

Universität Hamburg

Fachbereich Biologie

Eingangsstempel

12. JAN. 2001

0

Aus dem
Institut für Zellbiochemie und klinische Neurobiologie
(Dir.: Prof. Dr. Dietmar Richter)

**Identifizierung und Charakterisierung
des Allatostatin Rezeptors aus *Drosophila melanogaster*,
Periplaneta americana und
*Carausius morosus***

Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades
des Fachbereichs Biologie der Universität Hamburg

**Vorgelegt von
Necla Birgül**

Hamburg, Januar 2001

Genehmigt vom
Fachbereich Biologie der
Universität Hamburg
Auf Antrag von Herrn Professor Dr. Dr. RICHTER
Weitere Gutachter der Dissertation:
Herr Prof. Dr. Udo Wienand und Herr Prof. Dr. Thomas Roeder

Hamburg den 8. Januar 2001

Arg	Arginin
Asn	Asparagin
Asp	Aspartat
ATP	Adenosintri-phosphat
bp	Basenpaare
β -END	β -Endorphin
β -LPH	β -Lipotropin
β -MSH	β -Melanozytenstimulierendes Hormon
CLIP	Corticotropin-like-intermediate lobe peptide
C-Terminus	Carboxylterminus
cAMP	Cyclisches AMP
cDNA	Komplementäre Desoxyribonukleinsäure
cpm	„Counts“ pro Minute
cRNA	Komplementäre Ribonukleinsäure
CTP	Cytosintri-phosphat
dATP	Desoxyadenosintri-phosphat
dCTP	Desoxycytosintri-phosphat
dATP	Didesoxyadenosintri-phosphat
dCTP	Didesoxycytosintri-phosphat
dGTP	Didesoxyguanosintri-phosphat
dNTP	Didesoxynukleotidtri-phosphat
dTTP	Didesoxythymidintri-phosphat
dGTP	Desoxyguanosintri-phosphat
DNA	Desoyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
dNTPs	Desoxyribonukleotidtri-phosphate
DTT	Dithiotreitol
dTTP	Desoxythymidintri-phosphat
Ec 50	50% der effektivsten Konzentration
e1, e2, e3	Extrazelluläre Schleife 1, 2, und 3
FSH	Follikelstimulierendes Hormon
g	Erdbeschleunigung
GDP	Guanosindiphosphat

GH	growth hormone
GIRK	G-protein-gated inwardly rectifying potassium channels
G-Protein	GTP-bindendes Protein
Gly	Glycin
GpppG	Diguanosintriphosphat
GPCR	G-Protein-gekoppelter Rezeptor
GTP	Guanosintriphosphat
h	Stunde
HPLC	high-performance liquid chromatography
Ile	Isoleucin
IL-8	Interleukin-8
IPTG	Isopropylthiogalaktosid
i1, i2, i3	Intrazelluläre Schleife 1, 2 und 3
kb	Kilobasen
KOAc	Kaliumacetat
LDH	Luteinisierendes Homon
Leu	Leucin
Lys	Lysin
M	Molar
Maldi	Matrixunterstützter Laser-Desorptions/Ionisationstechnik
MS	Massenspektroskopie
min	Minute
ml	Mililiter
mM	Milimolar
mRNA	Botenribonukleinsäure
N-Terminus	Aminoterminus
Na-Citrat	Natriumcitrat
NaOAc	Natriumacetat
nA	Nano-Amper
nm	Nanometer
OD _{595,280,260}	Optische Dichte (gemessen bei einer Wellenlänge von 595, 280, 260 nm)
PCR	Polymerasekettenreaktion
pH	Wasserstoffionenkonzentration
Phe	Phenylalanin

Pro	Prolin
POMC	Pro-Opiomelanocortin
RACE	Rapid amplification of cDNA ends
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
rpm	Umdrehung pro Minute
sec	Sekunde
Ser	Serin
SLC1	Somatostatin-like receptor
SST 14	Somatostatin 14
SST 28	Somatostatin 28
TM	Transmembrandomäne
Tm	Schmelztemperatur
TSH	thyreotrope hormone
Tyr	Tyrosin
U	Einheit für Enzymaktivität
UE	Untereinheit
UTP	Uridintriphosphat
UV	Ultraviolett
V	Volt
(v/v)	Volumen zu Volumen
(v/w)	Volumen zu Gewicht
(w/v)	Gewicht zu Volumen
X-Gal	5-Bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-galactosid

ZUSAMMENFASSUNG

Die fünf bisher bekannten Rezeptoren für das Neuropeptid Somatostatin (SST) können auf Grund ihrer strukturellen Ähnlichkeit und der konservierten Kopplung an intrazelluläre *second messenger* Systeme als eine eigene Proteinfamilie innerhalb der großen Gruppe der G-Protein-gekoppelten Rezeptoren betrachtet werden. Sie weisen dabei die größte Ähnlichkeit zur Familie der Opioid-Rezeptoren auf. Ebenso wie die den Opioid-Rezeptoren konnten die SSTRs in einer ganzen Reihe von verschiedenen Vertebraten identifiziert werden, bisher jedoch nicht in Invertebraten.

Um die Evolution dieser Rezeptorfamilie besser zu verstehen, sollte hier versucht werden, ähnliche Rezeptoren in Invertebraten zu klonieren und funktionell zu charakterisieren. Ausgehend von konservierten Sequenzbereichen innerhalb der sieben Transmembranregionen wurden degenerierte Oligonukleotide konstruiert, um cDNAs, die für einen möglichen Somatostatin-Rezeptor kodieren, aus *Drosophila melanogaster* zu amplifizieren. Nachdem zuerst eine partielle Sequenz erhalten wurde, die Ähnlichkeiten zu den G-Protein-gekoppelten Rezeptoren der Vertebraten aufwies, wurde durch Verwendung der RACE-Technik anschließend die vollständige cDNA-Sequenz eines neuen Rezeptors ermittelt. Die abgeleitete Proteinsequenz wies in den Transmembranregionen eine Identität von 30-35 % sowohl zu den Somatostatin- und Opioid-Rezeptoren als auch zu den Galanin-Rezeptoren der Säuger auf. Aufgrund dieser strukturellen Ähnlichkeit wurde vermutet, daß der neue Rezeptor auch ähnliche Signaltransduktionswege wie die Somatostatin- und Opioid-Rezeptoren benutzen könnte. Da SSTRs in vielen Fällen an den GIRK-Kanal (*G-protein gated inwardly rectifying potassium channel*) koppeln und mit diesem Kanal in den *Xenopus*-Oozyten koexprimiert und elektrophysiologisch gemessen werden können, wurde dieser Versuchsansatz auch für den neuen Rezeptor aus *Drosophila* gewählt. Jedoch bewirkten die zunächst ausgewählten potentiellen Liganden (Galanin, Somatostatin, Met-Enkephalin, Leu-Enkephalin) keine Aktivierung des Rezeptors in diesem Expressionssystem. Daher wurde versucht, den endogenen Liganden des neuen Rezeptors aus *Drosophila*-Köpfen zu isolieren. Ein Peptid-Rohextrakt aus *Drosophila*-Köpfen zeigte eine starke agonistische Aktivität auf Rezeptor-exprimierenden *Xenopus*-Oocyten; diese Aktivität wurde in mehreren Chromatographic-Schritten zur Homogenität aufgereinigt. Die Sequenz dieses Peptides wurde massenspektroskopisch als **Ser-Arg-Pro-Tyr-Ser-Phe-Gly-Leu/Ileu-NH₂** bestimmt.

Da die Molekülmassen des Leucins und Isoleucins identisch sind, konnte nicht unterschieden werden, welche dieser Aminosäuren sich am Carboxyterminus befindet. Ein Sequenzvergleich zeigte, daß das identifizierte Peptid aus *Drosophila*-Köpfen mit dem Helicostatin aus *Lepidoptera* identisch ist. Weiterhin zeigte das *Drosophila*-Peptid hohe Ähnlichkeit zum Carboxyterminus der Allatostatine aus *Diploptera*. Die Identität dieses nun als *Drosophila*-Allatostatins bezeichneten Peptids als der endogene Ligand des neu klonierten Rezeptors wurde dadurch bewiesen, daß ein synthetisches Peptid nach der vorliegenden Sequenz hergestellt und die Aktivität in *Xenopus*-Oozyten gemessen wurde. Das synthetische Peptid zeigte bei der funktionellen Analyse eine hohe Affinität zu dem neu identifizierten Rezeptor, so daß dieser eindeutig als Allatostatin-Rezeptor klassifiziert werden konnte (ALSTR).

Die Klonierung von homologen Rezeptoren aus Schabe und Stabheuschrecke sowie die erfolgreiche Kopplung an den GIRK-Kanal belegen, daß die in Invertebraten weit verbreiteten Allatostatine über eine Familie von Rezeptoren wirken, die strukturell und funktionell verwandt zu den Somatostatin-, Opioid- und Galanin-Rezeptoren der Vertebraten ist.

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

ZUSAMMENFASSUNG

1.	EINLEITUNG	9
2.	MATERIAL UND METHODEN	
2.1	Materialien	
2.1.1	Chemikalien und Enzyme.....	19
2.1.2	Nährmedien und häufig verwendete Lösungen.....	19
2.1.2.1	Nährmedien zur Züchtung von <i>Dros. melanogaster</i>	20
2.1.2.2	Häufig verwendete Lösung.....	20
2.1.3	Bakterienstämme eukaryontischer Zelllinien und Vektoren	
2.1.3.1	Bakterienstämme mit Genotyp.....	21
2.1.3.2	Vektoren.....	21
2.1.3.3	cDNA Bibliothek.....	23
2.1.4	Gewebe.....	23
2.1.5	Oligonukleotidsequenzen.....	24
2.2	Methoden	
2.2.1	Arbeiten mit Ribonukleinsäuren	
2.2.1.1	RNA-Isolierung aus Gewebe.....	25
2.2.1.2	Northern-Blot-Analyse.....	26
2.2.1.3	<i>In vitro</i> Transkription.....	27
2.2.1.4	cDNA-Synthese.....	28
2.2.2	Arbeiten mit Desoxyribonukleinsäuren	
2.2.2.1	Polymerasen-Kettenreaktion (PCR).....	29
2.2.2.2	Konstruktion von chimären Rezeptor-cDNA.....	30
2.2.2.3	Klonierung von Nukleinsäuren.....	31
2.2.2.4	Minipräparation von Plasmid-DNA.....	32
2.2.2.5	Maxipräparation von Plasmid-DNA.....	32
2.2.2.6	Aufreinigung von DNA	
2.2.2.6.1	Aufreinigung aus Lösungen.....	33
2.2.2.6.2	DNA-Modifikation mit Restriktionsendonukleasen.....	34
2.2.2.6.3	5' Dephosphorylierung von DNA.....	34
2.2.2.6.4	Ligation von DNA-Fragmenten.....	34
2.2.2.7	Radioaktive DNA-Markierung.....	34

2.2.2.8	DNA-Analysemethoden	
2.2.2.8.1	Qualitative DNA-Analyse.....	35
2.2.2.8.2	Quantitative DNA-Analyse.....	35
2.2.3	Mikrobiologische Arbeitsmethoden	
2.2.3.1	Langzeitlagerung von Bakterien.....	36
2.2.3.2	Anlegen einer Übernachtskultur.....	36
2.2.3.3	Herstellung kompetenter Bakterienzellen.....	37
2.2.3.4	Transformation von Bakterienzellen.....	37
2.2.4	Elektrophysiologische Arbeitsmethoden.....	38
2.2.5	Peptidaufreinigungsmethoden.....	40
2.2.5.1	Erstellung des Peptidohextraktes aus <i>D. melanogaster</i> Köpfen.....	40
2.2.5.2	Erstellung des Peptidohextraktes aus zytosolischer Fraktion der <i>D. melanogaster</i> Köpfen.....	41
2.2.5.3	Peptidtrennung über MonoS-Kationenaustauschersäule.....	41
2.2.5.4	Peptidtrennung über reversed-phase-HPLC.....	42
3.	ERGEBNISSE	
3.1	Klonierung und Charakterisierung eines Somatostatin-ähnlichen Rezeptors in <i>Drosophila melanogaster</i>	
3.1.1	Primerkonstruktion.....	43
3.1.2	Testen der Primer.....	44
3.1.3	RT-PCR zur Amplifikation des Somatostatin-ähnlichen Rezeptors.....	46
3.1.4	Sequenzanalyse der Amplifikate.....	46
3.1.5	Amplifizierung der 5'-und 3'-Enden durch die RACE-Technik.....	48
3.1.6	Klonierung des gesamten offenen Leserahmens.....	49
3.1.7	Charakterisierung des <i>Drosophila</i> -GPCRs.....	50
3.1.7.1	Genomische Struktur Aufklärung des <i>Drosophila</i> -GPCRs.....	52
3.1.7.2	Northern-Blot-Analyse.....	53
3.1.7.3	Genexpressionsanalyse des <i>Drosophila</i> -GPCRs in unterschiedlichen Entwicklungsstadien.....	53
3.2	Pharmakologische und funktionelle Charakterisierung des <i>Drososophila</i> -GPCRs.....	54
3.2.1	Erste Aufreinigung des Peptidohextraktes mit der MonoS-Ionenaustauschersäule.....	58
3.2.2	Weitere Aufreinigung der Fraktion 22 und 23 mit Hilfe der <i>reverse phase</i> HPLC (C ₁₈ -Säule).....	59
3.2.3	Weitere Aufreinigung der aktiven Fraktion mit Hilfe der <i>reverse phase</i> HPLC (C ₈ -Säule).....	60
3.2.4	Peptidanalyse mittels einer matrixunterstützter Laser-Desorptions/Ionisations-Technik.....	61
3.2.5	Dosiswirkungskurve des synthetisch erstellten Peptide und der unterschiedlichen Allatostatine.....	66
3.2.6	Struktur- und Funktions-Analyse des <i>Drosophila</i> -AlstR.....	67

3.2.7	Signaltransduktionskaskade des <i>Drosophila</i> -AlstR über den Inositoltriphosphatweg.....	66
3.3	Klonierung weiterer Allatostatin Rezeptoren	69
4.	DISKUSSION	75
5.	LITERATURVERZEICHNIS	85

1. EINLEITUNG

Für die Koordination der Zellfunktionen stehen dem Organismus zwei Kommunikationssysteme zur Verfügung: zum einen das Nervensystem, zum anderen das hormonale System. Die Nervenzellen bzw. Neurone, die morphologischen und funktionellen Einheiten des Nervensystems, leiten die Erregung und dienen im ZNS der Informationsverarbeitung. Die Neurone stehen durch spezielle Verbindungsstellen, die Synapsen, miteinander in Kontakt. Die synaptische Erregungsübertragung erfolgt auf chemischen Wegen mit speziellen Übertragungstoffen, sog. Neurotransmittern. Neurotransmitter sind wie Hormone und andere Wachstumsfaktoren interzelluläre Botenstoffe. Voraussetzung für ihre Wirkung ist das Vorhandensein von spezifischen Zelloberflächen-Rezeptoren.

Botenstoffe sind in vielen Fällen hydrophile Verbindungen, die nicht durch die Zellmembran diffundieren können, sondern an Rezeptoren binden, die in der Zellmembran der betreffenden Zielzelle integriert sind. Die Bindung des Liganden an einen spezifischen Rezeptor bewirkt, daß das extrazelluläre Signal durch die Zellmembran in das Zellinnere übermittelt wird und die Zelle daraufhin reagiert.

Membrangebundene Rezeptoren, die interzelluläre Botenstoffe und sensorische Informationen erkennen, werden in drei Proteinfamilien eingeteilt. Sowohl strukturell als auch aufgrund des Mechanismus ihrer Signaltransduktion lassen sich die Zelloberflächen-Rezeptoren weiter in verschiedene Klassen einteilen: **ligandengesteuerte Ionenkanäle** sind Transmitter-abhängige Ionenkanäle, die vorwiegend bei der schnellen Signalübertragung zwischen elektrisch reizbaren Zellen eine Rolle spielen. Diese Art der Signalübertragung wird von einer kleinen Zahl von Neurotransmittern vermittelt, die vorübergehend Ionenkanäle, an die sie binden, öffnen und schließen. Sie ändern dadurch kurz die Permeabilität der Plasmamembran und somit auch das Membranpotential der postsynaptischen Zelle.

Die **enzymgekoppelte Rezeptoren**, die von ihrem Liganden aktiviert werden, sind selbst Enzyme. Alle bisher bekannten enzymgekoppelten Rezeptoren sind Proteine, die sich durch die Plasmamembran erstrecken und eine zytoplasmatische Domäne besitzen, die z.B. eine tyrosinspezifische Proteinkinaseaktivität zeigen können.

Unter der Familie membrangebundener Rezeptoren, die interzelluläre Botenstoffe und sensorische Informationen erkennen, stellt die **G-Protein-gekoppelte Rezeptor-Familie** (GPCR-Familie) die am häufigsten vorkommende Proteinfamilie dar. Die Wechselwirkung zwischen Rezeptor und Enzym (z.B. Adenylatzyklase) oder Ionenkanal wird durch ein drittes Protein, das GTP-bindende Regulator-Protein (Guanylnucleotid-bindendes Protein oder G-Protein), vermittelt. Diese löst meist eine Reaktionskette aus, die die Konzentration eines oder mehrerer kleiner, intrazellulärer Signalmoleküle, der sogenannten intrazellulären Botenstoffe (oder intrazellulären Mediatoren), ändert. Diese Moleküle verändern ihrerseits das Verhalten anderer Zielproteine in der Zelle. Die beiden wichtigsten intrazellulären Botenstoffe sind zyklisches Adenosinmonophosphat (cAMP) und Kalzium (Ca^{+2}). Die GPCRs binden allerdings nicht nur an G-Proteine. Studien haben gezeigt, daß sie u.a. mit PDZ-Domänehaltigen Proteinen interagieren können (Hall *et al.*, 1998). Ein gutes Beispiel hierzu ist die PSD-95-Familie, welche an der Organisation von NMDA-Rezeptoren in der postsynaptischen Dichte beteiligt ist.

Eine Konformationsänderung der Transmembrandomänen stellt eine Antwort auf die Rezeptoraktivierung dar. Biochemische Analysen zeigen, wie in dem Beispiel des Rhodopsins, daß durch eine Konformationsänderung des TM III- und des TM VI-Bereiches das G-Protein von der inaktiven Form in die aktive Form übergeht, welche die G-Protein-Bindungsstellen zugänglich macht (Farrens *et al.*, 1996; Bourne, 1997; Javitch *et al.*, 1997). Bei den meisten GPCRs sind in der ersten und zweiten extrazellulären Schleife zwei Cysteinreste konserviert. Möglicherweise sind sie für die Stabilisierung während der Konformationsänderung notwendig.

Die Bindung eines extrazellulären Liganden verändert die Konformation der zytoplasmatischen Domäne des Rezeptors. Dieser bindet daraufhin an ein G-Protein, daß seinerseits ein Plasmamembran-Enzym aktiviert ($G_{s\alpha}$) oder inaktiviert ($G_{i\alpha}$). Manchmal bindet das G-Protein auch an einen Ionenkanal und nicht an ein Enzym. Die Funktion des G-Proteins hängt entscheidend von der Struktur seiner Untereinheiten ab. Das G-Protein besteht aus drei Polypeptiden, einer 45 kD α -Kette (G_{α}) und einem festen Komplex aus einer 35 kD β -Kette und einer 7 kD γ -Kette ($G_{\beta\gamma}$). Es kommt in einer GDP- und einer GTP-Form vor (Abb. 1.1). Die GTP-Form verändert die Konzentration der intrazellulären Botenstoffe, die GDP-Form jedoch nicht. Ohne den Agonisten liegt das gesamte G-Protein in der inaktiven GDP-Form vor (Abb. 1.1).

Die Agonistenbindung an den Rezeptor bewirkt den Austausch von gebundenem GDP gegen GTP. Der Rezeptor-Agonisten-Komplex bindet an das G-Protein, bewirkt die Freisetzung von gebundenem GDP und ermöglicht die Bindung von GTP. Die α -Untereinheit mit dem GTP (G_{α} -GTP) dissoziiert von der $\beta\gamma$ -Kette. Das G_{α} -GTP ändert die Aktivität der Adenylatzyklase, welche die Konzentration der intrazellulären Botenstoffe verändert.

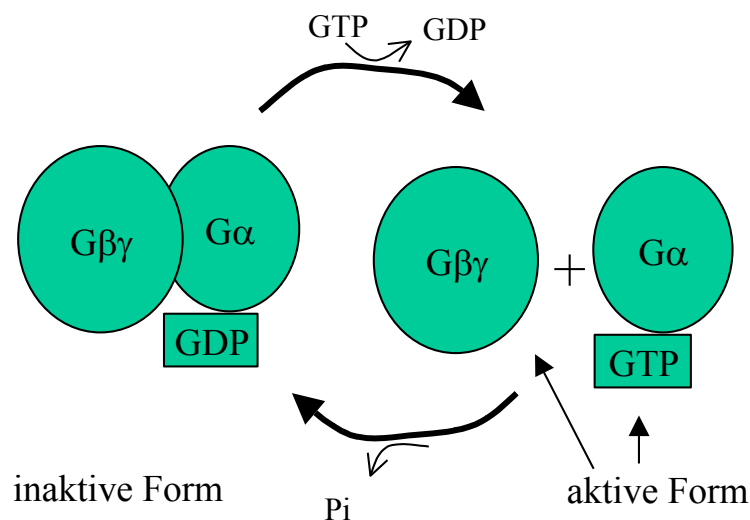


Abb. 1.1 Aktivierung des G-Proteins durch den Austausch von GDP gegen GTP

G-Proteine können eine inaktive GDP-Form und eine aktive GTP-Form annehmen. Der Austausch von gebundenem GDP gegen GTP wird vom Agonisten-Rezeptor-Komplex katalysiert. G_{α} -GTP ändert die Aktivität der Adenylatzyklase, welche die Konzentration eines oder mehrerer kleiner intrazellulärer Botenstoffe ändert. Die Hydrolyse des gebundenen GTP stellt den inaktiven Zustand des G-Proteins wieder her. Der Zyklus wird vom Phosphorylpotential des GTP betrieben.

Es gibt zahlreiche Agonisten, die den Informationsfluß innerhalb der G-Protein-gekoppelten Rezeptoren einleiten. Zwei Agonisten, die den Informationsfluß für die Somatostatin- und Opioid-Rezeptoren einleiten, sind das Somatostatin- und das Opioid-Peptid. Somatostatin-14 (SST-14) ist ein Peptid aus 14 Aminosäuren, welches zuerst aus dem Hypothalamus des Schweins isoliert wurde (Brazeau *et al.*, 1973). Neben dem biologisch aktiven SST-14 existiert noch eine höhermolekulare, ebenfalls biologisch aktive Form, das Somatostatin-28 (SST-28). Dieses Peptid ist am Aminoterminus um 14 Aminosäuren verlängert (Pradayrol *et al.*, 1980).

SST-14 und SST-28 stammen von einem gemeinsamen Prohormon, das Präprosomatostatin, ab (Goodman *et al.*, 1980; Montminy *et al.*, 1984). Nach Abspaltung des 24 Aminosäuren langen Signalpeptids entstehen durch proteolytische Spaltung an mono- und dibasischen Aminosäuren des Prosomatostatins (92 Aminosäuren) die beiden Peptide (Sevarino *et al.*, 1987). Je nach Gewebe wird entweder Somatostatin-14 oder Somatostatin-28 bevorzugt gebildet. Somatostatin kommt im zentralen und peripheren Nervensystem sowie in verschiedenen Organen wie Magen, Darm und Bauchspeicheldrüse vor (Reichlin, 1983; Epelbaum, 1986). Die physiologischen Effekte des Somatostatins sind regulatorisch, z.B. inhibiert es die Sekretion von Wachstumshormonen (GH), Schilddrüsen-stimulierendes Hormon (TSH) und Prolactin aus dem Hypophysenvorderlappen. Sowohl die reduzierte Freisetzung von Insulin und Glukagon aus den Inselzellen, als auch die Amylasesekretion aus Azinarzellen der Bauchspeicheldrüse (Brazeau *et al.*, 1973; Reichlin, 1983; Epelbaum, 1986) wird durch Somatostatin bewirkt.

Die Opioid-Peptide sind auf drei Vorstufen zurückzuführen: am Carboxyterminus des Pro-Opiomelanocortins (POMC) befindet sich das 31 Aminosäuren lange β -Endorphin (β -END) und seine aus 91 Aminosäuren bestehende Vorstufe β -Lipotropin (β -LPH), die bei einigen Spezies auch β -Melanozytenstimulierendes Hormon (β -MSH) enthält. In der Mitte des POMC-Moleküls befindet sich das aus 39 Aminosäuren bestehende ACTH, das auch in α -MSH und ein corticotropinähnliches Peptid des Hypophysenzwischenlappens (Corticotropin-like intermediate lobe peptide, CLIP) oder ACTH gespalten werden kann. Am Aminoterminus befindet sich β -MSH. Pro-Enkephalin enthält sieben aktive Peptide: viermal das Pentapeptid Methionin-Enkephalin, zwei am Carboxyterminus verlängerte Formen des Methionin-Enkephalins und Leucin-Enkephalin. Aus Pro-Dynorphin entstehen die 8-32 Aminosäuren langen Dynorphine (α -bzw. β -Neoendorphine, Dynorphin A und Dynorphin B) (Simon, 1991; Akil *et al.*, 1984). Bis auf β -Endorphin, das u.a. auch die Wirkung eines Hormons hat, werden die endogenen Opioide im Blut sehr rasch abgebaut und können daher keine morphinähnlichen Analgetika ersetzen. Opioide spielen eine signifikante Rolle in der Nozizeption, in respiratorischen, kardiovaskulären, gastrointestinalen und immunologischen Prozessen, Neurotransmittersekretion und der Regulation der Körpertemperatur (Olson *et al.*, 1992).

Die G-Protein-gekoppelten Rezeptoren haben alle eine zentrale Kerndomäne, die aus sieben alpha-helikalen Transmembranregionen (TM I-TM VII) besteht. Der Aminoterminus mit seinen putativen Glykosylierungsstellen befindet sich im extrazellulären Raum und der Carboxyterminus im intrazellulären Raum. Diese Transmembranregionen sind mit drei extrazellulären (e1, e2, e3) und drei intrazellulären (i1, i2, i3) Schleifen verbunden (Abb 1.2). Die Rezeptoren unterscheiden sich in der Länge des Aminoterminus, Carboxyterminus und der extra- und intrazellulären Schleifen. Funktionelle Analysen der chimären und mutierten Rezeptoren zeigen jedoch, daß eine Dimerisierung möglich ist (Maggio *et al.*, 1993; Mannot *et al.*, 1996). Diese Dimerisierung ist vermutlich für die Aktivierung der Rezeptoren wichtig (Herbert *et al.*, 1996).

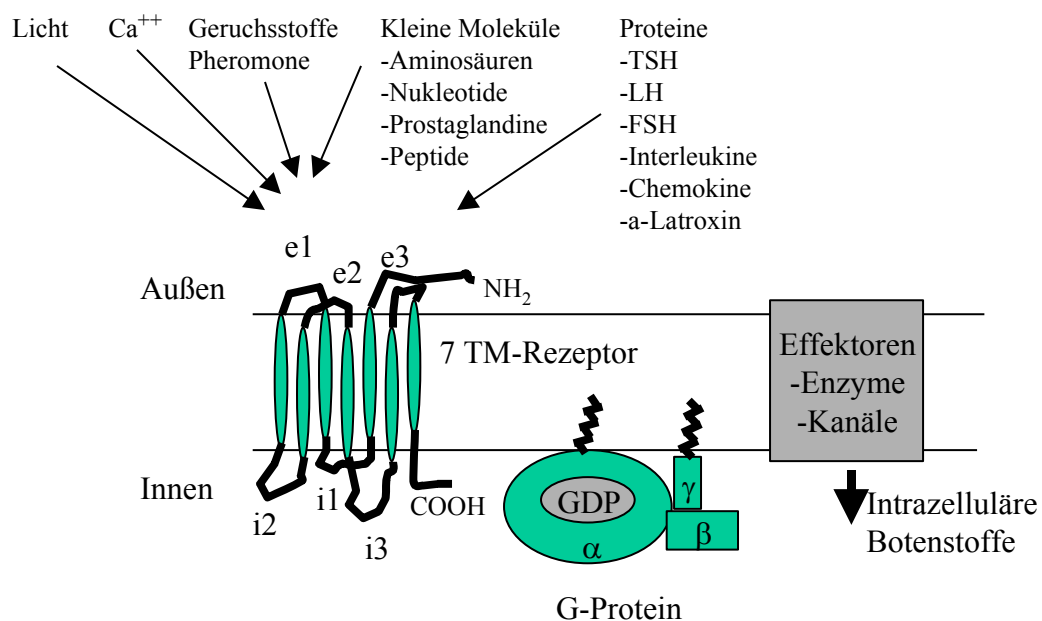


Abb. 1.2 Schematische Darstellung der G-Protein-gekoppelten Rezeptoren

Die sieben TM-Domänen sind durch die intrazellulären (i1, i2, i3) und extrazellulären (e1, e2, e3) Schleifen miteinander verbunden. Durch verschiedene Moleküle, die als Ligand fungieren, wie z.B. Geruchsstoffe, Licht oder auch Ca^{+2} , wird die Konformation des Rezeptors verändert, der Rezeptor bindet an ein G-Protein und der Signaltransduktionsweg wird eingeleitet.

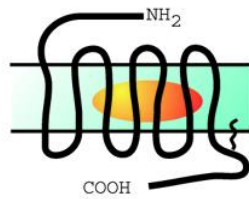
Die GPCRs werden nach ihrer Primärstruktur in drei Familien eingeteilt. Sequenzvergleiche unter den Familien der GPCRs zeigen keine Ähnlichkeit. Die erste Familie unterteilt sich in drei Subfamilien, wobei sich die Unterteilung nach der Bindungsstelle, der Größe und der chemischen Natur des Liganden richtet (Bockaert und Pin, 1999) (Abb.1.3). Die Subfamilie 1a wird durch kleine Liganden wie z.B. Catecholamine aktiviert. Der Ligand bindet in der Einbuchtung, die von den TM-Domänen III und IV gebildet wird. Ein gutes Beispiel hierzu ist der lichtaktivierte Rezeptor Rhodopsin. Bei der Subfamilie 1b sind die Liganden meistens kleine Peptide, die mit der extrazellulären Schleife und der N-terminalen Domäne interagieren. Die Subfamilie 1c wird durch große Proteine aktiviert. Die Rezeptoren haben eine große N-terminale extrazelluläre Domäne, welche an Glycoproteine bindet und somit die Kerndomäne durch Interaktion mit der e1- und e3-Schleife aktiviert (Ji und Ji, 1995; Fernandez und Puett, 1996).

Die zweite Familie wird durch große Peptide wie Glukagon oder Sekretin aktiviert. Die verhältnismäßig lange N-terminale Domäne spielt eine große Rolle bei der Bindung des Liganden (Pantolini *et al.*, 1996).

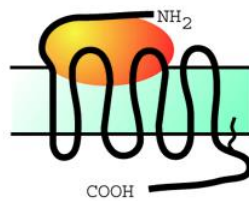
Die dritte Familie der GPCRs umfaßt die metabotropischen Glutamat-Rezeptoren, die Pheromon-Rezeptoren und die GABA_B-Rezeptoren. Alle diese Rezeptoren besitzen eine sehr lange extrazelluläre Domäne, welche eine geringe, aber signifikante Sequenzähnlichkeit zu dem periplasmatischen Bindungsprotein der Bakterien aufweist. Im Bakterium ist dieses Protein an Transportvorgängen, z.B. Transport von Aminosäuren, Ionen, Zucker oder Peptiden, beteiligt. Die Form dieses Bindungsproteins ähnelt einer Venusfliegenfalle. Aufgrund der Sequenzhomologien wird so eine ähnliche Struktur für die Bindung der Liganden postuliert (O'Hara *et al.*, 1993).

Die Somatostatin- und die Opioid-Rezeptoren gehören zur Superfamilie der G-Proteingekoppelten Rezeptoren (Subfamilie 1a). Die ersten Somatostatin-Rezeptor-cDNAs wurden aus einer cDNA-Bibliothek des Rattengehirns (Meyerhof *et al.*, 1991) sowie aus genomischen DNA-Bibliotheken des Menschen und der Maus isoliert (Yamada *et al.*, 1992).

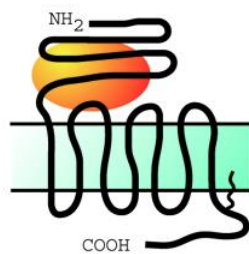
Familie 1



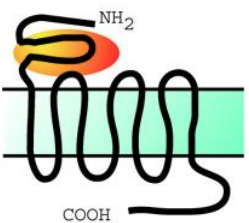
Subfamilie 1a: Retinal, Geruchsstoffe, Catecholamine, Adenosin, ATP, Opiate, Enkephaline, Anandamide



Subfamilie 1b: IL8, Formyl-Met-Leu-Phe-Peptide, Thrombin

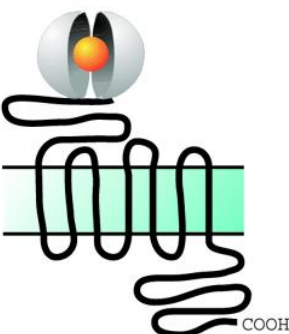


Subfamilie 1c: Glycoprotein-Hormone (LDH, TSH, FSH)



Familie 2

Kalzitinin, α -Latrotoxin, Sekretine, PTH, VIP, PACAP, GnRH, CRF



Familie 3

Glutamat, GABA, Pheromone

Abb.1.3 Einteilung der GPCRs

Die Einteilung richtet sich nach der Struktur des Rezeptors, der Größe, der chemischen Natur sowie der Bindungsstelle des Liganden

Bisher wurden fünf verschiedene Subtypen von Somatostatin-Rezeptor-cDNAs aus Mensch, Ratte, Maus und Schwein kloniert (Meyerhof *et al.*, 1992; Kluxen *et al.*, 1992; Yasuda *et al.*, 1992; Bruno *et al.*, 1992; O'Carroll *et al.*, 1992; Corness *et al.*, 1993; Demchyshyn *et al.*, 1993; Rohrer *et al.*, 1993; Xu *et al.*, 1993; Yamada *et al.*, 1993; Yasuda *et al.*, 1992; Matsumoto *et al.*, 1994; Panetta *et al.*, 1994). Die Nomenklatur richtete sich nach der Reihenfolge ihrer Klonierung. Entsprechend ihrer Verwandtschaftseinordnung innerhalb der G-Protein-gekoppelten Rezeptoren ist die Klasse der Opioid-Rezeptoren mit 32 % Ähnlichkeit auf Aminosäureebene die am nächsten verwandte Familie zu den Somatostatin-Rezeptoren (Abb. 1.4).

Die Opioid-Rezeptoren vermitteln die Wirkung der Morphine und ihrer Derivate sowie der endogenen Opioid-Peptide (Darlison *et al.*, 1997). Die Opioid-Rezeptoren werden in vier Kategorien eingeteilt: μ -, κ -, δ -, Orphanin FQ. Sie unterscheiden sich in ihrer Affinität zu ihren Liganden, ihrer anatomischen Verteilung und ihrer Funktion (Goldstein, 1987; Loh und Smith, 1990; Simon, 1991; Wood, 1982). Durch die Bindung von Opioiden kommt es zur Inhibierung der Adenylatzyklase und einer dadurch vermittelten Senkung des intrazellulären cAMP-Spiegels. Desweiteren haben sie modulierende Effekte auf die Kalium- und Kalzium-Leitfähigkeit (Barnard und Simon, 1993; Reisine und Bell, 1993).

Die Säuger-GPCRs für Neuropeptide wie z.B. Somatostatin (SST)- oder Opioid-Peptide existieren in verschiedenen Subtypen, welche ihre eigene Subfamilie innerhalb der Familie 1 der GPCRs bilden (Darlison und Richter, 1999). Es gibt mindestens neun unterschiedliche Rezeptoren, deren physiologischen Liganden bekannt sind (Somatostatin-Rezeptor SSTR 1-5; μ -, κ -, δ -, Orphanin FQ-Opioid-Rezeptor). Andererseits gibt es einige Rezeptoren, sog. Orphan-Rezeptoren, deren Liganden nicht bekannt sind (O'Dowd *et al.*, 1995). Es ist unklar, in welchem evolutionären Stadium diese Vielzahl an Subtypen entstanden ist. Um diese Fragestellung zu lösen, sind Versuche an niederen Vertebraten und Invertebraten durchgeführt worden.

Bei den **niederen Vertebraten** konnten SSTR- und Opioid-ähnliche Gene charakterisiert werden, z.B. konnten durch die Verwendung von degenerierten Oligonukleotiden aus dem Knochenfisch *Catostomus commersoni* cDNAs isoliert werden, welche für sechs unterschiedliche Opioid-Rezeptor-ähnliche Proteine kodieren. Eine dieser cDNAs konnte in voller Länge isoliert werden.

Diese cDNA kodiert für ein 383 Aminosäuren langes Protein, welches eine Sequenzähnlichkeit zum Säuger-Opioid-Rezeptor zeigt (Darlison *et al.*, 1997). Die cDNA, welche für SSTR3 codiert, wurde ebenfalls von dem niederen Vertebraten *Apteronotus albifrons* kloniert (Sieler *et al.*, 1999). Diese Daten deuten darauf hin, daß Somatostatin- und Opioid-ähnliche Rezeptoren schon vor der Evolution der Vertebraten existiert haben.

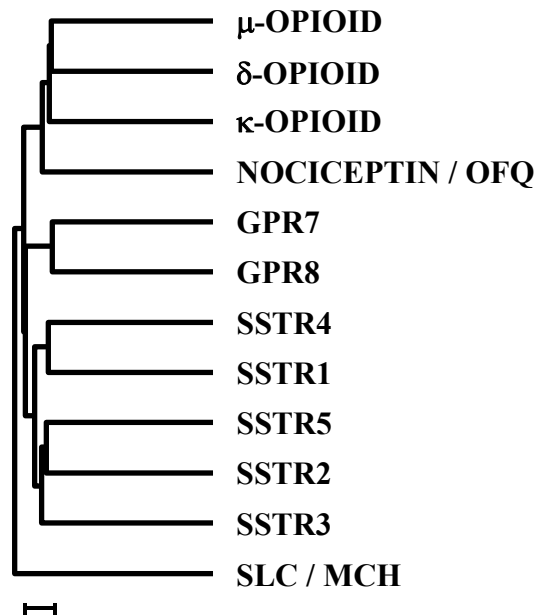


Abb. 1.4 Verwandtschaft abgeleiteter Aminosäuresequenzen von GPCRs aus Vertebraten

Gezeigt ist ein Vergleich der Aminosäuresequenzen zwischen Rezeptoren für Somatostatin, Opioid, G-Protein gekoppelter Rezeptor 7- und 8 und Melanin concentrating hormon. Die abgeleiteten Aminosäuresequenzen wurden mit Hilfe des „pile up“-Programms der GCG (Genetics Computer Group, Inc. Madison, USA) -Software verglichen. Der Balken unten kennzeichnet die Mutationsrate pro 100 Aminosäuren.

In welchem evolutionären Stadium diese Vielzahl an Subtypen entstanden ist, ist ungeklärt. Um eine Schlußfolgerung über die evolutionäre Entstehung der GPCRs zu ziehen, sind Versuche an niederen Vertebraten und Invertebraten durchgeführt worden. Es wurden viele Neuropeptid-Rezeptoren in *Drosophila melanogaster* identifiziert (Li *et al.*, 1992; Monnier *et al.*, 1992; Hauser *et al.*, 1998; Vanden Broeck *et al.*, 1998), aber die nativen Liganden konnten bisher nicht isoliert werden. Aus *Drosophila melanogaster* wurden cDNAs kloniert, welche für die Rezeptoren für Tachykinin und Neuropeptid Y kodieren. Die nativen Liganden dieser Rezeptoren konnte bisher nicht isoliert werden. Die Rezeptoren konnten jedoch durch das Säuger-Tachykinin-Peptid und das Säuger-Neuropeptid Y stimuliert werden (Monnier *et al.*, 1992). Bei Insekten sind die 7 TM-Domänen-Rezeptoren in Hinsicht auf den natürlichen Liganden bisher nicht charakterisiert. Eine Ausnahme stellt der Rezeptor für das diuretische Hormon aus *manduca sexta* dar, bei dem der native Ligand ebenfalls charakterisiert werden konnte (Reagen, 1994). Es gibt sehr viele Insekten-Neuropeptide, deren vermutliche GPCRs nicht bekannt sind (Gäde *et al.*, 1997; Vanden Broeck *et al.*, 1998). In Vertebraten umfaßt die GPCR-Familie 1000-2000 Mitglieder (mehr als 1 % des Genoms). Bei *C. elegans* codieren 5 % des gesamten Genoms für die G-Protein-gekoppelten Rezeptoren (ca. 1100 GPCRs), dieses stellt die größte Genfamilie dar.

Die GPCRs sind evolutionär konserviert, sie sind bei Pflanzen (Plakidou-Dymock *et al.*, 1998), Hefen (Dohlman *et al.*, 1991), Pilzen (Devreotes, 1994) und auch in Protozoen (Vernier *et al.*, 1995; New und Wong, 1998) die älteste Vorrichtung, die für die Signaltransduktion sorgt. Die vorliegenden Sequenzinformationen sind allerdings nicht ausreichend, um genauere Schlußfolgerungen über die evolutionäre Entstehung von GPCRs, die man bei Vertebraten findet, zu ziehen.

Da bis zu Beginn dieser Arbeit kein Somatostatin- und Opioid-ähnlicher Rezeptor in Invertebraten kloniert war, sollte hier versucht werden, solche Rezeptoren in Invertebraten zu klonieren, zu charakterisieren und ihre Genexpression zu vergleichen. Aus evolutionärer Sicht wäre es ein wichtiger Aspekt, die Verwandtschaft dieser GPCRs zu untersuchen. In dieser Arbeit wurde ein Invertebrat, die Fruchtfliege *Drosophila melanogaster*, verwendet, um zu untersuchen, wie sich mögliche Somatostatin- und Opioid-ähnliche Rezeptoren dieser evolutionär weit von Vertebraten entfernten Spezies unterscheiden könnten, und ob ihre Primärstruktur im Vergleich mit den Vertebraten Aufschluß über wichtige konservierte Bereiche und mögliche Ligandenbindungsdomänen geben könnte.

2. MATERIAL UND METHODEN

2.1 Materialien

2.1.1 Chemikalien und Enzyme

Die in dieser Arbeit verwendeten Chemikalien wurden von den Firmen Boehringer Mannheim, Life Technologies GmbH (Eggenstein, Deutschland), Merck (Hamburg, Deutschland), Amersham Pharmacia Biotech (Freiburg, Deutschland), Invitrogen 2000 (Gröningen, Holland) und Sigma (Deisenhofen, Deutschland) bezogen.

Restriktionsendonukleasen, DNA- sowie RNA-Polymerasen, DNasen, RNasen, DNA-Größenstandards, sowie RNase-Inhibitoren und DNA-modifizierende Enzyme wurden von den Firmen MBI-Fermentas, Boehringer Mannheim, Gibco BRL, New England Biolabs, Pharmacia LKB und Promega Biotec bezogen. Radioaktive Nukleotide kamen von Amersham, die verwendeten Peptide von Bachem und das spezifisch synthetisierte Peptid von Genemed Synthesis (Californien, USA).

2.1.2 Nährmedien und häufig verwendete Lösungen

Nährmedien zur Kultivierung der verwendeten *Escherichia coli*-Stämme (Sambrook *et al.*, 1989).

Alle Medien wurden nach ihrer Herstellung autoklaviert.

LB-Medium:	10 g	Bacto-Pepton
	5 g	Hefeextrakt
	10 g	NaCl
	ad 1000 ml	Aqua tridest pH 7,5

LB-Agar:	15 g	Agar
	ad 1000 ml	LB-Medium

LB-Topagarose:	5 g	Agarose
	ad 1000 ml	LB-Medium

2.1.2.1 Nährmedien zur Züchtung von *Drosophila melanogaster*

<i>Drosophila</i>-Futter	10 g	Agar
	35 g	Bäckerhefe
	15 g	Maismahl
	10 g	Weizenkeime
	1 El	Soja-Mehl
	30 g	Glukose
	15 g	Sucrose
	30 g	Sirup
	10 ml	Tegosept
	5 ml	Propionsäure
	Ad 500 ml	H ₂ O

Das *Drosophila*-Futter wurde nach der Herstellung aufgekocht. Die Propionsäure und das Tegosept wurden nach dem Abkühlen dazugegeben.

2.1.2.2 Häufig verwendete Lösungen:

1 x	TAE:	40 mM	Tris/Acetat pH 8.0
		1 mM	EDTA
10 x	PBS:	1.4 M	NaCl
		17 mM	KCl
		100 mM	Na ₂ HPO ₄
20 x	SSC:	3 M	NaCl
		0.3 M	Natriumcitrat
6 x	Agarosegel-Ladepuffer	30 %	Glycerol
		0.25 % (w/v)	Bromphenolblau
100 x	Denhardts	1 % (w/v)	BSA
		1 % (w/v)	Ficoll
		1 % (w/v)	Polyvinylpyrolidon
1 x	TE-Puffer	10 mM	Tris/HCl pH 8.0
		1 mM	EDTA

2.1.3 Bakterienstämme und Vektoren

2.1.3.1 Bakterienstämme

XL1-Blue : SupE 44, hsd R17, rec A1, end A1, gyr A46, thi, rel A1, lac⁻
 Top10F' : F' {proAB, lacIq, lacZΔM15, Tn10 (tet^r)mcrA Δ(mrr-hsdRMS-mcrBC)
 φ80 ΔlacZΔM15 ΔlacX74 deoR recA1 araD139 Δ(ara,leu) 7697 gaiU
 gaiK λ-rpsstreptomycin^r endA1 nupG

2.1.3.2 Vektoren

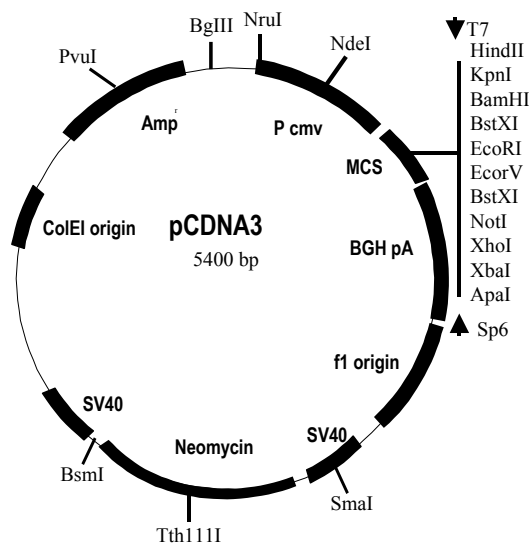


Abb. 2.1 Eukariontischer Expressionsvektor pCDNA3

Gezeigt ist die schematische Darstellung des Expressionsvektors pCDNA3 mit den Restriktionsschnittstellen des multiplen Klonierungsabschnittes. Dieser Abschnitt wird von den Promotoren T7 und SP6 flankiert. Weitere Merkmale sind folgenderweise gekennzeichnet: CMV-Promotor (P cmv), BGH-Polyadenylierungssignal (BGH pA), Replikationsstartpunkt (f1 origin), SV40 Promotor (SV40), Neomycinresistenz (Neomycin), SV40-Polyadenylierungssignal (SV40), Replikationsstartpunkt (ColE1 origin), Ampizillinresistenz (Ampicillin). Dieser Expressionsvektor pCDNA3 wurde zur Vermehrung von Plasmiden in prokariotischen Systemen verwendet.

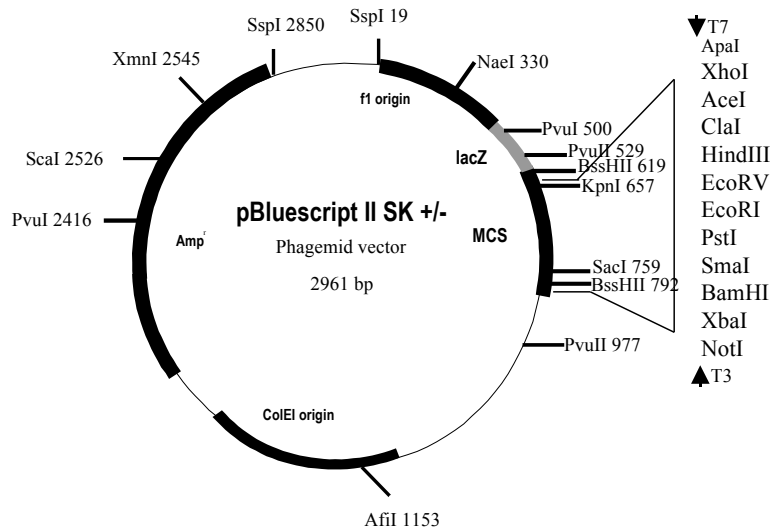


Abb. 2.2 Prokaryotischer Expressionsvektor pBluescript II SK+

Gezeigt ist die schematische Darstellung des Expressionsvektors *pBluescript II SK+* mit den Restriktionsschnittstellen des multiplen Klonierungsabschnittes. Dieser Abschnitt wird von den Promotoren T3 und T7 flankiert. Weitere Merkmale sind folgenderweise gekennzeichnet: β -Galactosidase (*lacZ*), Replikationsstartpunkt (*f1 origin*), Replikationsstartpunkt (*ColEI origin*), Ampizillinresistenz (Ampicillin). Dieser Expressionsvektor *pBluescript II SK+* wurde zur Vermehrung von Genabschnitten in prokaryotischen Systemen verwendet.

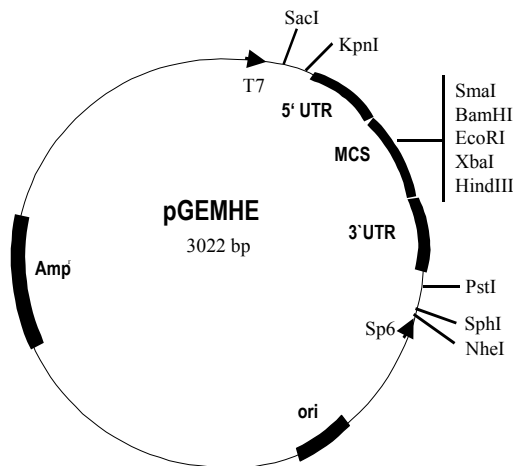


Abb. 2.3 Eukaryotischer Expressionsvektor pGEMHE

Gezeigt ist die schematische Darstellung des Expressionsvektors *pGEMHE* mit den fünf Restriktionsschnittstellen der multiplen Klonierungsstellen (MCS), Dieser Abschnitt wird von der 5'-und 3'-untranslatierten Region des β -Globingens aus dem Krallenfrosch *Xenopus* flankiert. Weitere Abschnitte sind folgendermassen gekennzeichnet: Promotoren T7 und SP6 (T7, SP6), Replikationsstartpunkt (*ori*), Ampizillinresistenz (Ampicillin). Der Vektor *pGEMHE* wurde zur funktionellen Expression im *Xenopus*-Oozyten-System benutzt.

2.1.3.3 cDNA-Bibliothek

Die cDNA-Bibliothek für den Knochenfisch *Eptatretus stouti* wurde aus dem Hypothalamus-Gewebe in den λ ZAPII-Vektor gerichtet über die EcoRI-Schnittstelle durch J. Heierhorst inkloniert. Die cDNA-Bibliothek für den Knochenfisch *Catostomus commersoni* wurde ebenfalls aus dem Hypothalamus-Gewebe in den λ gt11-Vektor durch J. Heierhorst inkloniert.

2.1.4 Gewebe

Die verwendeten Gewebe stammen aus der Fruchtfliege *Drosophila melanogaster*. Die Fliegen wurden im Labor in 50 ml Greiner-Röhrchen gezüchtet. Weil der Lebenszyklus 10 Tage dauert, wurden die Fliegen alle 10 Tage in frisches Medium umgesetzt oder abgeerntet. Vor dem Ernten wurden die Fliegen 5 min im Kühlraum gehalten. Somit konnte die Bewegungsaktivität der Fliegen gehemmt werden. Sie wurden in flüssigem Stickstoff schockgefroren und anschließend über Nacht bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert. Am folgenden Tag wurden die Fliegen durch starkes Schütteln teilweise zerkleinert und direkt über drei übereinanderliegende Analysensiebe (Maschenweite $150\mu\text{m}$, $710\mu\text{m}$, $1000\mu\text{m}$, Retsch) gesiebt. Im untersten Sieb wurden die Köpfe der Fliegen und im mittleren Sieb die Körper der Fliegen gesammelt. Diese wurden bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert.

Zur Isolierung der Embryonen-, Larven- und Puppen-Gewebe wurden spezielle Apfelsaftplatten (*Drosophila*-Nährmedium mit 30% Apfelsaft) angefertigt. Nach Umsetzung der Fliegen wurden die Embryonen nach einem Tag mit H_2O aus den Platten gespült. Zur Entfernung der Hefe wurden die Embryonen mehrmals auf einem Siebgewebe aus Polyamid mit H_2O gewaschen und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die Larven wurden nach 3 Tagen und die Puppen nach 5 Tagen abgeerntet und auch in flüssigem Stickstoff schockgefroren.

2.1.5 Oligonukleotidsequenzen

Alle verwendeten synthetischen Oligonukleotide wurden im Institut Zellbiochemie und klinische Neurobiologie hergestellt. Die fettmarkierten Basen stellen die Schnittstellen der Oligonukleotide und rechts davon das zugehörige Enzym dar.

PRIMER NAME	SYNTHETISCHE OLIGONUKLEOTID SEQUENZEN	ENZYM
SRF1-Primer	: GCG GAA TTC C(T)T(A)C(T) TGG CCX TT(C) GG	EcoRI
SRF2-Primer	: AGG GAA TTC GCX GTX GTX CAC(T) CC	EcoRI
SRR1-Primer	: GCC GGA TTC G(A/T)A TXG GG(A) TTX GCG(A/C)	BamHI
SRR2-Primer	: GAC GGA TCC G(A)AA XGG XAG(T/A) CCA G(A)CA	BamHI
Drosi1-Primer	: CAC GGA TCC ACA ATC ATG TAC TGG ACA AAC	BamHI
Drosi2-Primer	: AGG GAA TTC GGC GCG TCA CCC GAA TGG TTG	EcoRI
Drosi3-Primer	: CAG GAA GCG ATC AAA GGA CAT CAG	
Drosi4-Primer	: GCT GCA AAC CTT CCG CAG GAG TC	
Drosi6-Primer	: AGG GAA TTC GGA CAA ACT TGC ACC ACA ACA CAT T	EcoRI
DrosiATG-Primer	: GCC AAG CTT ATG GCT GGC CAT CAG TCG GC	HindIII
Drosi7-Primer	: CC TCT AGA TTA GAG CAT TTC AAT ATT GGA CC	XbaI
DrosAktinF1-Primer	: GAG CAC GGT ATC GTG ACC AAC	
DrosAktinR1-Primer	: GAG GGC ATA ACC CTC GTA GAT	
SSTR2/Drosi.forw:	: CAG ACA GAG CCA TAC TAC	
SSTR2/Drosi.rev.	: GAA CGG ATC GTA TCC	
Schabe1	: GCCTCCAGGAACACGCAGGCGGT	
Schabe2	: CCTCGCCGTGGCTCAGGTAC	
Schabe3	: CAC GGA TCC TACCCACGTCACCGCGATGGC	BamHI
Schabe4	: GAAGAGCGTCGACAAGTACGAGAT	
Schabe5	: AGG GAA TTC CACGTGCTAGCCTATATGAAC	EcoRI
SchabeATG	: GCC AAG CTT CTATTGTCAACTAAGAAATG	HindIII
Schabe7	: CC TCT AGA CAGACGTGGATATGGTTGC	XbaI
CamalstR1	: GCGCACCGAGATGGACGCGATGGG	
CamalstR2	: GGAAGCGGTCCAGCGACATGAGCA	
CamalstR3	: AC GGA TCC GATCAGGTSCTGCACGATCTTG	BamHI
CamalstR4	: GGTGGTCGTCGTCGCCATCTTCG	
CamalstR5	: GG GAA TTC GAGATCACCAACACGAGCGTC	EcoRI
CamsstR1	: GAGATGAGCGGCGTGCGGACCTT	
CamsstR2	: GCGCTCATGATCGTCAGGAAGAT	
CamsstR3	: AC GGA TCC CGTCATGTACGCCTTGACAT	BamHI
CamsstR4	: CTGGTGCTGACGGTGATCACGGTG	
CamsstR5	: GG GAA TTC GCGCTCATCTTCACGCCGCC	EcoRI

2.2 Methoden

2.2.1 Arbeiten mit Ribonukleinsäure (RNA)

Allgemein gilt für das Arbeiten mit RNA, daß alle verwendeten Materialien und Lösungen RNase-frei sein müssen.

2.2.1.1 RNA-Isolierung aus Gewebe

Lösungen:

Lysis-Bindungspuffer:	100 mM Tris/HCl pH 8.0 500 mM LiCl 10 mM EDTA 1 % SDS
Waschpuffer	100 mM Tris/HCl pH 8.0 250 mM LiCl 2 mM EDTA 0.5 % SDS
Waschpuffer I:	50 mM Tris/HCl pH 8.0 250 mM LiCl 2 mM EDTA
Waschpuffer II:	10 mM Tris/HCl pH 8.0 150 mM LiCl 1 mM EDTA

Für die direkte Isolierung der mRNA aus dem Gewebe wurde die Dynabeads Oligo(dT)₂₅ Kit-Methode der Firma Dynal (Hamburg) verwendet. Hierbei wurden die polyadenylierten mRNAs an eine magnetisierte Suspension gebunden, in der Oligonukleotide aus 25 Thymidinnukleotiden (Oligo(dT)₂₅) an einer festen Matrix fixiert sind. Die Bindung erfolgte durch Basenpaarung der Poly(A)⁺-Ketten mit den Oligo (dT)-Ketten.

In Stickstoff eingefrorenes isoliertes Gewebe (ca. 50 mg) wurde in einem Mörser unter Stickstoffgabe fein zermahlen und in Lysis-Bindungspuffer mit einem Homogenisator (Potter) vollständig suspendiert. Nach einer Zentrifugation von 2 min bei 10000 g wurde der Überstand auf 4 Eppendorfgefäße mit je 250 µl Dynabeads Oligo(dT)₂₅ verteilt. Das Homogenisat wurde mit den Dynabeads vorsichtig gemischt und 5 min bei Raumtemperatur unter leichtem Schwenken im Eppendorfgefäß inkubiert. Nach der Inkubation wurden die Eppendorfgefäße mit Homogenisat und den Dynabeads im Magnetständer für 2 min belassen. Der Überstand wurde abgenommen und je 2 x mit Waschpuffer I und II gewaschen. Die aufgereinigte mRNA wurde anschließend mit 1 mM EDTA eluiert.

2.2.1.2 Northern-Blot-Analyse (Sambrook *et al.*, 1989)

Lösungen:

10 x MOPS:	200 mM MOPS pH 7.0 5 mM EDTA 40 mM Natriumacetat
Gellaufpuffer:	10 x MOPS 1:10 mit depc-H ₂ O verdünnt (1 x MOPS-Puffer)
Agarosegel:	9 ml 37 % Formaldehyd-Lösung 0.5 g Agarose (1 %) 36 ml depc-H ₂ O 5 ml 10 x MOPS
RNA-Probenlösung:	11 µl Poly (A) ⁺ -RNA Probe (5 µg) 5 µl 10 x MOPS 9 µl 37 % Formaldehyd-Lösung 25 µl 50 % deionisiertes Formamid 0.18 µl Ethidiumbromid (10 mg/µl)

RNA-Elektrophorese

RNA-Probenlösung sowie RNA-Längenstandard (0.24-9.5 Kb) wurden für 15 min bei 55 °C inkubiert und sofort auf Eis abgekühlt. Nach Beladen des Gels wurde eine Spannung von 5V/cm Gellänge eingestellt. Nach Beendigung des Gellaufes wurde das Gel photographisch dokumentiert, zur Entfernung des Formaldehyds wurde das Gel kurz in depc-H₂O geschwenkt und direkt einem 10-15-stündigen Kapillartransfer mit 10x SSC auf eine Hybond N-Nylonmembran (Amersham) unterzogen. Anschließend wurde dieser Northern-Blot an der Luft getrocknet und die transferierte RNA durch UV-Strahlung in einem Stratalinker TM UV-crosslinker 1800 der Firma Stratagene kovalent an die Nylonmembran gebunden.

Prähybridisierung und Hybridisierung eines Northern-Blots

Hybridisierungslösungen:

50 % deionisiertes Formamid
 5 x SSC
 1 mM EDTA
 10 x Denhardts
 0.1 % SDS

1 ml Heringssperma-DNA (10 µg/ml), 5 min bei 100 °C denaturiert, zur Prähybridisierungslösung zugegeben.

In dieser Lösung wurde der Northern-Blot für 3-4 h bei 50 °C vorhybridisiert und anschließend 15 h mit einem ³²P-markierten (siehe 2.2.2.7) spezifischen cDNA-Fragment (10ng/ml) mit einer Aktivität von 10⁶ cpm/ml Hybridisierungslösung bei der gleichen Temperatur hybridisiert. Danach wurde der Northern-Blot mit 2 x SSC/0.1 % SDS je zweimal für 5 min bei RT und mit 2 x SSC / 0.1% SDS je zweimal für 15 min bei 55 °C gewaschen und mit Verstärkerfolien für 4 Tage auf einem Kodak XAR 5 Film bei -80 °C exponiert.

2.2.1.3 *In vitro* Transkription

Reaktionsansatz:

5 µl	linearisierte rekombinante Plasmid-DNA (1 µg/µl)
14 µl	T ₇ -RNA-Polymerasen-Puffer
1 µl	RNasin (1 µg/µl)
6 µl	DTT (100 mM)
6 µl	rGTP (10 mM)
6 µl	rATP (10 mM)
6 µl	rCTP (10 mM)
6 µl	rUTP (10 mM)
6 µl	m ⁷ G (5') ppp (5') G (10 mM)
11 µl	depc-H ₂ O
3 µl	T ₇ -RNA-Polymerase (5 U/µl)

Die Linearisierung der Plasmid-DNA erfolgte im 3'-Bereich am Ende der zu transkribierenden DNA durch eine geeignete Restriktionsendonuklease. Die Verwendung der T₇-RNA-Polymerase bezieht sich auf das Plasmid pGEMHE (2.1.3.2). Alle Lösungen wurden auf Eis gelagert, bei RT in der angegebenen Reihenfolge zusammengegeben und für 2 h bei 37 °C inkubiert.

Damit am Schluß nur die reine RNA vorliegt, wurde mit 3 µl DNase und 1 µl RNasin 15 min bei 37 °C die DNA-Matrize abgebaut, abschließend mit Phenol/Chloroform extrahiert und in Ethanol gefällt. Die so erhaltene RNA trägt durch den Überschuß an GpppG gegenüber GTP eine Cap-Struktur. Dadurch kann eine mögliche Degradation der *in vitro* transkribierten RNA (cRNA) deutlich vermindert werden.

2.2.1.4 cDNA-Synthese (Sambrook *et al.*, 1989)

2.5 µl mRNA (1 µg) und 4 µl des Startermoleküls Oligo p(dT) (1 mg/ml) wurden zusammengegeben, für 5 min auf 70 °C erhitzt und sofort auf Eis abgekühlt. Anschließend wurden folgende Lösungen und Substanzen hinzugegeben:

0.5 µl	RNasin (10 U/µl)
4.0 µl	10 mM dNTP-Mix
4.0 µl	5 x reverse Transkriptase-Puffer
1.0 µl	DTT (10 mM)
2.0 µl	reverse Transkriptase (400 U/µl)

Es folgte dann eine 40 minütige Inkubation bei 37 °C. Zur Erhöhung der Ausbeute wurden erneut 2 µl reverse Transkriptase unter den gleichen Inkubationsbedingungen zugegeben. Beendet wurde die Reaktion durch Hitzeinaktivierung der reversen Transkriptase, durch eine 10 minütige Inkubation bei 70 °C.

Phenol/Chloroform-Extraktion

Diese dient der Entfernung von Proteinkontaminationen oder der Restriktionsenzyme durch Denaturierung mit Phenol. Da Phenol sauer reagiert, wurde es mit Tris/HCl auf pH 7.5 eingestellt. In einem Volumenanteil von 1:1 wurde die RNA-haltige Lösung mit Phenol gemischt, mehrfach invertiert und zur Phasentrennung kurz zentrifugiert. Dieser Arbeitsschritt wurde mit der wässrigen Phase im Verhältnis 1:1 zunächst mit einem Phenol/Chloroform (1:1)-Gemisch und dann mit reinem Chloroform wiederholt. Anschließend wurde die RNA mit Ethanol gefällt.

2.2.2 Arbeiten mit Desoxyribonukleinsäure (DNA)

2.2.2.1 Polymerasenkettenreaktion (PCR) (Saiki *et al.*, 1988)

PCR zur Amplifizierung nicht bekannter Bereiche mit Hilfe degenerierter Primer

Für die RT-PCR mit den degenerierten Primern wurde die Taq-DNA-Polymerase verwendet, da diese eine hohe Effizienz und Synthesegeschwindigkeit besitzt. Es wurden folgende Substanzen und Lösungen in der angegebenen Reihenfolge pipettiert:

5 µl	cDNA
100 pmol	je Primer
5 µl	10 x Puffer
2.5 mM	MgCl ₂
200 µM	je dNTP
2.5 U	Taq-DNA-Polymerase
ad 50 µl	H ₂ O

Die Temperaturzyklen wurden individuell abgestimmt. Überwiegend wurde in einem Perkin Elmer Thermal-Cycler je Zyklus 1 min bei 94 °C denaturiert, wobei die DNA in ihre Einzelstränge aufgetrennt wird. Anschließend konnten die gewählten Primer entsprechend ihrer errechneten Schmelztemperatur (T_m) für 1 min an der DNA-Matrize hybridisieren und am Ende eines jeden Zyklus erfolgte 1 min bei 72 °C die Elongationsreaktion an den angelagerten Primern (insgesamt 33 Zyklen). Die Schmelztemperatur errechnet sich nach der Formel $T_m = 4x (G+C) + 2x (A+T)$ [°C], wobei G, C, A und T für die Anzahl des jeweiligen Nukleotids stehen.

RACE-PCR

Die RACE-PCR-Technik (rapid amplification of cDNA ends) wurde zur Vervollständigung des offenen Leserahmens der cDNA der Allatostatin-Rezeptoren aus *Drosophila*, der Schabe und der Stabheuschrecke verwendet. Für das 5'-Ende wurde ein genspezifischer Primer für die Synthese der cDNA verwendet. Der neu synthetisierte cDNA-Strang endete mit einem Homopolymerschwanz von Adeninbasen, den man mit Hilfe einer terminalen Transferase an das 3'-Ende anhing. Die entstandene cDNA diente anschließend als Matrize für Amplifizierungen, wie sie für die RACE-PCR am 3'-Ende unten beschrieben ist.

Die Substanzen für die Durchführung der RACE-PCR stammten von der Firma Boehringer Mannheim. Für diese PCR wurde ebenfalls Taq-DNA-Polymerase verwendet. Das PCR-Programm sowie die Mengen der benutzten Bestandteile richteten sich nach dem RACE-Protokoll.

Für eine RACE des 3'-Endes wurde die Synthese des ersten cDNA-Stranges mit einer reversen Transkription an einem Oligo(dT)-Primer gestartet. Für die erste Amplifizierung wurde der genspezifische und der äußere Primer (PCR-Anker-Primer) verwendet. Zur weiteren Vervielfältigung wurde ein Teil der Reaktionslösung (1 µl) für die zweite PCR-Reaktion als Matritze verwendet. Hierfür wurde der zweite genspezifische Primer und der Anker-Primer verwendet.

PCR zur Amplifizierung des gesamten offenen Leserahmens einer cDNA

Um den gesamten offenen Leserahmen einer cDNA zu amplifizieren, wurden spezifische Primer mit Restriktionsendonuklease-Erkennungsstellen (Schnittstellen) konstruiert, die eine Klonierung der amplifizierten DNA in den gewünschten Vektor ermöglichen. Der Primer am 5'-Ende wurde direkt auf dem Startcodon und der Primer am 3'-Ende auf dem Stopcodon begonnen. Für diese PCR wurde die Vent-DNA-Polymerase verwendet, da diese über eine Exonuklease-Aktivität verfügt, und somit die Mutationsrate deutlich verringert ist. Die PCR-Bedingungen entsprachen den oben genannten.

2.2.2.2 Konstruktion von chimären Rezeptor-cDNAs

Diese Methode wurde für die Konstruktion der Chimäre aus dem Somatostatin-Rezeptor 2 der Ratte und dem Allatostatin-Rezeptor aus *Drosophila* verwendet. Hierbei wurden drei nacheinander folgende PCR-Reaktionen durchgeführt. Die erste PCR-Reaktion wurde mit dem T7-Primer und dem SSTR2/Drosi.rev-Primer (Abb. 2.4) durchgeführt, als DNA-Matritze wurde 50 ng des SSTR2-kodierenden Plasmids cDNA verwendet, hier wurde ein PCR-Fragment von 150 bp amplifiziert.

Die zweite PCR-Reaktion wurde mit dem Drosi.7-Primer und SSTR2/Drosi.forw-Primer (Abb. 2.4) durchgeführt, als DNA-Matritze diente 50 ng *Drosophila*-Allatostatin-Rezeptor-DNA, hierbei wurde ein PCR-Fragment von 1000 bp amplifiziert. Die letzte PCR-Reaktion wurde mit dem T7-Primer und dem Drosi.7-Primer durchgeführt.

Hierbei wurde das PCR-Produkt aus der ersten sowie aus der zweiten PCR-Reaktion als DNA-Matritze verwendet. Somit wurde die gewünschte Chimäre amplifiziert.

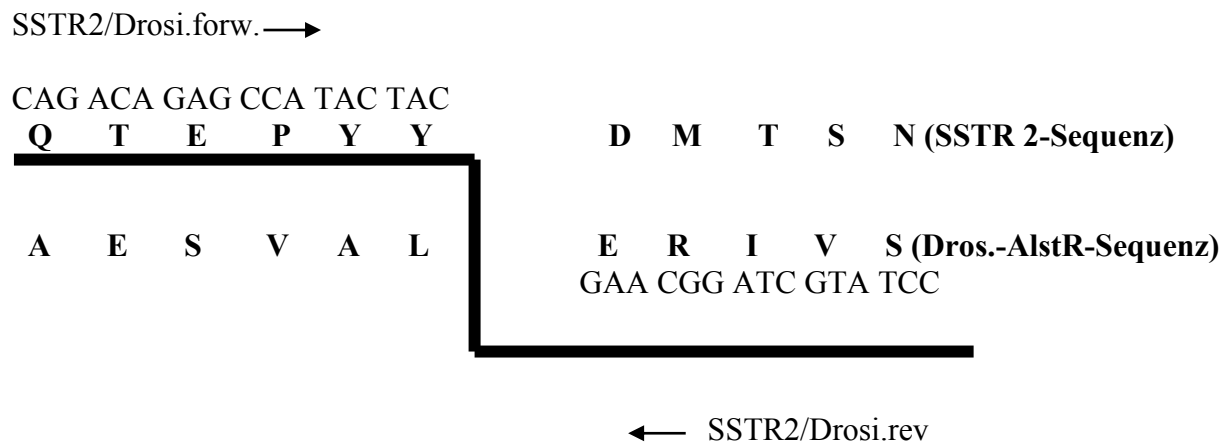


Abb. 2.4 Position der chimären Oligonukleotide
 Dieses Schema zeigt die Position der Oligonukleotide, die für die Chimäramplifizierung verwendet wurden. Die Position der Primer befand sich vor der ersten Transmembrandomäne.

2.2.2.3 Klonierung von Nukleinsäuren

Um spezifische DNAs einfach und schnell weiterverarbeiten zu können, wurden sie dem späteren Verwendungszweck entsprechend in unterschiedliche Vektoren (Plasmide) subkloniert.

Klonierung in pBluescript, pGEMHE und pcDNAIII

Als Klonierungsvektoren (2.1.3.2) wurden pcDNAIII (Abb. 2.1), Bluescript SK+ (Abb. 2.2) und pGEMHE (Abb. 2.3) verwendet. Diese bieten eine umfangreiche „multiple cloning site“ („Polylinker“), also einen Bereich mit dicht aufeinanderfolgenden Erkennungssequenzen für verschiedene Restriktionsendonukleasen. In diesen können nach Restriktion mit einer geeigneten Restriktionsendonuklease gewünschte DNA-Fragmente durch Ligation einkloniert und anschließend transformiert werden. Flankiert wird dieser Bereich u.a. von den Promotorsequenzen für die T7- und T3- oder SP⁶-RNA-Polymerase, was eine *in vitro* Transkription beider DNA-Stränge ermöglicht. Ferner vermitteln alle Plasmide eine Ampicillinresistenz.

2.2.2.4 Minipräparation von Plasmid-DNA

Lösung: TELT-Lysis-Puffer (Tris/HCl / EDTA / LiCl / Triton X-100):

62 mM	EDTA pH 8.0
50 mM	Tris/HCl pH 7.5
2.5 M	LiCl
0.4 %	Triton X-100 (w/v)

1.5 ml Übernachtskultur wurden bei 10000 g für 30 s abzentrifugiert und in 250 µl TELT-Lysis-Puffer resuspendiert. Es wurde 25 µl Lysozymlösung (10 mg/ml) zugegeben, gemischt, 5 min auf Eis inkubiert und 5 min aufgeköcht. Nach Abkühlung auf Eis wurde der Ansatz 15 min bei 10000 g zentrifugiert. Der Überstand wurde einer Phenol/Chloroform-Extraktion sowie einer anschließenden Isopropanolfällung unterzogen.

2.2.2.5 Maxipräparation von Plasmid-DNA

Lösungen:

S1-Puffer	: 50 mM Tris/HCl pH 8.0 : 10 mM EDTA : 100 µg RNase A/ml
S2-Puffer	: 200 mM NaOH : 1 % SDS
S3-Puffer	: 2.8 M Kaliumacetat pH 5.1
N2-Puffer	: 100 mM Tris/HCl pH 6.3 : 15 % Ethanol : 900 mM KCl
N3-Puffer	: 100 mM Tris/HCl pH 6.3 : 15 % Ethanol : 1150 mM KCl
N5-Puffer	: 100 mM Tris/HCl pH 8.5 : 15 % Ethanol : 1000 mM KCl

Die Pufferzusammensetzung sowie die Vorgehensweise entspricht den Informationen der Firma Macherey-Nagel.

30 ml einer Übernachtskultur wurden in einem GSA-Rotor bei 5000 g 5 min abzentrifugiert und in 4 ml S1-Puffer resuspendiert. Durch Zugabe von 4 ml S2-Puffer und 5 min Inkubation bei RT erfolgte die alkalische Lyse der Bakterienzellen, an die sich durch Zugabe von 4 ml S3-Puffer eine Kaliumacetat-Zugabe anschloß. Die Lösung wurde bei 12000 g im GSA-Rotor abzentrifugiert und der Überstand auf eine Nucleobond AX-100-Säule gegeben, welche vorher mit 2 ml N2-Puffer äquilibriert wurde. Anschließend wurde die Säule zweimal mit je 4 ml N3-Puffer gewaschen, mit 2.8 ml N5-Puffer eluiert und mit Ethanol gefällt.

2.2.2.6 Aufreinigung von DNA

Phenol/Chloroform-Extraktion

Diese dient der Entfernung von Proteinkontaminationen durch Denaturierung mit Phenol. Da Phenol sauer reagiert, wurde der pH auf 7.5 eingestellt. In einem Volumenanteil von 1:1 wurde die DNA-haltige Lösung mit Phenol gemischt, mehrfach invertiert und zur Phasentrennung 5 min zentrifugiert. Dieser Arbeitsschritt wurde mit der wäßrigen Phase im Verhältnis 1:1 zunächst mit einem Phenol/Chloroform-Gemisch und dann mit reinem Chloroform wiederholt.

DNA-Präzipitation

Üblicherweise wurde die DNA mit dem 2,5-fachen Volumen Ethanol unter Zugabe eines 1/10 Volumens 3 M Natriumacetat und 30 minütiger Inkubation bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ ausgefällt. Der Ansatz wurde dann 30 min bei 14000 g zentrifugiert, der DNA-Niederschlag mit 70 % Ethanol nachgewaschen, 5 min luftgetrocknet und in einer geeigneten Menge H_2O aufgenommen.

2.2.2.6.2 DNA-Modifikation mit Restriktionsendonukleasen

Es wurden stets die spezifischen Puffer in der angegebenen Konzentration sowie die enzymespezifische Reaktionstemperatur der jeweiligen Restriktionsendonuklease entsprechend Anweisung der Herstellerfirmen verwendet. Beendet wurde die Reaktion durch Hitzeinaktivierung bei 70 °C, sofern das gewählte Enzym hitzesensibel war.

2.2.2.6.3 5'-Dephosphorylierung von DNA

Diese wurde zur Verhinderung einer Religation von Plasmid-DNA, die nur mit einer Restriktionsendonuklease aufgetrennt wurde und als Vektor für Subklonierung eingesetzt werden sollte, vorgenommen. Dazu wurden 0.5 µg/µl DNA mit einer Einheit alkalischer Phosphatase pro µg DNA und entsprechendem Phosphatpuffer für 15 min bei 37 °C inkubiert. Abgestoppt wurde die Reaktion durch Hitzeinaktivierung bei 65 °C oder Komplexierung der Zn²⁺-Ionen mit EDTA (Sambrook *et al.*, 1989).

2.2.2.6.4 Ligation von DNA-Fragmenten

Hierfür wurde ein 4-10 facher molarer Überschuß an geschnittenem DNA-Fragment mit entsprechend geschnittener Vektor-DNA und 0.2 Einheiten/µl T₄-DNA-Ligase im T₄-DNA-Ligasepuffer in einem Endvolumen von 15 µl zusammengegeben. Der Puffer enthält 1 % PEG zur Erhöhung der Viskosität sowie 0.2 mM ATP, da diese Reaktion nur unter ATP-Verbrauch ablaufen kann. Inkubiert wurde über Nacht bei 16 °C.

2.2.2.7 Radioaktive DNA-Markierung

³²P-Markierung von DNA (Feinberg und Vogelstein, 1983)

50 ng eines linearisierten Plasmid-DNA-Fragmentes wurden in Anwesenheit von 50 ng Hexamernukleotidmix bei 100 °C für 5 min hitzedenaturiert und zur Verhinderung der Renaturierung auf Eis abgekühlt. Die so vorbehandelte DNA-Probe wurde nun in einem Reaktionsvolumen von 50 µl mit 50 mM Tris/HCl pH 6.9, 10 mM MgCl₂, 100 nM DTT, je 1 mM dGTP, dATP, dTTP, 50 µCi [α -³²P]dCTP [3.3µCi/nmol] und 5 Einheiten Klenow-Enzym zusammengegeben.

Nach 30 min Inkubation wurden die nicht inkorporierten [α - 32 P]dCTP-Nukleotide durch Gelfiltration abgetrennt.

2.2.2.8 DNA-Analysemethoden

2.2.2.8.1 Qualitative DNA-Analyse

Agarosegel-Elektrophorese

Sie dient der Auftrennung von DNA-Molekülen nach ihrer Größe. Die Trennung beruht auf der unterschiedlichen Wanderung der DNA entsprechend ihrer Größe unter dem Einfluß des elektrischen Feldes. In Abhängigkeit der aufzutrennenden DNA-Längen wurden unterschiedlich hohe Konzentrationen Agarose verwendet. Zur späteren UV-Detektion wurde dem Gel Ethidiumbromid zugegeben (0.2 ng/ml). Als Längenstandard diente EcoRI/HindIII-geschnittene λ -DNA. Als Laufpuffer diente 1 x TAE bei einer konstanten Spannung von 5 V/cm Gellänge.

DNA-Sequenzierung (Sanger *et al.*, 1977)

Die DNA-Sequenzierung wurde im Institut für Zellbiochemie und klinische Neurobiologie im Servicelabor nach der Didesoxy-Methode (Sanger *et al.*, 1977) unter Anwendung des Taq Dye Primer Cycle Sequencing Kits mit dem ABI Prism 377 DNA-Sequencer (Applied Biosystems, Heidelberg) durchgeführt.

2.2.2.8.2 Quantitative DNA-Analyse

UV-Spektroskopie

Da reine DNA ein Absorptionsmaximum bei 260 nm Wellenlänge hat, wurde unter Berücksichtigung des Lambert-Beerschen Gesetzes in stark verdünnten Lösungen und einem Extinktionsbereich von 0.3-0.6 gemessen.

Für die Berechnung der Primerkonzentration muß man zuerst mit der folgenden Formel den molaren Extinktionskoeffizienten des Primers bei 260 nm ermitteln:

$$(8400 \times T) + (15200 \times A) + (12010 \times G) + (7050 \times C)$$

Dabei stehen T, A, G, und C für die Häufigkeit, mit der jede dieser Basen im Primer vertreten ist. Der molare Extinktionskoeffizient entspricht der Absorption einer einmolaren Primerlösung bei 260 nm (A_{260}).

Densitometrische Konzentrationsbestimmung

Mit dieser Methode können DNA-Banden in einem mit Ethidiumbromid gefärbten Agarosegel quantifiziert werden. Dabei wurde über eine Computer angeschlossene Videokamera das emittierte Fluoreszenzlicht in Pixeln gemessen und durch Vergleich mit einem parallel aufgetragenen Konzentrationsstandard quantifiziert. Verwendet wurde das Videosystem Cybertech CS1 mit einem UVT-2035 UV-Schirm (320 nm Wellenlänge) und zur Auswertung die Win. Cam 2.0 Software.

2.2.3 Mikrobiologische Arbeitsmethoden

2.2.3.1 Langzeitlagerung von Bakterien

Zur dauerhaften Aufbewahrung von Bakterienstämmen wurden diese bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ im entsprechenden Kulturmedium unter Zugabe von 25 % Glycerol als Kristallisationshemmer eingefroren. Zur erneuten Verwendung wurde mit diesem Glycerinstock eine LB-Agarplatte beimpft und eine einzelne Kolonie weiterverwendet.

2.2.3.2 Anlegen einer Übernachtskultur

Mit einer einzelnen Kolonie wurden 5 ml LB-Medium beimpft und wenn möglich ein zur Selektion geeignetes Antibiotikum zugegeben. Die Kulturen wurden über Nacht bei $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ und 200 rpm inkubiert.

Die Selektion für die Bakterien des Stammes XL1-Blue erfolgte mit $25\text{ }\mu\text{g/ml}$ Tetracyclin. Rekombinante XL1-Blue- und Top10F-Zellen, die durch Transformation mit Plasmiden eine Ampicillinresistenz erworben haben, wurde mit $100\text{ }\mu\text{g/ml}$ Ampicillin selektiert.

2.2.3.3 Herstellung kompetenter Bakterienzellen

Herstellung kompetenter XL1-Blue- und Top10F-Zellen für die Transformation (Sambrook *et al.*, 1989)

Lösungen:

TFBI-Puffer: 30 mM KOAc pH 7.0
50 mM MnCl₂
100 mM RbCl
10 mM CaCl₂
15 % Glycerin

TFB2-Puffer: 10 mM MOPS pH 7.0
75 mM CaCl₂
10 mM RbCl
15 % Glycerin

Die Lösungen wurden steril filtriert und auf Eis gelagert

5 ml einer Übernachtskultur (XL1-Blue-Stämme, siehe 2.2.3.2), die Tetracyclin enthielt, wurden in 200 ml LB-Medium bei 37 °C und 200 rpm bis zu einer OD₆₅₀ von 0.4 angezogen, so daß die Zellen sich noch in der logarithmischen Wachstumsphase befanden. Diese Bakteriensuspension wurde dann 5 min bei 4000 g und 4 °C in einer Sorvall RC-5-Zentrifuge und einem GSA-Rotor zentrifugiert. Alle weiteren Arbeitsschritte wurden bei 4 °C und mit vorgekühlten Lösungen durchgeführt. Das Bakteriensediment wurde in 60 ml TFB1-Puffer vorsichtig vollständig resuspendiert und erneut unter gleichen Bedingungen zentrifugiert.

Das Pellet wurde dann in 8 ml TFB2-Puffer schonend resuspendiert, zu je 200 µl aliquotiert, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bis zu weiteren Verwendung bei –80 °C gelagert.

2.2.3.4 Transformation von Bakterienzellen

Transformation von XL1-Blue-Zellen mit Plasmid-DNA

Diese Methode ermöglicht den Transfer von modifizierter DNA (siehe 2.2.2.2) in eine Bakterienzelle mit Hilfe von Plasmid-DNA als Vektor.

Verwendet wurden die XL1-Blue-Zellen oder auch die Top10F-Zellen für die Vektoren pBluescript SK+ und pGEMHE oder pCDNAIII. Dazu wurden 10 µl des Ligationsansatzes (siehe 2.2.2.6) mit 100 µl kompetenter XL1-Blue-Zellen vermengt, 20 min auf Eis und 1 min bei 42 °C inkubiert. Der Ansatz wurde auf Eis abgekühlt. Die Zellen wurden vor dem Ausplattieren auf dem entsprechenden Selektionsmedium (LB-Agar mit Ampicillin [100 µg/ml]) 45 min bei 37 °C in 400 µl LB-Medium inkubiert. War pBluecript SK+ der Transformationsvektor, so wurde der gesamte Transformationsansatz auf LB-Agarplatten ausplattiert, die für eine Blau-Weiß-Selektion zuvor mit 9 µl 0.5 M IPTG und 18 µl 10 % (w/v) X-Gal bestrichen worden war. Da die pCDNAIII- und pGEMHE-Vektoren keine Blau-Weiß-Selektion ermöglichten, entfiel bei einer Transformation mit diesen Vektoren die Zugabe von IPTG und X-Gal. Anschließend wurden die ausplattierten Bakterienzellen über Nacht bei 37 °C inkubiert. Die durch den Transformationsvektor übertragene Ampicillinresistenz ermöglichte die Selektion der transformierten Bakterienzellen, während die Blau-Weiß-Selektion eine Unterscheidung zwischen rekombinantem und nicht rekombinantem Vektor zuließ. Durch die Insertion von fremder DNA in das Gen verändert sich der Phänotyp der Plasmide von Lac⁺ zu Lac⁻. Rekombinante Plasmide bilden in einem Bakterienrasen, dessen Nährmedium IPTG und X-Gal enthält, farblose Kolonien. Dagegen entstehen bei nicht rekombinanten Plasmiden blaue Kolonien; in diesem Fall ist unter Mitwirkung der β-Galactosidase und Luftsauerstoff das farblose X-Gal zum blauen 5,5,-Dibrom-4,4-dichlorindigo oxidiert worden.

2.2.4 Elektrophysiologische Arbeitsmethoden

ND 96:	96 mM NaCl 2 mM KCl 1 mM MgCl ₂ 1.8 mM CaCl ₂ 5 mM HEPES pH 7.4
--------	---

HK:	2 mM NaCl 96 mM KCl 1.8 mM CaCl ₂ 1 mM MgCl ₂ 5 mM HEPES pH 7.5
-----	---

Barth-Puffer: 88 mM NaCl
 1 mM KCl
 2.4 mM NaHCO₃
 15 mM Tris/HCl pH 7.6
 0.3 mM Ca(NO₃)₂ x 4H₂O
 0.41 mM CaCl₂ x 6 x H₂O

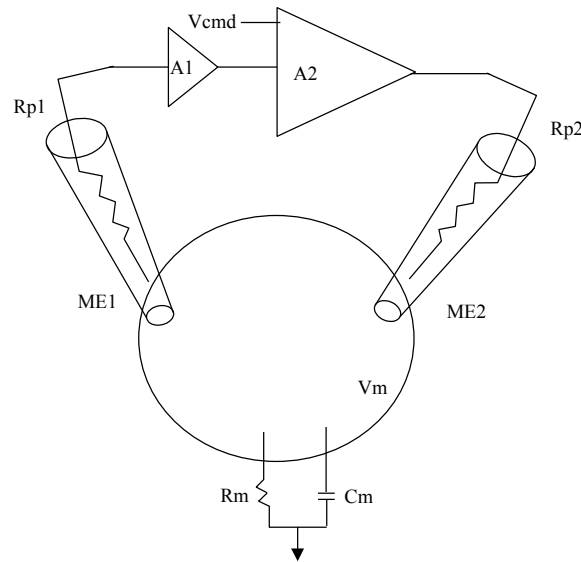


Abb. 2.5 Vereinfachtes Schaltbild eines Standard-2-Elektroden-Voltage-Clamp-Verstärkers
 Membranpotential (V_m), Mikroelektrode 1 (ME1), Mikroelektrode 2 (ME2), Kommandospannung (V_{cmd}), Verstärker (A1), Verstärker (A2), Widerstand der Membran (R_m), Widerstand der Pipette 1 (R_{p1}), Widerstand der Pipette 2 (R_{p2}). Der Kreis stellt die eingespannte *Xenopus*-Oozyte dar. Nähere Erläuterung im Text.

Um den klonierten Rezeptor funktional und pharmakologisch zu charakterisieren, wurde nach 2.2.1.4 *in vitro* transkribierte Rezeptor-cRNA mit der GIRK-cRNA (G-protein gated inwardly rectifying potassium channel - ein einwärts gerichteter Kalium-Kanal) in die defollikulierten *Xenopus*-Oozyten 50 nl (0.04 ng/nl) koinjiziert (Kreienkamp *et al.*, 1997). Nach 2-5 Tagen Inkubation bei 20 °C in Barth-Puffer wurden die Oozyten elektrophysiologisch mit der Standard-2-Elektroden-Voltage-Clamp-Technik gemessen (Methfessel *et al.*, 1986). Die Messung wurde bei einer Spannungsklemme von -70 mV durchgeführt. Ihre Hauptaufgabe ist es, Änderungen des Membranpotentials der untersuchten Zelle zu verhindern. Dazu erzeugt sie einen Kompensationsstrom, der genau so groß ist wie der Strom, der durch die Membran fließt, der diesem aber entgegengerichtet ist.

Dies erfolgt durch einen negativen Rückkopplungsmechanismus, bei dem das Membranpotential gemessen und mit dem vorgegebenen, gewünschten Wert - der Sollspannung - verglichen wird (Abb. 2.5). Jeder Unterschied zwischen der Kommandospannung, wie die Sollspannung auch genannt wird, und der tatsächlich gemessenen Membranspannung aktiviert einen Regler, der einen entgegengerichteten Strom in die Zelle injiziert. Dieser Kompensationsstrom wird bei diesem Experiment gemessen. Der Verlauf des Experiments ist folgendermaßen: bei der Zugabe von HK-Medium findet ein Kalium-Einstrom durch die Kalium-Kanäle statt, d.h. es findet ein einwärts gerichteter Membranstrom statt, der elektrophysiologisch meßbar ist. Sobald es ein Plateau erreicht hat, wird der Agonist ins Medium appliziert. Der resultierende Strom ist dann Agonisten-induziert und wird in nA pro Zeiteinheit dokumentiert. Nach der Messung wird die Oozyte mit ND-96 perfundiert und die Spannungsklemme abgeschaltet.

Messung der HPLC-Säulen-Fraktion

Um die Aktivität der HPLC-Säulen-Fraktion bei der Liganden-Isolierung an den Oozyten messen zu können, mußte zum einen der pH-Wert neutralisiert und zum anderen das Methanol aus den Fraktionen entzogen werden. Dieses konnte durch Zugabe von 2 ml H₂O und Einrotierung in der Speed-Vac erfolgen. Gemessen wurde 1/20 des Gesamtvolumens in HK.

Messung der Dosiswirkungskurven

Die Messungen erfolgten jeweils an 4-6 *Xenopus*-Oozyten, koinjiziert mit der cRNA des GIRK-Kanals und der cRNA des GPCRs mit einer Konzentration von 10⁻⁶ M - 10⁻¹¹ M des gewünschten Peptides. Die Werte wurden im Graph Pad Prism Programm normalisiert, d.h. der gemessene Strom jeder Oozyte wurde prozentual errechnet und so ausgewertet.

2.2.5 Peptidaufreinigungsmethoden

2.2.5.1 Erstellung des Peptidrohextraktes aus *Drosophila melanogaster*-Köpfen

4.2 g *Drosophila melanogaster*-Köpfe wurden in 45 ml 0.5 M Essigsäure, 10 mM Ascorbinsäure und 1 mM EDTA mit einem Ultra Turrax homogenisiert. Das Homogenisat wurde 10 min bei 95 °C inkubiert, um alle Proteine und größeren Zellbestandteile zu denaturieren. Nach einer Inkubation über Nacht bei 4 °C wurde das Homogenisat bei 4 °C 30 min bei 10000 g zentrifugiert. Der klare Überstand wurde mit einer Sep-Pak-Plus C₁₈-Kartusche (15 ml/Kartusche), so wie im Protokoll (Sep-Pak-Plus C₁₈-Kartuschen, Protokoll von Waters/Millipore GmbH) beschrieben, fraktioniert. Aus der Sep-Pak-Plus C₁₈-Säule wurde die Peptidfraktion mit 80 %igem Methanol eluiert. Das Eluat wurde für 4 h in der Speed-vac belassen, damit das Methanol vollständig abdampft. Als Ergebnis dieser Aufarbeitung wurde eine angereicherte Peptidfraktion erhalten, die frei von Proteinen und Salzen war. Anschließend wurde das Eluat über Nacht gefriergetrocknet. Das Lyophilisat wurde in 1 ml H₂O resuspendiert und bei –80 °C gelagert.

2.2.5.2 Erstellung des Peptidrohextraktes aus der zytosolischen Fraktion der *Drosophila melanogaster*-Köpfe

Die zytosolische Fraktion der *Drosophila melanogaster*-Köpfe (erhalten von Prof. Eckart Gundelfinger und Kathrin Chamaoun aus dem Leibniz-Institut für Neurobiologie in Magdeburg) war in einem Homogenisierungspuffer [(10 mM Tris/HCl pH 7.5, 280 mM Saccharose, 0.01 % NaN₃ und 0.1 mM PMSF (Phenyl–Methyl–sulfonyl–fluorid)] gelöst. Dieser Homogenisierungspuffer wurde auf 10 mM Tris/HCl pH 7.5, 10 mM Ascorbinsäure und 1 mM EDTA eingestellt. Die weitere Aufarbeitung des Peptidrohextraktes verlief wie bereits bei 2.2.5.1. beschrieben.

2.2.5.3 Peptidtrennung über MonoS-Kationenaustauschersäule

Bei dieser Chromatographie-Art werden Proteine aufgrund unterschiedlicher elektrostatischer Wechselwirkungen mit dem Säulenmaterial voneinander getrennt. Je nach pH-Wert des entsprechenden Elutionspuffers können Proteine eine positive oder eine negative elektrische Nettoladung tragen.

Ist der gewählte pH-Wert mit dem isoelektrischen Punkt des Proteins identisch, so gleichen sich die elektrischen Ladungen des Proteins vollständig aus, und es gibt keine Wechselwirkung mit dem Ionenaustauscher. Auf diese Weise können die Proteine von der Matrix durch geeignete Wahl des pH-Wertes eluiert werden. Hierfür wurde das Gerät LKB Bromma 2151 HPLC mit der MonoS™ HR5/5-Säule (Pharmacia/Schweden, Partikelgröße 10µm) verwendet. Die Probe wurde vorsichtig injiziert. Als Lösungsmittel wurden 10mM NH₄HCOO in 10 % Methanol (Puffer A) und 1 M NH₄HCOO in 10 % Methanol (Puffer B) verwendet. Ein Gradient von 0-100 % Puffer B in 30 min bei einer Flußrate von 1 ml/min wurde angelegt. Die Detektion erfolgte durch eine Extinktionsmessung bei 280 nm und die Fraktionen wurden von Hand gesammelt.

2.2.5.4 Peptidtrennung über Reversed-Phase-HPLC (Umkehrphasenchromatographie)

Die hochauflösende Umkehrphasenchromatographie mittels HPLC wird für die Trennung von Peptiden verwendet. Aufgrund hydrophober Wechselwirkungen binden Peptide an die Säule, die mit unterschiedlich langen Kohlenwasserstoffketten (von C₃-C₁₈) beladen sind. Für die Trenntechnik stehen eine Reihe von Matrices unterschiedlicher Poren-, Partikelgröße sowie Belegungsgrade zur Verfügung. Hierfür wurden die C₈- und C₄-Säulen (Micro C₈ 5µm 250 x 1.6mm, Nucleosil 300; Micro C₄ 5µm 250 x 2.1mm Vydac 300) verwendet.

Die Detektion der Peptide erfolgte durch Messung der UV-Absorption bei 215 nm. Die Polypeptide wurden in einem polaren Lösungsmittel (Puffer A = 0.1 % TFA in H₂O) auf die Säule aufgetragen und an die Säule gebunden. Die Elution der Peptide erfolgte durch kontinuierliche Erhöhung des organischen Lösungsmittels (Puffer B = 0.1 % TFA in Acetonitril). Bei Rechromatographie der aktiven Fraktionen (siehe 2.2.4) wurden die Fraktionen von Hand gesammelt. Die Trennung der Peptide erfolgte mit dem ABI (Applied Biosystems 130A) Separation System.

3. ERGEBNISSE

3.1 Klonierung und Charakterisierung eines Somatostatin-ähnlichen Rezeptors in *Drosophila melanogaster*

3.1.1 Primerkonstruktion

Um die cDNA eines möglichen Somatostatin-ähnlichen Rezeptors in *Drosophila melanogaster* zu klonieren; sind degenerierte Oligonukleotide konstruiert worden, die dann als Primer für die Amplifikation des entsprechenden cDNA-Abschnitts dienen. Da die meisten Aminosäuren von mehr als einem Kodon kodiert werden, ist es nicht einfach, die Sequenzen für die degenerierten Primer anhand der Proteindaten festzulegen. Bei der Konstruktion der Primer wurden deshalb Proteinbereiche ausgewählt, bei denen eine hohe Ähnlichkeit zwischen den unterschiedlichen SSTR-Subtypen vorliegt und die entsprechende Aminosäure höchstens von zwei Kodons kodiert werden. Für diese Konstruktion wurden die zweite und dritte extrazelluläre Schleife, die zweite intrazelluläre Schleife und die siebte Transmembrandomäne ausgewählt. Die Lage der degenerierten Oligonukleotide ist auf der Proteinsequenz in Abb. 3.1 schematisch dargestellt. Diese degenerierten Oligonukleotide wurden Somatostatin-Rezeptor forward 1 (SRF1), Somatostatin-Rezeptor forward 2 (SRF2), Somatostatin-Rezeptor reverse 1 (SRR1) und Somatostatin-Rezeptor reverse 2 (SRR2) genannt.

Position der degenerierten Primer auf der Sequenz

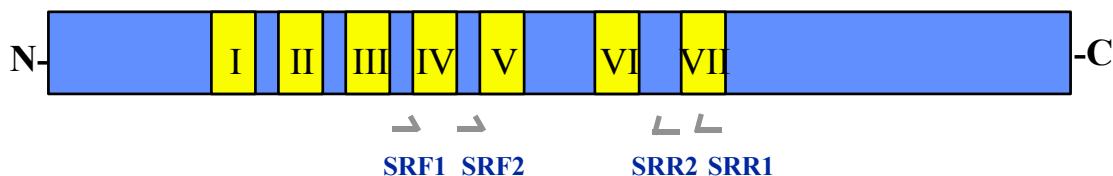


Abb. 3.1 Schematische Darstellung der Position der degenerierten Oligonukleotide in der Sequenz
 Der blaue Balken repräsentiert die Sequenz eines typischen Ratten-Somatostatin-Rezeptors, die gelben Kästchen (I-VII) die Transmembrandomänen, die nach links zeigenden Pfeile die reverse- und die nach rechts zeigenden Pfeile die forward-positionierten degenerierten Oligonukleotide.

3.1.2 Testen der Primer

Zunächst wurde versucht, die cDNA eines Somatostatin-ähnlichen Rezeptors in *Drosophila melanogaster* über die RT-PCR-Technik zu amplifizieren. Es wurde die mRNA aus *Drosophila melanogaster* der Firma Clontech verwendet, mit Hilfe der reversen Transkriptase in die cDNA umgeschrieben und die RT-PCR durchgeführt. Es wurde jedoch kein PCR-Produkt erhalten. Daraufhin wurde eine RT-PCR mit den cDNA-Bibliotheken (aus dem Knochenfisch *Eptatretus stouti* und dem Knochenfisch *Catostomus commersoni* (2.1.3.3) sowie den degenerierten Primern in allen Kombinationen durchgeführt. In diesem Experiment wurden Fragmente von 500-650 bp erhalten. Diese DNA-Fragmente wurden in den *pBluescript SK⁺*-Vektor inkloniert und sequenziert.

Nach einer Datenbankanalyse konnte in drei erzeugten Klonen durch die SRF1/SRR1-Primerkombination aus *Catostomus commersoni* eine Sequenzidentität von 67 % zu dem humanen SSTR3 auf Nukleotidebene festgestellt werden. Diese drei Klone zeigten untereinander eine Sequenzidentität von 98 %, d.h. diese drei Klone enthalten die selbe cDNA.

Zwei Klone die mit der Primerkombination SRF2/SRR1, aus der *Eptatretus stouti*-cDNA amplifiziert wurden, wiesen eine Sequenzidentität von 69 % zu dem SSTR3 der Maus auf Nukleotidebene auf. Diese zwei untersuchten Klone zeigten untereinander eine Sequenzidentität von 99 % auf Nukleotidebene. Bei einem Vergleich der Sequenzen von *Catostomus commersoni* und *Eptatretus stouti* in der Datenbank zeigten sie untereinander eine Sequenzidentität von 65 % auf Nukleotidebene.

Diese Ergebnisse belegten, daß die Primer gut funktionieren. Daher wurde *Drosophila melanogaster* gezüchtet, um aus dem Gewebe RNA zu isolieren und die RT-PCR damit durchzuführen. Die Züchtung von *Drosophila melanogaster* und die RNA-Aufarbeitung wurde in der Arbeitsgruppe von Herrn Prof. Dr. Gundelfinger im Leibnitz-Institut für Neurobiologie in Magdeburg erlernt.

```

1   CGTTATCTTGCTGTGGTCCACCCCGTGCAGCCGCCAATTGCCGCAAACCAAACATAGCC   60
    R Y L A V V H P V R A A N C R K P N I A

61  AAGATATTTAGCTGCATCAGCTGGCTGTTGTCCATCGTTGTTGTTCTCCCAGTCATTGCA   120
    K I F S C I S W L L S I V V V L P V I A

121 TTTTCACACACAGATGGACATAAAAGCATGTGCAACATAAAAGTGGCCTGATCCAGTTAAA   180
    F S H T D G H K S M C N I K W P D P V K

181 GTGTGGTCGACTGTCTTTATCCTCTACACATCATTGCTCGGCTTCTTCTCCCACTATTC   240
    V W S T V F I L Y T S L L G F F L P L F

241 ATCATCTGCCTTTGCTACCTCCTGATTGTTCTCAAGGTAAATCCTCGGGTATGCGTGTG   300
    I I C L C Y L L I V L K V K S S G M R V

301 AACTCCAGCAAGAGCCGTCGATCTGAGAAGAGGGTCACACAGATGGTCGTGGTGGTGGTG   361
    N S S K S R R S E K R V T Q M V V V V V

361 GCGGTGTTTGTGCTCTGCTGGCTGCCATTTTACATCTTA   399
    A V F V L C W L P F Y I L

```

Abb.3.2 Nukleotid- und abgeleitete Teil-Primärsequenz des *Eptatretus stouti*-Klons

Gezeigt ist die Teil-cDNA-Sequenz des *Eptatretus stouti*-Klons des amplifizierten G-Protein-gekoppelten Rezeptors mit einem offenen Leserahmen. Die Numerierung bezieht sich auf die Nukleotid-Sequenz.

```

1   GCGGTGAATGGGACAATCTGGGCAGTCTCCTTCTTGGTAGTCTTGCCAGTGGTGATTTTT   60
    A V N G T I W A V S F L V V L P V V I F

61  GCTAATGTGCAACGAGAGGGAGGAATCTGTAACATCATATGGCCAGAGCCAGCCAGAATC   120
    A N V Q R E G G I C N I I W P E P A R I

121 TGGGGAGCAGCATTATCATCTACACTTCCACTGTTGGGTTTTTCTTTCCCTGTTAGTC   180
    W G A A F I I Y T S T V G F F F P L L V

181 ATCTGCATGTGCTACCTCTTCATTGTGATCAAGATACGGAGCTCAGGAAAGAAGGTTTCAT   240
    I C M C Y L F I V I K I R S S G K K V H

241 GCCACTTCAACCAAACGGCGCAAGTCGGAACGAAAGGTCACGCGAATGGTGGTGATAGTG   300
    A T S T K R R K S E R K V T R M V V I V

301 GTGGCAGTGTT.TTTTTTGTGCTGGATGCCATTTTAC
    V A V ? F F C W M P F Y

```

Abb. 3.3 Nukleotid- und abgeleitete Teil-Primärsequenz des *Catostomus commersoni*-Klons

Gezeigt ist die Teil-cDNA-Sequenz des *Catostomus commersoni*-Klons des amplifizierten G-Protein-gekoppelten Rezeptors mit einem offenen Leserahmen. Die Numerierung bezieht sich auf die Nukleotid-Sequenz.

3.1.3 RT-PCR zur Amplifizierung des Somatostatin-ähnlichen Rezeptors mit cDNA aus *Drosophila melanogaster*

Um die cDNA eines möglichen Somatostatin-ähnlichen Rezeptors aus *Drosophila melanogaster* zu amplifizieren, wurde aus der isolierten mRNA wie im Methodenteil (2.2.1.1) beschrieben eine RT-PCR durchgeführt. Alle Primerkombinationen wurden bei einer Anlagerungs-Temperatur von 58 °C bei 33 Zyklen getestet. Nach einer Auftrennung über ein 1 %iges Agarosegel (Abb. 3.4) zeigte die Spur 2 mit der Primerkombination SRF1/SRR1 einige schwache Banden bei 200 bp, 300 bp und 500 bp, die Spur 4 mit der Primerkombination SRF2/SRR1 eine Bande bei ca. 500 bp, die Spur 6 mit der Primerkombination SRF1/SRR2 eine Bande bei ca. 550 bp und eine Bande bei 800 bp, die Spur 8 mit der Primerkombination SRF2/SRR2 eine Bande bei ca. 500 bp und einige Banden zwischen 200-400 bp.

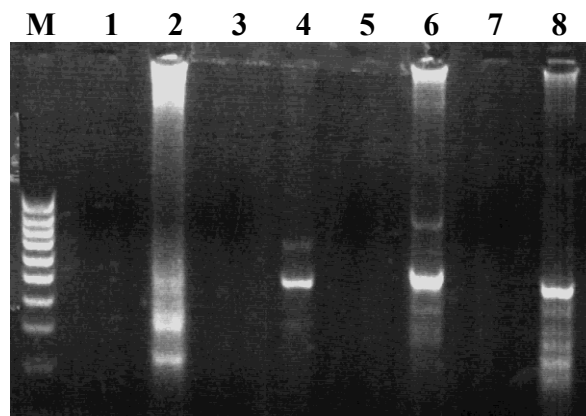


Abb. 3.4 PCR-Amplifikate mit den degenerierten Oligonukleotiden

Amplifikation von Fragmenten eines putativen Somatostatin-ähnlichen Rezeptor-Gens mit den unterschiedlich kombinierten degenerierten Oligonukleotiden aus *Drosophila*-Kopf-cDNA. Auftrennung über ein 1 %iges Agarosegel. M: 1 Kb Ladder (Molekulargewichtsstandard), 1: H₂O-Kontrolle für Primerpaar SRF1/SRR1, 2: Primerkombination SRF1/SRR1, 3: H₂O-Kontrolle für Primerpaar SRF2/SRR1, 4: Primerkombination SRF2/SRR1, 5: H₂O-Kontrolle für Primerpaar SRF1/SRR2, 6: Primerkombination SRF1/SRR2, 7: H₂O-Kontrolle für Primerpaar SRF2/SRR2, 8: Primerkombination SRF2/SRR2.

3.1.4 Sequenzanalyse der Amplifikate

Mit Hilfe der NCBI (National Center for Biotechnology Information) -Datenbank wurde eine Sequenzanalyse der PCR-Produkte durchgeführt. Das RT-PCR-Amplifikat aus der Spur 2 konnte nicht kloniert werden, so daß dieses Fragment nicht näher analysiert wurde.

Das RT-PCR-Amplifikat aus der Spur 4 (Primerkombination SRF2/SRR1) zeigte eine Ähnlichkeit von 95 % zu einem genomischen Klon (Klon AG5R) aus *Drosophila melanogaster*. Dieser Klon zeigte jedoch keine Ähnlichkeit zu den GPCRs. Das Amplifikat aus der Spur 8 zeigte eine Ähnlichkeit von 95 % zu dem *Drosophila*-Tachykinin-Rezeptor. Das RT-PCR-Amplifikat aus der Spur 6 (Primerkombination SRF1/SRR2) zeigte einen offenen Leserahmen von 507 bp mit 169 Aminosäuren (Abb. 3.5). Eine Analyse über die NCBI-Datenbank zeigte, daß diese Teilsequenz den mittleren Bereich der G-Protein-gekoppelten Rezeptoren mit einer Ähnlichkeit von 30-35 % auf Aminosäureebene abdeckt. Die höchste Ähnlichkeit zeigte die Sequenz zu den Somatostatin-, Galanin- und Opioid-Rezeptoren. Um nun die unbekanntenen Enden des G-Protein-gekoppelten Rezeptors aus *Drosophila* (*Drosophila*-GPCR) zu klonieren, wurde die RACE-Technik angewandt.

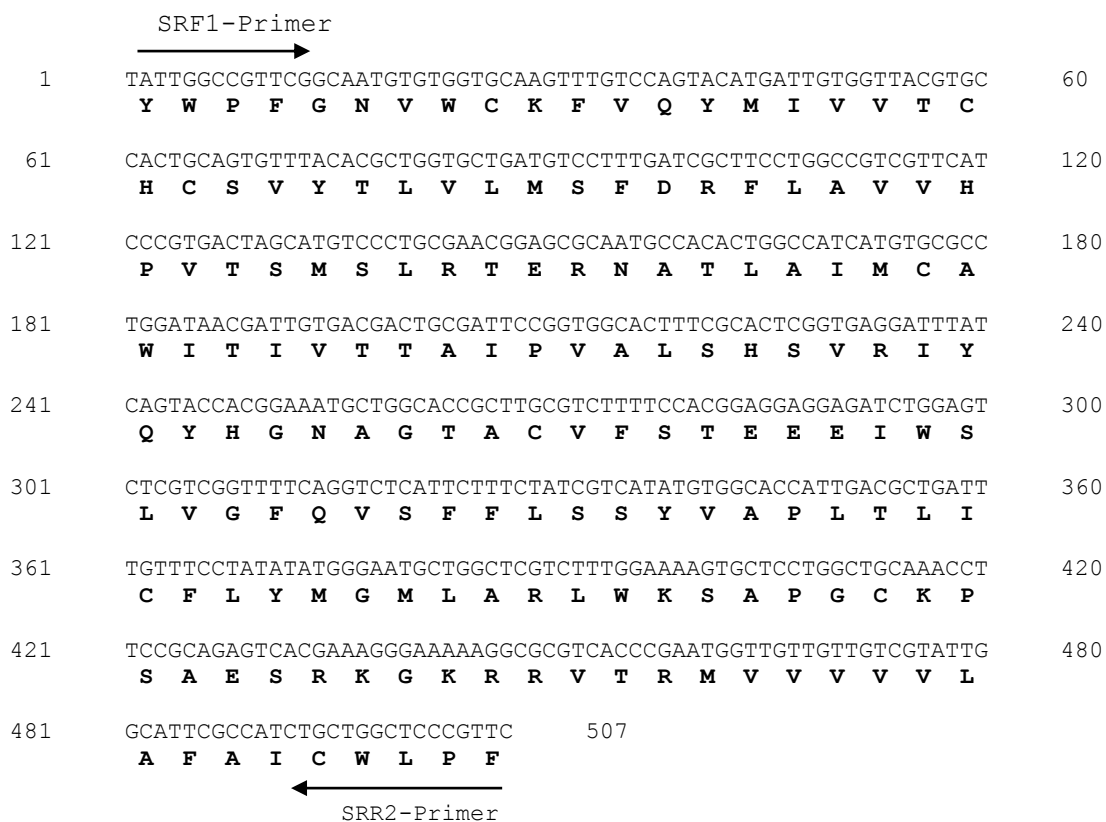


Abb. 3.5 Nukleotid- und abgeleitete Teil-Primärsequenz des *Drosophila melanogaster*-Klons

Gezeigt ist die Teil-cDNA-Sequenz mit abgeleiteter Primärsequenz (Einbuchstabencode) des amplifizierten *Drosophila*-G-Protein-gekoppelten Rezeptors. Die Numerierung bezieht sich auf die Nukleotid-Sequenz. Die degenerierten Primer sind auf der Sequenz mit Pfeilen gekennzeichnet.

3.1.5 Amplifizierung der 5'-und 3'-Enden durch die RACE-Technik

Für diese Technik wurden die spezifischen Oligonukleotide Drosi1-, Drosi2-, Drosi3-, Drosi4- und Drosi6-Primer konstruiert und verwendet (Abb.3.6).

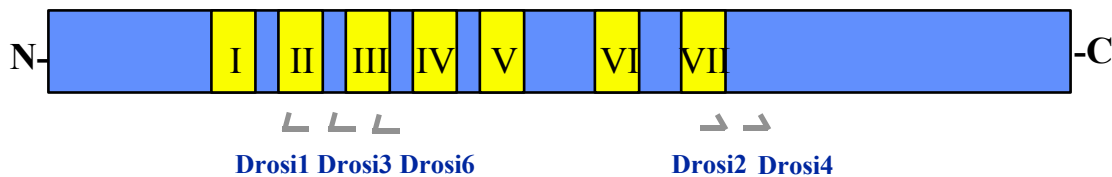
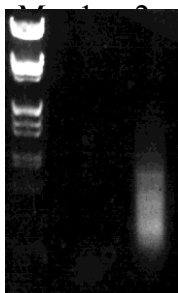


Abb. 3.6 Schematische Darstellung der Lage des RACE-Primers auf der Sequenz:

Der blaue Balken repräsentiert die vermutliche Sequenz des *Drosophila*-G-Protein-gekoppelten Rezeptors, die gelben Kästchen (I-VII) die Transmembrandomänen, die nach links zeigenden Pfeile die genspezifischen Oligonukleotide für die 5'-RACE-PCR und die nach rechts zeigenden Pfeile die genspezifischen Oligonukleotide für die 3'-RACE-PCR.

Nach der Durchführung der RACE-PCR wurde eine schwache Bande bei 800 bp im Agarosegel bei der 5'-RACE-PCR (Abb.3.7) und zwei starke Banden auf der Höhe von 560 bp und 800 bp bei der 3'-RACE-PCR (Abb.3.8) beobachtet. Um eine Sequenzanalyse durchführen zu können, wurden die Amplifikate des 5'-RACE-Produktes in den Vektor *pBluescript SK⁺* über die BamHI/SalI-Schnittstellen einkloniert. Die 3'-RACE-Produkte wurden ebenfalls in den Vektor *pBluescript SK⁺* über die Schnittstellen EcoRI/SalI einkloniert.

5'-RACE PCR-Produkt



3'-RACE PCR-Produkt

1 M

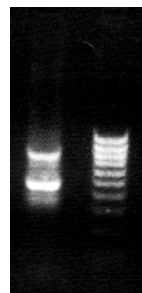


Abb. 3.7 5'RACE-Produkt

Die cDNA aus *Drosophila*-Köpfen wurde mit spezifischen Primern amplifiziert und in einem 1 %

igen Agarosegel analysiert. *M* : λ / Hind III
Molekulargewichtsstandard, 1 : H₂O-Kontrolle, 2 :
Drosi1 / PCR-Anker-Primer-Kombination.

M : λ / Hind III Molekulargewichtsstandard, 1 :
Drosi4 / PCR-Anker-Primer-Kombination.

Abb. 3.8 3'RACE Produkt

Analyse nach einer Amplifizierung von cDNA aus
Drosophila-Köpfen in einem 1 %igen Agarosegel.

Die Analyse der Sequenz des 5'-RACE-Klons zeigte einen offenen Leserahmen von 462 bp mit 154 Aminosäuren. Die erhaltene Sequenz ging über das potentielle Startkodon hinaus und enthielt im 5'-untranslatierten Bereich ein *in frame* Stop-Triplett, so daß davon ausgegangen werden konnte, daß es sich bei dem Methionin wirklich um das Initiationskodon handelte. Am 5'-Ende befand sich ein 230 bp langer nicht kodierender Abschnitt. Die Analyse der Sequenz des 3'-RACE-Klons zeigte einen offenen Leserahmen von 291 bp mit 97 Aminosäuren. Diese Region ist umgeben von einem 292 bp langen Bereich, wobei sich hier - nach dem Stopkodon - ein Polyadenylierungssignal befindet. In beiden RACE-Produkten konnte davon ausgegangen werden, daß zumindest das 5'- und das 3'-Ende der kodierenden Region vollständig war.

3.1.6 Klonierung des gesamten offenen Leserahmens (ORF)

Um nun die cDNA des aus *Drosophila*-G-Protein-gekoppelten Rezeptors in voller Länge zu klonieren, wurden zwei spezifische Primer jeweils am Start- und am Stopkodon entworfen. Für diese RT-PCR wurde die Vent-DNA-Polymerase verwendet, da diese über eine Exonuklease-Aktivität verfügt und eine damit verbundene geringere Fehlerrate.

Die Sequenzierungsergebnisse zeigten an zwei unabhängigen Klonen (Klon 3, Klon 5) Mutationen gegenüber der Konsensussequenz, daß mit Hilfe mehrerer Sequenzvergleiche der RACE-Produkte erstellt wurde. Für die Erstellung der Konsensussequenz wurden mindestens vier unterschiedliche Klone aus der selben Ligation verglichen. Bei einer Basenabweichung innerhalb der vier Klone wurde die Sequenz ausgewählt, welche bei drei Klonen identisch war. An dem Klon 3 wurde durch einen Basenaustausch an der Position 702 ein Cystein in ein Alanin mutiert. An dem Klon 5 wurde ebenfalls durch einen Basenaustausch an der Position 847 ein Alanin in ein Valin mutiert. Da diese beiden Klone über die gleichen Restriktionsschnittstellen verfügten, konnten die Bereiche mit den Mutationen ausgeschnitten und die mutationsfreien Bereiche zu einem fehlerfreien Gesamtfragment ligiert werden.

3.1.7 Charakterisierung des *Drosophila*-GPCRs

Die Sequenzierungsergebnisse zeigten einen offenen Leserahmen von 1182 bp, der für ein Protein von 394 Aminosäuren mit einem kalkulierten Molekulargewicht von 43.2 kD kodiert. Umgeben ist dieser Bereich von einem 231 bp umfassenden 5'-und einem 411 bp langen 3'-Bereich. Die Primärsequenz des *Drosophila*-GPCR-Klons weist verschiedene Konsensussequenzen für mögliche Proteinmodifikationen auf.

So befindet sich an den Asparagin-Resten 28, 36, 57 entsprechend der Konsensussequenz [N-X-S/T] die Möglichkeit einer Glykosylierung (Kornfeld und Kornfeld, 1985). Desweiteren gibt es an den Aminosäure-Positionen 184, 187, 214, 282 und 379, den Konsensussequenzen [(S/T)-X-(K/R)] entsprechend, die Möglichkeit einer Phosphorylierung durch Proteinkinase C (Woodgett *et al.*, 1986), an der Aminosäure-Position 287 durch Proteinkinase A mit der Konsensussequenz [R-X-(S/T)]. Am Cysteinrest 364 besteht hier die Möglichkeit einer Palmitoylierung (O'Dowd *et al.*, 1989). Ein Vergleich der Primärsequenz des *Drosophila*-Klons mit der Genbank ergab eine deutliche Zuordnung in die Familie der G-Protein-gekoppelten Rezeptoren.

Als weitere Evidenz für diese Zuordnung diente eine Hydrophathieanalyse (Kyte und Doolittle, 1982), speziell für Membranproteine nach Heijne (Heijne, 1987). Nach Kyte und Doolittle sollten Sequenzbereiche, die sich in einer Membran befinden, einen Hydrophobizitätsindex von mindestens +1,6 erreichen. Da dieser Wert in sieben Sequenzabschnitten von je 21-25 Aminosäuren Länge bei dem Protein erreicht wurde, ließ sich die für G-Protein-gekoppelte Rezeptoren typische Struktur annehmen, bei der das Protein sieben mal die Plasmamembran durchspannt.

GCCAAATGTCNAAGGTGGNGTGNCCGTGGGCGTNCCCGCAACAAGCAAATGCGAGAAGCCAANCAATAGAGNCAGAGTCATC
CAATTAGAAAGGCCNTACAGAATCGAATAATATATATACTCATATATATATATATATTTGAGCACGATAGGGATCTCTGTCAAG

ATGGCTGGCCATCAGTCGCTGGCACTTTTGTGGCCACGCTAATTAGCAGCTGGCCAAAAGCCTCTTGGGGCGCCACTGGA
M A G H Q S L A L L L A T L I S S W P K A S W G A T G 27
 1
 AACGGTAGTATCATAAGCGTTAGCAACAGCAGTGGCAACAATATGCATTCACCTCGGAACACACGGATCATTCCGGATCAC
N G S I I S V S N S S G N N Y A F T S E H T D H S D H 54
 28
 AATGCCAACGACTCCATGGAATATGATGCAGAGAGTGTGGCCCTCGAACGGATCGTATCCACAATAGTTCCCGTATTCTTT
N A N D S M E Y D A E S V A L E R I V S T I V P V F F 81
 55
 GGCATTATCGGATTCGCAGGACTTTTGGGCAATGGTCTGGTTATTCTGGTGGTTGTGGCCAACCAGCAGATGCGCTCCACC
G I I G F A G L L G N G L V I L V V V A N Q Q M R S T 108
 82
 ACCAATCTGCTGATAATCAACCTGGCCGTCTCGGACATTCTGTTCTGCATCTTCTGTGTCCCCTTACGGCTACCGATTAC
T N L L I I N L A V S D I L F V I F C V P F T A T D Y 135
 109
 GTGCTGCCGGAGTGGCCGTTTGGCAATGTGTGGTGCAAGTTTGTCCAGTACATGATTGTGGTTACGTGCCACTGCAGTGT
V L P E W P F G N V W C K F V Q Y M I V V T C H C S V 162
 136
 TACACGCTGGTGTGATGTCCTTTGATCGCTTCCCTGGCCGTCTGTTTCCCGTGACTAGCATGTCCCTGCGAACGGAGCGC
Y T L V L M S F D R F L A V V H P V T S M S L R T E R 189
 163
 AATGCCACACTGGCCATCATGTGCGCCTGGATAACGATTGTGACGACTGCGATTCCGGTGGCACTTTCCGACTCGGTGAGG
N A T L A I M C A W I T I V T T A I P V A L S H S V R 216
 190
 ATTTATCAGTACCACGAAATGCTGGCACCGCTTGGCTCTTTTCCACGGAGGAGGAGATCTGGAGTCTCGTCCGTTTTTCAG
R I Y Q Y H G N A G T A C V F S T E E I W S L V G F 243
 217
 GTCTCATTCTTTCTATCGTCATATGTGGCACCATTGACGCTGATTTGTTTCCCTATATATGGGAATGCTGGCTCGTCTTTGG
Q V S F L S S Y V A P L T L I C F L Y M G M L A R L W 270
 244
 AAAAGTGCTCCTGGCTGCAAACCTTCCGACAGATCACGAAAGGGAAAAAGGCGCTCACCCGAATGGTTGTTGTTGTCGTA
K S A P G C K P S A E S R K G K R R V T R M V V V V V 297
 271
 TTGGCATTCCGCATCTGTTGGCTGCCATTTCATGTCATCTCTGCTGCTAAAGGCACTGAATCTATATGGCGGCAGCCACTTA
L A F A I C W L P I H V I L V L K A L N L Y G G S H L 324
 298
 TCGGTCATTATTCAGATTATATCCCATGTGGTGGCGTACACGAATTCGTGCATCAATCCGATACTGTATGCCTTTCTATCC
S V I I Q I I S H V V A Y T N S C I N P I L Y A F L S 351
 325
 GACAACTTTTCGCAAGGCATTCCGCAAGGTGGTCTGGTGTGGAAGTCCGCCACCTTTGATGACCAATCAACAGGTGACCAAG
D N F R K A F R K V V W C G S P P P L M T N Q Q V T K 352
 352
 ACAACGCGAACTGCAACCGGAAACGGAAACGTCCTCAATATTGAAATGCTCTAA
T T R T A T G N G T S N I E M L * 379
 379

GCGGCTCTTGAAAGTAAACTAATTTGAGATGGTCACAACATTTTTGAAGGCGACTTACAACTCGAAACAGAAAATATGAAT
 TTAACAACAAAGAAACAAAGAAAACATAAAAACGCGGCATATAAGTTAACTTTAGTGTATATATAGTAAACAATGTAT
 GTCTATGAGGAGAAATAATTTCCGAATTATGAAATGTGATTGTTTTGATAGTTTAAATGTGTACGATTATTTCACTAA
 GAATAAGACAACCGAAAAGGTATATATAAACACGCATATATTCTACGTTAAATTTTAAATACGACTGGTTTCTTTTTAAACA

TTGAGCGCCGTGTAAGTTGCATTTGTGCCTANAACCTAAGTATTTAACATATAAATTTAAAATTTAATTTTTCCAAAAAT

Abb. 3.9 Nukleotid- und abgeleitete Primärsequenz des G-Protein-gekoppelten Rezeptors aus *Drosophila*
Gezeigt ist die cDNA-Sequenz mit abgeleiteter Primärsequenz (Einbuchstabencode) des isolierten G-Protein-gekoppelten Rezeptors aus *Drosophila melanogaster*. An den Seiten ist die Aminosäuresequenz nummeriert. Mutmaßliche Transmembrandomänen sind in türkisfarbener Schrift gekennzeichnet. Mögliche Glykosylierungsstellen sind durch rote Schrift gekennzeichnet, hellgrün die Phosphorylierungsstelle für die Proteinkinase C, blau die Phosphorylierungsstelle für die Proteinkinase A, grau die Palmitoylierungsstelle und rosa für das Poly A-Signal.

3.1.7.1 Genomische Strukturaufklärung des *Drosophila*-GPCRs

Ein Vergleich der Primärsequenz des *Drosophila*-Klons mit der „flybase“-Datenbank des NCBI ergab, daß die bekannte mRNA-Sequenz des Rezeptors sich in mehreren Fragmenten in einem genomischen Klon befindet. Dieser genomische Klon ist im Rahmen des *Drosophila* Genom Projektes (European *Drosophila* Genome Project) als Cosmid 121E (Zugangsnummer AL024454) zugänglich gemacht worden. Die bekannte mRNA-Sequenz verteilt sich auf 11 Exons und 28 Kb, wobei die kodierende Region sich auf 8 Exons verteilt (Abb. 3.10).

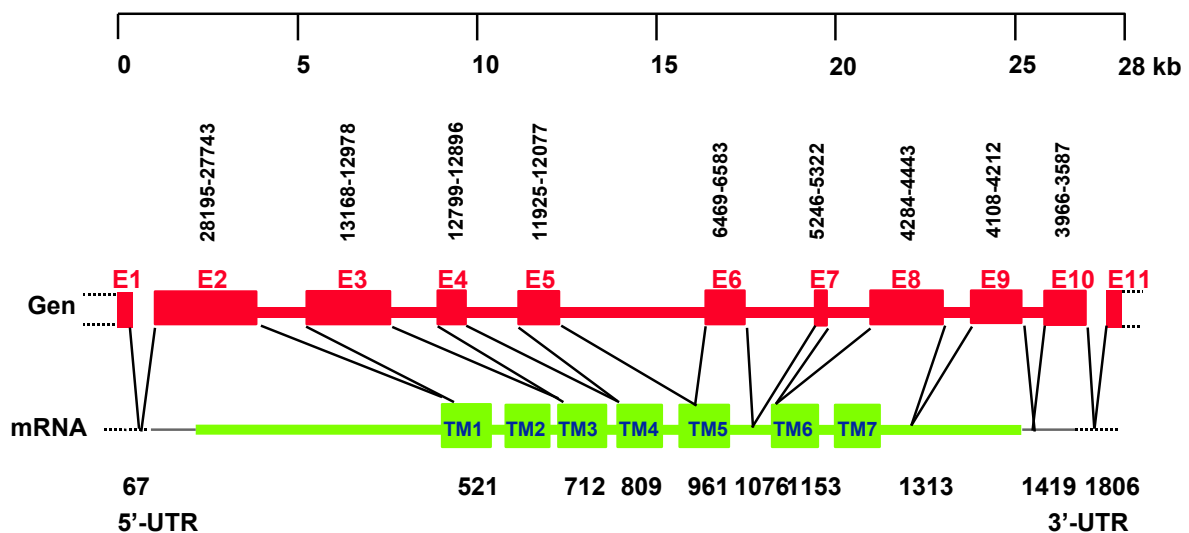


Abb. 3.10 Genomische Struktur des *Drosophila*-GPCR-Gens

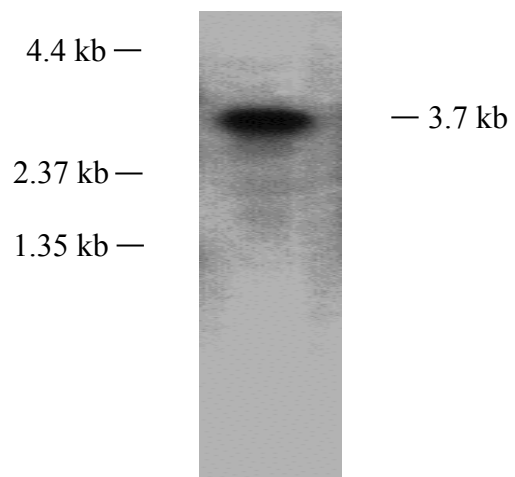
Gezeigt ist die genomische Struktur des *Drosophila*-GPCR-Gens. Die roten Boxen (Exons) mit dem roten Balken (Introns) repräsentieren das Gen. Die rot geschriebenen Buchstaben mit den Zahlen repräsentieren die Numerierung der Exons. Der grüne Balken mit den grünen Boxen stellt die Position der kodierenden Region mit den sieben Transmembrandomänen dar. An den Enden sind die 5'- und 3'-untranslatierten Regionen (UTR) dargestellt.

3.1.7.2 Northern-Blot-Analyse

Um die Größe des Transkriptes und die Expression im Gewebe feststellen zu können, wurde eine Northern-Blot-Analyse (siehe 2.2.1.3) durchgeführt. Dafür wurde Poly(A)⁺-RNA aus *Drosophila*-Köpfen, die nach 2.2.1.1 isoliert worden war, benutzt. Als cDNA-Sonde diente die nach 2.2.1.1 ³²P-markierte vollständige cDNA des *Drosophila*-GPCR-Klones. Es wurde eine einzige Bande mit einer Größe von 3.7 kb detektiert.

Abb. 3.11 Northern-Blot-Analyse

Die gezeigte Spur beinhaltet 5 µg Poly(A)⁺-RNA aus *Drosophila*-Köpfen.



3.1.7.3 Genexpressionsanalyse des *Drosophila*-GPCRs in unterschiedlichen Geweben sowie Entwicklungsstadien

Um die Genexpression in verschiedenen Geweben und verschiedenen Entwicklungsstadien zu untersuchen, wurde eine RT-PCR-Analyse durchgeführt. Als Primerpaar dienten die Primer Drosi.ATG/Drosi.7, die für die Amplifizierung der vollen Länge des *Drosophila*-GPCR verwendet wurden. Es konnte in allen Entwicklungsstadien (außer im Embryonalstadium) sowie im Kopf und Körper eine Expression festgestellt werden. Durch die Aktin-Kontrolle

konnte bewiesen werden, daß die Qualität der cDNA während der Aufarbeitung nicht beeinträchtigt wurde. So konnte in allen Entwicklungsstadien und Geweben Aktin nachgewiesen werden.

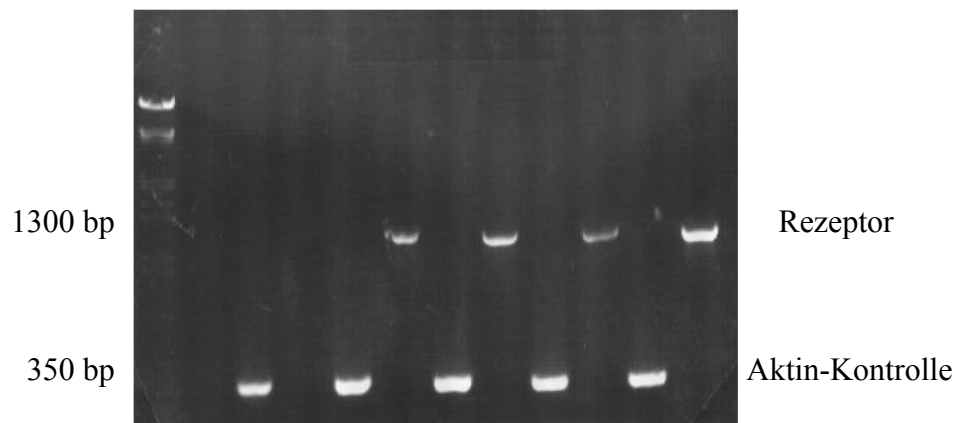


Abb. 3.12 Vorkommen von *Drosophila*-GPCR in verschiedenen Entwicklungsstadien und Geweben

Jede der dargestellten Spuren enthielt 10µl (siehe 2.2.2.1) einer mit 33 Zyklen durchgeführten RT-PCR, in die 10% einer nach 2.2.1.4 gewonnenen gewebespezifischen cDNA eingesetzt wurden. Auftrennung über ein 1 %iges Agarosegel. M: λ /HindIII (Molekulargewichtsstandard), 2: H₂O-Kontrolle, 3: *Drosophila* Embryonalstadium, 4: *Drosophila* Larvalstadium, 5: *Drosophila* Larvalstadium/Aktin-Kontrolle, 6: *Drosophila* Puppenstadium, 7: *Drosophila* Puppenstadium/Aktin-Kontrolle, 8: *Drosophila* Körper, 9: *Drosophila* Körper/Aktin-Kontrolle, 10: *Drosophila* Kopf, 11: *Drosophila* Kopf/Aktin-Kontrolle

3.2 Pharmakologische und funktionelle Charakterisierung des *Drosophila*-GPCRs

Nach der Klonierung des *Drosophila*-GPCRs stellte sich die Frage, welcher Agonist an den *Drosophila*-GPCR bindet. Zur funktionellen Charakterisierung von Rezeptoren, die von einer gegebenen cDNA kodiert werden, ist das *Xenopus*-Oozyten-System gut geeignet. Da der *Drosophila*-GPCR eine Ähnlichkeit zum Somatostatin-Rezeptor zeigt, wurde davon ausgegangen, daß der Signaltransduktionsweg auch derselbe wie der des Somatostatin-Rezeptors sein könnte. Die SSTR-Subtypen (SSTR2-SSTR5) wurden mit der Untereinheit des einwärts gerichteten Kalium-Kanals (GIRK, G-protein gated inwardly rectifying potassium channel) in den *Xenopus*-Oozyten koexprimiert. Diese Rezeptoren koppeln alle an das G-Protein der G_i/G_o-Klasse, welches Pertusistoxin-sensitiv ist. Durch die Aktivierung des GIRK-Kanals führt es dazu, daß das Somatostatin eine Hyperpolarisation der Zellmembran

bewirkt. Bei Agonisten-Zugabe dissoziiert das G-Protein in seine α - und $\beta\gamma$ -UE, die α -UE steuert die Aktivität von „*second messenger*“ erzeugenden Enzymen, und die $\beta\gamma$ -UE steuert die Aktivität verschiedener Ionenkanäle (z.B. GIRK-Kanal). Der letzte Schritt der Signaltransduktionskaskade führt zu einem einwärts gerichteten Membranstrom, der elektrophysiologisch meßbar ist.

Somit wurde versucht, über das *Xenopus* - Oozytensystem den unbekannt Agonisten für den *Drosophila*-GPCR zu finden. Für die funktionelle Expression des *Drosophila*-GPCRs in *Xenopus*-Oozyten wurde die *in vitro* transkribierte RNA des *Drosophila*-GPCRs sowie des GIRK-Kanals in die *Xenopus*-Oozyten koinjiziert. Der funktionelle Nachweis erfolgte über die „voltage clamp“, Meßmethode.

Die Messungen erfolgten wie im Abschnitt 2.2.4 beschrieben. Um eine geeignete Wahl von zu testenden Liganden für den *Drosophila*-GPCR zu treffen, wurde versucht, aus den bisherigen Untersuchungsdaten Anhaltspunkte zu erkennen. Da der *Drosophila*-GPCR die höchste Ähnlichkeit zu den Galanin-, Somatostatin- und Opioid-Rezeptoren zeigte, wurden Somatostatin 14, Somatostatin 28, Galanin, Met-Enkephalin, Leu-Enkephalin, sowie das insektenspezifische Peptid Proktolin zusammengestellt und den Oozyten in einer Konzentration von $1 \times 10^{-6} \text{M}$ appliziert. Alle applizierten Peptide konnten den *Drosophila*-GPCR nicht aktivieren und belegten eindeutig, daß es sich bei dem *Drosophila*-GPCR nicht um ein Somatostatin-, Opioid- oder ein Galanin-Rezeptor handelte (Abb. 3.13). Nun war die Frage, ob der *Drosophila*-GPCR über Inositoltriphosphat (IP₃) den Signaltransduktionsweg auslöst. Wenn das der Fall ist, würden bei der Ligandenaktivierung die oozyteneigenen G-Proteine die Freisetzung von Ca^{++} -Ionen aus intrazellulären Speichern mit Hilfe des Inositoltriphosphates bewirken. Dieses würde wiederum membranständige Chloridkanäle aktivieren. Im letzten Schritt der Signaltransduktion würde dies dazu führen, daß ein einwärts gerichteter Membranstrom fließt, der elektrophysiologisch meßbar ist. Bei dieser Messung wurden die Liganden in ND 96 aufgenommen und so den Oozyten appliziert. Hierbei konnte ebenfalls kein Strom gemessen werden.

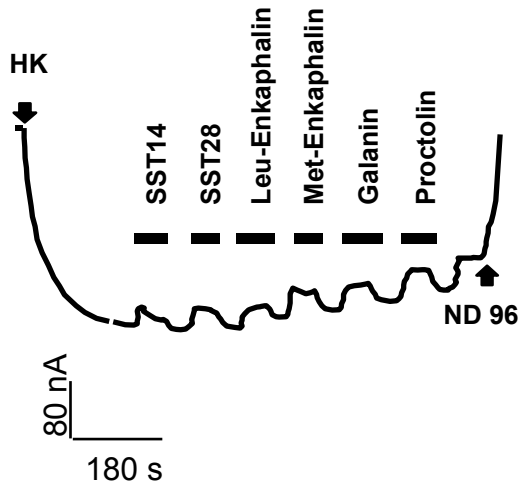


Abb. 3.13 Funktionelle Expression des *Drosophila*-GPCRs in *Xenopus*-Oozyten

Eine Koinjektion der *Drosophila*-GPCR-cRNA mit der GIRK-cRNA wurde zur funktionellen Expression in die *Xenopus*-Oozyten injiziert. Nach einer 2-tägigen Inkubation in modifiziertem Barth-Puffer wurde bei einem konstanten Potential von -70mV elektrophysiologisch mit der Standard-2-Elektroden-Voltage-Clamp-Technik gemessen. Applizierte Peptide sind Somatostatin 14, Somatostatin 28, Leu-Enkephalin, Met-Enkephalin, Galanin sowie Proktolin.

Die applizierten Peptide aktivierten nicht den *Drosophila*-GPCR. Es ist bekannt, daß die Somatostatin-Rezeptor-Subtypen im *Xenopus*-Oozyten-System erfolgreich exprimiert werden. Daher wurde der Aminoterminus des Somatostatin-Rezeptor-Subtypes 2 aus der Ratte zur Chimärer-Konstruktion verwendet. Somit wurde der chimäre *Drosophila*-GPCR so wie im Abschnitt 2.2.2.2 beschrieben mit Hilfe mehrerer PCR-Reaktionsschritte amplifiziert.

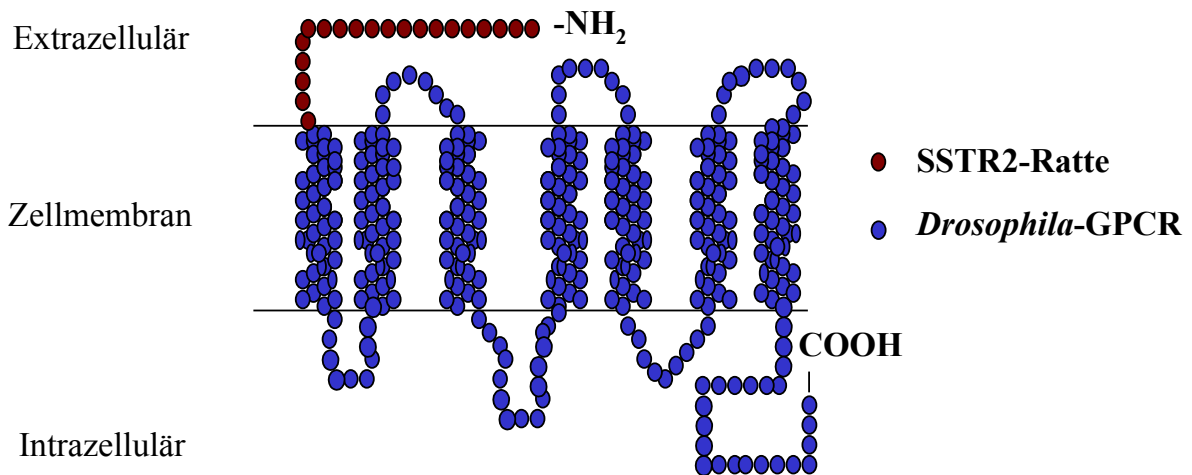


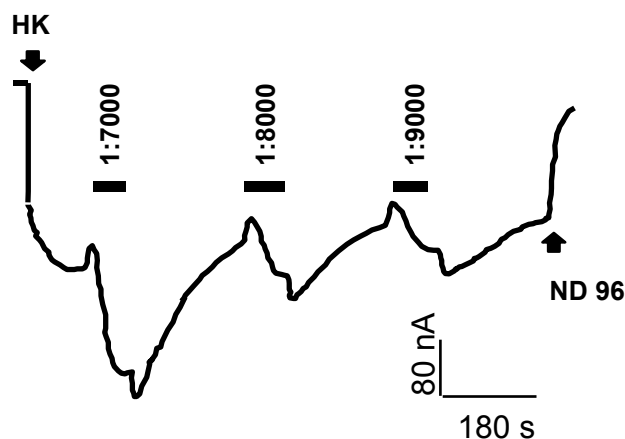
Abb. 3.14 Schematische Darstellung der *Drosophila*-GPCR-Chimäre

Die gezeigte Struktur beruht auf Hydropathieanalysen. Der chimäre Rezeptor wurde so konstruiert, daß er am Aminoterminus bis zur ersten Transmembrandomäne aus dem SSTR2-Rezeptor der Ratte (braun) und ab der ersten Transmembrandomäne aus dem *Drosophila*-GPCR besteht (blau).

Dieser chimäre *Drosophila*-GPCR beinhaltet den SSTR2-Aminoterminus bis zur ersten Transmembrandomäne und ab der ersten Transmembrandomäne den *Drosophila*-GPCR (Abb. 3.14). Nach der *in vitro* Transkription des chimären Rezeptors und Koinjektion mit dem GIRK-Kanal in die *Xenopus*-Oozyten konnte ebenfalls durch die applizierten Peptide (SST 14, SST 28, Leu-Enkaphalin, Met-Enkaphalin, Galanin, Proctolin) keine Stimulation des Rezeptors beobachtet werden.

Weil die oben erwähnten getesteten Peptide den chimären *Drosophila*-GPCR nicht aktivierten und der Ligand auf diese Weise nicht identifiziert werden konnte, wurde beschlossen, erst mal zu überprüfen, ob es überhaupt einen Liganden für diesen *Drosophila*-GPCR gibt. Dazu wurde aus *Drosophila*-Köpfen ein Peptidohextrakt, wie im Abschnitt 2.2.5.1 beschrieben, hergestellt. Es wurde eine Verdünnungsreihe in HK erstellt, 2 ml der Verdünnung wurde an die *Xenopus*-Oozyten appliziert. So wie in Abb. 3.15 (A) zu sehen ist, wurde bei einer Verdünnung von 1:9000 ein Strom von 70 nA, bei einer Verdünnung von 1:8000 ein Strom von 80 nA und bei einer Verdünnung von 1:7000 ein Strom von 160 nA gemessen. Um dieses Ergebnis zu verifizieren, ist parallel ein Kontrollexperiment durchgeführt worden. Beim Kontrollexperiment wurden die Oozyten nur mit der cRNA des GIRK-Kanals injiziert. Bei Zugabe des Peptidohextraktes sollte also kein Signal zu messen sein. Aus der Verdünnungsreihe des *Drosophila*-Peptidohextraktes wurden jeweils 2 ml appliziert. So wie in Abb. 3.15 (B) zu sehen ist, wurde kein Strom gemessen. Diese Ergebnisse wiesen deutlich darauf hin, daß der native Ligand des *Drosophila*-GPCRs sich in dem Peptidohextrakt befand.

A



B

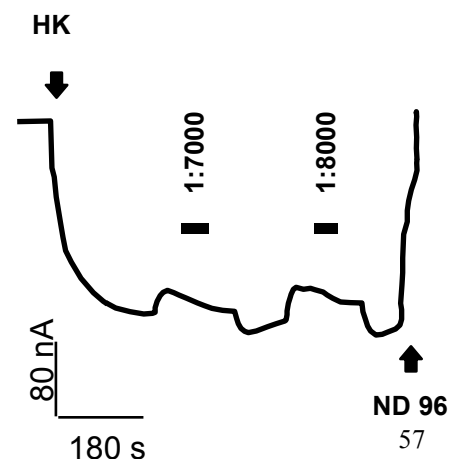


Abb. 3.15 Darstellung der Stromflußkurve einer Oozyte, welche mit *Drosophila*-GPCR und dem GIRK-Kanal (A) oder mit GIRK allein (B) injiziert wurde

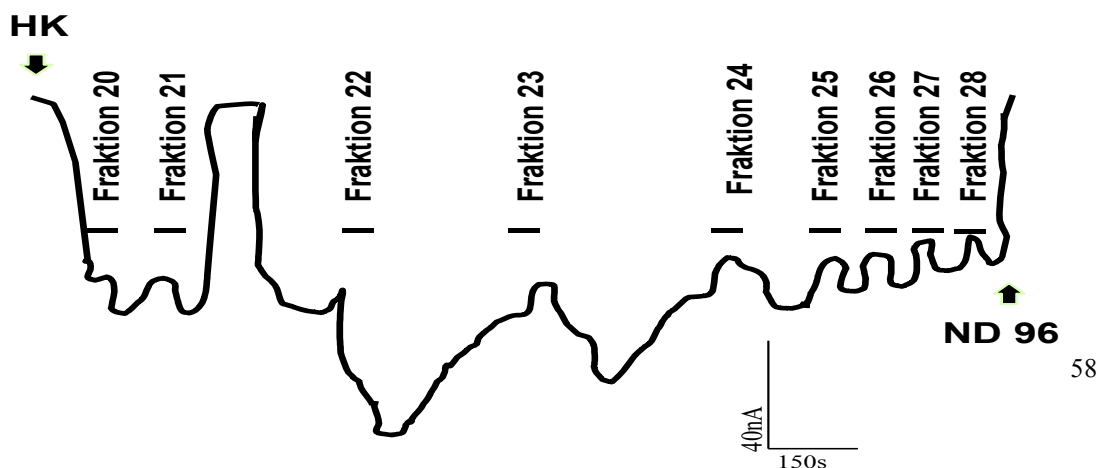
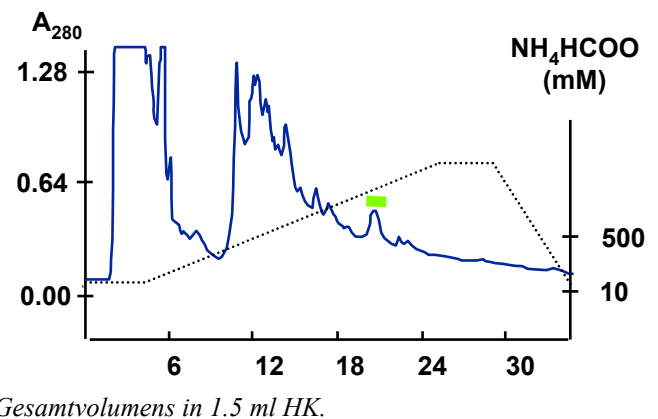
Appliziert wurde eine Verdünnung von 1:7000, 1:8000 und 1:9000 des *Drosophilakopf*-Peptidohextraktes in HK. Ein Strom von 70 nA, 80 nA und 160 nA wurde gemessen (A). Bei der GIRK allein injizierten Oozyte wurde ebenfalls eine Verdünnungsreihe appliziert. Wie zu sehen ist, konnte kein Strom gemessen werden (B).

3.2.1 Erste Aufreinigung des Peptidohextraktes mit der MonoS-Ionenaustauschersäule

Nachdem eine Aktivität in dem Peptidohextrakt aus *Drosophila*-Köpfen gemessen werden konnte, wurde beschlossen, den Liganden aus dem Rohextrakt zu reinigen. Der erste Aufreinigungsschritt wurde mit der MonoS-Ionenaustauschersäule durchgeführt. Bei dieser Chromatographieart werden Proteine aufgrund unterschiedlicher elektrostatischer Wechselwirkungen mit dem Säulenmaterial getrennt. Als Lösungsmittel wurden 10 mM NH₄COO in 10 % Methanol (Puffer A) und 1 M NH₄COO in 10 % Methanol (Puffer B) verwendet. Nach der Elution wurde die Aktivität der einzelnen Fraktionen in den Oozyten getestet.

Abb. 3.16 Aufreinigung des Peptidohextraktes aus *Drosophila*-Köpfen mit der MonoS-Ionenaustauschersäule

Gezeigt ist ein Chromatogramm (rechts) nach der Fraktionierung des Peptidohextraktes aus *Drosophila*-Köpfen über eine MonoS-Ionenaustauschersäule. Als Lösungsmittel wurden 10 mM NH₄COO in 10 % Methanol (Puffer A) und 1 M NH₄COO in 10 % Methanol (Puffer B) verwendet. Die unterbrochene Linie kennzeichnet den Gradienten des Chromatogramms. Die Detektion erfolgte bei 280 nm und die Fraktionen wurden von Hand gesammelt. Der grüne Balken über den Fraktionen 22 und 23 zeigt die aktiven Fraktionen an. Unten wurde die Aktivitätsmessung in den *Xenopus*-Oozyten bei einem konstanten Potential von -70 mV elektrophysiologisch mit der Standard-2-Elektroden-Voltage-Clamp-Technik gemessen. Appliziert wurde 1/20 des



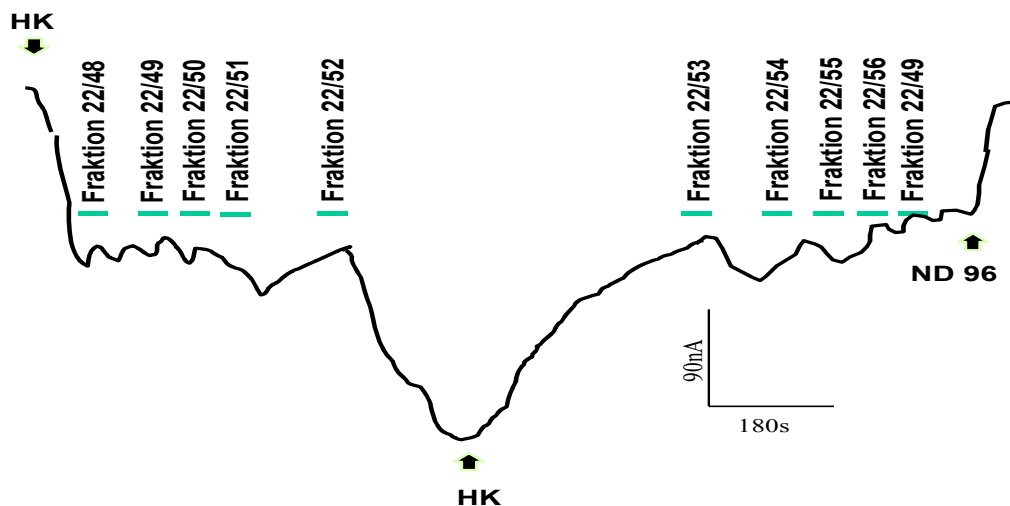
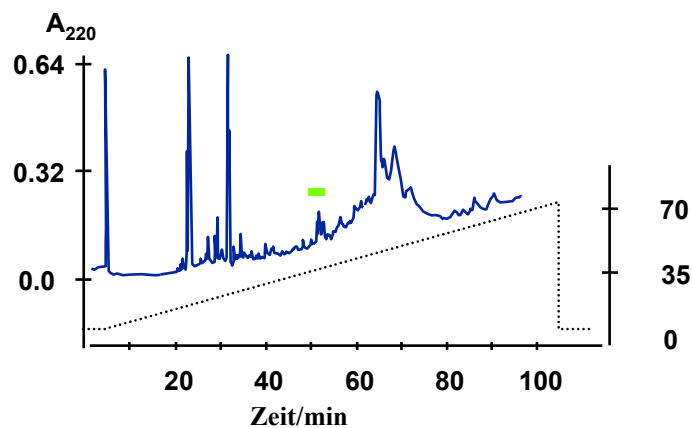
Die gesammelten Fraktionen wurden dabei wie im Abschnitt 2.2.4 beschrieben behandelt und gemessen. So wie in Abb. 3.16 (unten) zu sehen ist, wurde mit der Fraktion 22 eine Aktivität von 65 nA und mit der Fraktion 23 eine Aktivität von 40 nA gemessen.

3.2.2 Weitere Aufreinigung der Fraktionen 22 und 23 mit Hilfe der reverse phase-HPLC (C₁₈-Säule)

Die aktiven Fraktionen wurden gesammelt und weiter über die reverse phase HPLC aufgereinigt (Abb. 3.17, rechts). Hierzu mußte das Methanol aus den Fraktionen mit Hilfe der Speed-Vac abgezogen werden. Die Polypeptide wurden in einem polaren Lösungsmittel (Puffer A = 0.1% TFA in H₂O) auf die Säule aufgetragen. Aufgrund hydrophober Wechselwirkungen binden die Peptide an die Kohlenwasserstoffketten (C₁₈). Die Elution der Peptide erfolgte durch kontinuierliche Erhöhung der Konzentration des organischen Lösungsmittels (Puffer B = 0.1 % TFA in Acetonitril).

Abb. 3.17 Weitere Aufreinigung der Fraktionen 22 und 23 über eine reverse-phase-HPLC (C₁₈-Säule)

Gezeigt ist ein Chromatogramm (rechts) nach der Fraktionierung der Polypeptide 22 und 23 aus der MonoS-Ionenaustauschersäule. Der Gradient wurde als unterbrochene Linie dargestellt. Die Detektion der Peptide erfolgte durch Messung der UV-Absorption bei 215 nm. Die Fraktionen wurden per Hand gesammelt. Die Aktivitätsmessung (unten) der Fraktionen aus der reverse phase-HPLC wurde so wie bei Abb. 3.16 beschrieben gemessen. Der Hauptteil der Aktivität befindet sich in Fraktion 22/52.



Nach der Fraktionierung der Polypeptide erfolgte eine Aktivitätsmessung in den *Xenopus*-Oozyten. So wie in Abb. 3.17 (unten) zu sehen ist, konnte mit der Fraktion 22/52, eine Aktivität von 180 nA gemessen werden.

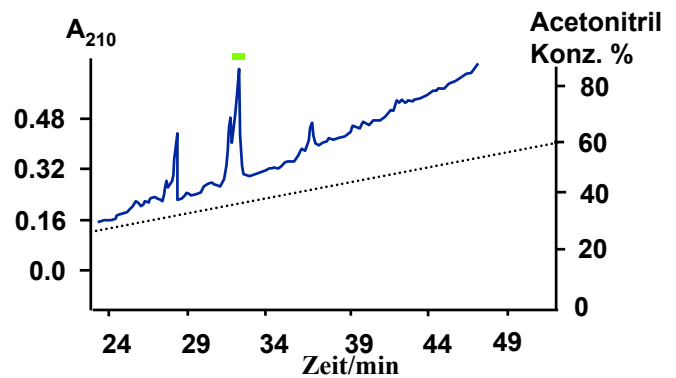
3.2.3 Weitere Aufreinigung der aktiven Fraktion mit Hilfe der reverse phase HPLC (C8-Säule)

Die aktive Polypeptid-Fraktion 22/52 wurde über drei weitere reverse phase HPLC Säulen aufgereinigt. Zuerst wurde die Polypeptid-Fraktion mit der C4-Säule und zuletzt zweimal mit der C8-Säule gereinigt (Abb. 3.18, rechts). Die Aktivitätsmessung erfolgte mit Hilfe von *Xenopus*-Oozyten. Die Durchführung der HPLC erfolgte wie im Abschnitt 3.2.2 beschrieben.

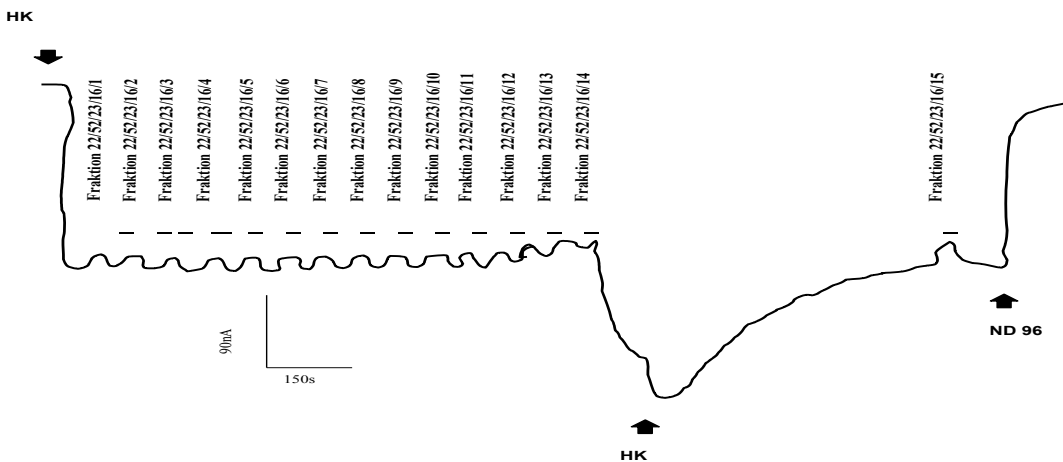
Abb. 3.18 Weitere Aufreinigung der aktiven Fraktionen über eine reverse phase HPLC (C8-Säule)

Gezeigt ist ein Chromatogramm (rechts) nach der Fraktionierung der aktiven Polypeptide 22/52/23/16 aus der reverse phase HPLC (C8-Säule). Die Elution der Peptide erfolgte durch kontinuierliche Erhöhung des organischen Lösungsmittels (Puffer B = 0.1 % TFA in Acetonitril). Der Gradient wurde als unterbrochene Linie dargestellt. Die Detektion der Peptide erfolgte durch Messung der UV-Absorption bei 215 nm. Die Fraktionen wurden per Hand gesammelt. Die Aktivitätsmessung der Fraktionen aus der reverse phase HPLC (C8-Säule) wurde wie in Abb.

3.15 beschrieben in *Xenopus*-Oozyten



durchgeführt.



So wie in Abb. 3.18 (unten) zu sehen ist, konnte in der Fraktion 22/52/23/16-14 eine Aktivität von 180 nA gemessen werden. Der gesuchte native Ligand des *Drosophila*-GPCRs befand sich also in dieser Fraktion. Der nächste Schritt war nun, das Peptid zu sequenzieren und zu charakterisieren. Da am Ende der Reinigung nur wenig Material zur Verfügung stand, konnte die Reinheitsanalyse und Sequenzierung nur mit der matrixunterstützten Laser-Desorptions/Ionisations-Technik (MALDI-MS) durchgeführt werden, da sie wesentlich empfindlicher als der Edman-Abbau ist.

3.2.4 Peptidanalyse mittels matrixunterstützter Laser-Desorptions/Ionisations-Technik (MALDI)

Die MALDI-Analyse wurde im Institut für Chemie-Biochemie in der Freien Universität Berlin von Dr. C. Weise durchgeführt. Hierzu möchte ich einige Grundprinzipien der Meßtechnik erläutern. Bei einem TOF- Massenspektrometer wird ein gepulster Ionenstrahl erzeugt und die Ionenflugzeit zwischen Quelle und Detektor gemessen. Der Puls eines UV- oder eines IR-Lasers desorbiert und ionisiert die Probe und startet die Zeitmessung. Da die Flugzeit proportional der Wurzel aus der Ionenmasse ist, läßt sich die gemessene Zeitdifferenz direkt in die Masse umrechnen. Für TOF-Analysatoren werden hauptsächlich sog. Reflektor-TOF (reTOF)-Instrumente verwendet. Mit einem Reflektor kann in gewissen Grenzen erreicht werden, daß Ionen mit gleicher Masse und unterschiedlicher Energie zur gleichen Zeit den Detektor erreichen. Diese Fokussierung erhöht die Auflösung der Massenspektren und verbessert die Präzision der Massenbestimmung im unteren Massenbereich bis etwa 5000 Da.

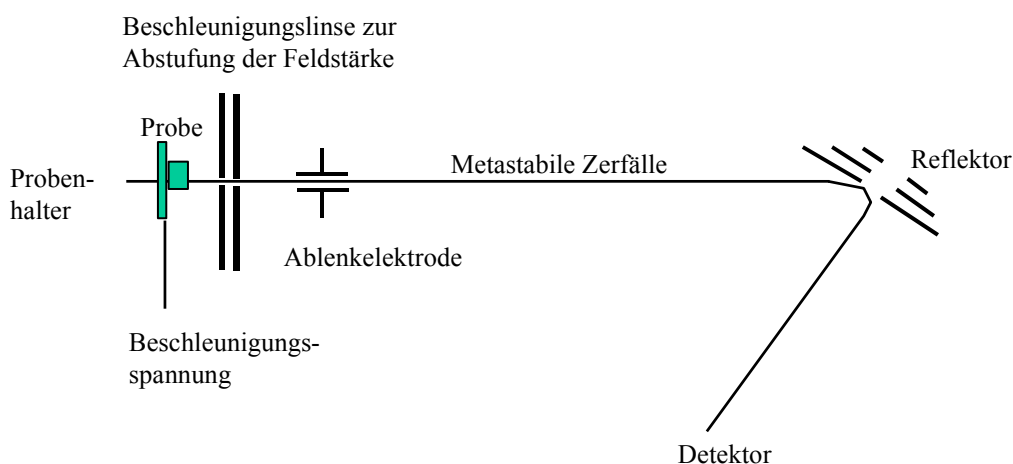


Abb. 3.19 Schematischer Aufbau eines Reflektor-TOF-Analysators

In der Ionenquelle gebildete Fragmente werden wie Moleküllionen nachgewiesen. Die metastabilen Fragmente, die sich auf der Flugstrecke zwischen der Beschleunigungslinse und dem Reflektor bilden, können durch stufenweises Absenken des Reflektorpotentials detektiert werden.

Bei der matrixunterstützten Laserdesorption/-ionisation wird die Probe mit einem 10^3 - 10^4 fachen Überschuß der Matrixsubstanz (hierzu wurde die α -Cyano-4-hydroxymizsäure verwendet) vermischt auf das Target aufgetragen und bestahlt. Bei dieser Variante hat die Matrix mehrere Funktionen: Über ihre hohe Absorption bei der eingestrahnten Wellenlänge absorbiert die Matrix Energie aus dem Laserpuls, durch ihre Absorptionscharakteristik und durch ihre Präsenz in hohem Überschuß gegenüber der Probe schützt sie diese vor photolytischer Zersetzung. Zudem überträgt sie die zur Desorption notwendige Energie auf die Probe, sie stellt die für die Ionisierung notwendigen Protonen zur Verfügung und sie reduziert die Wechselwirkung der Probenmoleküle untereinander sowie mit der Metalloberfläche des Targets.

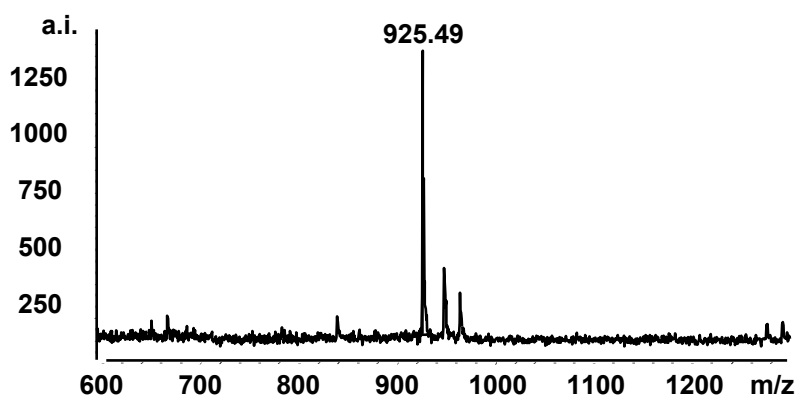


Abb. 3.20 Massenspektroskopie des aufgereinigten Peptids

Gezeigt ist das Massenspektrum des aufgereinigten Peptids aus der reverse phase HPLC (C_8 -Säule) der Fraktion 22/52/23/16-14. Das Molekulargewicht des aufgereinigten Peptids beträgt 925.49 Da. Die beiden Peaks rechts neben dem Hauptpeak sind Natrium- bzw. Kalium-Addukte.

Die Abb. 3.20 zeigt einen sauberen Hauptpeak mit zwei kleinen Nebenpeaks. Das Molekulargewicht des Peptids beträgt 925.48 Da. Das Peptid war also frei von Verunreinigungen. Die Sequenzierung erfolgte durch MALDI-PSD (post-source decay)-Spektren. Durch die begrenzten Fokussierungseigenschaften eines Ionenreflektors bedingt muß ein komplettes MALDI-PSD-Spektrum abschnittsweise aufgenommen werden. Für ein komplettes MALDI-PSD-Spektrum müssen etwa 10 Teilspektren aufgenommen und anschließend kombiniert werden. Für diesen Zweck stehen vollständige Software-Programme zur Verfügung.

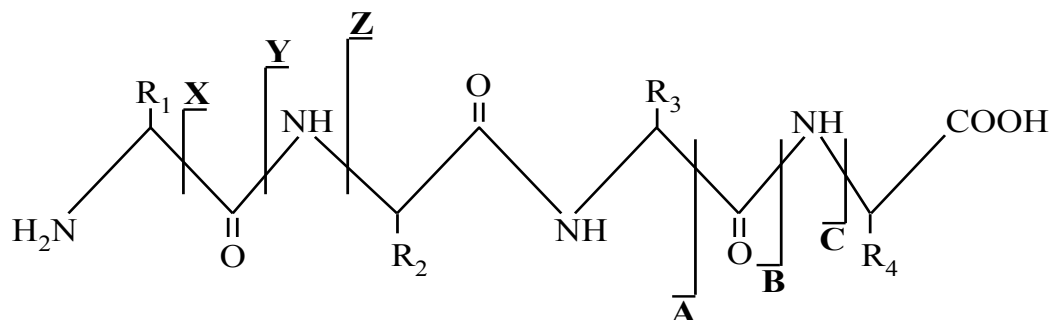


Abb. 3.21 Nomenklatur bei der Entstehung der Fragmentierungsreaktion

Die gezeigten C-terminalen Fragmente sind die X-, Y- und Z-Fragmente, die dargestellten N-terminalen Fragmente die A-, B- und C-Fragmente

Die Auswertung dieser Sequenzanalyse ist folgendermaßen:

Die in der Ionenquelle gebildeten Fragmente auf der Flugstrecke zwischen Beschleunigungslinse und dem Reflektor werden durch das stufenweise Absenken des Reflektorpotentials detektiert (Abb. 3.19). Die Fragmentierungsreaktion bei Peptiden treten vor allem an den Bindungen entlang der Peptidkette auf, die in drei verschiedenen Bindungsarten eingeteilt werden können (Abb. 3.21): Die vom Carbonyl-Kohlenstoff ausgehende C-C-Bindung, die vom Carbonyl-Kohlenstoff ausgehende C-N-Bindung (Peptidbindung) und die weitere vom Amid-Stickstoff ausgehende N-C-Bindung. Verbleibt bei der Spaltung die Ladung am N-terminalen Fragment, so werden die entsprechenden Fragmente als A-, B- bzw. C-Typ klassifiziert, verbleibt die Ladung am Carboxyterminus, so werden die Fragmente entsprechend als X-, Y- und Z-Fragmente bezeichnet. Ist der Bindungsbruch von einer Wasserstoffübertragung begleitet, so wird jedes übertragene H-Atom mit einem Strich symbolisiert und zwar auf der linken Seite für einen Verlust und auf der rechten Seite für ein zusätzliches H-Atom. Die Fragmentserien werden untereinander mit den Nachbarspektren verglichen und ausgewertet. Die Differenz der Masse zwischen den Nachbarspektren entspricht einem Aminosäurerest.

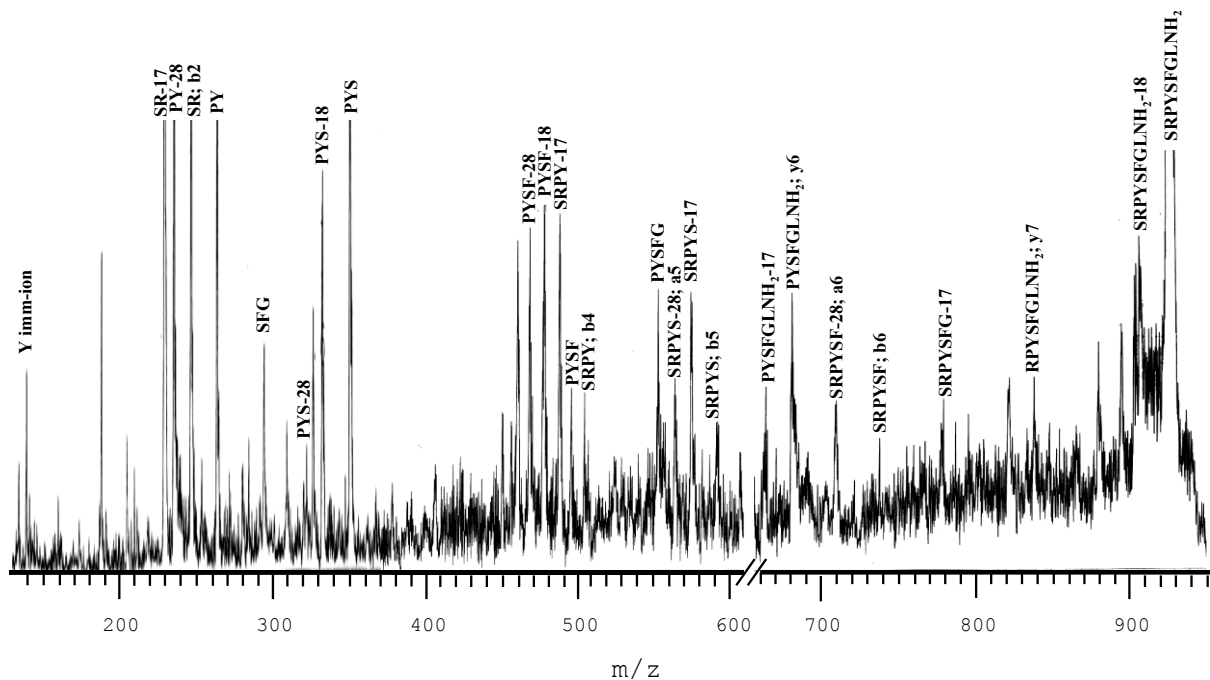


Abb. 3.22 Peptid-Sequenzanalyse durch Malldi

Gezeigt sind relevante Peaks zur Aufstellung der Aminosäuresequenz des aufgereinigten Peptids. Die Peaks geben die Aminosäurereste an. Die *b*- und die *y*-Fragmentserien entsprechen der Spaltung der Peptidbindung und der Ausbeute des N- und Carboxyterminus. Die Anwesenheit eines Tyrosinrestes wurde als charakteristisches Immoniumion (links), ein Bestandteil des Peptids, identifiziert. Die Sequenzanalyse wurde durch die Beobachtung eines Prolinrestes, welches generell als Spaltungspunkt dient, erleichtert. Dieses entspricht der neuen Serie des *b*-Fragments, welches als erste Aminosäure gilt. Der Verlust von 17 Masseneinheiten entspricht dem Verlust des Ammoniaks, welches für einen Lysin- oder Argininrest spricht. Der Verlust von 18 Masseneinheiten entspricht den Verlust des Wassers, was für einen Serin- oder einen Threoninrest spricht.

Die Analyse der PSD-Spektren führte zur Ermittlung der Peptidsequenz **Ser-Arg-Pro-Thy-Ser-Phe-Gly-Leu/Ileu-NH₂**. Da die Molekülmasse des Leucins und Isoleucins identisch ist, kann nicht angegeben werden, welche Aminosäure sich am Carboxyterminus befindet.

Um das Ergebnis der Sequenzanalyse zu überprüfen, wurde ein synthetisches Peptid nach der vorliegenden Sequenz in unseren Institut im Service Labor von Dr. Buck hergestellt. Da die ermittelte Sequenz mit dem Helicostatin identisch war (Tab. 3.1), wurde das synthetische Peptid nach dieser Sequenz hergestellt. Mit diesem synthetisch hergestelltem Peptid wurde die Aktivität in Oozyten gemessen.

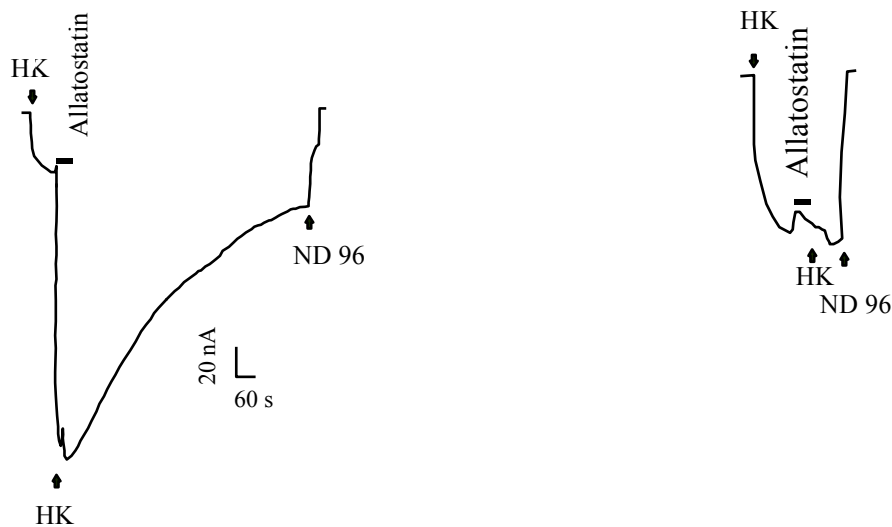


Abb. 3.23 Darstellung der Stromflußkurve einer Oozyte, welche mit *Drosophila*-GPCR und dem GIRK-Kanal (links) oder mit GIRK allein (rechts) injiziert wurde
Gezeigt ist die gemessene Aktivität mit dem synthetisch hergestelltem Peptid. Eine Aktivität von 570 nA bei einer Konzentration von 10^{-6} M wurde gemessen (links). Bei der mit GIRK allein injizierten Oozyte (rechts) wurde ebenfalls das synthetisch hergestellte Peptid appliziert. Wie zu sehen ist, konnte kein Strom gemessen werden.

Ein Meßsignal von 570 nA konnte damit bei einer Konzentration von 10^{-6} M erhalten werden. Dies war ein Beweis dafür, daß die Peptidsequenz richtig ermittelt wurde. Die Ergebnisse der Peptidanalyse zeigten, daß das aufgereinigte Peptid aus *Drosophila*-Köpfen mit dem Helicostatin aus *Lepidoptera* identisch ist. Weiterhin zeigte das *Drosophila*-Peptid hohe Ähnlichkeit am Carboxyterminus zu den Allatostatinen aus *Diploptera* (Tab. 3.1). Dieses Ergebnis belegte eindeutig, das es sich bei dem *Drosophila*-GPCR tatsächlich um ein Allatostatin-Rezeptor (*Drosophila*-AlstR) handelt. Bisher war kein Rezeptor für das Allatostatin-Peptid bekannt.

Aufgereinigtes Peptid (<i>Drosophila</i>)	SRPYSFGL-NH ₂
Helicostatin 3 (<i>Lepidopteran</i>)	SRPYSFGL-NH ₂
AllatostatinI (<i>Diploptera</i>)	APSGAQRLYGFGL-NH ₂
AllatostatinIII (<i>Diploptera</i>)	GGSLYSFGL-NH ₂
AllatostatinIV (<i>Diploptera</i>)	DRLYSFGL-NH ₂
AllatostatinTyp B (<i>Diploptera</i>)	AYSYVSEYKRLPVYSFGL-NH ₂
SST 14 (<i>Ovine</i>)	AGCKNFFWKTFTSC-OH
Leu-Enkaphalin (<i>bovine</i>)	YGGFL-OH
Galanin (<i>human</i>)	GWTLNSAGYLLGPHAVGNHRFSKNGLTLS-OH

Tab.3.1 Vergleich der Peptidsequenzen des aufgereinigten Peptids mit den Allatostatin-Peptiden

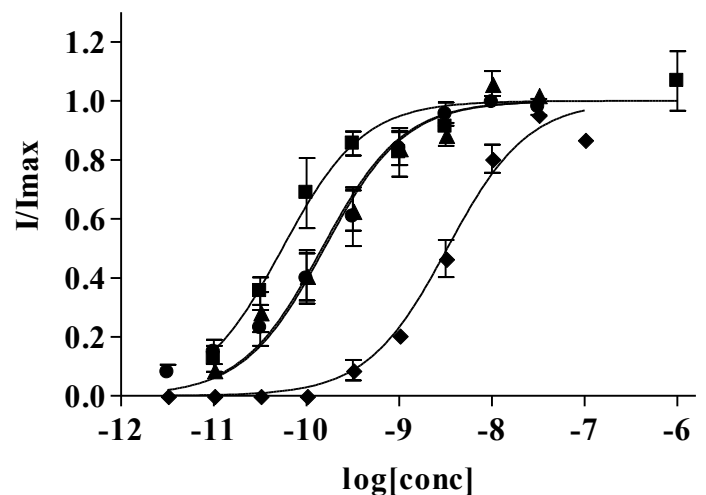
Gezeigt ist der Vergleich der Sequenz des aufgereinigten Peptids aus *Drosophila melanogaster* mit den Allatostatinen aus *Lepidoptera* und *Diploptera*. Eine Ähnlichkeit des aufgereinigten Peptids aus *Drosophila melanogaster* mit Somatostatin, Galanin oder Leu-Enkaphalin ist nicht zu sehen.

3.2.5 Dosiswirkungskurve des synthetisch hergestellten Peptids und der unterschiedlichen Allatostatine

Um die Affinität der Rezeptor/Liganden-Bindung feststellen zu können, wurde eine Dosiswirkungskurve erstellt. Hierzu wurde das Allatostatin III, Allatostatin IV und Typ B-Allatostatin bestellt, um damit ein Vergleich erstellen zu können. Die Messungen erfolgten jeweils an 4-6 *Xenopus*-Oozyten mit einer Konzentration von 10^{-6} M - 10^{-11} M des gewünschten Peptids. Die Werte wurden im Graph Pad Prism-Programm normalisiert und ausgewertet.

Abb. 3.24 Dosiswirkungskurve des synthetisch hergestellten *Drosophila*-Allatostatins und der verschiedenen *Diptera*-Allatostatine

Gemessen ist die funktionelle Expression in den *Xenopus*-Oozyten. Der Allatostatin-Rezeptor wurde wie bereits beschrieben (2.2.4) mit den GIRK-Kanal koexprimiert. Der EC_{50} -Wert für das synthetisch erstellte Allatostatin für *Drosophila* (quadrat) liegt bei 55 pM, 147 pM für das Allatostatin IV aus *Diptera* (Dreieck), 156 pM für das Allatostatin III aus *Diptera* (Kreis) und 3.3 nM für das Allatostatin Typ B aus *Diptera* (Raute). Die Auswertung erfolgte mit dem Graph Pad Prism-Programm (GraphPad Inc., San Diego, CA)



3.2.6 Struktur- und Funktionsanalyse des Allatostatin-Rezeptors

Da der chimäre Rezeptor konstruiert vorlag (Abb. 3.14), konnte damit eine Struktur-Funktions-Analyse durchgeführt werden. Dieser chimäre Allatostatin-Rezeptor beinhaltet den SSTR2-Aminoterminus bis zur ersten Transmembrandomäne. Mit dieser Chimäre kann ein Vergleich in bezug auf die Dosiswirkung zwischen zwei Rezeptoren, die sich nur am Aminoterminus bis zur ersten Transmembrandomäne unterscheiden, durchgeführt werden. Nach der *in vitro* Transkription des chimären Rezeptors und Koinjektion mit dem GIRK-Kanal in die *Xenopus*-Oozyten konnte die Dosiswirkungskurve, wie im Methodenteil (2.2.4.1) beschrieben, durchgeführt werden. Der EC_{50} -Wert lag bei 6.22 nM (Abb. 3.25). Die Affinität des chimären Allatostatin-Rezeptors ist bei weitem geringer als der ursprüngliche Allatostatin-Rezeptor.

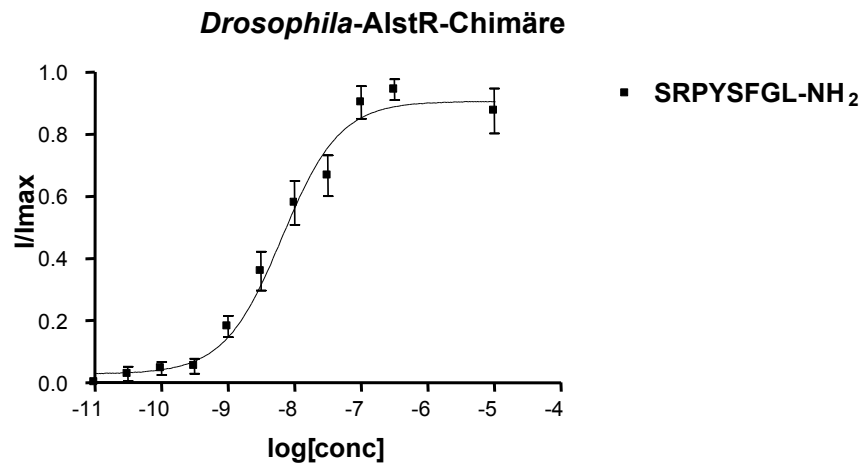


Abb. 3.25 Dosiswirkungskurve des Allatostatin-Peptids für den chimären Allatostatin-Rezeptor

Gezeigt ist die Dosiswirkungskurve des Allatostatin-Peptids aus *Drosophila melanogaster*. Der *Ec-50*-Wert beträgt 6,22 nM. Die Auswertung erfolgte mit dem Graph Pad Prism-Programm (GraphPad Inc., San Diego, CA).

Um weitere Struktur- und Funktionsanalysen durchführen zu können, wurden zwei Peptide synthetisch hergestellt. Weil alle Mitglieder der Allatostatin-Familie das Pentapeptid **YXFGL-NH₂** am Carboxyterminus enthalten, sollte hier das Pentapeptid carboxyliert und amidiert getestet werden. Die Sequenz für die Peptide lauteten **YSFGL-NH₂** und **YSFGL-COOH**. Die Analyse erfolgte über die funktionelle Expression in den *Xenopus*-Oozyten.

Durch diese Analyse könnte ermittelt werden, in wie weit der Carboxyterminus des Agonisten für den Allatostatin-Rezeptor eine Auswirkung in bezug auf die Affinität hat. Das Peptid mit der COOH-Endung zeigte keine Affinität zum Allatostatin-Rezeptor (Abb. 3.26, B). Das Peptid mit der NH₂-Endung zeigte eine Affinität von 2,1 nM (Abb. 3.26, A). Diese Ergebnisse belegen eindeutig, daß der Carboxyterminus des Peptids amidiert sein muß, um eine Affinität zeigen zu können. Desweiteren reichen für eine Bindung des Allatostatin-Rezeptors die letzten fünf Aminosäuren des Peptids aus.

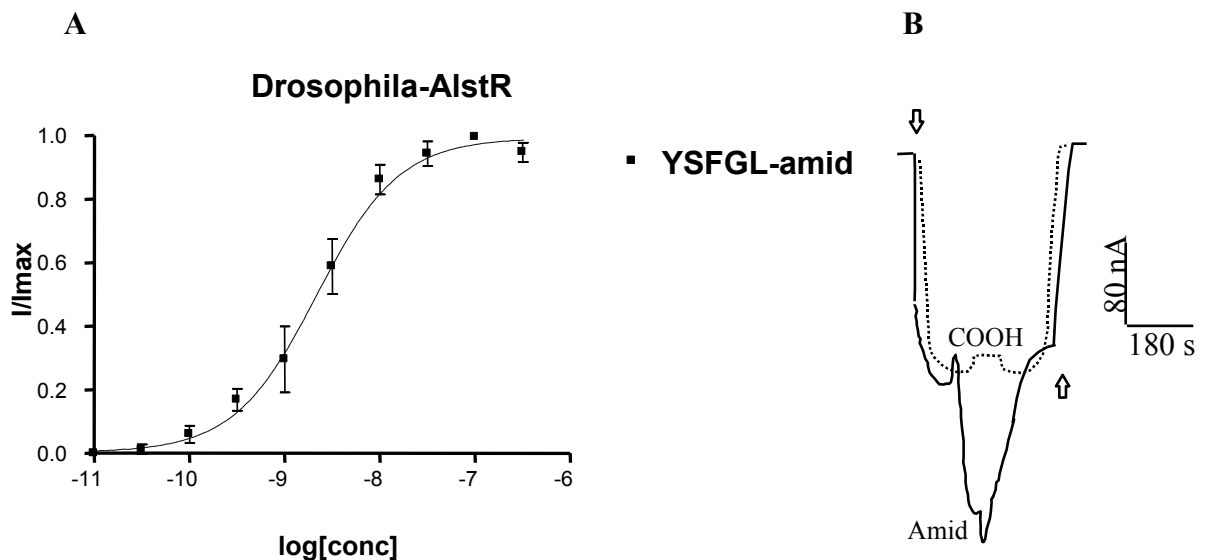


Abb. 3.26 Dosiswirkungskurve des amidierten YSFGL-Peptids und die Stromflußkurve einer Oozyte, welche mit dem Allatostatin-Rezeptor und den GIRK-Kanal koinjiziert wurde

Gezeigt ist die Dosiswirkungskurve des amidierten YSFGL-Peptids (A). Der EC_{50} -Wert beträgt 2.1 nM. Die Auswertung erfolgte mit dem Graph Pad Prism-Programm (GraphPad Inc., San Diego, CA). Gezeigt sind zwei Stromflußkurven (B). Bei Applikation des amidierten Peptids (10^{-8} M) konnte eine Aktivität von 160 nA gemessen werden (durchgehende Linie), im Gegensatz zu dem carboxylierten Peptid konnte keine Aktivität gemessen werden (unterbrochene Linie).

3.2.7 Signaltransduktionskaskade des Allatostatin-Rezeptors über den Inositoltriphosphatweg

Um einen Vergleich über den Signaltransduktionsweg (IP3) zwischen den Somatostatin-Rezeptoren und den Allatostatin-Rezeptor zu stellen, wurde wie bei 3.2 bereits beschrieben die funktionelle Expression über den elektrophysiologischen Test durchgeführt. Hiermit könnte überprüft werden, ob der Allatostatin-Rezeptor über Inositoltriphosphat (IP3) den Signaltransduktionsweg auslöst. Wenn es der Fall ist, würden bei der Agonistenstimulation die UE der oozyteneigenen G-Proteine die Freisetzung von Ca^{++} -Ionen aus intrazellulären Speichern mit Hilfe des Inositoltriphosphates bewirken. Dadurch würden die membranständigen Chloridkanäle aktiviert werden, so daß im letzten Schritt der Signaltransduktion dieses zu einem einwärts gerichteten Membranstrom führt, der elektrophysiologisch meßbar ist. Bei dieser Messung wurde der Ligand in ND 96 aufgenommen und so den Oozyten appliziert. Hierbei wurde kein Strom gemessen, d.h. die Signaltransduktionskaskade des Allatostatin-Rezeptors wird nicht über den Inositoltriphosphatweg vermittelt.

3.3. Klonierung weiterer Allatostatin-Rezeptoren aus *Periplaneta americana* (Schabe) und *Carausius morusus* (Stabheuschrecke)

Das Allatostatin wurde ursprünglich aus dem Schabenhirn der *Diptera punktata* als Neuropeptid identifiziert (Woodhead *et al.*, 1989; Pratt *et al.*, 1989). Der Name Allatostatin wurde aus dem Organ „*corpora allata*“ (Allato) abgeleitet, weil es dort identifiziert wurde (Tobe, 1980). Da das Peptid eine inhibierende Wirkung auf die Juvenile Hormon-Synthese in der *corpora allata* bei *Diptera* bewirkt, wurde das „*statin*“ noch hinten hinzugefügt, so kam der Name Allatostatin zustande. In *Drosophila* inhibiert das Allatostatin nicht die Juvenile Hormon-Synthese in der *corpora allata*, sondern inhibiert die Darmbewegung. Bei der Immunreaktivität findet man das Allatostatin im ZNS und in der Peripherie.

Da Allatostatin-Peptide aus *Periplaneta americana* und *Carausius morusus* seit längerem bekannt waren, aber der Rezeptor nicht kloniert vorlag, wurde auf die Bitte von Prof. Dr. Gäde (Universität Kapstadt) mit seiner Arbeitsgruppe kooperiert. Es sollten weitere Allatostatin-Rezeptoren aus der Schabe und aus der Stabheuschrecke kloniert werden. Zur Klonierung des Rezeptors wurde dieselbe Strategie wie bei *Drosophila melanogaster* angewendet. Für die erste Amplifizierung wurde ein zusätzlicher degenerierter reverser Primer (PeaR1) anhand der Aminosäuresequenz des *Drosophila*-Allatostatin-Rezeptors konstruiert. Die erste Teilsequenz der Schabe wurde mit den Primern SRF1/PeaR1 und SRF2/PeaR1 amplifiziert. Diese PCR-Amplifikate wurden in einem pBluescript SK+-Vektor inkloniert und sequenziert. Fünf Klone zeigten einen offenen Leserahmen und eine Ähnlichkeit von 70 % in der TM-Region auf Aminosäureebene zu dem *Drosophila*-AlstR. Es wurde eine Konsensus-Sequenz anhand der fünf Klone erstellt. Die Konsensus-Sequenz beinhaltete 537 bp.

Um nun das 5'-Ende und das 3'-Ende über die RACE-Technik zu amplifizieren, wurden spezifische Primer anhand dieser Konsensus-Sequenz konstruiert. Die Enden konnten mit Hilfe der RACE-RT-PCR-Technik amplifiziert werden. Das 5'-Ende beinhaltete 700 bp, mit 186 bp am 5'-UTR-Bereich, das 3'-Ende beinhaltete 504 bp, mit 316 bp am 3'UTR-Bereich. Die erhaltene 5'-RACE-Sequenz ging über das potentielle Startkodon hinaus und enthielt im 5'-untranslatierten Bereich ein *in frame* Stop-Triplett, so daß davon ausgegangen werden konnte, daß es sich bei dem Methionin wirklich um das Initiationskodon handelte. Die Analyse der Sequenz des 3'-RACE-Produktes zeigte ebenfalls einen offenen Leserahmen von 188 bp.

Diese Region ist umgeben von einem 316 bp langem Bereich, wobei sich hier nach dem 3'-Ende - nach dem Stopkodon - ein Polyadenylierungssignal befindet. In beiden RACE-Produkten konnte davon ausgegangen werden, daß die 5'- und 3'-Enden des kodierenden Bereiches vollständig waren. Um den Klon in voller Länge (gesamte cDNA) zu erhalten und somit die funktionelle Expression in *Xenopus*-Oozyten zu ermöglichen, wurden zwei spezifische Primer jeweils am Start- und am Stopkodon entworfen. Für diese RT-PCR wurde ebenfalls die Pfu-DNA-Polymerase verwendet, da diese über eine Exonuklease-Aktivität verfügt und somit die Mutationsrate deutlich verringert ist. Es wurde ein Klon ausgewählt, der keine Mutation gegenüber der Konsensussequenz aufwies.

Das Sequenzierungsergebnis zeigt einen offenen Leserahmen von 1269 bp, der für ein Protein von 423 Aminosäuren kodiert. Umgeben ist dieser Bereich von einem 186 bp umfassenden 5'UTR-Bereich und einem 316 bp langen 3'UTR-Bereich. Die Primärsequenz des Schaben-GPCR-Klons weist verschiedene Konsensussequenzen für mögliche Proteinmodifikationen auf. So befindet sich an den Asparagin-Resten 27, 31, 41 entsprechend der Konsensussequenz [N-X-S/T] die Möglichkeit einer Glykosylierung (Kornfeld und Kornfeld, 1985). Desweiteren gibt es an den Positionen 178, 181 und 282 den Konsensussequenzen [(S/T)-X-(K/R)] entsprechend die Möglichkeit einer Phosphorylierung durch Proteinkinase C (Woodgett *et al.*, 1986) und der Position 287 durch Proteinkinase A mit der Konsensussequenz [R-X-(S/T)]. Ein Vergleich der Primärsequenz des Schabenrezeptors mit der Datenbank ergab eine deutliche Ähnlichkeit von 70 % in den TM-Regionen auf Aminosäureebene zu dem *Drosophila*-AlstR (Abb.3.27).

		1					
60	SchabeAlstR	~~~~~MD	VSGTVTAPPP	LGVGIGGLRY	HACVNISVNT	SELSAFCSNS	SEQLNGYGLD
	DrosAlstR	MAGHQSLALL	LATLISSWPK	ASWGATG..N	GSIISSVSNSS	GNNYAFTSEH	TDHSDHNAND
		61					120
	SchabeAlstR	PPPEPQSLQL	IQKIVSIVVP	LLFGLIVLVG	LFGNALVVLV	VAANQQMRST	TNLLIINLAV
	DrosAlstR	SMEYDAESVA	LERIVSTIVP	VFFGIIGFAG	LLGNGLVILV	VVANQQMRST	TNLLIINLAV
		121					180
	SchabeAlstR	ADLLFIVFCV	PFTATDYVLP	FWPFGDIWCK	IVQYLIVVTA	YASVYTLVLM	SLDRFLAVVH
	DrosAlstR	SDILFVIFCV	PFTATDYVLP	EWPFNGVWCK	FVQYMIVVTC	HCSVYTLVLM	SFDRFLAVVH
		181					240
	SchabeAlstR	PITSMSIRTE	RNAIAAIAVT	WVVILLASVP	VYLSHGCVTY	TYSSAEHTAC	VFLEADPINR
	DrosAlstR	PVTSMSLRTE	RNATLAIMCA	WITIVTTAIP	VALSHSVRIY	QYHGNGAGTAC	VFSTEEEL..
		241					300
	SchabeAlstR	PDGYNKPVFQ	IIFFATSYVT	PLALICGLYL	WLLVRLWRGA	APGGHVSAAES	RRGKRRVTRM
	DrosAlstR	...WSLVGFQ	VSFFLSSYYA	PLTLICFLYM	GMLARLWK.S	APGCKPSAES	RKGKRRVTRM
		301					360
	SchabeAlstR	VVVVVAIFAV	CWFPIQLILV	LKSVDKYEIT	NTSVMIQIVS	HVLAYMNSCV	NPILYAF LSD
	DrosAlstR	VVVVVLAFAI	CWLPIHVILV	LKALNLYGGS	HLSVYIIQIIS	HVVAYTNSCI	NPILYAF LSD
		361					420
	SchabeAlstR	HFRKAFRKVI	NCGSAQRAQP	GPRYHRASTI	QQQPQANGRA	LNN.ECVEND	NKSGLLNVTK
	DrosAlstR	NFRKAFRKVV	WCGS.....P	PPLMTNQQVT	KTRTRATGNG	TSNIEML~~~	~~~~~
		421	433				
	SchabeAlstR	ATRANGSSND	IL*				
	DrosAlstR	~~~~~	~~~				

Abb. 3.27 Aminosäurevergleich der Allatostatin-Rezeptoren aus der Schabe und *Drosophila*

Der Vergleich wurde mit dem GCG-Programm erstellt. Die sieben TM-Domänen sind durch die rote Schrift gekennzeichnet.

Nachdem der Rezeptor aus der Schabe in voller Länge kloniert worden war, konnte überprüft werden, ob dieser Rezeptor auch der Allatostatin-Rezeptor ist. Da eine Sequenzähnlichkeit von 70% auf Aminosäureebene zu dem *Drosophila*-AlstR bestand, wurde davon ausgegangen, daß der Signaltransduktionsweg der selbe wie der des *Drosophila*-AlstR ist. Somit konnte der Nachweis wie unter 3.2. beschrieben über das *Xenopus*-Oozyten-System elektrophysiologisch erfolgen. Auch der Schaben-GPCR wurde mit dem GIRK-Kanal koexprimiert. Die Ergebnisse belegten deutlich, daß der Schaben-GPCR ein Allatostatin-Rezeptor ist. Es konnte eine Aktivität von 460 nA bei einer Konzentrationszugabe von 10^{-6} M gemessen werden.

Um auch hier die Affinität der Rezeptor/Liganden-Bindung feststellen zu können, wurde eine Dosiswirkungskurve erstellt. Die Messungen erfolgten wie unter 3.3.1 beschrieben. Die Werte wurden im Graph Pad Prism-Programm normalisiert und ausgewertet.

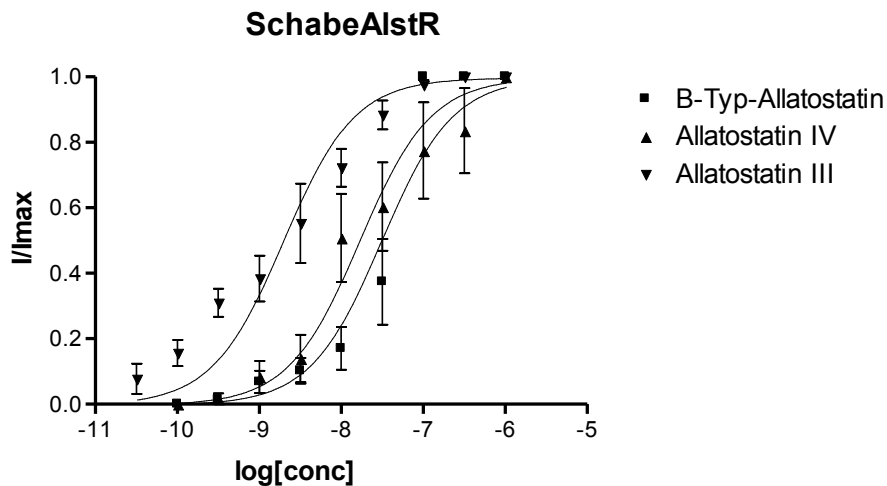


Abb. 3.28 Dosiswirkungskurve der verschiedenen *Diptera*-Allatostatine

Gezeigt ist die Dosiswirkungskurve der unterschiedlichen Allatostatine aus *Diptera*. Der EC_{50} Wert für das Allatostatin IV beträgt 8.8 nM, 12 nM für das Allatostatin III und 114 nM für das Allatostatin Typ B. Die Auswertung erfolgte mit dem Graph Pad Prism-Programm (GraphPad Inc., San Diego, CA)

Die Strategie für die Klonierung des putativen Allatostatin-Rezeptors aus der Stabheuschrecke war die selbe wie für den *Drosophila*- und den Schaben-AlstR. Somit wurde die erste Amplifizierung über die RT-PCR mit den degenerierten Primern durchgeführt. Die erste Teilsequenz der Stabheuschrecke wurde mit den Primern SRF1/SRR2 und SRF1/PeaR1 amplifiziert. Diese PCR-Amplifikate wurden aus dem Agarosegel ausgeschnitten und über die Restriktionsstellen BamHI/EcoRI in den pBluescript SK+-Vektor kloniert und sequenziert. Vier Klone zeigten einen offenen Leserahmen mit einer Ähnlichkeit von 56 % zu dem Allatostatin-Rezeptor aus *Drosophila melanogaster* auf Aminosäureebene. Vier weitere Klone zeigten ebenfalls einen offenen Leserahmen mit einer Ähnlichkeit von 36 % zu dem humanen Somatostatin-Rezeptor1 auf Aminosäureebene. Es wurde für beide Klone eine Konsensus-Sequenz anhand der Sequenzdaten erstellt. Die Konsensus-Sequenz für den putativen Allatostatin-Rezeptor beinhaltete 628 bp und für den putativen Somatostatin-Rezeptor1 629 bp. Um das 5'-Ende und das 3'-Ende über die RACE-Technik zu amplifizieren, wurden spezifische Primer anhand der Konsensus-Sequenz konstruiert.

CamAlstR	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~	60
SchabeAlstR	~~~~~MD	VSGTVTAPP	LGVGIGGLRY	HACVNIISVNT	SELSAFCSNS	SEQLNGYGLD	
DrosAlstR	MAGHQSLALL	LATLISSWPK	ASWGATG.N	GSIIISVSNSS	GNNYAFTSEH	TDHSDHNAND	
CamSSTR	~~~~~	~~~~~	~~~~~MSVEQ	VTVMVTSLED	LNTSSTTDPL	VLRFSKMQTV	
CamAlstR	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~	120
SchabeAlstR	PPPEPQSLQL	IQKIVSIVVP	LLFGLIVLVG	LFGNALVVLV	VAANQQMRST	TNLLIINLAV	
DrosAlstR	SMEYDAESVA	LERIVSTIVP	VFFGIIGFAG	LLGNGLVILV	VVANQQMRST	TNLLIINLAV	
CamSSTR	MSLDHHECDT	DQP TLL LITQ	VLYAAVCIVG	LLGNGLVIYV	VLRFSKMQTV	TNMYIVNLAV	
CamAlstR	~~~~~	~~~~~	FWPFGDVWCK	IVQYLIVVTA	YASVYTLVLM	SIDRFLAVVH	180
SchabeAlstR	ADLLFIVFCV	PFT ATDYVLP	FWPFGDVWCK	IVQYLIVVTA	YASVYTLVLM	SIDRFLAVVH	
DrosAlstR	SDILFVIFCV	PFT ATDYVLP	E W FPFGNVWCK	FVQYMI V VTVC	HCSVYTLVLM	S E DRFLAVVH	
CamSSTR	ADECF LI.GV	P FLLATMNL	FWPFGSIMCK	AYMTTTSINQ	FTSSIFLTIM	SADRYIAVCH	
CamAlstR	PIASISVRTE	RNAVTAIGVT	WVWILLSSVP	VYLSHGVTNY	IYLSSEHTAC	VFL.....	240
SchabeAlstR	PITSM SIRTE	RNAIAAIAVT	WVWILLASVP	VYLSHGVTNY	TYSSAEHTAC	VFLEADPINR	
DrosAlstR	PVTSM SLRTE	RNATLAIMCA	WITIVTTAIP	VALSHSVRIY	QYHGNAGTAC	VFSTEEEL..	
CamSSTR	PISAPKVRTP	LISKVVSASA	WTASALLMIP	IFIYANIMT.	...NENVVSC	NILWPESENV	
CamAlstR	.DDYNKPVFQ	ILFFATS Y VI	PLALICGLYL	CMLMRLWRGV	APGGHVSAES	RRGKRK V TRM	300
SchabeAlstR	PDGYNKPVFQ	IIFFATS Y VT	PLALICGLYL	WLLVRLWRGA	APGGHVSAES	RRGKRK V TRM	
DrosAlstR	...WSLVGFQ	VSEFFLSS Y VA	PLTLICFLYM	GMLARLWKS.	APGCKPSAES	RKGKRK V TRM	
CamSSTR	S...SQGAFT	LYTFILGFSI	PLMLISVFIYI	.LVIRK L KTV	GPKNK.SKEK	KKSHR K VTKL	
CamAlstR	VVVVVAIFAV	CWFP...IQM	ILVLKSVDRY	EITNTSVM.Q	IVSHVLAYMN	SCVEPRL~~~	360
SchabeAlstR	VVVVVAIFAV	CWFP...IQL	ILVLKSVDKY	EITNTSVMIQ	IVSHVLAYMN	SCVNPILYAF	
DrosAlstR	VVVVVLAFAI	CWLP...I H V	ILVLKALNLY	GGSHLSV I IQ	IISHVVAYTN	SCINPILYAF	
CamSSTR	VLTVITVYVL	CWLPYWLTQM	ALIFT P PKQC	Q.SRV S ITVF	LLAGCLSYSN	SAMNPILYA~	
CamAlstR	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~	420
SchabeAlstR	LS DHFRKA F R	KVINCGSAQR	AQPGPRYHRA	STIQQQPQAN	GRALNNECVE	NDNKSGLLN	
DrosAlstR	LS DNFRKA F R	KVWCGSPPP	LMTNQVTKT	TRTATGNGTS	NIEML~~~~~	~~~~~	
CamSSTR	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~	
CamAlstR	~~~~~	~~~~~	434				
SchabeAlstR	TKATRANGSS	NDIL					
DrosAlstR	~~~~~	~~~~~					
CamSSTR	~~~~~	~~~~~					

Abb. 3.29 Aminosäurevergleich der Allatostatin-Rezeptoren aus *Drosophila* (DrosAlstR), der Schabe (SchabeAlstR), der Stabheuschrecke (CamAlstR) und der Somatostatin-ähnliche Rezeptor aus der Stabheuschrecke (CamSSTR)

Der Vergleich wurde mit dem GCG-Programm erstellt. Die TM-Domänen sind durch die rote Schrift gekennzeichnet. Die identischen Aminosäurereste der aufgeführten Rezeptoren sind fett markiert. Erklärung bitte siehe im Text.

Der Vergleich der Aminosäuresequenz (Abb. 3.29) zeigte die höchste Aminosäure-Identität in der ersten extrazellulären, sowie der zweiten intrazellulären Schleife zwischen den aufgeführten Rezeptoren. Diese konservierte Region mag wichtig für die Konformationsänderung der TM-Region nach der Agonistenstimulation sein (Bockaert und Pin, 1999).

Weiterhin ist bei dem Somatostatin-ähnlichen Rezeptor aus der Stabheuschrecke an der Schnittstelle der dritten TM und der zweiten intrazellulären Schleife das Tripeptid (DRY) konserviert, sowie auch bei den Säugerhomologen. Allerdings ist bei den Allatostatin-Rezeptoren an der dritten Position des Tripeptids (DRF) ein Phenylalanin- statt ein Tyrosinrest. Das Phenylalaninrest mag für die Allatostatin-Rezeptoren typisch sein, da alle bekannten Allatostatin-Rezeptoren dieses Tripeptid aufweisen. Der Cysteinrest in der ersten und zweiten Schleife, welcher bei den GPCRs konserviert ist und die Stabilisierung während der Konformationsänderung ermöglicht, befindet sich ebenfalls in allen neu klonierten Rezeptoren.

Mit Hilfe der RACE-PCR-Technik konnte für den putativen Somatostatin-Rezeptor1 das 5'-Ende amplifiziert werden. Zur vollständigen Analyse müßte zusätzlich noch das 3'-Ende amplifiziert werden.

4. DISKUSSION

Die G-Protein-gekoppelten Neuropeptid-Rezeptoren in Vertebraten wie z.B. die Somatostatin- oder auch die Opioid-Rezeptoren kommen in verschiedenen Subtypen vor, die ihre eigene Subfamilie innerhalb der Familie 1 der GPCRs bilden (Darlison und Richter, 1999). Es gibt neun unterschiedliche Rezeptoren (SSTR1-SSTR5, μ -, κ -, δ -, Orphanin FQ-Opioid-Rezeptor), deren physiologische Liganden bekannt sind. Es gibt auch einige Rezeptoren, deren Liganden nicht identifiziert werden konnten (O'Dowd *et al.*, 1995). Bisher ist nicht bekannt wie diese Subtypen im Verlauf der Evolution entstanden sind. Um dieser Fragestellung nachzugehen, wurde versucht, in der Fruchtfliege *Drosophila melanogaster* einen Somatostatin-ähnlichen Rezeptor zu identifizieren. Die Aminosäuresequenz des Rezeptors sollte mit denen der Vertebraten-Rezeptoren verglichen werden. Dadurch könnten Erkenntnisse über konservierte Bereiche, sowie einen Einblick über mögliche Ligandenbindungsdomänen gewonnen werden.

In der vorliegenden Arbeit konnte mit Hilfe degenerierter Oligonukleotide, welche auf der Basis der fünf Somatostatin-Rezeptoren aus der Ratte konstruiert wurden, ein cDNA-Fragment aus *Drosophila melanogaster* amplifiziert werden. Mit Hilfe der RACE-PCR-Technik konnte der gesamte offene Leserahmen amplifiziert werden. Die klonierte cDNA kodiert ein 394 Aminosäuren langes Protein. Ein Vergleich der Aminosäuresequenz des *Drosophila*-Klons mit der Genbank ergab eine deutliche Zuordnung in die Familie der G-Protein-gekoppelten Rezeptoren (*Drosophila*-GPCR). Um für den neu beschriebenen *Drosophila*-GPCR einen Liganden zu identifizieren, wurde die *reverse physiology*-Strategie angewendet (Meunier *et al.*, 1995; Reinscheid *et al.*, 1995; Tensen *et al.*, 1998; Birgül *et al.*, 1999). Bei der *reverse physiology*-Strategie dient die Rezeptor-DNA als biologischer Sensor während dem Aufreinigungsprozeß (Reinscheid *et al.*, 1999). Der ligandhaltige Extrakt kann auf diese Weise bestimmt werden. Diese aktive Fraktion wird über mehrere Schritte zur Homogenität aufgereinigt. Der *Drosophila*-GPCR konnte mit Hilfe dieser Methode als Allatostatin-Rezeptor (***Drosophila*-AlstR**) charakterisiert werden.

Die Aminosäuresequenz des *Drosophila*-AlstRs zeigt eine Ähnlichkeit von 30-35 % zu der Somatostatin-, Opioid- und der Galanin-Rezeptor-Familie in den TM-Regionen (Darlison *et al.*, 1997; Kavour *et al.*, 1997; Kreienkamp, 1999). Insbesondere zeigte eine Hydrophathieanalyse aus der abgeleiteten Aminosäurersequenz des *Drosophila*-AlstRs sieben Transmembran-Bereiche, die jeweils aus mindestens 21 vorwiegend hydrophoben Aminosäuren bestehen. Diese Anzahl von hydrophoben Aminosäuren ist erforderlich damit die Zellmembran einmal durchquert werden kann (Ross, 1989). Diese Transmembranregionen werden auch als „zentrale Kerndomäne“ bezeichnet, da sie für G-Protein-gekoppelte Rezeptoren charakteristisch sind (Bockaert und Pin, 1999). Die sieben Transmembran-Regionen (TM I- TM VI) sind mit drei intrazellulären- und drei extrazellulären-Schleifen verbunden (Baldwin, 1993). Die kurze dritte extrazelluläre-Schleife ist ebenfalls eine weitere Gemeinsamkeit, die für viele Neuropeptidrezeptoren charakteristisch ist (Probst *et al.*, 1992).

Die Bereiche am Übergang von der Schnittstelle zwischen der dritten TM und der zweiten intrazellulären Schleife sowie am Übergang von der Schnittstelle zwischen der fünften TM und der dritten intrazellulären Schleife sind bei den GPCRs stark konserviert. Es wird vermutet, daß diese Bereiche für die Protein-Interaktion zuständig sind (Bockaert und Pin, 1999). Am Übergang von der Schnittstelle zwischen der dritten TM und der zweiten intrazellulären Schleife befindet sich für die Familie 1 der GPCRs das konservierte DRY-Motiv (Probst *et al.*, 1992; Savarese und Fraser, 1992). Untersuchungen an mutierten GPCRs im DRY-Motiv lassen vermuten, daß die partielle zweite sowie dritte intrazelluläre Schleife und in einigen Fällen auch die TMs mit dem G-Protein interagieren und die Signaltransduktion vermitteln (Moro *et al.*, 1993; Zhu *et al.*, 1994; Smith *et al.* 1996). Die Schlüsselrolle in der Signaltransduktion dieser GPCRs übernimmt das konservierte DRY-Motiv (Scheer *et al.*, 1996; Scheer *et al.*, 1997; Ballesteros *et al.*, 1998; Rasmussen *et al.*, 1999; Alewijnse *et al.*, 2000). Aus welchem Grund das Tripeptid nur für die GPCRs der Familie 1 konserviert ist, könnte an der unterschiedlichen Konformationsänderung der Kerndomäne innerhalb der Mitglieder der GPCR-Familie liegen (Bockert und Pin, 1999). Bei dem *Drosophila*-AlstR ist an dieser Position, am Übergang von der Schnittstelle zwischen der dritten TM und der zweiten intrazellulären Schleife, das Tripeptid (DRF) bei allen bisher klonierten Allatostatin-Rezeptoren konserviert. Diese starke Konservierung kann unter anderem der Grund dafür sein, daß die Somatostatin- sowie die Opioid-Rezeptoren und der *Drosophila* AlstR denselben Säuger-GIRK-Kanal im *Xenopus*-Oozyten-System aktivieren.

Da der *Drosophila*-AlstR ebenfalls den GIRK-Kanal im *Xenopus*-Oozyten-System aktiviert, ist er möglicherweise ähnlich wie die Somatostatin-Rezeptor-Familie an die $G_{\alpha o}/G_{\alpha i}$ -Familie der G-Proteine gekoppelt (Birgöl *et al.*, 1999). Es ist bekannt, daß die metabotropischen Glutamat-Rezeptoren, die über die Phospholipase C den Signaltransduktionsweg auslösen, an die $G_{\alpha q}$ -Untereinheit der G-Proteine koppeln (Sharon *et al.*, 1997). Bei der Expression des *Drosophila*-AlstRs im *Xenopus*-Oozyten-System wurde keine Aktivierung der membranständigen Chloridkanäle über den Inositoltriphosphat-Signaltransduktionsweg beobachtet. Der *Drosophila*-AlstR zeigt somit weiterhin eine funktionelle Ähnlichkeit zu der Somatostatin-Rezeptor-Familie, bei der bekannt ist, daß sie ebenfalls nicht über die Phospholipase C den Signaltransduktionsweg auslöst.

Am Übergang der sechsten TM-Domäne zur dritten extrazelluläre Schleife sowie in der dritten extrazelluläre Schleife weisen die GPCRs untereinander nur eine begrenzte Ähnlichkeit auf (Metzger und Ferguson, 1995). Durch Mutationsanalysen wie z.B. Punktmutation und Konstruktion Chimärer Rezeptoren, konnte gezeigt werden, daß die dritte extrazelluläre Schleife für die Ligandenspezifität zuständig ist (Metzger und Ferguson, 1995). Ebenso konnte beim Galanin-Rezeptor-Subtyp1 keine Aktivität mehr beobachtet werden, wenn eine Punktmutation des Histidins (His 264, His 267) eingeführt wurde (Kask *et al.*, 1996). Beim *Drosophila*-AlstR ist ebenfalls ein Histidinrest (His 306) an dieser Position konserviert, ob durch eine Punktmutation des Histidins ähnlich wie bei dem Galanin-Rezeptor-Subtyp 1 eine Reduktion der Agonisten Affinität bewirkt werden kann, müßte untersucht werden. Dies würde eine weitere Ähnlichkeit zwischen dem *Drosophila*-AlstR und den GPCRs hinweisen. Der SSTR2-Subtyp zeigt eine hohe Affinität zum Somatostatin14-Analog SMS 201-995, im Unterschied dazu zeigt der SSTR1-Subtyp eine geringere Affinität (Kaupmann *et al.*, 1995). Der SSTR1-Subtyp wurde in drei aufeinander folgenden Schritten so mutiert, daß der SSTR1-Subtyp eine hohe Affinität zum SMS 201-995 zeigte, somit konnten diese beiden Rezeptor-Subtypen miteinander verglichen werden. Der mutierte SSTR1-Subtyp erhielt eine zusätzliche Punktmutation im Serin305 zum Phenylalanin in der siebten TM-Domäne, dieses bewirkte eine geringere Affinität zum SMS 201-995. Zu eine zweiten zusätzlichen Mutation vom Glutamin (Gln 291) zu Arginin führte zur ursprünglichen Affinität zum SMS 201-995 (Kaupmann *et al.*, 1995).

Aufgrund dieser Experimente vermuten die Autoren, daß dieser Bereich beim SSTR2-Subtyp mit den Aminosäureresten Asparagin (Asn 276, Phe 295) und Phenylalanin (Asn 276, Phe 295) am Ende der TM VI und Anfang der TM VII für die Bindung an das SMS 201-995 d.h. für die Selektivität der Liganden zuständig sind. Beim *Drosophila*-AlstR ist am Übergang der sechsten TM-Domäne zur dritten extrazellulären Schleife sowie die dritte extrazelluläre Schleife und der Übergang von der dritten extrazellulären Schleife zur siebten TM-Domäne die Aminosäuresequenzen nur begrenzt ähnlich. Möglicherweise sind diese Regionen für die Spezifität der Ligandenbindung verantwortlich. Diese Veränderung hinsichtlich der Struktur im Laufe der Evolution mag für die Anpassung an neue Peptid-Liganden wichtig sein (Birgül *et al.* 1999).

Weitere funktionelle Bereiche, die bei fast allen Mitgliedern der G-Protein-gekoppelte Rezeptoren häufig beschrieben werden, sind auch beim *Drosophila*-AlstR identifiziert worden: Die möglichen asparagingebundenen Glykosylierungsstellen sind im aminoterminalen Bereich (Asn 28, Asn 36, Asn 57) lokalisiert. Es wird vermutet, daß die Glykosylierungen am Aminoterminus d.h. im extrazellulären Bereich des Rezeptors, für eine Bindung des Liganden bereit gehalten wird (Rens-Domiano und Reisine, 1991), wie durch Untersuchungen an einer doppelt Mutation an den möglichen Glykosylierungsstellen im Asparagin (Asn 18, Asn 31) des Somatostatin-Rezeptors subtyp 3 gezeigt werden konnte, bei der dies zur einer signifikanten Reduktion der Agonisten Affinität führte (Nehring *et al.*, 2000). Desweiteren ist eine mögliche Palmitoylierungsstelle kurz nach der siebten TM-Domäne (Cys 364) lokalisiert. Vermutlich ist das Cystein an dieser Stelle für die Verankerung des Carboxyterminus an den *lipid bilayer* mit verantwortlich. Es gibt auch Evidenzen dafür, daß eine Palmytoylierung einiger GPCRs die Desensitivierung beeinflusst (Böhm *et al.*, 1997). Bei der Desensitivierung wird der aktivierte Rezeptor vom G-Protein, innerhalb von Sekunden zu Minuten, entkoppelt. Beim β -Adrenergen Rezeptor wurde das Cystein an der Aminosäure-Position 341 mutiert (C341G), so daß keine mögliche Palmitoylierungsstelle zur Verfügung stand. Bei der Mutante C341G konnte eine Verlängerung der Desensitivierung beobachtet werden (Moffett *et al.*, 1993; Moffett *et al.*, 1996). In wie weit die Desensitivierung durch Palmitoylierung den *Drosophila*-AlstR beeinflusst kann, müßte untersucht werden.

Weiterhin gibt es an den Aminosäure-Positionen 184, 187, 214, 282 und 379 entsprechend der Konsensussequenzen die Möglichkeit einer Phosphorylierung durch Proteinkinase C und an der Aminosäure-Position 290 die Möglichkeit einer Phosphorylierung durch Proteinkinase A. Die Phosphorylierung durch Proteinkinase A oder C wird in die Klasse der *second messenger* abhängigen Kinasen eingeordnet, diese Proteinkinasen vermitteln die Agonisten-unabhängige Phosphorylierung des Rezeptors (z.B. β -Adrenergen Rezeptors) und initiieren die heterologe Desensitivierung (Stradel *et al.*, 1983). Die andere Klasse sind die Serin/Threonin Proteinkinasen, die auch als G-Protein Rezeptor Kinasen (GRKs) genannt werden, sie vermitteln die Agonisten-abhängige Phosphorylierung und leiten die homologe Desensitivierung ein (Böhm *et al.*, 1997). Möglicherweise könnte die Phosphorylierung durch Proteinkinasen die Desensibilisierung beim *Drosophila*-AlstR auch beeinflussen. Um diese Aussage zu verifizieren sind noch weitere Untersuchungen nötig. Zudem befindet sich jeweils ein Cystein-Rest in der ersten und der zweiten extrazellulären Schleife, die in der Familie der GPCRs meistens konserviert sind. Möglicherweise sind die Cysteinreste für die Stabilisierung der sieben TMs durch Disulfidbindung während der Konformationsänderung nötig (Bockaert und Pin, 1999).

Dank des *Drosophila*-Genomprojektes konnte die genomische Struktur des *Drosophila*-AlstRs aufgeklärt werden. Die kodierende Region der mRNA des *Drosophila*-AlstRs verteilt sich auf 8 Exons. Die in *Drosophila* identifizierten 100 GPCR-Gene enthalten in den meisten Fällen mehrere Exons (Brody und Cravchik, 2000). Die Vertebraten-Gene für GPCRs enthalten meistens weniger Exons (Brody und Cravchik, 2000). Das Somatostatin-Rezeptor-Subtyp1 Gen enthält nur ein Exon (Hauser *et al.*, 1994). Somit konnte der Unterschied bei Vertebraten und Invertebraten im Bezug auf die Organisation der genomischen Struktur durch die Aufklärung des *Drosophila*-AlstR-Gens bestätigt werden.

Im Rahmen dieser Arbeit konnten weitere Allatostatin-Rezeptor-cDNAs kloniert werden. Aus der Küchenschabe *Periplaneta americana* ist der vollständige cDNA-Klon durch Verwendung der selben Klonierungsstrategie der **Schaben-AlstR** kloniert worden. Die abgeleitete Aminosäuresequenz des Schaben-AlstRs zeigt eine Ähnlichkeit von 70 % zu dem *Drosophila*-AlstR in den TM-Regionen. Die möglichen funktionellen Bereiche, die beim *Drosophila*-AlstR beschrieben wurde, sind auch hier beim Schaben-AlstR identifiziert worden.

Die möglichen asparagingebundenen Glykosylierungsstellen (Asn 27, Asn 31, Asn 41), mögliche Palmitoylierungsstelle (Cys 364), mögliche Phosphorylierung durch Proteinkinase C (Ser 184, Thr 187, Ser 282, Thr 379) oder Proteinkinase A (Thr 290) entsprechen die bei anderen GPCRs vorhandenen Konsensussequenzen. Beim Schaben-AlstR sind ebenfalls zwei Cysteinreste und das Tripeptid (DRF) an der gleichen Position konserviert. Aus der Stabheuschrecke *Carausius morusus* sind - ebenfalls über dieselbe Klonierungsstrategie - zwei weitere partielle cDNAs kloniert worden. Nach einem Vergleich der Primärsequenz der partiellen cDNA mit der Datenbank zeigte die Sequenz einen offenen Leserahmen mit einer Ähnlichkeit von 56 % in den TM-Regionen zu dem *Drosophila*-AlstR auf Aminosäureebene. Die andere partielle cDNA aus der Stabheuschrecke zeigte ebenfalls einen offenen Leserahmen und eine Ähnlichkeit von 36 % in den TM-Regionen zu dem humanen Somatostatin-Rezeptor 1 auf Aminosäureebene. Nachdem die partielle Sequenz, die dem Somatostatin-Rezeptor 1 aus der Stabheuschrecke ähnelt, kloniert vorlag und das *Drosophila* Genom vollständig sequenziert war, konnten mit Hilfe dieser Daten zwei Rezeptor-Subtypen, die eine Ähnlichkeit zum Somatostatin zeigten, aus *Drosophila* in unserer Arbeitsgruppe kloniert werden (Daten noch nicht publiziert). Diese Ergebnisse deuten darauf hin, daß die verwendete Strategie zur Klonierung eines GPCRs sehr effektiv ist.

Ein Vergleich der aufgeführten (Abb. 4.3) Neuropeptid-Rezeptoren (Somatostatin-, Opioid-, Galanin-, Tachykinin-Rezeptor und Neuropeptid Y-Rezeptor) zeigt, daß die Neuropeptid-Rezeptoren sich in vier Hauptgruppen - die Somatostatin-, die Opioid-, die Allatostatin-, und die Galanin-Rezeptor-Familie - unterteilen. Der *Drosophila*-AlstR zeigt die höchste Ähnlichkeit zu den Allatostatin-Rezeptoren der Schabe und der Stabheuschrecke. Alle diese Allatostatin-Rezeptoren wiederum sind den Galanin-Rezeptoren am ähnlichsten. Die Somatostatin- sowie die Opioid-Rezeptor-Familie stellen eine eigenständige Rezeptorfamilie dar, vermutlich besitzen sie einen gemeinsamen Ursprung. Die Rezeptoren für Tachykinin und Neuropeptid Y aus *Drosophila* sind aus phylogenetischer Sicht viel weiter entfernt als die Somatostatin- sowie Opioid-Rezeptoren. Da sehr wenige GPCR in Insekten bekannt sind, kann nur eine annähernde phylogenetische Beziehung gestellt werden.

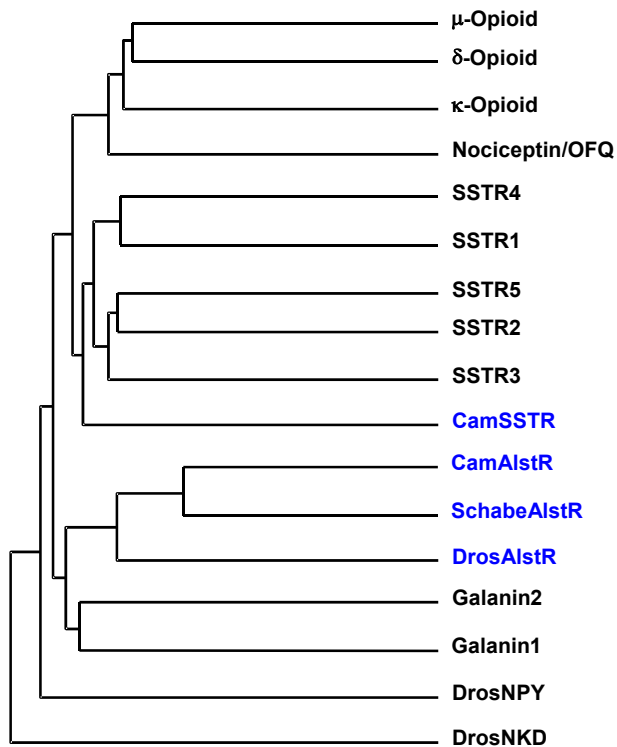


Abb. 4.3 Verwandtschaft abgeleiteter Aminosäuresequenzen G-Protein-gekoppelter Rezeptoren

Ein Vergleich der Aminosäuresequenzen zwischen Rezeptoren für Somatostatin (SSTR1-5), Galanin (Galanin1 und 2) und Opioid (μ -, δ -, κ -Opioid) aus dem Säuger, Allatostatin (DrosAlstR), Tachykinin (DrosNKD) und Neuropeptid Y (DrosNPY) aus *Drosophila*, Allatostatin (SchabeAlstR) aus der Schabe, Allatostatin (CamAlstR) und Somatostatin-ähnlicher Rezeptor (CamSSTR) aus der Stabheuschrecke. Die Somatostatin- sowie die Opioid-Familie bilden eine eigenständige Rezeptorfamilie, wobei sie vermutlich einen gemeinsamen Ursprung besitzen. Die Allatostatin-Rezeptoren zeigen die höchste Ähnlichkeit zu der Galanin-Rezeptorfamilie. Die neu klonierten Rezeptoren sind in blauer Schrift gekennzeichnet. Der Balken Kennzeichnet die Mutationsrate pro 100 Aminosäure.

Mit Hilfe der reverse physiology-Strategie konnte der native Ligand des *Drosophila*-AlstR isoliert werden. Der Name Allatostatin wurde ursprünglich eingeführt, da sie die Juvenile-Hormon-Biosynthese *in vitro* bei Insekten in der *Corpora allata* (CA) inhibierte (Tobe, 1980). Das „allato“ wurde aus der *Corpora allata* abgeleitet, weil die Wirkung des Allatostatins das erste Mal dort beobachtet wurde. Da das Allatostatin eine inhibierende Wirkung zeigte, wurde das „statin“ noch hinten hinzugefügt. Das Allatostatin wurde zuerst aus der Küchenschabe (*Diploptera punctata*), als Neuropeptid identifiziert (Woodhead *et al.*, 1989; Pratt *et al.*, 1989). Seit 1989 sind mehr als 60 Neuropeptide, die die Juvenil-Hormon-Biosynthese inhibieren, aus Insektengehirnen isoliert worden (Hoffmann *et al.*, 1999). Hierzu können einige Beispiele gegeben werden: Die Küchenschaben *Periplaneta americana* (Weaver *et al.*, 1994) und *Blattella germanica* (Belles *et al.*, 1994), die Grille *Gryllus bimaculatus* (Lorenz *et al.*, 1998), die Stechmücke *Aedes aegypti* (Veenstra *et al.*, 1997), die Schmetterlinge *Cydia pomonella*, *Helicoverpa armigera* (Duve *et al.*, 1997), die Honigbiene *Apis mellifera* (Unnithan *et al.*, 1995) und der Nachtfalter *Manduca sexta* (Davis *et al.*, 1997). Das Allatostatin ist nicht nur bei den Insekten sondern auch bei den Krustaceen weit verbreitet (Duve *et al.*, 1997; Skiebe, 1999). Die Allatostatine vermitteln eine Reihe von wichtigen physiologische Prozessen, zum einen durch das neuronale- zum anderen durch das humorale-System.

Sie inhibieren die Sekretion des endokrinen Systems, haben interneuronale und neuromodulierende Effekte und haben einen direkten Einfluß auf die Biosynthese des Juvenile-Hormons (Bendena *et al.*, 1999). Das Allatostatin inhibiert bei *Drosophila* die Darmbewegung, so daß es auch als Gehirn-Darm-Peptid bezeichnet wird (Gäde *et al.*, 1997). In *Drosophila* konnte durch Immunreaktivität das Allatostatin vorwiegend in den Ganglien des ZNS identifiziert werden (Yoon und Stay, 1995). Die mRNA des *Drosophila*-AlstRs wird vorwiegend im Kopf und im Körper der Fliegen exprimiert (Birgül *et al.*, 1999). Das *Drosophila*-Allatostatin wurde ebenfalls aus dem Kopf und aus dem Körper isoliert. Diese weisen darauf hin, daß der *Drosophila*-AlstR sowie das *Drosophila*-Allatostatin ubiquitär vorkommen.

Die cDNA für den ersten Allatostatin-Precursor wurde aus der weiblichen Küchenschabe *Diploptera punctata* über die RT-PCR mit spezifischen Primern amplifiziert (Donly *et al.*, 1993). Später konnte aus der cDNA und der genomischen DNA der Küchenschabe *Periplaneta americana* auch der Allatostatin-Precursor amplifiziert werden (Ding *et al.*, 1995). Der Precursor ist in Domänen unterteilt (Abb. 4.1), die mit der hydrophoben Signalsequenz beginnen und mit den Aminosäuren Gly-Lys/Arg-Arg enden. An diesen Aminosäuren findet die α -Amidierung und die endoproteolytische Spaltung statt.

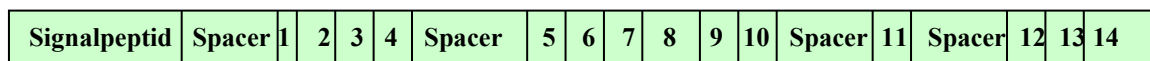


Abb. 4.1 Schematische Darstellung des Allatostatin-Precursors aus *Periplaneta americana*. Dieser Precursor enthält 14 Allatostatin-Peptide (1-14).

Die Aminoterminis der Allatostatine sind in der Länge und der Sequenz sehr unterschiedlich, z.B. enthält das Allatostatin1 aus der *Diploptera punctata* 13 Aminosäuren, wobei das Allatostatin vom TypB 18 Aminosäuren enthält. Das *Drosophila*-Allatostatin enthält 8 Aminosäuren und ist mit dem Helicostatin 3 aus dem Schmetterling identisch (Tab. 3.1). Die meisten Allatostatine enthalten am Carboxyterminus die konservierte Pentapeptid-Sequenz **Y-X-F-G-L-Amid** (Duve *et al.*, 1997; Gäde *et al.*, 1997, Veenstra *et al.*, 1997; Veelart *et al.*, 1998). Es gibt auch einige Peptide, die diese Pentapeptidsequenz nicht vorweisen, z.B. in der Heuschrecke *S. gregoria* endet das Pentapeptid mit einem **Valin**, in einigen Fliegen mit einem **Methionin** (Duve *et al.*, 1993; 1994).

Das *Drosophila*-Allatostatin endet ebenfalls mit der konservierten Pentapeptidsequenz (Birgöl *et al.*, 1999). Es wird vermutet, daß das Pentapeptid für die Rezeptorbindung sehr wichtig ist (Hayes *et al.*, 1994; Nachman *et al.*, 1998). Als der *Drosophila*-AlstR kloniert vorlag und eine funktionelle Expression in den *Xenopus*-Oozyten möglich war, wurde die Aktivität von zwei synthetisch hergestellten Pentapeptiden (Y-S-F-G-L-NH₂ und Y-S-F-G-L-COOH) wie bereits beschrieben (3.2.6) in den *Xenopus*-Oozyten gemessen. Das carboxylierte Pentapeptid zeigte keine Affinität zum *Drosophila*-AlstR, eine Bindung zwischen Agonist und *Drosophila*-AlstR wurde nicht beobachtet. Das amidierte Peptid zeigte hingegen eine hohe Aktivität. Diese Ergebnisse zeigen eindeutig, daß der Carboxyterminus des Allatostatins amidiert sein muß, um mit hoher Affinität an den Rezeptor zu binden. Zudem reichen die letzten fünf Aminosäuren des Peptids für eine Bindung an den *Drosophila*-AlstR aus. Das Amid am Carboxyterminus ist möglicherweise durch posttranslationale Modifikationen entstanden. Diese Modifikationen verleihen dem Peptid vermutlich eine höhere Resistenz gegenüber enzymatischen Abbau (Belles *et al.*, 1994; Weaver *et al.*, 1994; Woodhead *et al.*, 1994; Lorenz *et al.*, 1995).

Durch die eingeführte und etablierte Methode der funktionellen Expression im Oozyten-System konnte in unserer Arbeitsgruppe ebenfalls der native Ligand für den Säuger-Orphan-PCR, SLC-1, mit Hilfe der HPLC-Fraktionierung und Aktivitätsmessungen in den *Xenopus*-Oozyten aufgereinigt und als *melanin concentrating hormone* (MCH) charakterisiert werden (Bächner *et al.*, 1999). Die *Xenopus*-Oozyten eignen sich aus mehreren Gründen besonders gut als Expressionssystem. Als Eizelle besitzen sie eine sehr hohe Translationsfähigkeit. Außerdem führen sie an Fremdproteinen die meisten posttranslationalen Modifikationen, wie Glykosylierung und Acetylierung durch und bauen Kanäle korrekt in die Zellmembran ein. Sie sind wegen ihrer Größe einfach zu handhaben. Ein Vorteil dieses Expressionssystems ist auch die schnelle und einfache Analyse der Ergebnisse. Außerdem haben sie nur wenige endogene Rezeptoren und Kanäle, was die Untersuchungen erleichtert im Unterschied zu anderen Expressionssystemen, wie z.B. stabil transfizierten CHO-Zellen, an denen die Forskolin-induzierte Inhibierung des cAMPs nach Stimulierung gemessen wird. Die CHO-Zellen haben viele endogene Rezeptoren, die unter Umständen die Messungen erschweren können. Zudem können die Ergebnisse erst nach einigen Stunden oder auch nach einigen Tagen analysiert werden.

In der vorliegenden Arbeit konnte durch die Verwendung der RT-PCR-Technik aus *Drosophila melanogaster* der *Drosophila*-GPCR kloniert werden. Der endogene Ligand des neuen *Drosophila*-GPCRs wurde aus *Drosophila*-Köpfen isoliert, so daß der *Drosophila*-GPCR als *Drosophila*-Allatostatin-Rezeptor (***Drosophila*-AlstR**) klassifiziert werden konnte. Die Klonierung von homologen Rezeptoren aus der Schabe und der Stabheuschrecke sowie die erfolgreiche Kopplung an den GIRK-Kanal weisen darauf hin, daß die in Invertebraten weit verbreiteten Allatostatine über eine Familie von Rezeptoren wirkt, die strukturell und funktionell verwandt zu den Somatostatin-, Opioid- und Galanin-Rezeptoren der Vertebraten ist.

Nachdem für das Allatostatin der unbekannte *Drosophila*-AlstR jetzt identifiziert und die mögliche Signaltransduktionskaskade entschlüsselt worden sind, könnte durch Punktmutation in den konservierten Bereichen des *Drosophila*-AlstRs mögliche Ligandenbindungsdomänen untersucht werden. Diese Daten könnten für einen Vergleich zwischen den Vertebraten und Invertebraten hilfreich sein. Um die genaue Funktion des Allatostatins zu untersuchen, könnte die Herstellung von mutanten Fliegen und ihrer Analyse ebenfalls sehr hilfreich sein. Das *Drosophila*-Genom enthält 200 Gene, die für GPCRs kodieren (Adams *et al.*, 2000; Clyne *et al.*, 2000; Rubin *et al.*, 2000). Davon sind 100 Gene identifiziert worden, die für vermutliche Neurotransmitter- und Hormon-Rezeptoren kodieren (Brody und Cravchik, 2000). Es sind auch Gene identifiziert, die keine signifikante Ähnlichkeit zu Rezeptoren haben sog. *Orphan*-Rezeptoren, die sie vermutlich kodieren könnten. Mit Hilfe die hier für diese Arbeit verwendete Ligandenaufreinigungsstrategie könnten die nativen Liganden für die *Orphan*-GPCRs charakterisiert werden und ihre biologischen Funktionen durch Mutageneseanalysen untersucht werden.

-
- Adams M.D.**, Celniker S.E., Holt R.A., Evans C.A., Gocayne J.D., Gocayne P.G., Amanatides S.E., Scherer S.E., Li P.W., Hoskins R.A., Galle R.F. (2000): The genome sequence of *Drosophila melanogaster*. *Science*. **287**, 2185-2195.
- Akil H.**, Watson S.J., Young E., Lewis M.E., Khachaturian H., Walker J.M. (1984): Endogenous opioids: biology and function. *Annu. Rev. Neurosci.* **7**, 223-255.
- Alewijnse A.E.**, Timmerman H., Jacobs E.H., Smith M.J., Roovers E., Cotecchia S., Leurs R. (2000): The effect of mutation in the DRY motif on the constitutive activity and structural instability of the Histamin H₂ receptor. *Mol. Pharmacol.* **57**, 890-908.
- Bächner D.**, Kreienkamp H-J., Weise C., Richter D. (1999): Identification of melanin concentrating hormone (MCH) as the natural ligand for the orphan somatostatin-like receptor 1 (SLC-1). *FEBS Lett.* **457** (3), 522-4.
- Baldwin J. M.** (1993): The probable arrangement of the helices in G protein-coupled-receptors. *EMBO J.* **12**, 1693-1703.
- Barnard E.A.** and Simon J. (1993): Opioid receptors. In: *Neurotransmitter receptors*. (Hucho F., Hrsg.), 297-323.
- Belles X.**, Maestro J.L., Piulachs M.D., Johnson A.H., Duve H., Thorpe A. (1994): Allatostatic neuropeptides from the cockroach *Blattella germanica* (L.) (*Dictyoptera*, *Blattelidea*). Identification, immunolocalization and activity. *Regul. Pept.* **53**, 237-247.
- Bellestros J.**, Kitanovic S., Guarnieri F., Davies P., Fromme B.J., Konvicka K., Chi L., Millar R.P., Davidson J.S., Weinstein H., Sealfon S.C. (1998): Functional microdomains in G-protein-coupled receptors: The conserved arginine-cage motif in the gonadotropin-releasing hormone receptor. *J. Biol. Chem.* **273**, 10445-10453.
- Bendena W.G.**, Donly B.C., Tobe S.S. (1999): Allatostatins: a growing family of neuropeptides with structural and functional diversity. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **897**, 311-329.

-
- Birgül N.**, Weise C., Kreienkamp H.-J., Richter D. (1999): Reverse physiology in *Drosophila*: identification of a novel allatostatin-like neuropeptide and its cognate receptor structurally related to the mammalian somatostatin/galanin/opioid receptor family. *EMBO J.* **18**, 5892-5900.
- Bockaert J.** and Pin J.-P. (1999): Molecular tinkering of G-protein-coupled receptors: an evolutionary success. *EMBO J.* **7**, 1723-1729.
- Böhm S.K.**, Grady E.F., Bunnett N.W. (1997): Regulatory mechanisms that modulate signalling by G-protein coupled receptors. *Biochem. J.* **322**, 1-18.
- Bourne H.** (1997): How receptor talk to trimeric G proteins. *Curr. Opin. Cell. Biol.* **9**, 134-142.
- Brazeau P.**, Vale W., Burgus R., Ling N., Butcher M., Rivier J., Guillemin R. (1973): Hypothalamic polypeptide that inhibits the secretion of immunoreactive pituitary growth hormone. *Science* **179**, 77-79.
- Bruno J.F.**, Xu Y., Song J., Berelowitz M. (1992): Molecular cloning and functional expression of a brain-specific somatostatin receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **89**, 11151-11155.
- Brody T.** and Cravchik A. (2000): *Drosophila melanogaster* G-Protein-coupled receptors. *The Journal of Cell Biology* **150**, (2), 83-88.
- Clyne P.J.**, Warr C.G., Carlson J.R. (2000): Candidate taste receptors in *Drosophila*. *Science* **287**, 1830-1834.
- Corness J.D.**, Demchyshyn L.L., Seeman P., van Tol H.H., Srikant C.B., Kent G., Patel Y.C., Niznik H.B. (1993): A human somatostatin receptor (SSTR3), located on chromosome 22, displays preferential affinity for somatostatin-14 like peptide. *FEBS Lett.* **26**, 321, 279-284.

-
- Darlison M.G.** and Richter D. (1999): Multiple genes for neuropeptides and their receptors: co-evolution and physiology. *Trends Neurosci.* **22**, 81-88.
- Darlison M.G.**, Greten F.R., Harvey R.H., Kreienkamp H-J., Stühmer T., Zwiers H., Lederis K., Richter D. (1997): Opioid receptors from a lower vertebrate (*Cotosomus commersoni*): Sequence, pharmacology, coupling to a G-protein-gated inward-rectifying potassium channel (GIRK), and evolution. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **94**, 8214-8219.
- Davis N.T.**, Veenstra J.A., Feyereisen R., Hildebrand J.G. (1997): Allatostatin-like-immunoreactive neurons of the tobacco hornworm, *Manduca sexta*, and isolation and identification of a new neuropeptide related to cockroach allatostatins. *J. Comp. Neurol.* **385**, 265-284
- Demchyshyn L.L.**, Srikant C.B., Sunahara R.K., Kent G., Seeman P., Van toll H., Panatta R., Patel Y.C., Niznik H.B. (1993): Cloning and expression of human somatostatin-14 selective receptor variant (somatostatin receptor 4) located on chromosome 20. *Mol. Pharmacol.* **43** (6), 894-901.
- Devreotes P.** (1994): G protein-linked signaling pathways control the developmental program of *Dictyostelium*. *Neuron* **12**, 235-241
- Ding Q.**, Donly B.C., Tobe S.S., Bendena W.G. (1995): Comparison of the allatostatin neuropeptide precursors in the distantly related cockroaches *Periplaneta americana* and *Diploptera punctata*. *Eur. J. Biochem.* **234**, 737-746.
- Dohlman H.G.**, Thorner J., Caron M.G., Lefkowitz R.J. (1991): Model systems for the study of seven-transmembrane-segment receptors. *Annu. Rev. Biochem.* **60**, 653-688.
- Donly B.C.**, Ding Q., Tobe S.S., Bendena W.G. (1993): Molecular cloning of the gene for the allatostatin family of neuropeptides from the cockroach *Diploptera punctata*. *Proc. Natr. Acad. Sci. USA* **90**, 8807-8811.

- Duve J.**, Johnson A.H., Maestro J.L., Scott A.G., Jaros A.G., Winstanly D., Davey M., East P-D., Thorpe A. (1997): Lepidopteran peptides of the allatostatin superfamily. *Peptides* **18**, 1301-1309.
- Duve H.**, Johnson A.H., Maestro J-L., Scott A.G., Jaros P.P., Thorpe A. (1997): Isolation and identification of multiple neuropeptides of the Allatostatin superfamily in the shore crab *Carcinus maenas*. *Eur. J. Biochem.* **250**, 727-734.
- Duve H.**, Johnson A.H., Maestro J.L., Scott A.G., East P-D., Thorpe A. (1994): [Hyp³] Met-callatostatin-identification and biological properties of a novel neuropeptide from the blowfly *Calliphora vomitoria*. *J. Biol. Chem.* **269**, 21059-21066.
- Duve J.**, Johnson A.H., Scott A.G., Yu C.G., Yagi K.J., Tobe S.S. (1993): Callatostatins: neuropeptide from the blowfly *Calliphora vomitoria* with sequence homology to cockroach allatostatins. *Proc. Natn. Acad. Sci. USA* **90**, 2456-2460.
- Epelbaum J.** (1986): Somatostatin in the central nervous system-physiology pathological modifications . *Prog. Neurobiol.* **27**, 63-100.
- 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.
- Feinberg A.P.**, Vogelstein B. (1983): A technique for radiolabeling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity. *Anal. Biochem.* **132**, 6-13.
- Fernandez L.M.** and Puett D. (1996): Lys 583 in the third extracellular loop of the lutropin/choriogonadotropin receptor is critical for signaling *J. Biol. Chem.* **271**, 925-930.
- Gäde G.**, Hoffmann K.H., Spring J.H. (1997): Hormonal regulation in insects: facts, gaps and future directions. *Physiol. Rev.* **77**, 963-1032.

-
- Goldstein A.** (1987): Binding selectivity profiles for ligands of multiple receptors. *TIBS* **8**, 456-459.
- Goodman R.H.,** Lund P.K., Jacobs J.W., Habener J.F (1980): Pre-prosomatostatins. Products of cell-free translations of messenger RNAs from anglerfish islets. *J. Biol. Chem.* **255** (14), 6549-52.
- Hall R.,** 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 beta2-adrenergic receptor interacts with the Na⁺/H⁺-exchanger regulatory factor to control Na⁺/H⁺ exchange. *Nature* **392** (6676), 626-630.
- Hauser F.,** Sondergaard L., Grimmelikhuijzen C.J.P. (1998): Molecular cloning, genomic organisation and developmental regulation of a novel receptor from *Drosophila melanogaster* structurally related to gonadotropin-releasing hormone receptors from vertebrates. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **249**, 822-828.
- Hayes T.K.,** Guan X.C., Johnson V., Strey A., Tobe S.S. (1994): Structure-activity studies of allatostatin 4 on the inhibition of the juvenile hormone biosynthesis by corpora allata: the importance of individual side chains and stereochemistry. *Peptides* **15**, 1165-1171.
- Heijne G.** (1987): Sequence analysis in molecular biology. *Academic Press. Inc.* (London) LTD.
- Herbert T.E.,** Moffet S., Morello J.P., Loisel T.P., Bichet D.G., Barret C., Bouvier M. (1996): A peptide derived from a β2-adrenergic receptor transmembrane domain inhibits both receptor dimerisation and activation. *J. Biol. Chem.* **270**, 15970-15973.
- Hoffmann K.H.,** Meyering-Voss M., Lorenz M.W. (1999): Allatostatins and allatotropins: Is the regulation of *corpora allata* activity their primary function? *Eur. J. Entomol.* **96**, 255-266.

-
- Jawitch J.A.**, Fu D., Liapakis G., Chen J. (1997): Constitutive activation of the β 2-adrenergic receptor alters the orientation of its sixth membrane-spanning segment. *J. Biol. Chem.* **272**, 18546-18549.
- Ji I.** and Ji T.H. (1995): Differential roles of exoloop 1 of the human follicle stimulating hormone receptor in hormone binding and receptor activation. *J. Biol. Chem.* **270**, 15970-15973.
- Kask K.**, Berthold M., Kahl U., Nordvall G., Bartfai T. (1996): Delineation of the peptide binding site of the human galanin receptor. *EMBO. J.* **15**, 236-244.
- Kaupmann K.**, Bruns C., Raulf F., Weber H.P., Mattes H., Lübbert H. (1995): Two amino acids, located in transmembrane domains VI and VII, determine the selectivity of the peptide agonist SMS 201-995 for the SSTR2 somatostatin receptor. *EMBO. J.* **14**, 727-735.
- Kavoor A.**, Nappey V., Kieffer B.L., Chavkin C. (1997): μ and δ opioid receptors are differentially desensitized by the coexpression of β -adrenergic receptor kinase 2 and β -arrestin 2 in *Xenopus* oocytes. *J. Biol. Chem.* **272**, 27605-27611
- Kluxen F.W.**, Bruns C., Lübert H. (1992): Expression cloning of a rat brain somatostatin receptor cDNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **89**, 4618-4622.
- Kornfeld R.** and Kornfeld S. (1985): Assembly of asparagine-linked oligosaccharides. *Annu. Rev. Biochem.* **54**, 631-664.
- Kreienkamp H-J.**, (1999): Molecular biology of the receptors for somatostatin and cortistatin. In Richter D. (ed.) *Regulatory Peptides and Cognate Receptors*. Springer, Heidelberg, Germany 215-237.
- Kreienkamp H-J.**, Hönck H-H., Richter D. (1997): Coupling of rat somatostatin receptor subtypes to a G-protein gated inwardly rectifying potassium channel (GIRK1). *FEBS Lett.* **419**, 92-94.

-
- Kyte J.** and Doolittle R.F. (1982): A simple method for displaying the hydrophobic character of a protein. *J. Mol. Biol.* **157**, 105-132.
- Li X-J.,** Wu Y-N., North A., Forte M. (1992): Cloning, functional expression and developmental regulation of a neuropeptide Y receptor from *Drosophila melanogaster*. *J. Biol. Chem.* **267**, 9-12.
- Loh H.H.** and Smith A.P. (1990): Molecular characterization of opioid receptors. *Ann. Rev. Pharmacology Toxicology* **30**, 123-147.
- Lorenz M.W.** and Hofmann K.H. (1998): Cricket Allatostatins- new structure and physiological properties. Abstr. *Vlth Eur. Congr. Entomol.* Institute of Entomology, Ceske Budejovice, 110-111.
- Lorenz M.W.,** Kellner R., Hoffmann K.H. (1995): Identification of two allatostatins from the cricket, *Gryllus bimaculatus de Gees (Ensifera, Gryllidae)*: additional members of a family of neuropeptides inhibiting juvenil hormone biosynthesis. *Regul. Pept.* **57**, 227-236.
- Maggio R.,** Vogel Z., Wess J. (1993): Coexpression studies with mutant muscarinic/adrenergic receptors provide evidence for intermolecular 'cross-talk' between G-protein-linked receptors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **90**, 3103-3107.
- Mannot C.,** Bihoreau C., Conchon C., Curnow K.W., Corvol P., Clauser E. (1996): Polar residues in the transmembrane domains of the type I angiotensin II receptor are required for binding and coupling. *J. Biol. Chem.* **271**, 1507-1513.
- Matsumoto K.,** Yokogoshi Y., Fijinaka Y., Zheng C., Saito S. (1994): Molecular cloning and sequencing of porcine somatostatin receptor 2. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **199**, 298-305.

- Methfessel C.**, Witzemann V., Takahashi T., Mishina M., Numa S., Sakmann B. (1986): Patch clamp measurements on *Xenopus leavis* oocytes: currents through endogenous channels and implanted acetylcholin receptor and sodium channels. *Pflugers Arch.* **407**, 577-588.
- Metzger T.G.** and Ferguson D.M. (1995): On the role of the extracellular loops of Opioid receptors in conferring ligand selectivity. *FEBS Lett.* **375**, 1-4.
- Meunier J-C.**, Mollereau C., Toll L., Suaudeau C., Moisand C., Alvinerie P., Butour J-L., Guillemot J-C., Ferrara P., Monsarrat B., Mazarguil H., Vassart G., Parmentier M., Costentin J. (1995): Isolation and structure of the endogenous agonist of opioid receptor-like ORL₁ receptor. *Nature* **377**, 532-535.
- Meyerhof W.**, Wulfsen I., Schönrock C., Fehr S., Richter D. (1992): Molecular cloning of a somatostatin-28 receptor and comparison of its expression pattern with that of a Somatostatin-14 receptor in rat brain. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **89**, 10267-10271.
- Meyerhof W.**, Paust H.-J., Schönrock C., Richter D. (1991): Cloning of a cDNA encoding a novel putative G-protein-coupled receptor expressed in specific rat brain regions. *DNA and Cell Biology* **10**, 689-694.
- Moffett S.**, Adam L., Bonin H., Loisel T.P., Bouvier M., Mouillac B. (1996): Palmitoylated Cysteine 341 Modulates phosphorylation of the β -Adrenergic receptor by the cAMP-dependent Protein-kinase. *J. Biol. Chem.* **271**, 21490-21497.
- Moffett S.**, Mouillac B., Bonin H., Bouvier M. (1993): Altered phosphorylation and desensitization pattern of a human β 2-adrenergic receptor lacking the palmitoylated Cys 341. *EMBO J.* **12**, 349-356.
- Monnier D.**, Colas J-F., Rosay P., Hen R., Borelli E., Maroteaux L. (1992): NKD, a developmentally regulated tachykinin receptor in *Drosophila*. *J. Biol. Chem.* **267**, 1298-1302.

- Montminy M.R.**, Goodman R.H., Horovitch S.J., Habener J.F. (1984): Primary structure of the gene encoding rat preprosomatostatin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **81**, 3337-3340.
- Moro O.**, Lamah J., Hogger P., Sadee W. (1993): Hydrophobic amino acid in the i2 loop plays a key role in receptor G-protein coupling. *J. Biol. Chem.* **268**, 22273-22276.
- Nachman R.J.**, Moyna G., Williams H.J., Tobe S.S., Scott A.I. (1998): Synthesis, biological activity and conformational studies of insect allatostatin neuropeptide analogues incorporating turn-promoting moieties. *Bioorg. Med. Chem.* **6**, 1379-1388.
- Nehring R.B.**, Richter D., Meyerhof W. (2000): Glycosylation affects agonist binding and signal transduction of the rat somatostatin receptor subtype 3. *J. Physiol. Paris* **94**, 185-192.
- New D.** and Wong J. (1998): The evidence for G-protein-coupled receptors and heterotrimeric G-proteins in protozoa and ancestral metazoa. *Biol. Signals Recept.* **7**, 98-108.
- O'Carroll A.M.**, Lolait S.J., König M., Mahen L.C. (1992): Molecular cloning and expression of a pituitary somatostatin receptor with preferential affinity for somatostatin-28. *Mol. Pharmacol.* **42**, 939-946.
- O'Dowd B.F.**, Scheideler M.A., Nguyen T., Cheng R., Rasmussen J.S., Marchese A., Zastawny R., Heng H.H., Tsui L.C., Shi X. (1995): The cloning and chromosomal mapping of two novel human opioid-somatostatin-like receptor genes, GPR7 and GPR8, expressed in discrete areas of the brain. *Genomics* **28**, 84-91.
- O'Dowd B.F.**, Hnatowich M., Caron M.G., Lefkowitz R.J., Bouvier M. (1989): Palmitoylation of the human β 2-adrenergic receptor. *J. Biol. Chem.* **264**, 7564-7569.
- O'Hara P.J. et al.** (1993): The ligand-binding domain in metabotropic glutamate receptors is related to bacterial periplasmic binding proteins. *Neuron* **11**, 41-52.
- Olson G.A.**, Olson R.D., Kastin A.J. (1992): Endogenous Opiates: 1991. *Peptides* **13**, 1247-1287.

-
- Panneta R.**, Greenwood M.T., Warszynska A., Demchyshyn L.L., Day R., Niznik H.B., Srikant C.B., Patel Y.C. (1994): Molecular cloning, functional characterization, and chromosomal localisation of a human somatostatin receptor (somatostatin receptor type 5) with preferential affinity for somatostatin-28. *Mol. Pharmacol.* **45** (3), 417-427.
- Pantolini C.**, Brabet P., Bilanges B., Dumuis A., Houssami S., Sprengler D., Bockaert J., Journot L. (1996): Alternative splicing in the N-terminal domain of the PACAP receptor modulates receptor selectivity and relative potencies of PACAP-27 and -38 in phospholipase C activation. *J. Biol. Chem.* **271**, 22146-22151.
- Plakidou-Dymock S.**, Dymock D., Hooley R. (1998): A higher plant seven-transmembrane receptor that influences sensitivity to cytokinins. *Curr. Biol.* **8**, 315-324.
- Pradayrol L.**, Jornvall H., Mutt V., Ribet A. (1980): N-terminally extended somatostatin: the primary structure of somatostatin-28. *FEBS Lett.* **109** (1), 55-8.
- Pratt G.E.**, Farnsworth D.E., Feyereisen R. (1989): Identification of an Allatostatin from adult *Diploptera punctata*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **163**, 1243-1247.
- Probst W. C.**, Synder L.A., Schuster D.I., Brosius J., Sealfon C. (1992): Sequenz alignment of the G-protein-coupled-receptor superfamily. *DNA and Cell Biology* **11**, 1-20.
- Rasmussen S.G.F.**, Jensen A.D., Liapakis G., Ghaoui P., Javitch J.A., Gether U. (1999): Mutation of the highly conserved aspartic acid in the β_2 -adrenergic receptor: Constitutive activation, structural instability, and conformational rearrangement of transmembrane segment 6. *Mol. Pharmacol.* **56**, 175-184.
- Reagen J.D.** (1994): Expression cloning of an insect diuretic hormone receptor. A member of the calcitonin/secretin receptor family. *J. Biol. Chem.* **269**, 9-12.
- Reichlin S.** (1983) in *Brain Peptides: Somatostatin*, ed: Krieger D.T., Brownstein M.J., Martin J.B., (Wiley, New York), 1-20.

- Reinscheid R.K.**, Nothacker H-P., Civelli O. (1999): Orphan receptors and the concept of reverse physiology: discovery of the novel neuropeptide orphanin Orphanin FQ/nociceptin. *Results Probl. Cell. Differ.* **26**, 193-214.
- Reinscheid R.K.**, Nothacker H-P., Bourson A., Ardati A., Henningsen R.A., Bunsow J.R., Grandy D.K., Langen H., Monsma F.J., Civelli O. (1995): Orphanin FQ: A neuropeptide that activates an opioid-like G-protein-coupled receptor. *Science* **270**, 792-794.
- Reisine T.** and Bell G. (1993): Molecular biology of opioid receptors. *Trends in Neuroscience* **16**, 506-510.
- Rens-Domiano S.** and Reisine T. (1991): Structural analysis and functional role of the carbohydrate component of somatostatin receptors. *J. Biol. Chem.* **266**, 20094-20102.
- Rohrer L.**, Raulf F., Bruns C., Buettner R., Hofstaedter F., Schule R. (1993): Cloning and characterization of a fourth human somatostatin receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **90**, 4196-200.
- Ross E.M.** (1989): Signal sorting and amplification through G protein-coupled receptors. *Neuron* **3**, 141-152.
- Rubin G.M.**, Yandell M.D., Wortman G.R., Gabor-miklos G.L., Nelson C.R., Hariharan I.K., Fortini M.E., Li P.W., Apweiler R., Fleischmann W. (2000): Comparative genomics of the eucaryotes. *Science* **287**, 2204-2216.
- Saiki R.K.**, Gelfand D.H., Stoffel S., Scharf S.J., Higuchi R., Horn G.J., Mullis K.B., Ehrlich H.A. (1988): Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* **239**, 487-491.
- Sambrook J.**, Fritsch E.F., Maniatis T. (1989): Molecular cloning: a laboratory manual ed. 2, (Cold Spring Harbor: (Cold Spring Harbor Laboratory Press)).

-
- Sanger F.S.**, Nicklen S., Coulson A.R. (1977): DNA-sequencing with chain terminating inhibitors. *Proc. Natl. Sci. USA* **74**, 5463-5467.
- Savarese T.M.** and Fraser C.M. (1992): *In vitro* mutagenesis and search for structure-function relationships among G-Protein-coupled receptors. *Biochem. J.* **283**, 1-19.
- Scheer A.**, Fanelli F., Costa T., De Benedetti P.G., Cotecchia S. (1996): Constitutively active mutants of the α_{1B} -adrenergic receptor: Role of highly conserved polar amino acids in receptor activation. *EMBO J.* **15**, 3566-3578.
- Scheer A.**, Fanelli F., Costa T., De Benedetti P.G., Cotecchia S. (1997): The activation process of the α_{1B} -adrenergic receptor: Potential role of protonation and hydrophobicity of highly conserved aspartate. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **94**, 802-813.
- Sevarino K.A.**, Felix R., Banks C.M. Low M.G., Montminy M.R., Mandel G., Goodman R.H. (1987): Cell-specific processing of preprosomatostatin in cultured neuroendocrine cells. *J. Biol. Chem.* **262**, (11) 4987-4993.
- Sharon D.**, Vorobiov D., Dascal N. (1997): Positive and negative coupling of the metabotropic glutamate receptors to a G protein-activated K⁺channel, GIRK, in *Xenopus* Oocytes. *J. Gen. Physiol.* **109**, (4) 477-490.
- Sieler S.**, Zupanc G.K., Seuwen K., Hoyer D. (1999): Characterization of the fish sstr3 receptor, a member of the SRIF1 receptor family: atypical pharmacological features. *Neuropharmacology* **38**, 449-462.
- Simon E.J.** (1991): Opioid receptors and endogenous opioid peptides. *Medicinal Res. Rev.* **11**, 357-374.
- Skiebe P.** (1999): Allatostatin-like immunoreactivity in the stomatogastric nervous system and the pericardial organs of the crab *Cancer pagurus*, the lobster *Homarus americanus* and the crayfish *Cherax destructor* and *Procambarus clarkii*. *J. Comp. Neurol.* **403**, 85-105.

- Smit M.J.**, Roovers E., Timmerman H., van de Vrede Y., Alewski A.E., Leurs R. (1996): Two distinct pathways of Histamin H₂ receptors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93**, 6802-6807.
- Stadel J.M.**, Nambi P., Shorr R.G., Sawyer D.F., Caron M.G., Lefkowitz R.G. (1983): Catecholamine-induced desensitization of turkey erythrocyte adenylate cyclase is associated with phosphorylation of the beta-adrenergic receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **11**, 3173-3177.
- Tensen C.P.**, Cox K.J., Smit A.B., van der Schors R.C., Meyerhof W., Richter D., Planta R.J., Hermann P.M., van Minnen J., Geraerts W.P., Knol J.C., Burke J-F., Vreugdenhil E., van Heerikhuizen H. (1998): The lymnaea cardioexcitatory peptide (LyCEP) receptor: a G-protein-coupled receptor for a novel member of the RFamide neuropeptide family. *J. Neurosci.* **18**, 9812-9821.
- Tobe S.S.** (1980): Regulation of *corpora allata* in adult female insects. In Locke M. & Smith D.S. (eds): *Insect Biology of the future*: VBW 80 Academic press, New York, 355-367
- Unnithan G.C.**, Pratt G.E., Fok K.F., Siegel N.R., Veenstra J.A., Kaatz H., Feyereisen R. (1995): Structure-activity studies of natural and synthetic allatostatins and evidence for two receptor types. *Proc. 6th Int. Conf. juvenile Hormones Woods Hole ME*. Abstract No. 129
- Vanden Broeck J.**, Poels J., Simonet G., Dickens L., De Loof A. (1998): Identification of G-protein-coupled receptor in insect cells. *Ann. NY Acad. Sci.* **839**, 123-128.
- Veenstra J.A.**, Noriga F.G., Graf R., Feyereisen R. (1997): Identification of three allatostatins and their cDNA from the mosquito *Aedes aegypti*. *Peptides* **18**, 937-942.
- Veelaert D.**, Schoofs L., De Loof A. (1998): Peptidergic control of the *corpus cardiacum-corpora allata* complex of locusts. *Int. Rev. Cytol.* **182**, 249-302.

-
- Vernier P.**, Cardinaud B., Valdenaire O., Philippe H., Vincent J-D (1995): An evolutionary view of drug-receptor interaction: the bioamine receptor family. *Trends Pharmacol. Sci.* **16**, 375-381.
- Weaver R.J.**, Freeman Z.A., Pickering M.G., Edwards J.P. (1994): Identification of two allatostatins from the CNS of the cockroach *Periplaneta americana*: novel members of a family of neuropeptide inhibitors of insect juvenile hormone biosynthesis. *Comp. Biochem. Physiol.* **107**, 119-127.
- Wood P.H.** (1982): Multiple opiate receptors. Support for unique mu, delta and kappa sites. *Neuropharmacology* **21**, 487-497.
- Woodgett J.R.**, Gould K.L., Hunter T. (1986): Substrate specificity of protein kinase C. Use of synthetic peptides corresponding to physiological sites as probes for substrate recognition requirements. *Eur. J. Biochem.* **161**, 177-184.
- Woodhead A.P.**, Khan M.A., Stay B., Tobe S.S. (1994): Two new allatostatins from the brains of *Diploptera punctata*. *Insect Biochem. Mol. Biol.* **24**, 257-263.
- Woodhead A.P.**, Stay B., Seidel S.L., Khan M.A., Tobe S.S. (1989): Primary structure of four allatostatins: neuropeptide inhibitors of juvenile hormone synthesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **86**, 5997-6001.
- Xu Y.**, Song J., Bruno J.F., Berelowitz M. (1993): Molecular cloning and sequencing of a human somatostatin receptor, hSSTR4. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **193** (2), 648-52.
- Yamada Y.**, Kagimoto S., Kuboto A., Yasuda K., Masuda K., Someya Y., Ihara Y., Imura H., Seino H., Seino Y. (1993): Cloning, functional expression and pharmacological characterization of a fourth and fifth human somatostatin receptor subtype. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **195**, 844-852.

- Yamada Y.**, Post S.R., Wang K., Tager H.S., Bell G.I., Seino S. (1992): Cloning and functional characterization of a family of human and mouse somatostatin receptors expressed in brain, gastrointestinal tract and kidney. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **89**, 251-255.
- Yasuda K.**, Raynor K., Kong H., Breder C.D., Takeda J., Reisine T., Bell G. (1993): Cloning and functional comparison of κ and δ opioid receptors from mouse brain. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **90**, 6736-6740.
- Yasuda K.**, Rens-Domiano S., Breder C.D., Law S.F., Saper C.B., Reisine T., Bell G.I., (1992): Cloning of a novel somatostatin receptor, SSTR3, coupled to adenylylcyclase. *J. Biol. Chem.* **267**, 20422-20428.
- Yoon J.G.** and Stay B. (1995): Immunocytochemical localization of *Diploptera punctata* allatostatin-like peptide in *Drosophila melanogaster*. *J. Comp. Neurol.* **363**, 475-488.
- Zhu S.Z.**, Wang S.Z., Hu J.R., Elfakahany E.E. (1994): An Arginin residue conserved in most G-Protein-coupled receptors is essential for the funktion of the M1 muscarinic receptor. *Mol. Pharmacol.* **45**, 517-523.

Danksagung

Diese Arbeit wurde am Institut für Zellbiochemie und klinische Neurobiologie der Universität Hamburg unter der Leitung von Prof. Dr. Richter angefertigt. Ich möchte mich bei Prof. Richter für die Ermöglichung dieser Arbeit, das Interesse an der Arbeit und die Motivation während der drei Jahre bedanken.

Für die Überlassung des Promotionsthemas und die Unterstützung durch zahlreiche Anregungen und Hilfestellung danke ich Priv. Doz. Dr. Hans-Jürgen-Kreienkamp.

Für die Konstruktion der degenerierten Oligonukleotide danke ich Dr. Mark Darlison. Herr Hans-Hinrich-Hönck danke ich für seine intensive Unterstützung bei der Einarbeitung im Laboralltag. Herr Ellinghausen danke ich für seine Hilfsbereitschaft bei den elektrophysiologischen Messungen. Herr Sönke Harder und Frau Agata Wever-Blaszcek danke ich für die Durchführung der zahlreichen DNA-Sequenzierung. Dem AG-Kreienkamp danke ich für die nette Zusammenarbeit und Hilfsbereitschaft insbesondere bei Herr Dr. Dietmar Bächner, Claus-Peter Schwartkop, Marcus Christenn, Hannes Jön-Lauruson, Marie Mameza, Maylin Seger-Junius und Michaela Soltau. Schließlich möchte ich mich bei allen Mitarbeitern des Institutes für ihre Hilfsbereitschaft, Motivation und die nette Zusammenarbeit bedanken, insbesondere bei Dr. Stefan Kindler und Dr. Kerstin Vieluf.

Mein besonderer Dank gilt an meine Eltern und meine Geschwister die mich während der drei Jahre permanent motiviert und unterstützt haben.

LEBENS LAUF

Name : Birgül
Vorname : Necla
Geb. am / in : 08.01.67 / Urfa – Türkei
Staatsangehörigkeit : Deutsch
Einreise in die BRD : September 1974
Mutter : Serife, geb. Deveci, Schneiderin
Vater : Mahmut, Kaufmann
Geschwister : drei Brüder, zwei Schwestern

Schulbildung : 09 / 74 – 07 / 78 Grundschule Steilshoop
07 / 78 – 07 / 80 Gesamtschule Steilshoop
07 / 80 – 07 / 84 Realschule am Heidberg

Berufsbildung : 08 / 84 – 08 / 87 Ausbildung zur Krankenschwester am AK-Altona / Hamburg

Studium : 10 / 87 – 10 / 89 Türkisches Abitur. Besuch einer Privatschule zur Vorbereitung der Uni-Aufnahmeprüfung in Istanbul
10 / 89 – 10 / 93 Immatrikulation im Studiengang Biologie an der Trakya Universität zu Edirne
10 / 93 Einreise nach Hamburg, Beschäftigung als Krankenschwester am AK-Eilbek (Chirurgische Abteilung)
04 / 94 Immatrikulation an der Uni-Hamburg im Fachbereich Biologie ins Hauptstudium. Fortführende Beschäftigung als Teilzeitkraft im AK-Eilbek (Chirurgische Abteilung)
10 / 95 – 05 / 96 Aufenthalt in Leeds, Durchführung der praktischen Teil-Diplomarbeit unter der Leitung von Prof. Dr. Cove, University of Leeds, Dep. of Genetics, UK, mit einem Auslands-Stipendium der Uni.-Hamburg
10 / 97 Beendigung der Diplomarbeit, fortführende Beschäftigung als Teilzeitkraft im AK-Eilbek (Psychiatrische Abteilung)
seit 11 / 97 Doktorarbeit an der Universität Hamburg, Institut für Zellbiochemie und klinische Neurobiologie unter der Leitung von Prof. Dr. D. Richter in der Arbeitsgruppe von Dr. H-J. Kreienkamp
1 / 2000 Voraussichtliche Promotion an der Uni-Hamburg Fachbereich Biologie

Fremdsprachen Türkisch und Englisch

EDV MS-Windows: Word, Excel, Corel, Adobe photoshop, graph pad Prism

Hamburg den 05.01.2001

Unterschrift: N. Birgül