAAGACTTGGTCCT
241 AGACCAACAACAACAACAACCTAGAGAAGCATCAGAAACAGCGACAGCATCAAGGACAACAACAGCATCACTACTATATGA
321 CACAAAGGCAGCAACAAAACATACATCAGCATTTCAAACGTTACACAAACTGTCAACGACATCCAATTCATTTGCAACAA
401 CTGCAACACCAGCAACTACAACAACAACAATGCCCTAACAGCGCCAGCAATAATAAAAACAATGAAGAATTTTACGAT
481 ACTGCTGTTGGCAAGAGACTAAAAACGACATGGATGTCAACGATAATAATGCAACCGGAAAAATGAAGTACTTGTCTAG
561 AGAACAGGAACACGAACAAAAAGAAATCGCTTTTTAAAAATATGGTGTGAACAGGCAGCTGGCACAATCACCTATGGAAAAATG
641 ATGAAACTGAAAGACCGGAAATCACCCGCCATTATGCTGATGATAAAGATAAGCCGGGCGTTGAGGAGGGGGCAACAAAA
721 AGTTTGGCACAAACATTCGGTTGTATACCTTGAACATTCGAAACTACAGCAGCAAAAGACTACGACGAACAATACACAAT
801 ACAATATAGTTGTATAATACTGATATGCCTGATTATTTATACTATCCCTCCAATTCACCTCCAACAACAACAATTTGT
881 CATCCTTCACTCATCAACATGAACATCAGCAATTAACAATTTGTTAATGAAACTGAAAGGAATGTTAACAGCAGCATCAGT
961 AGTAGTATTAGCAATAGCATCAGCAATAACACAATCCTGCCATCATTAAATAGTCATGAACATGAACAGCAGCAAACTTC
1041 CACTACGAATACATTTTTGCAAAAAATGATAGACTCATATAAAAATTAATAGTGAAGATGTAGCAGAACCCATTAAGAAT
1121 TCCAAATATCATTTGAAATCAAAACCTCACCAAGAGCGTCTACATCCTCCTCTCGACGAACATTTATATGCGGCACGGAA
1201 GCAACAACAAGTTGCCAACTGATCATTATCAACAGCCACCAGCAATAGTAGTAGTAGTTTCTTAACCCGAGTGA
1281 TACATTTATAAAATCCTAACCAACCTAATCTTTAGTATAGTAGTCAAAATAATTTTACAAAACCTTCTTTTCGAGTCCCATAAT
1361 CTGCAGCTTTTAAACAGCCCTCATCATCTCTAGCTAATCGTGTCAACCTGTAGTACAAAATCTCTCCATATATTGTCAA
1441 CAACCTTCAGCCATCTTCTCATCCCTACCCCTGCCCCAACATTCCTGCCCATAAAGTCAAGTGCCTTCTTACGAATAC
1521 CCTGACTGAGTTAACCACAAATGCTTCCTATTAGCTCAACTACAGGATTAATTTACCCACATTTGGGTCTGGCCTCAGTCG
1601 CAAATGCTGAGGATCATATGAATCAATCTTTGACTCTAGCAGCAATTTGGTTGGAAGATCCATGGCCTTGGAGTATGGCT
1681 GTCATGAACCTCAACTCTTGTCAATTCATCATCTACATTTGCTGCCCTAAGTTCTGCTGATACAAAATATGACAAAATTAAC
1761 CACCCTTGGATGGAGATCTCACAGTGCCAAATCAAAGGTTTTGATTGGAGTTTTCTATTTGTAATATTTTTTATATTTGCGG
1841 GCGGACTGGGAAATATTTTGGTGTCTGGCTGTGGCTTTAGATCGTCGTTTGCAAAAATGTCACCAATATTTCTTATTC
1921 TCACTGGCCATAGCTGATCTGTTGGTGAGTTTGTGTGATGCCGTGGGAGCGATACCGGCTTTTTTGGGTTATTTGGCC
2001 ATTAGGTTTTACATGGTGCAATATATATGTGACCTGCCGATGTTATGGCATGTTCAATCCAGCATCTTGCATGTGCTTCA
2081 TCGATTTGGGTGTTATTTGGTATACGAAATCCGTTTGGTGGTTCACCGCATCGTTCAACGAAACCTGCTGGATGAA
2161 ATTGCCATTGTCTGGTTAATGGCCATGATTGTATCCAGCTCGATAACAGTATTGGGCTTGTGAATGAAAAGAAATATCAT
2241 GCCCCAGTCAAAATGTTTGTGTCATTAACAATCGTGCATTTTTTGTTCGTTTGGTGGCATTATATACCCATGG
2321 TAATGATGGTAATCACGTACGCTCTGACAATACCATTGTTAAGGAAAAAGGCACGATTTGCAGCTGAACATCCGGAAAGC
2401 GAATTAATTCGTCGCTTGGGTGCTGTTTCTACATACGCTCCCAACATTCACCAACAGCAGCTGCAATGCACAGTAGTTT
2481 TAGCAGCAACAGCAGCTACAACAATAATGTTTTGGGCGTGGTCCAGCGATTCCAATCGAATTCACAATGACTATA
2561 ACGATAAACCAACATCAACAGCAGCAGTACCAGCATCATCGTTCTTCATCCTCGTCAAAATTTCTCTAATGGCACTGCCACC
2641 AGCCGTCTCGGAGCAGGCAGTGGTCTGAATGGTCTCAGGGCAATGGCAGTAATGGCGGTGGCATTGTGGCAATGATGA
2721 TGATGATGGACCAATGGCTGCTGCCGCCACAGCCAAACCTGTCCGAATGCTGCGAATTTTCGTAGCGGTATTTTACGCC
2801 ATTCATCTTCATCATCTTTACGCAATAAACCCACTAGTTTTAAGTTATAGTTGCATCGCCAACAACAACGTAACAAT
2881 GATAAACGACGCATATCATCACACCCCACTCGCAGCAGCATTCGCAACAGCAGCTTCAGCAACAGACCAATCTGTCCAC
2961 CTCATCGTCAGCGTTGCTAACGCCCCACCACCACCATCAGGAAACAAATAACTATTGGCGTTTCATCGCATGCTGGTA
3041 ATGCGAATCTAATGGATAGCCATCCAAATAGAAGTTCTCGGTGCGTATTAACCGAAGCAACAATCTAACACAAATAGGT
3121 TTTGCTAGCAGCAGCACCCCAACAACAACAACAACAACAATAAATAGCAACAGCAATAACAAACAACAACAACAACG
3201 TAACAAAACCTCATTGTCTATGCGACCCATTGGCTTTTTCTGTTACGCCGCAATAGTCCAGATGAAGAAGGTTGGAGGACGTG
3281 TGGGCGCTGATGTTGGCATAGCCACTCTCAGTGGCAACAGCAATAAGGCAATTTGGGCAATTTTCGCGCTGTTATGGCTGATGGT
3361 CATCATACGAGCTTTCAGCATCATCATCATATTTGCACTATAGCAGACCTGTGAACAAAGCACTCAAAACGCCAAATTC
3441 GATTAGTCGTGAAACCGGTAGAAACCGCAAAATAAAAGTATTAAGATTTAATTTTAAATAAAGTGGCAACACCAACATTTGA
3521 ATTTGCGCTTCTGAATAATCGCAATAAACGCAATAACCTTTCCGCCAACGCGGTTGCCACCGAACAACAAGGCCAACAAA
3601 GTGCTGGGTTTGTCTTCTTTACATTCGTTTTGTGCTGGTCAACCTTTTTTATACTCAACATTAATTTTGGCGCTGTCC
3681 GGAGTGCAGAGTACCCGAGCATGTTGTTAATACTTCCCTGTTGGTGGTACGTTTCCCTCCACCATAAATCCAAATCATTT
3761 ATACAATATTCAAATCGAACATTTCTGTGCTGCAATTTATACGTTTGTCAAGTGAATTTGTGAAAGGTAAGTGAAGAA
3841 GGGCGGTTATGGAGGAGGAGGAGGAGGAAAGATGAATGGATGGATGGTTGGTTGGTTAGATGAATAAATAAATGATGGA
3921 GTTTGAAAAACAAGGGCAAGTAAAAATAAATGAGCAGAAATAAAGATTAAGATACAATTTTGTAACTAAGTTAAGGGA
4001 AATTAAAAAAGGGTAAATGCAATGTTGATGCTTAATTAAGGTTGGGTTTTGTGTTTTTTTTTTTATATAGACATACTT
4081 CAAAAAATAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAGT

```

Abb. 6.1: Nukleinsäuresequenz des *Cv5-ht2*-cDNA-Klons.

Die Nukleotidabfolge ist in 5'-3'-Richtung dargestellt. Die Position des ersten Nukleotids jeder Zeile ist links neben der Sequenz angegeben. Das Start-Kodon (ATG, Position 214-216) sowie das Stopp-Kodon (TAA, Position 3.826-3.828) ist grau unterlegt. Ein putatives Spleiß-Donor-Akzeptor-Paar welches zu einer verkürzten cDNA-Variante führen könnte ist farbig hinterlegt (der Donor in türkis und der Akzeptor in gelb). In der verkürzten cDNA Variante (3469 bp) fehlt der Bereich (645 bp) zwischen Spleißdonor und -akzeptor.

```

1      GCGGGATTTCAAACAATTATTAATTAATTCGTAACCAAAGAAAGTTAAGGATATCATAATAGAATCATTAAACACATACA
81     CACACCACAAACCTCTCCCAATAAACCCAAAAATTCCTCAACATTTTATACATAAAAACGTTTTATATGGATTTCGTTAGTT
161    GAAAAACAAGTTGAACAAAAGCTTAAAGTTTTCTCTTTACACGCTTCTGGCGTGTTTTATACTACAACATATCGCAACTAC
241    TACTACTAATACTTCAAAAAGCTATTAACGCTACCACCCTTATGCCACAAAATCCTCGACTTCAAATGCAACTAATGCTG
321    TTAAGAATTTTCAGTTTCAATACAAAATCATCGCCAGCTATCTACTAAAGTTATACTGCGAAAACATCTGCGAAAAAATTTAAA
401    CATTGCATATTGACAATTGTTGGTTTTTTGTTCTATATATTTTTGATATTAAGCCTGACAGATGGTTTCAATTTGGGTAC
481    AGTATTGGCTGTAAACGAAAATAAATCGAGACCAGATTTTTTAAATATTTTCGACAGCCTCATCGTCTTGGTGCAGCGT
561    TATCGTCTTCTCAACTGCCAGTTGAAGCTCTGATTTTGGAAAGCCAACACAAAATTTAGATGTACACAATTTACCAGCAAC
641    AAAACGGCAAAACAAATGGCTTTAGTAAACAGTACCTACCACAAACTGCATAGCAAATAACAACGGCAGCAGCAACAACAACAT
721    CATGTTTAATACAGACACAGCAGTGCACGGGTCAACATTTAGCAACAGCAACCAATCAATAGCATCACCTTACCCTGT
801    CATCACTGTCCCTCTCACCATTGCCACCACCAGTTCCTCCTCTTCATCATATTTACAGCATGACAACTTGTACTCTACG
881    CTTTACTCATCTACAACATTTGAGCCTGCCTCACCATCTGCCTCGTCTGAAGCAAGCGTTGAATTTACCATGCCCGCAGT
961    CCACACAGTACTCGTCTGCATTGTTCTGCTCTTTGTCATCTTGGGTACGATTGTGGCAATGTGTTGGTCTGCATTGCCG
1041   TTTGTATGGTACGCAAAATACGGCGTCCCTGTAATTTATCTGCTGGTGTCTTTGGCTTTGTCCGATCTTTGTGTGGCTGTT
1121   TTAGTTATGCCGATGGCGTTGCTCTACGAAGTATTGGAAAAGTGGAAATTTTGGCCAGTTTTATGTGACATTTGGGTGTC
1201   GTTTGATGTTCTGTGTTGTACAGCATCCATATTGAATTTGTGGCCATTTTCAGTCGACCGTTACTTGGCCATAACAAAAC
1281   CTCTGGAGTACGGTGTCAAACGTACACCACGACGCATGATGTTGTGTGGCATTAGTTTGGCTGGCTGCCGCATGTATA
1361   TCATTACCACCCTACTCATACTGGGCAATGAACACGAAGATGAACATGGCAATCCAATGTGTTAGTTTGTCAAATTT
1441   TGCATATCAAATTTATGCAACGCTTGGTTCCTTTTACATACCCCTGGCCGTAATGCTGTTTGTGTACTATCAGATATTTA
1521   GAGCAGCACGTCCGATTGTGTTGGAGGAGAAGAGAGCACAGACGCATTTACAGCATGCTCTTAATGGAACCGGCTCACCG
1601   CCCGGCCACACCGATTTGGGTGGCAATGGCCAACATCGTACAGTAGTTATGGCAACACTTCCCTTAATTTATCCACCTG
1681   TGGTGGTCTCTCTGCCAGCCAGGCTGGTGGCGGTGGAGGCGGTTCCGGCTCAAGTGGTCTTCTAGGTTCCGCCCATCAA
1761   AGAAGTTACGCTTTCAATTGGCCAAAGAGAAGAAGGCCCTCCACTACGCTGGGCATTATAATGTCTGCGTTTACCATATGC
1841   TGGCTGCCATTTTTATTTTAGCTCTTATACGTCCATTTGTGGAGAACGAGACCCTCATGTGCCACAGTCATTATCTTC
1921   TTTGTTCTATGGCTGGGTTATGCCAACTCATTTGCTCAATCCCATCATTTATGCCACCCTAAATCGTGACTTCCGTA AAC
2001   CATTTCAGGAAATTTCTACTTCCGTTGTTCTAGTCTTAATACCATGATGCGTGAAAACATATTATCAGGATCAGTATGGC
2081   GAACCACCCCTCGCAGCGTGTATGTTGGGCGATGAAAGGCATGGTGCCTGGGAAAATTTTCTCTGAATTAGGTATTATA
2161   AAGGGTCGAGGTTGGCCGGGTCGAGTTCCACAGGGTTTAAATCCTTAAGCCCTTTATATTCTAAAAACCAACACACACT
2241   TACATAACAATTATGCACACATTACACGCCTTTAAAGAAAACCTAACACGAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAGTAC
2321   TCTGCGTTGATACCACCTGCTTACCCTATAGTGAGTCGTATTAG

```

Abb. 6.2: Nukleinsäuresequenz des Cv5-ht7-cDNA-Klons.

Die Nukleotidabfolge ist in 5'-3'-Richtung dargestellt. Das Start-Kodon (ATG, Position 146-148) sowie das Stopp-Kodon (TGA, Position 2144-2146) sind grau unterlegt.

6.3. Übersicht über verwendete Bakterienstämme, Enzyme, Vektoren, Geräte, kommerzielle Kits und Rezeptorliganden

Tabelle 6.1: Verwendete Bakterienstämme

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

Tabelle 6.2: Verwendete Enzyme

Enzyme		
Bioline-X-ACT™ Short		Bioline (Luckenwalde)
Dnase I		Ambion (Huntingdon, UK)
Dnase I from bovine pancreas		Sigma (München)
FastDigest® Restriktionsendonukleasen		Fermentas (St. Leon-Rot)
Restriktionsendonuklease BstZI		Promega (Mannheim)
RNase-Cocktail		Ambion (Austin, USA)
RNase H		Invitrogen (Karlsruhe)
Phusion® High-Fidelity DNA Polymerase		Finnzymes, Espoo, Finland
PNGase F		NEB (Frankfurt am Main)
Taq-Polymerase		roboklon (Berlin)
T4-DNA-Ligase		Promega (Mannheim)
T4-DNA-Ligase		Fermentas (St. Leon-Rot)

Tabelle 6.3: Verwendete Vektoren

Vektoren		
pBluescript II SK (-)	für Klonierung, Lagerung	Stratagene (Amsterdam)
pcDNA3.1 (+)	für eukaryotische Expression	Invitrogen (Karlsruhe)
pcDNA6/myc-His A	für eukaryotische Expression	Invitrogen (Karlsruhe)
pET-30a	für prokaryotische Expression	Novagen (Darmstadt)
pGEM-T	für T/A-Klonierung	Promega (Mannheim)
pMal-c2X	für prokaryotische Expression	NEB (Frankfurt am Main)

Tabelle 6.4: Geräte

Geräte	
Agarose-Horizontalgelelektrophorese Hoefer™ HE33	Amersham Bioscience (Freiburg)
Binokular Stemi 2000	Zeiss (Jena)
Electrophoresis Power Supply - EPS 600	Pharmacia Biotech (Dübendorf)
Fluoreszenz-Lesegerät FluoStar Galaxy	BMG Labtech (Ortenberg)
Gefriermikrotom HM 500 OM.	Microm (Edgewater, USA)
Gel-Dokumentation Gelsystem 8 Entry	Biostep (Jahnsdorf)
GeneQuant 1300	GE-Healthcare (Uppsala, Schweden)
Gradientenmischer	Bio-Rad (München)
inverses Mikroskop Axiovert 135TV	Zeiss
konfokales Mikroskop LSM510	Zeiss
Kühlzentrifuge Biofuge Primo R	Thermo Fischer (Schwerte)
Labor-pH-Meter 766	Knick (Berlin)
Milli-Q Reference Ultrapure Water Purification System	Millipore (Schwalbach)
Mini Protean IITM System	Bio-Rad (München)
PCR-Maschine T3 Thermocycler	Biometra (Göttingen)
Peristaltikpumpe Pump P-1	Pharmacia Biotech (Dübendorf)
Spektralphotometer GeneQuant 1300	GE Healthcare (München)
Stabsonifizierer/Ultraschallprozessor UP 50H	Hielscher Ultrasonics GmbH (Teltow)
Thermomixer comfort	Eppendorf (Hamburg)
Tischzentrifuge Biofuge pico	Heraeus (Hanau)
Tischzentrifuge UECI	UniEquip (Martinsried)
Trans-Blot SD Cell	Bio-Rad (München)
Vakuumzentrifuge	Bachofer (Reutlingen)
Warmluftschüttler Shaker ES-70	Peqlab (Erlangen)
UV-Illuminator	Vilber Lourmat (Marne La Vallee, Frankreich)
Varioklav Dampfsterilisator)	Thermo Scientific (Bonn)
Variomag Electronicrührer Mono	H&P Labortechnik (Minden)
Wippschüttler	Cat (Staufen)

Tabelle 6.5: Verwendete kommerzielle Kits

Vom Hersteller bezogene Chemikalienszusammenstellungen (Kits)	
AccuScript™ High Fidelity 1 st Strand cDNA Synthesis	Stratagene (Amsterdam, Niederlande)
BD SMART™ RACE cDNA Amplification Kit	Clontech (Heidelberg)
cAMP Screen System	Applied Biosystems (Darmstadt)
High Pure PCR Product Purification Kit	Roche Applied Science (Mannheim)
Micro-FastTrack™ TM 2.0	Invitrogen (Karlsruhe)
pGEM®-T Vector Systems	Promega (Mannheim)
peqGOLD Plasmid Miniprep Kit I	peqLab (Erlangen)
Superscript III™ First-Strand Synthesis System for RT-PCR	Invitrogen (Karlsruhe)
SuperScript™ One-Step RT-PCR mit Platinum® Taq Systems	Invitrogen (Karlsruhe)
Super Signal West Pico Chemiluminescent Substrate	Thermo Fischer Scientific (Bonn)

Tabelle 6.6: Verwendete Rezeptorliganden

biogene Amine	Konzentration der Stammlösung
Serotonin	100 mM in H ₂ O
Dopamin	100 mM in H ₂ O
Histamin	100 mM in H ₂ O
Octopamin	100 mM in H ₂ O
Tyramin	100 mM in H ₂ O
Agonisten	
R-(+)-Lisurid	10 mM in DMSO
5-Carboxyamidotryptamin (5-CT)	10 mM in DMSO
5-Methoxytryptamin (5-MT)	10 mM in DMSO
8-OH-DPAT	10 mM in H ₂ O
AS 19	10 mM in 100 % EtOH
Antagonisten	
Cinanserin	10 mM in H ₂ O
Clozapin	10 mM in H ₂ O
Cyproheptadin	10 mM in H ₂ O
Ketanserin	10 mM in H ₂ O
Methiothepin	5 mM in H ₂ O
Methysergid	10 mM in H ₂ O
Mianserin	10 mM in H ₂ O
Phentolamin	10 mM in H ₂ O
Prazosin	10 mM in DMSO
SB269970	10 mM in H ₂ O
Sipiperon	10 mM in DMSO
Yohimbin	10 mM in DMSO

6.4. Molekularbiologie

Tabelle 6.7: Primersequenzen

Bezeichnung	Sequenz
degenerierte Primer	
5'Cv5-HT2-F2	GTIGGIYTIWTHGTIATGCC
5'Cv5-HT7-F1	GYGTIGCIBTIYTIGTIATG
3'Cv5-HT2-R3	GCYTTYTGYTCIGTIGCIAC
3'Cv5-HT7-R1	AABGGYTTSCGGAARTC
spezifische Primer	
5'RACE-Cv5HT2-R1	CGTATACCCAAATAACGACCCAAACTG
5'RACE-Cv5HT2-R2	CAAGAGTTGAGTTCATGACGGCCATAC
5'RACE-Cv5HT2-R3	GATGCTGCTGTAAACATTCCTTTTCAGTTT
5'RACE-Cv5HT2-R4	CAGCATAATGGCGGGTGATTTC
5'RACE-Cv5HT7-R	GTACAACACAGAACATCAAACGACACCC
3'RACE-Cv5HT2-F	CGCAATAAACGCAATAACCTTTCCG
3'RACE-Cv5HT7-F	GTCTGCGTTTACCATATGCTGGCTGCC
fullCv5-HT2-F	CACAGCTTGTCAAACAGC
fullCv5-HT7-F	GAATCATTAAACACATACACACACCAC
fullCv5-HT2-R	CCCTTCTTCACTTACTTACCTTTCCAC
fullCv5-HT7-R	CCAACCTCGACCCTTTATAATACC
RT-Cv-5HT2-F	CGTTACGCCGCAATAGTCC
RT-Cv-5HT2-R	GATGATGATGATGATGCTGAAAGC
RT-Cv-5HT7-F	CAGTAGTTATGGCAACACTTCC
RT-Cv-5HT7-R	GAGGCCTTCTTCTCTTTGG
RT-Cv-Actin-F	GGTAATGAACGTTTCCGTTGC
RT-Cv-Actin-R	CATACGGAGTATTTGCGTTCTGG
HA-Oligo 1	AAATCTAGATACCCATACGACGTCCCAGACTACGCTTAAGCG GCCGCTTTTT
HA-Oligo 2	AAAAAGCGGCCGCTTAAGCGTAGTCTGGGACGTCGTATGGGT ATCTAGATTT
3'-RACE CDS Primer A	AAGCAGTGGTATCAACGCAGAGTAC(T) ₃₀ VI
5'-RACE CDS Primer	(T) ₂₅ VI
10X Universal Primer A Mix	lang: CTAATACGACTCACTATAGGGCAAGCAGTGGTATCAAC GCAGAGT kurz : CTAATACGACTCACTATAGGGC
Nested Universal Primer A	AAGCAGTGGTATCAACGCAGAGT
BD SMART II A Oligo	AAGCAGTGGTATCAACGCAGAGTACGCGGG

Y = C oder T; D = A,G oder T; H = A,C oder T; R = A oder G; V = A, G, oder C

Inosin (I) = A,G,C, oder T

Tabelle 6.8: mRNA-Expressionsprofil der Rezeptoren für biogene Amine in den Speicheldrüsen von *Drosophila melanogaster* laut FlyAtlas.org

Für jeden Rezeptor von *Drosophila melanogaster* ist die Zugangsnummer genannt. Bei einer Expression in den Speicheldrüsen adulter Fruchtfliegen ist auch die Anreicherung der mRNA in der Drüse im Vergleich zum Gesamttier aufgeführt. Ist die Expression in den Speicheldrüsen fraglich, so ist die mRNA-Anreicherung in Klammern gesetzt. Die Tabelle wurde anhand von Daten auf FlyAtlas.org erstellt (CHINTAPALLI et al., 2007).

	Zugangsnummer	mRNA-Expression in den Speicheldrüsen	mRNA-Anreicherung
5-HT_{1A}	CAA77570	ja	1.75
5-HT_{1B}	CAA77571	nein	-
5-HT_{2A}	CAA57429	ja	95.10
5-HT_{2B}	AAN13390	nein	-
5-HT₇	AAF57104	ja	39.16
DOP1	P41596	nein	-
DOP2	Q24563	nein	-
D2R	AAX52462	fraglich	(2.50)
TyrRI	NP_001163494	nein	-
TyrRII	NM_142394	nein	-
Oamb	NP_524669	ja	0.64
OA2	NP_001034064	nein	-

Die Seite A10 (Curriculum Vitae) enthält persönliche Daten. Sie ist deshalb nicht Bestandteil der Online-Veröffentlichung.

Publikationen

Röser, C.; Jordan, N.; Balfanz, S.; Baumann, A.; Walz, B.; Baumann, O. and Blenau, W. (2012) Molecular and pharmacological characterization of 5-HT₂ and 5-HT₇ receptors in the salivary glands of the blowfly *Calliphora vicina*. Manuskript in Vorbereitung

Konferenzbeiträge

Röser, C.; Blenau, W.; Baumann, A.; Walz, B. and Baumann, O. (2011): Molecular and pharmacological characterization of serotonin receptors in the salivary gland of *Calliphora vicina*. *Annual Main Meeting 2011 of the Society for Experimental Biology*, Glasgow (United Kingdom), Poster, Abstract No. A1.31

Röser, C.; Baumann, O.; Walz, B. and Blenau, O. (2010): Serotonin receptors in the salivary gland of *Calliphora vicina*. *IXth European Congress of Entomology*, Budapest (Ungarn), Poster, Abstract WE 50

Teilnahme an nationalen & internationalen Konferenzen

07/2011	Annual Main Meeting 2011 der „Society for Experimental Biology“ in Glasgow, United Kingdom
05/2011	Rauischholzhausen Seminar zum Thema “Plastizität und Entwicklung des Insektennervensystems”, Universität Marburg
08/2010	IX th European Congress of Entomology in Budapest, Ungarn
04/2010	Rauischholzhausen Seminar zum Thema “Plastizität und Entwicklung des Insektennervensystems”, Universität Marburg

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei all jenen bedanken, die durch ihre fachliche und persönliche Unterstützung zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Zunächst möchte ich mich bei Prof. Dr. Bernd Walz, apl. Prof. Dr. Otto Baumann und PD Dr. Wolfgang Blenau für die Vergabe dieses spannenden Themas bedanken.

Ganz besonderer Dank gilt meinem Betreuer PD Dr. Wolfgang Blenau und apl. Prof. Dr. Otto Baumann für die ständige Bereitschaft über aktuelle Erfolge und Probleme im Labor zu diskutieren.

Ich danke Prof. Dr. Christian Wegner, Prof. Dr. Dorothea Eisenhardt sowie Prof. Dr. Ralph Gräf für die Bereitschaft als Gutachter für meine Dissertation zu wirken.

Des Weiteren möchte ich mich bei der Arbeitsgruppe um Prof. Dr. Arnd Baumann für die Kooperation und Hilfestellung auf dem Gebiet der Zellkultur bedanken.

Vielen Dank auch an Eileen Wojtek, Carmen Fourier, Angela Hubig, Helga Liebherr und Bärbel Wuntke für die Unterstützung im Labor.

Der gesamten AG Zoophysiologie danke ich für die tolle Arbeitsatmosphäre. Ganz besonders danke ich dabei Steffi, Kristoffer, Markus, Anne-Katrin, Tina, Daniel und Lennie für die schönen Stunden auch außerhalb der Arbeitszeit.

Zum Schluss möchte ich noch meiner Familie und meinen Freunden danken, die immer für mich da waren wenn ich sie brauchte.

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 09.05.2012

Claudia Röser