

**Identifikation und Charakterisierung der
Dopamin-Rezeptoren des Flohs
*Ctenocephalides felis***

DISSERTATION

der Fakultät für Chemie und Pharmazie
der Eberhard-Karls-Universität Tübingen

zur Erlangung des Grades eines
Doktors der Naturwissenschaften

2007

vorgelegt von

Sonja Gerber

Tag der mündlichen Prüfung: 22.01.2007

Dekan:	Prof. Dr. L. Wesemann
1. Berichterstatter:	PD Dr. P. M. Selzer
2. Berichterstatter:	Prof. Dr. M. Duszenko

Die vorliegende Arbeit wurde unter Leitung von PD Dr. Paul M. Selzer und Dr. Christian Wolf bei der Firma Intervet Innovation GmbH, Schwabenheim durchgeführt.

Herrn PD Dr. Paul M. Selzer und Herrn Dr. Christian Wolf möchte ich für die Themenstellung sowie die Betreuung meiner Arbeit danken.

Herrn Prof. Dr. Michael Duszenko danke ich für die wohlwollende Unterstützung dieser Arbeit und die Übernahme des Mitberichts.

Dem Gruppenleiter Herrn Dr. Nikolas Gunkel danke ich für die stete Diskussionsbereitschaft.

Bei der Intervet Innovation GmbH möchte ich mich für die Möglichkeit zur Promotion in der Industrie bedanken.

Herrn Prof. Dr. Didier Rognan (CNRS, Illkirch) danke ich für die Hilfe bei der Klassifizierung der Dopamin-Rezeptoren des Flohs und der Erstellung des dreidimensionalen Modells des CfDopRI bzw. II.

Frau Prof. Dr. Ellen I. Closs (Johannes-Gutenberg-Universität, Mainz) danke ich für die Möglichkeit, in ihrem Labor die Handhabung der Oozyten erlernen zu können sowie die stete Unterstützung und Diskussionsbereitschaft. Frau Alice Habermeier danke ich für die Anleitung beim Umgang mit den Oozyten.

Frau Dipl.-Biol. Kirsten Hübner möchte ich für die wertvollen und sehr hilfreichen Anregungen danken.

Herrn Dr. Volker Spehr danke ich für die hilfreichen Gespräche bei so manchen Klonierungen und Excel-Fragen.

Herrn Dr. Andreas Rohwer möchte ich für die Einführung und die fortlaufende Hilfe bei bioinformatischen Fragestellungen danken.

Frau Dr. Anette Klinger und Herrn Dr. Jörg Cramer gilt mein Dank für die chemoinformatischen Arbeiten.

Meinen Kollegen in den Abteilungen Target Discovery und BioCheminformatics möchte ich für ihre Hilfsbereitschaft, ihr Interesse sowie die motivierenden und anregenden Gespräche danken.

Mein besonderer Dank gilt meinen Eltern, Geschwistern und Andreas für die grenzenlose Unterstützung. Elena und Valerie danke ich für die wunderbare Freundschaft, die sich während unserer Arbeit entwickelt hat.

Inhaltsverzeichnis

1.	Einleitung	1
1.1	Parasiten und Parasitenbekämpfung	1
1.2	<i>Ctenocephalides felis</i>	1
1.3	Signaltransduktion	4
1.4	G-Protein gekoppelte Rezeptoren	6
1.5	GPCRs als <i>Drug Targets</i>	11
1.6	Der Ligand Dopamin	14
1.7	Dopamin-Rezeptoren	15
1.7.1	Klassifizierung und Struktur	15
1.7.2	Funktion von Dopamin und Dopamin-Rezeptoren für den Menschen	17
1.7.3	Funktion von Dopamin und Dopamin-Rezeptoren in Insekten	19
1.8	Strukturbasierte Identifikation von neuen Liganden für Zielproteine	20
1.9	Zielsetzung der Arbeit	24
2.	Material und Methoden	26
2.1	Materialien	26
2.1.1	Geräte	26
2.1.2	Gebrauchswaren	28
2.1.3	Chemikalien	30
2.1.4	Enzyme, Enzymtests, <i>Primer</i> und Vektoren	31
2.1.5	Puffer, Medien und Lösungen	33
2.1.6	Verwendete kompetente Bakterienstämme	36
2.1.7	Humane Dopamin-Rezeptoren	36
2.2	Molekularbiologische Methoden	37
2.2.1	Klonierungen	37
2.2.1.1	DNA-Verdau mit Restriktionsendonukleasen	37
2.2.1.2	Ligation von DNA-Fragmenten	38
2.2.1.3	Dephosphorylierung von DNA-Fragmenten	38
2.2.1.4	Klonierung von PCR-Produkten mittels Topoisomerasen	39
2.2.1.5	Herstellung elektrokompenter Zellen	39
2.2.1.6	Transformation von Bakterien	40
2.2.1.7	Test auf Abbau von X-Gal („Blau-Weiß-Selektion“)	41

2.2.1.8	Präparation von Plasmid-DNA	42
2.2.1.9	DNA-Präzipitation: Ethanol-fällung	43
2.2.1.10	Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren	44
2.2.1.11	Agarosegelelektrophorese zur Auftrennung von DNA und Gelextraktion	45
2.2.2	Amplifikation von DNA-Sequenzen	46
2.2.2.1	Polymerase-Kettenreaktion	46
2.2.2.2	Bestimmung der <i>Annealing</i> Temperatur für PCR <i>Primer</i>	47
2.2.2.3	DNA-Sequenzierungen	48
2.2.3	Herstellung von genomischer DNA und cDNA	48
2.2.3.1	Gewinnung von genomischer DNA aus <i>D. melanogaster</i>	48
2.2.3.2	Präparation von RNA aus adulten Flöhen und Fliegen	49
2.2.3.3	Formaldehyd-Agarose Gel für RNA-Proben	50
2.2.3.4	cDNA-Synthese	51
2.2.4	Identifikation und Klonierung unbekannter Orthologer	51
2.2.4.1	cDNA <i>library</i> von <i>C. felis</i>	51
2.2.4.2	Design degenerierter <i>Primer</i>	52
2.2.4.3	Degenerierte <i>nested PCR</i>	56
2.2.4.4	<i>Rapid amplification of cDNA ends</i> (RACE)	58
2.2.4.5	<i>In silico</i> Analyse der Sequenzen aus degenerierter <i>nested PCR</i> und RACE-PCRs	64
2.2.4.6	Identifikation fehlerfreier Gensequenzen	64
2.2.4.7	Klonierung des Dopamin-Rezeptors I und II von <i>C. felis</i>	65
2.2.4.8	Klonierung des Dopamin-Rezeptors II von <i>D. melanogaster</i>	66
2.3	Bioinformatik	66
2.3.1	Bioinformatische Analysen	66
2.4	Zellkultur	67
2.4.1	Humane embryonale Nierenzellen.	67
2.4.2	Medium	67
2.4.3	Kultivierung	68
2.4.4	Transiente Transfektion	68
2.4.5	Passage der transient transfizierten HEK293-Zellen	69
2.4.6	Kontrolle der Transfektionseffizienz	70
2.4.7	Stimulation der HEK293-Zellen	70
2.4.8	Bestimmung der cAMP-Konzentration	70
2.4.9	Einfrieren von HEK293-Zellen.	72
2.4.10	Auftauen	73
2.5	Oozyten von <i>Xenopus laevis</i> als Expressionssystem	73
2.5.1	Expression in Oozyten von <i>Xenopus laevis</i>	73
2.5.2	Präparation von Oozyten	73

2.5.3	Darstellung von <i>copy</i> RNA (cRNA)	75
2.5.4	Injektion von cRNA in Oozyten	77
2.5.5	Inkubation der Oozyten	78
2.5.6	Bestimmung der cAMP-Konzentration	79
2.6	Transgenes RNA <i>interference</i> in <i>D. melanogaster</i>	80
2.6.1	Standardnährboden für die Fliegenhaltung	80
2.6.2	Fliegenhaltung.	80
2.6.3	Klonierung der <i>hairpin</i> -Konstrukte zur Herstellung transgener RNAi-Fliegen	81
2.6.4	Etablierung und Balancierung von transgenen Fliegenlinien .	82
2.6.5	Aktivierung der Expression der <i>hairpin</i> -Konstrukte in den transgenen Fliegen	86
2.7	Chemoinformatik	86
2.7.1	Chemoinformatische Methoden zur Erstellung von 3-D-Modellen	86
2.7.2	Pharmakophor-Modelle, virtuelle Substanz- bibliothek und <i>Docking</i>	87
3. Ergebnisse		88
3.1	Bioinformatische Analyse.	88
3.2	Identifikation der Dopamin-Rezeptoren I, II und III von <i>C. felis</i>	92
3.3	Sequenzvergleiche der Dopamin-Rezeptoren von <i>C. felis</i> mit Orthologen anderer Insekten	94
3.4	Klassifizierung der Dopamin-Rezeptoren von <i>C. felis</i>	99
3.5	Funktionelle Expression des CfDopRII in Oozyten von <i>X. laevis</i>	103
3.6	Funktionelle Expression des CfDopRII in HEK293-Zellen .	108
3.7	Funktionelle Expression des CfDopRI in HEK293-Zellen .	118
3.8	<i>In vivo</i> RNAi-Analyse der Dopamin- Rezeptoren von <i>D. melanogaster</i>	124
3.8.1	Herstellung der transgenen RNAi-Fliegen	126
3.8.2	Aktivierung der Expression des <i>hairpin</i> -Konstrukts durch das UAS-GAL4-System	130
3.9	Homologie-Modellierung und rationales Wirkstoff-Design .	136
4. Diskussion		144
4.1	Konservierung orthologer GPCRs der Klasse <i>Insecta</i> . . .	144

4.2	Identifikation orthologer Dopamin-Rezeptoren des Flohs	145
4.3	Funktionelle Charakterisierung des CfDopRII	147
4.4	Funktionelle Charakterisierung des CfDopRI	151
4.5	Bedeutung der Dopamin-Rezeptoren für <i>D. melanogaster</i>	153
4.6	Chemoinformatische Identifizierung neuer Antagonisten	154
4.7	Ausblick	156
5. Zusammenfassung		157
6. Literaturverzeichnis		159
7. Anhang		171
7.1	<i>Primer</i>	171
7.2	Vektoren	175
7.3	<i>Alignments</i> bekannter Dopamin-Rezeptoren von <i>A. mellifera</i> , <i>D. melanogaster</i> und <i>A. gambiae</i>	178
7.4	Marker	182

Abkürzungen

Abb.	Abbildung
AMP	Adenosinmonophosphat
ATP	Adenosintriphosphat
bp	Basenpaar
cDNA	komplementäre DNA
CIP	<i>calf intestinal alkaline phosphatase</i>
dATP	Desoxyadenosintriphosphat
dCTP	Desoxycytosintriphosphat
DEPC	Diethylpyrocarbonat
dGTP	Desoxyguanosintriphosphat
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphate
DTT	Dithiothreitol
dTTP	Desoxythymidintriphosphat
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EST	<i>expressed sequence tag</i>
FCS	<i>fetal calf serum</i>
GSS	<i>genome survey sequences</i>
Hepes	2-[4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazino]-ethansulfonsäure
kb	Kilobasenpaare
LB	Luria Bertani
Lsg.	Lösung
MEM	<i>minimum essential medium</i>
NCBI	<i>National Center for Biotechnology Information</i>
OD	optische Dichte
PBS	<i>phosphate buffered saline</i>
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PP _i	Pyrophosphat
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	Reverse Transkriptase Polymerase-

	Kettenreaktionen
Tab.	Tabelle
Taq	<i>Thermus aquaticus</i>
Tris	Tris(hydroxyethyl)aminoethan
ü.N.	über Nacht
UAS	<i>upstream activating sequence</i>
Umin ⁻¹	Umdrehungen pro Minute
UV	ultraviolettes Licht
X-Gal	5-Brom-4-Chlor-3-Indoyl-β-D-Galaktosid

1. Einleitung

1.1 Parasiten und Parasitenbekämpfung

Parasiten sind Lebewesen, die zum Zwecke der Nahrungsgewinnung und Fortpflanzung dauernd oder vorübergehend in oder auf einem andersartigen Wirtsorganismus leben und diesen schädigen (Hiepe *et al.*, 2006). Die Wirtsorganismen können dabei mechanisch, nutritiv und metabolisch geschädigt werden. Viele Parasiten können immunpathogene oder toxische Effekte auslösen. Zudem können Krankheitserreger, insbesondere Viren und Bakterien übertragen werden. Der Parasitenbefall von Tieren führt zu Leistungsbeeinträchtigungen und im Fall von landwirtschaftlichen Nutztieren zu Produktionsverlusten. Von besonderer Gefahr sind parasitäre Infektionen, die auf den Menschen übertragbar sind (Zoonosen) (Hiepe *et al.*, 2006).

Für die Bekämpfung von Parasiten sind vor allem wirtschaftliche Gründe (Einschränkung von Verlusten bei der Erzeugung von Produkten tierischer Herkunft) und medizinische Gründe (Heilung bzw. Verhütung krankhafter Zustände durch Parasitenbefall, Schutz der Gesundheit des Menschen vor Infektionen mit Zoonoseerregern) maßgebend (Hiepe *et al.*, 2006, Rehbein, S. 378, f.). Zur Kontrolle der Parasiten werden Antiparasitika eingesetzt. Diese stellen Pharmaka dar, welche einen chemotherapeutischen Effekt gegen die Adulten und Entwicklungsstadien von Ekto- und/oder Endoparasiten besitzen (Hiepe *et al.*, 2006, Rehbein, S. 404, f.). Die Entwicklung neuer hochwirksamer und spezifischer Antiparasitika zur Kontrolle der Parasiten ist vor allem vor dem Hintergrund immer neuer Resistenzen von großem Interesse (Baxter und Barker, 1999; Hiepe *et al.*, 2006).

1.2 *Ctenocephalides felis*

Ektoparasiten leben auf der Oberfläche anderer Organismen, die ihnen als Wirte dienen. In den meisten Fällen ernähren sie sich von Blut, Haut, Haaren, oder Sekreten des Wirts. Häufig sind die Parasiten in einem hohen Maße an das Wirtstier angepasst. Typisch sind zum Beispiel der Verlust von funktionellen Flügeln, eine Abflachung des Körpers, beißende oder saugende Mundwerkzeuge (Wehner und Gehring, 1995), sowie starke Beine und Klauen, damit sich die Parasiten an ihren Wirten festklammern können. Flöhe sind

Ektoparasiten der Ordnung *Siphonaptera*. Sie leben vom Blut ihrer Wirtstiere. Weltweit sind etwa 2.380 Arten beschrieben. Der Floh *Ctenocephalides felis* (siehe Abb. 1.1) befällt primär Katzen und Hunde. Zwar haben Flöhe Vorlieben für bestimmte Wirtstiere, sind aber nicht ausschließlich auf diese angewiesen. Der Katzenfloh ist 1,5 bis 3 mm lang, braun bis rot-braun gefärbt und gehört zu der am weitesten verbreiteten Flohart (Westheide und Rieger, 1996; Dryden und Rust, 1994).

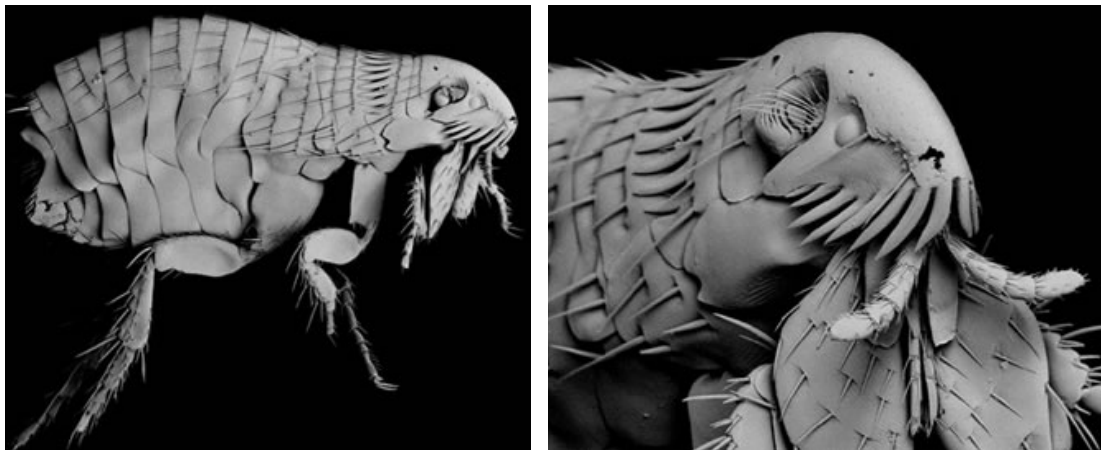


Abb. 1.1. Elektronenmikroskopische Aufnahmen des Flohs *C. felis*. Die abgeplattete Körperform des Parasits führt zu einer guten Beweglichkeit im Fell des Wirts. Darüber hinaus besitzt der Floh Borsten, die über den gesamten Körper verteilt und alle zum Körperende hin ausgerichtet sind. Einerseits kann sich der Floh im Fell seines Wirtes fangen, falls er mit seinen Klauen den Kontakt zur Haut verliert. Andererseits kann er sich aufgrund der Ausrichtung der Borsten dennoch leicht vorwärts durch das Fell bewegen. Die für Insekten typischen Facettenaugen sind hier durch ein Paar einlinsiger Einzelaugen ersetzt (Westheide und Rieger, 1996). (Herkunft: Australisches Museum; <http://www.amonline.net.au/insects/index.cfm>; S. Lindsay)

C. felis entwickelt sich über vier verschiedene Stadien (Abb. 1.2). Adulte Flöhe legen auf den Wirts-Tieren Eier, welche herunterfallen und sich vermehrt an Plätzen sammeln, an denen die Wirts-Tiere schlafen oder sich ausruhen. Pro Woche werden etwa 150 bis 300 Eier gelegt. In Abhängigkeit von der Temperatur und der relativen Feuchtigkeit schlüpfen innerhalb von ein bis sechs Tagen Larven aus den Eiern. Die Larvalentwicklung findet in geschützten Mikrohabitaten statt, in denen eine moderate Temperatur und eine hohe Luftfeuchtigkeit herrschen und der Kot von adulten Flöhen zu finden ist. Der Kot von adulten Flöhen enthält noch immer ausreichend unverdautes Blut, damit sich die Larven davon ernähren können. Die Larven durchlaufen drei Stadien in einem temperaturabhängigen Zeitraum von fünf bis zwölf Tagen. Anschließend bildet die reife Larve eine Puppe. Der Kokon besteht aus Seide an deren Außenseite sich Material der Umgebung, wie z.B.

Sand anheftet. Das Puppenstadium kann sieben bis vierzehn Tage dauern. Die Entwicklung der Flöhe ist holometabol, d.h. der Organismus unterliegt in der Puppe einer kompletten Reorganisation. Anschließend an die Metamorphose findet der adulte Floh durch Wahrnehmung von Bewegung, Körpertemperatur und dem ausgeatmeten Kohlendioxid seinen Wirt (Dryden und Rust, 1994; Hiepe *et al.*, 2006).

Nach der ersten Blutmahlzeit mit Hilfe seiner stechend-saugenden Mundwerkzeuge ist der Floh in der Lage sich fortzupflanzen. Etwa 24 bis 48 Stunden nach der Nahrungsaufnahme und der anschließenden Paarung können Weibchen Eier produzieren, womit der Zyklus von neuem beginnt. Die Entwicklung ist flexibel und kann in 13 Tagen abgeschlossen sein oder bis zu 190 Tage betragen. Sie ist abhängig von der Temperatur und anderen Stimuli. Die Fähigkeit des Flohs über ausgedehnte Perioden im Kokon zu überleben ist besonders wichtig, da er mobile Wirtstiere befällt, die nicht regelmäßig zu ihrem Nest oder Bau zurückkehren (Westheide und Rieger, 1996; Dryden und Rust, 1994).

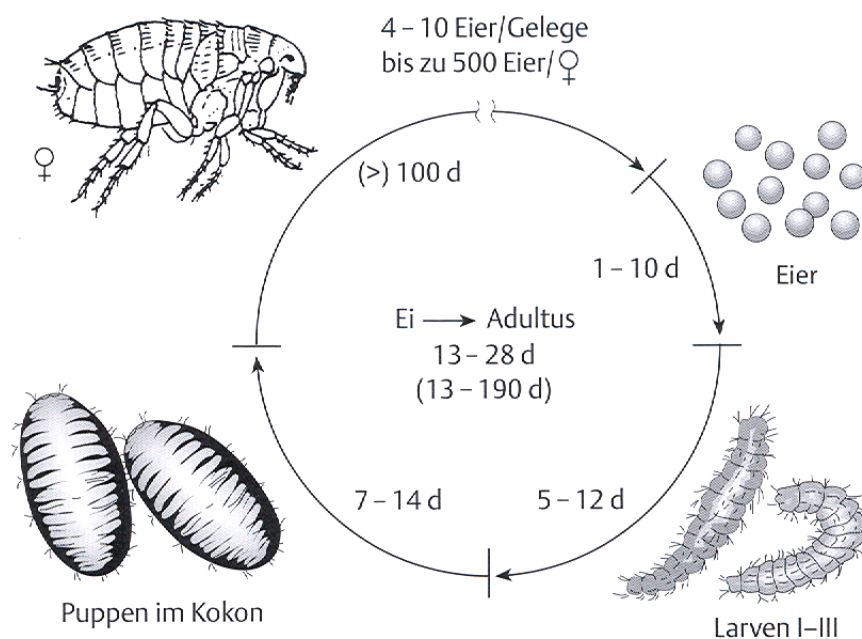


Abb. 1.2. Schematische Darstellung des Lebenszyklus von Flöhen. Die Weibchen legen Eier, welche in einem Zeitraum von 1-10 Tagen (d) schlüpfen. Die Larven entwickeln sich über drei verschiedene Larvenstadien und verpuppen sich anschließend. Nach etwa 7-14 Tagen schlüpfen die adulten Tiere aus den Kokons. (Quelle: Hiepe *et al.*, 2006).

Es sind vier verschiedene Sub-Spezies von *C. felis* bekannt: *C. felis strongylus* und *C. felis damarensis* wurden in Afrika gefunden. *C. felis orientis* ist im Südosten Asiens und in Ost-Indien verbreitet. *C. felis felis* tritt weltweit auf

und parasitiert viele Wild- und Haustier-Spezies (Lewis, 1972). Flöhe verursachen bei ihren Wirtstieren schwere allergische Dermatitis. Die Ursache ist die Injektion von antigenem Material aus den Speicheldrüsen der Flöhe. Darüber hinaus sind Flöhe Überträger von Infektionen. Zum Beispiel können durch den Flohstich Bakterien der Gattung *Rickettsia* übertragen werden. Sie vermehren sich intrazellulär und führen zu Typhus-ähnlichen Krankheitsbildern. Weiterhin werden Fadenwürmer (Filarien) und Bandwürmer (Cestoden) übertragen (Dryden und Rust, 1994). Die Pest ist eine der bedeutendsten Infektionen, die durch Flöhe (u.a. *Xenopsylla cheopis* und *Nosopsyllus fasciatus*; Hiepe *et al.*, 2006) übertragen werden kann. Der bakterielle Erreger der Pest ist *Yersinia pestis*. Das natürliche Reservoir dieses Seuchenerregers sind wilde Nagetiere, hauptsächlich Ratten. Wenn Flöhe das Blut der infizierten Nagetiere saugen, kann der Erreger auf den Ektoparasiten und anschließend weiter auf den Menschen übertragen werden. Durch rasche Vermehrung und starke Toxinproduktion im Körper führt die Infektion rasch zum Tode (Schlegel, 1992). Zusammenfassend lässt sich sagen, dass Flohstiche nicht nur lästig sind, sondern auch wirkliche Gesundheitsrisiken darstellen. Da Flöhe außerdem nicht ausschließlich auf einen Wirt festgelegt sind, sondern auch der Mensch von anderen Floharten als dem Menschenfloh (*Pulex irritans*) befallen werden kann, stellt *C. felis* nicht nur eine Gefährdung für Haustiere, sondern auch für die Haustierhalter dar (Dryden und Rust, 1994).

1.3 Signaltransduktion

Für multizelluläre Lebewesen ist die Kommunikation zwischen Zellen essentiell. Auf diese Weise erfolgt die Koordination unterschiedlichster interzellulärer Reaktionen. Der interzelluläre Informationsaustausch basiert auf Signalen, die von einer Zelle ausgesandt und von einer anderen erkannt werden. Ein Beispiel für solche Signale sind chemische Botenstoffe. Nur wenige unpolare Moleküle können in die Zelle diffundieren und regulierend in intrazelluläre Reaktionen eingreifen. Die meisten Botenstoffe sind zu groß und polar, um die Membran zu passieren (Berg *et al.*, 2003). Dagegen können verschiedenste extrazelluläre Signalmoleküle beispielsweise von membran-assoziierten Oberflächenrezeptoren detektiert werden. Chemische Moleküle, die an einen spezifischen Rezeptor binden, werden auch als Liganden bezeichnet. Durch die Bindung wird eine Konformationsänderung des Rezeptors induziert. Mit Hilfe dieser Konformationsänderung wird die Übertragung des extrazellulären Signals in die Zelle ermöglicht. Intrazellulär wird das Signal

häufig über eine Signalkaskade weiter vermittelt. Hierfür wird in den meisten Fällen die Konzentration von *second messenger* (sekundären Botenstoffen) variiert. Die wichtigsten *second messenger* sind zyklisches AMP (cAMP), zyklisches GMP (cGMP), Calciumionen, Inositol-1,4,5-trisphosphat (IP₃) und Diacylglycerin (DAG). *Second messenger* werden durch Enzyme produziert bzw. durch Aktivierung von Membrankanälen konzentriert. Dabei können diese Enzyme und Membrankanäle eine Verstärkung des Signals vermitteln. Die Signalverstärkung ist von großer Bedeutung, da so auch ein gering konzentriertes extrazelluläres Signal in ein hoch konzentriertes intrazelluläres Signal übersetzt werden kann, um anschließend eine starke zelluläre Reaktion auszulösen (Abb. 1.3) (Nelson und Cox, 2001; Koolman und Röhm, 2002).

In vielen Fällen lösen *second messenger* die Aktivierung von Proteinkinasen aus. Diese übertragen Phosphorylgruppen von Adenosintriphosphat auf spezifische Serin-, Threonin- und Tyrosin-Reste in Proteinen. Die Phosphorylierung von Enzymen ist eine Regulationsmöglichkeit der Aktivität von Proteinen. So kann am Ende einer Signaltransduktionskaskade eine biochemische Reaktion regulativ beeinflusst werden. Mit Hilfe von Proteinphosphatasen können die Phosphorylgruppen wieder von den Enzymen entfernt werden, wodurch der Ausgangszustand wieder hergestellt wird (Koolman und Röhm, 2002).

Die Auswertungen der Genomsequenzierungsprojekte haben gezeigt, dass etwa die Hälfte der 25 größten Proteinfamilien, die im menschlichen Genom codiert sind, der Weiterverarbeitung von Informationen dient. Die größte und wichtigste Rezeptorenklasse sind die G-Protein gekoppelten Rezeptoren (Berg *et al.*, 2003).



Abb. 1.3. Prinzipien der Signaltransduktion. Ein Signal aus der Umwelt bzw. dem extrazellulären Raum wird mit Hilfe eines Oberflächenrezeptors von der Zelle detektiert. Anschließend wird diese Information in die Zelle übertragen. Bei dieser Übertragung kommt es in den meisten Fällen zu einer Verstärkung des Signals. Das intrazelluläre Signal löst anschließend weitere Reaktionen aus oder ist an der Regulation biochemischer Prozesse beteiligt. (Quelle: geändert nach Berg *et al.*, 2003).

1.4 G-Protein gekoppelte Rezeptoren

G-Protein gekoppelte Rezeptoren (G-protein coupled receptors, GPCRs) übertragen extrazelluläre Signale in die Zelle. Sie sind in der Zellmembran lokalisiert und durchspannen diese mit sieben Transmembran-Helices. An einen Rezeptor können agonistische oder antagonistische Liganden binden. Ein Agonist löst eine Rezeptorantwort aus und führt zur Aktivierung eines Signaltransduktionsweges. Dagegen verhindert ein Antagonist die Bindung des Agonisten direkt (kompetitiv) oder indirekt (allosterisch) (Berg *et al.*, 2003; Böhm *et al.*, 2002). Beispiele für Agonisten von GPCRs sind Duftstoffe, Geschmackstoffe, Hormone, Neurotransmitter, biogene Amine, Aminosäuren, Ionen, Lipide, Peptide und Proteine sowie andere chemische Substanzen (Krauss, 2001). Nach der spezifischen Bindung eines Agonisten ändern die Rezeptoren ihre Konformation und aktivieren intrazellulär gekoppelte G-Proteine. Diese bestehen in den meisten Fällen aus drei Untereinheiten α , β

und γ und werden deshalb auch als heterotrimere G-Proteine bezeichnet (im Gegensatz zu kleinen (monomeren) G-Proteinen) (Abb. 1.4) (Böhm *et al.*, 2002). G-Proteine können GTP und GDP binden, wobei die GDP-gebundene Form inaktiv ist. Die Aktivierung des Rezeptors verursacht einen Austausch von GDP gegen GTP an der α -Untereinheit des G-Proteins. Durch die Bindung des GTP wird der G-Protein-Komplex instabil und die Konformation des heterotrimeren G-Proteins ändert sich, was zu einer Dissoziation in die α - und die $\beta\gamma$ -Untereinheit führt. Die aktivierten G-Proteine übertragen die Signale an weitere Proteine. Häufig sind ganze Signalkaskaden an einer intrazellulären Antwort beteiligt. Für die Inaktivierung des G-Proteins spaltet die intrinsische GTPase der α -Untereinheit das gebundene GTP in GDP und Pyrophosphat. Die α -Untereinheit lagert sich wieder mit der $\beta\gamma$ -Untereinheit zusammen und das G-Protein kann erneut an einen GPCR koppeln (Abb. 1.5) (Krauss, 2001).

Es gibt verschiedene $G\alpha$ -Proteine, welche mit einem Suffix unterschieden werden: G_i , G_o , G_s und G_{12} . Im Fall einer Aktivierung des GPCRs führen diese $G\alpha$ -Proteine zu unterschiedlichen intrazellulären Reaktionen. G_i wirkt inhibierend auf die Adenylatzyklase und verursacht einen Abfall der cAMP-Konzentration, wohingegen G_s stimulatorisch auf dieses Enzym wirkt und somit zu einem Anstieg der cAMP-Konzentration führt. Dagegen bewirken G_o -Proteine die Erhöhung des intrazellulären Calciumspiegels (Abb. 1.4). Darüber hinaus gibt es noch die kleinen G-Proteine ($G_{12/13}$). Zu ihnen zählen die Ras-, Rho-, Arf-, Rab- und Ran-Proteine. Diese G-Proteine sind Monomere, die über divergente Evolution entstanden sind. Sie sind an Zellfunktionen wie Wachstum, Differenzierung, Beweglichkeit, Cytokinese und dem Substanztransport innerhalb der Zelle beteiligt (Berg *et al.*, 2003). Am Ende der Signaltransduktionskaskade der kleinen G-Proteine steht die Regulation von serin/threoninspezifischen Proteinkinasen, welche wiederum andere Enzyme regulieren.

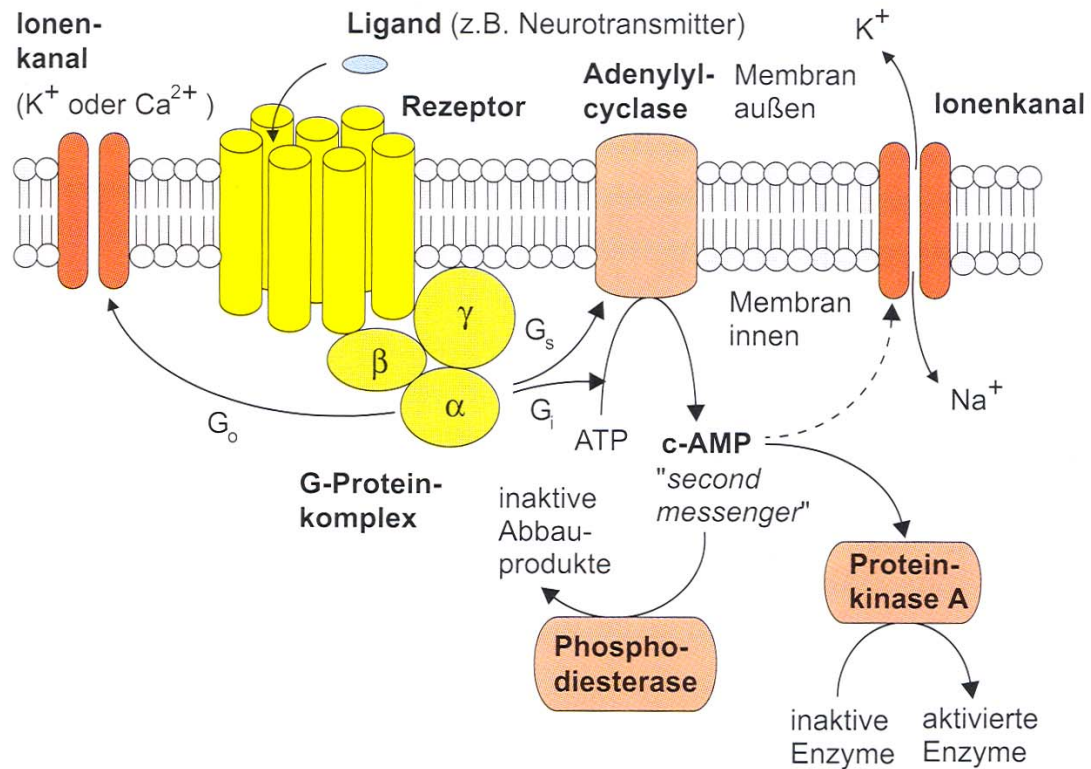


Abb. 1.4. G-Protein gekoppelte Rezeptoren. Die Grafik zeigt die Funktion eines GPCRs. Die sieben Zylinder stellen die sieben Transmembran-Helices dar. Die extra- und intrazellulären Schleifen, die diese Helices verbinden, sind nicht eingezeichnet. Nach Bindung eines Agonisten erfolgt eine Konformationsänderung zunächst im Rezeptor und anschließend im G-Protein, was zum Austausch des gebundenen GDPs durch GTP führt. Darauf hin dissoziiert die α -Untereinheit des G-Proteins. Liegt ein G_s -Protein vor, so wird die Adenylylcyclase aktiviert, welche den *second messenger* cAMP produziert. Der *second messenger* kann über Proteinkinase A die Aktivierung weiterer Zielproteine bewirken oder einen Ionenkanal öffnen. Das Enzym Phosphodiesterase spaltet cAMP und führt so zu einem Abstoppen der Reaktion. G_i -Proteine hemmen die Adenylylcyclase und führen zu einer Absenkung der cAMP Konzentration. Andere GPCRs wirken über G_o -Proteine, welche über Ionenkanäle z.B. die Calcium Konzentration steuern (Böhm *et al.*, 2002)

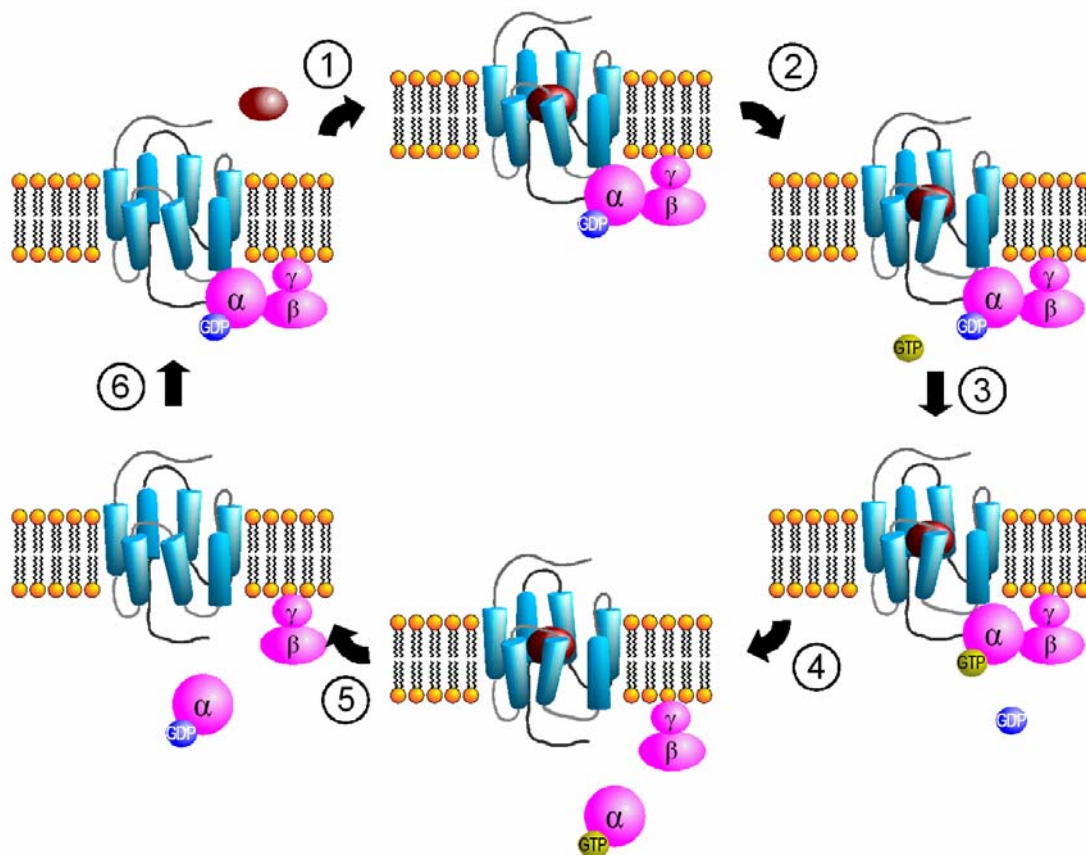


Abb. 1.5. Aktivierungszyklus von G-Proteinen durch G-Protein gekoppelte Rezeptoren. (1) Ligandenbindung, (2) Aktivierung des Rezeptors, (3) Aktivierung des G-Proteins durch Austausch von GDP gegen GTP, (4) Dissoziation des G-Proteins und Signaltransduktion, (5) Inaktivierung des G-Proteins durch hydrolytische Spaltung von GTP zu GDP und anschließende Zusammenlagerung der Untereinheiten des G-Proteins (6) Bindung des G-Proteins an den Rezeptor. (Quelle: Sven Jähnichen, <http://de.wikipedia.org/wiki/Bild:GPCR-Zyklus.png>; Krauss, 2001)

Im humanen Genom sind mehr als 800 Gene enthalten, die für GPCRs codieren. Sie werden in drei Klassen unterteilt: Klasse I sind Rhodopsin-ähnliche Rezeptoren, die durch biogene Amine (Dopamin, Serotonin, Histamin usw.) und kleine Peptide (Chemokine und Neuropeptide usw.) aktiviert werden. Die Liganden werden mit Hilfe der Transmembran-Helices gebunden. Die Klasse II besteht aus Sekretin/Glucagon-ähnlichen Rezeptoren. Diese zeichnen sich durch einen großen N-Terminus aus, welcher Protein-Hormone (z.B. Glucagon) als Liganden bindet. Klasse III enthält metabotroph-ähnliche Rezeptoren, welche geladene Liganden geringen Molekulargewichts (z.B. Glutamat, Calcium und γ -Aminobuttersäure usw.) binden können. Die Bindung erfolgt mit Hilfe einer sehr langen N-terminalen Domäne, welche aus zwei symmetrischen Flügeln besteht (Abb. 1.6) (Bissantz *et al.*, 2004).

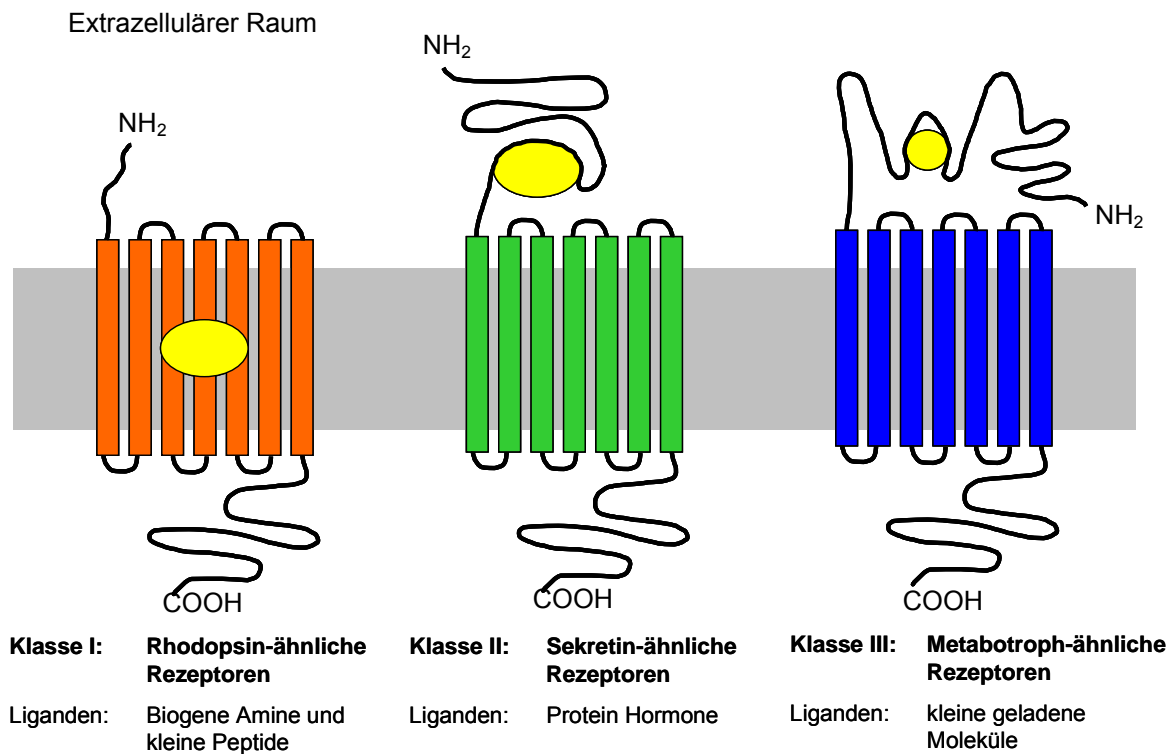


Abb. 1.6. Klassifizierung humaner GPCRs. Die über 800 humanen GPCRs werden in drei Klassen eingeteilt. Rhodopsin-ähnliche Rezeptoren zeichnen sich durch eine kleine N-terminale Domäne und eine große C-terminale Domäne aus. Die Bindung des Liganden erfolgt mit den Transmembran-Helices. Sekretin-ähnliche Rezeptoren besitzen einen wesentlich größeren N-Terminus, welcher die Liganden bindet, sowie eine große intrazelluläre C-terminale Domäne. Metabotroph-ähnliche Rezeptoren erkennen den Liganden mit einer sehr großen N-terminalen Domäne, die aus zwei symmetrischen Flügeln besteht. Auch diese Rezeptoren besitzen eine große C-terminale Domäne. (Quelle: nach Bissantz *et al.*, 2004).

Die Genomprojekte der Insekten *Drosophila melanogaster* und *Anopheles gambiae* und die anschließende Annotierung haben gezeigt, dass die für *Homo sapiens* beschriebenen GPCR-Familien auch in den beiden Insekten zu finden sind. Allerdings weisen die GPCR-Familien dieser Insekten zum Teil weniger Mitglieder auf (Brody und Cravchik, 2000; FlyBase; <http://flybase.bio.indiana.edu>; Hill *et al.*, 2002). In *D. melanogaster* sind nahezu 300 GPCRs bekannt (Brody und Cravchik, 2000 und FlyBase; <http://flybase.bio.indiana.edu>), welche in vier Klassen eingeteilt werden: Rhodopsin-ähnliche, Sekretin-ähnliche und metabotroph-ähnliche Rezeptoren wie für die humanen GPCRs und zusätzlich die atypischen sieben- transmembran-Proteine. Die Klassifizierung basiert auf Strukturvorhersagen, Sequenzanalysen mit dem

Hidden Markov Modell und Sequenzvergleichen mit BLAST (Brody und Cravchik, 2000).

1.5 GPCRs als *Drug Targets*

Häufig führt die Fehlfunktion von Biomolekülen wie Enzymen, Rezeptoren oder Ionenkanälen zur Entstehung von Krankheiten. Um diese Störungen auszugleichen, versucht man spezifische Wirkstoffe zu entwickeln, die als Medikamente eingesetzt werden können. Die Zielproteine, mit denen die Medikamente interagieren, werden als *drug targets* bezeichnet. GPCRs sind als Teil der Signaltransduktion an vielen regulierenden Prozessen beteiligt. Diese regulierende Funktion der GPCRs kann zur Kompensation von molekularen Krankheitsursachen genutzt werden, indem mit Hilfe von Antagonisten bzw. Agonisten spezifisch Einfluss auf die GPCRs genommen wird. Etwa 30% aller humanen *drug targets* sind GPCRs (Hopkins und Groom, 2002). Beispiele für solche Medikamente sind unter anderem Beta-blocker, Neuroleptika, Antihistaminika, Opioide und Sympathomimetika (ROTE LISTE® 2006; Arzneimittelsverzeichnis für Deutschland; <http://www.rote-liste.de/Online>). Die Tabelle 1.1 stellt eine Übersicht über Wirkstoffe dar, die an humane G-Protein gekoppelte Rezeptoren angreifen. Am Beispiel der Acetylcholinergika wird das Prinzip eines Medikaments erläutert, dessen *drug target* ein GPCR ist:

Fünf verschiedene muscarinische Acetylcholinrezeptoren (M1, M2, M3, M4 und M5) sind für den Menschen beschrieben (Koolman und Röhm, 2002). Die Namensgebung basiert auf dem agonistischen Liganden Muscarin, welches ein Alkaloid des Fliegenpilzes (*Amanita muscaria*) ist. Der antagonistische Wirkstoff Atropin (Alkaloid aus der Tollkirsche, *Atropa belladonna*) wird als Medikament z.B. zur Beschleunigung der Herzschlagfrequenz und zur Senkung des Tonus der glatten Muskulatur in Bronchien und im Urogenitaltrakt eingesetzt. (ROTE LISTE® 2006; Arzneimittelsverzeichnis für Deutschland; <http://www.rote-liste.de/Online>). So kann über GPCRs regulierend in den Organismus eingegriffen werden.

Im Bereich der Veterinärmedizin werden ebenfalls GPCRs als *drug targets* für die Bekämpfung von Schädlingen genutzt. Das Ziel von antiparasitischen Wirkstoffen ist die Tötung der adulten Schadinsekten. Das Akarizid Amitraz ist als GPCR-aktiver Wirkstoff beschrieben (Baxter und Barker, 1999). Zecken wie z.B. die Rinderzecke *Boophilus microplus* verursachen weltweit großen Schaden in der Viehzucht, indem sie bei Rindern Anämien auslösen, ihnen physischen Schaden zufügen und Krankheitserreger übertragen. Seit 1971 werden Formamidine wie Amitraz als Akarizid eingesetzt (Reid, 1989). Kurz

nach der Aufnahme von Amitraz werden Zecken hyperaktiv, lösen sich von den Rindern und fallen vom Wirt, ohne sich wieder anhaften zu können (Roulston *et al.*, 1971). Bei niedrigen Dosen Amitraz sterben die Parasiten nicht, sondern legen eine verringerte Zahl Eier, aus denen außerdem weniger Larven schlüpfen (Knowles und Roulston, 1973). Werden hohe Dosen verwendet, sterben die Zecken. Die primären *targets* von Amitraz sind vermutlich biogene Aminrezeptoren, im Besonderen der adrenerge sowie die octopaminergen Rezeptoren (Hollingworth und Lund 1982). Octopamin ist ein biogenes Amin, das als Neurotransmitter, Neuromodulator und Neurohormon in Invertebraten fungiert (Axelrod und Saavedra, 1977; Orchard, 1982). Da *Mammalia* den Octopamin-Rezeptor nicht besitzen, stellt dieser ein exzellentes *target* für Akarizide dar. Diese können am Octopamin-Rezeptor der Zecken angreifen, ohne einen orthologen Rezeptor der Wirtstiere zu beeinflussen (Evans und Robb, 1993).

Amitraz besitzt bei Akariden agonistische Wirkung auf octopaminerge Systeme. Studien zeigen, dass der Octopamin-Rezeptor in Insekten ebenfalls das *target* von Amitraz ist (Hashemzadeh *et al.*, 1985; Baxter und Barker, 1999). α -adrenerge Antagonisten wie z.B. Phentolamin inhibieren die Wirkung von Octopamin. Es wurde gezeigt, dass diese Antagonisten auch die agonistische Wirkung von Amitraz blockieren. Dieses Ergebnis weist darauf hin, dass Amitraz auch in Insekten auf Octopamin-Rezeptoren wirkt (Hiripi *et al.*, 1994; Roeder 1995). Flöhe sind neben Zecken für die Veterinärmedizin die wichtigsten Ektoparasiten (Rust, 2005). Obwohl Flöhe zu den Insekten zählen, besitzt Amitraz in diesem Fall allerdings nur eine geringe Wirkung (Folz *et al.*, 1986). Da GPCRs sowohl im menschlichen Organismus als auch in Arthropoden an zahlreichen regulierenden Prozessen beteiligt sind, stellt sich die Frage, ob GPCRs möglicherweise auch im veterinärmedizinischen Bereich *drug targets* für weitere Wirkstoffe darstellen.

Für *C. felis* sind bisher keine GPCRs beschrieben. Eine bioinformatische Analyse aller bekannten Insekten GPCRs von *D. melanogaster* und *A. gambiae* (Brody und Cravchik, 2000; FlyBase; <http://flybase.bio.indiana.edu>; Hill *et al.*, 2002) sowie von EST Sequenzen und genomischen Sequenzen von Insekten ergab, dass die Familie der Dopamin-Rezeptoren hoch konserviert ist. Daher wurde diese GPCR-Familie ausgewählt, um die ersten GPCRs von *C. felis* zu identifizieren.

Tab. 1.1. Wirkstoffe, welche an humanen GPCRs angreifen.

Arzneimittelgruppe	Wirkstoffe	Indikation	Rezeptoren	Erläuterungen
Alphablocker	Prazosin, Tamsulosin	Hypertonie, Prostatahyperplasie	α_1 -Adrenorezeptoren	Senken als Antagonisten den Tonus der glatten Muskulatur in Blutgefäßen und im Urogenitaltrakt.
Acetylcholinergika	Atropin	Harninkontinenz, Asthma, Herzrhythmusstörungen	Muskarinische Acetylcholinrezeptoren	Senken als Antagonisten den Tonus der glatten Muskulatur in Bronchien und im Urogenitaltrakt. Hemmen die Herzfrequenz-senkende Wirkung von Acetylcholin.
Betablocker	Atenolol, Metoprolol	Hypertonie, Herzinsuffizienz, koronare Herzkrankheit	β_1 -Adrenorezeptoren	Senken als Antagonisten unter anderem die Herzfrequenz.
Dopamin-Agonisten	Pergolid, Cabergolin, Pramipexol, Ropinirol	Parkinson, Restless-Legs-Syndrom	Dopamin-Rezeptoren	Agonisten aktivieren Dopamin-Rezeptoren.
H ₁ -Antihistaminika	Diphenhydramin, Loratadin, Cetirizin	Allergische Reaktionen	H ₁ -Rezeptoren	Inhibieren als Antagonisten die Wirkung von Histamin, das bei allergischen Reaktionen ausgeschüttet wird.
H ₂ -Antihistaminika	Ranitidin, Famotidin, Cimetidin	Kontrolle der Magensäureproduktion (Refluxkrankheiten, Magengeschwüre)	H ₂ -Rezeptoren	Inhibieren als Antagonisten die Histaminvermittelte Freisetzung von Magensäure.
Neuroleptika	Haloperidol, Risperidon, Clozapin, Olanzapin	Schizophrenie	Dopamin und Serotonin Rezeptoren	Als Antagonisten inhibieren sie Dopamin- und Serotonin-Rezeptoren und besitzen antipsychotische Wirkung.
Opioide	Morphin, Codein, Fentanyl, Loperamid	Schmerzen, Anästhesie, Husten, Durchfall	Opioidrezeptoren	Wirken als Agonisten.
Sartane	Losartan, Candesartan, Irbesartan, Valsartan, Telmisartan	Hypertonie, Herzinsuffizienz, koronare Herzkrankheit	Angiotensin ₁ -Rezeptor (AT ₁)	Senken als Antagonisten des Angiotensins II an AT ₁ -Rezeptoren den Tonus der glatten Muskulatur in Blutgefäßen.
Triptane	Sumatriptan, Naratriptan, Zolmitriptan	Migräne	5HT ₁ -Rezeptoren	Wirken agonistisch auf 5HT ₁ -Rezeptoren.

Die Informationen wurden aus verschiedenen Quellen zusammengetragen: Wise *et al.*, 2002; <http://www.gpcr.org/7tm/ligand/Seeman/index.html> und ROTE LISTE® 2006; Arzneimittelsverzeichnis für Deutschland; <http://www.rote-liste.de/Online>

1.6 Der Ligand Dopamin

Der Neurotransmitter Dopamin (Abb. 1.7) bindet als Ligand an Dopamin-Rezeptoren und aktiviert diese. Dopamin ist ein biogenes Amin und zählt zu den Katecholaminen. Die Biosynthese beginnt mit der Hydroxylierung der Aminosäure Tyrosin zu Dihydroxyphenylalanin (L-DOPA). Anschließend erfolgt eine Decarboxylierung zu Dopamin (Abb. 1.8).

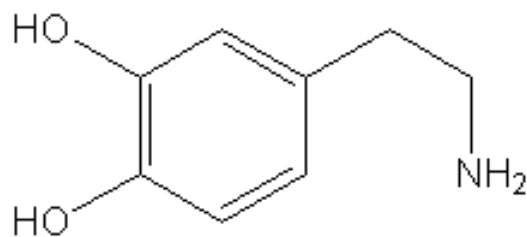


Abb. 1.7. Strukturformel von Dopamin. Das biogene Amin Dopamin zeichnet sich durch zwei Hydroxyl- sowie eine Aminogruppe aus und zählt zu den Katecholaminen.

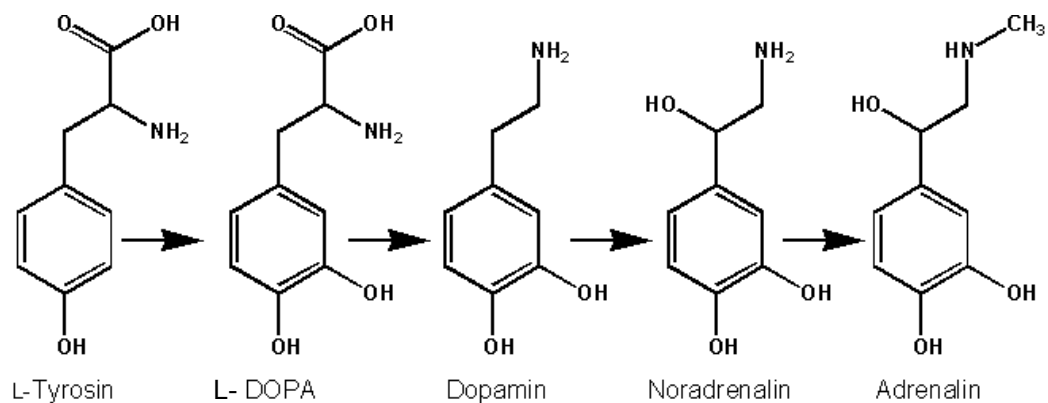


Abb. 1.8. Biosynthese von Dopamin. Ausgehend von der Aminosäure Tyrosin wird durch die Enzyme Tyrosin-Hydroxylase und eine Decarboxylase Dopamin synthetisiert. Weitere Modifikationen des Moleküls führen zu Noradrenalin und Adrenalin (Quelle: http://de.wikipedia.org/wiki/Bild:Biosynthese_Adrenalin.png; Voet und Voet, 1994).

1.7 Dopamin-Rezeptoren

1.7.1 Klassifizierung und Struktur

Die Rezeptoren für den Neurotransmitter Dopamin sind GPCRs und besitzen die typische heptahelicale Struktur (Missale *et al.*, 1998). Im Menschen sind Dopamin-Rezeptoren in Neuronen und glatten Muskelzellen von Nierengefäßen lokalisiert. Man unterscheidet fünf Dopamin-Rezeptoren in *H. sapiens*, welche in zwei Gruppen unterteilt werden. Zunächst wurde die Existenz zweier Dopamin-Rezeptoren (D1 und D2) basierend auf Experimenten mit Gehirnregionen vorhergesagt (Kebabian und Calne, 1979). Diese Rezeptoren konnten später identifiziert und charakterisiert werden (Dearry *et al.*, 1990; Monsma *et al.*, 1990; Zhou *et al.*, 1990; Gingrich und Caron, 1993; Bunzow *et al.*, 1988). Der Rezeptor D1 erhöht bei Stimulation mit Dopamin den intrazellulären cAMP-Spiegel durch die Aktivierung der Adenylatzyklase, wohingegen D2 den cAMP-Spiegel senkt. Erst später wurden die Rezeptoren D₃ (Sokoloff *et al.*, 1990), D₄ (Van Tol *et al.*, 1991) und D5/D1b (Sunahara *et al.*, 1991; Tiberi *et al.*, 1991) identifiziert. Da D3 und D4 wie D2 den cAMP-Spiegel senken, wurden diese Rezeptoren als D2-ähnliche Rezeptoren zusammengefasst. Die Rezeptoren D1 und D5 erhöhen den cAMP-Spiegel und werden als D₁-ähnliche Rezeptoren bezeichnet (Missale *et al.*, 1998).

Abbildung 1.9 zeigt die Struktur von D1-ähnlichen Dopamin-Rezeptoren. Es wurde beschrieben, dass an der Bindung des Dopamins zwei Serin-Reste der Transmembran-Helix 5, ein Phenylalanin-Rest der Transmembran-Helix 6 und ein Aspartat-Rest der Transmembran-Helix 3 beteiligt sind (Strader *et al.*, 1995). Im Unterschied zu D1-ähnlichen Rezeptoren besitzen D2-ähnliche Rezeptoren einen kürzeren C-Terminus und eine größere dritte intrazelluläre Schleife (Missale *et al.*, 1998).

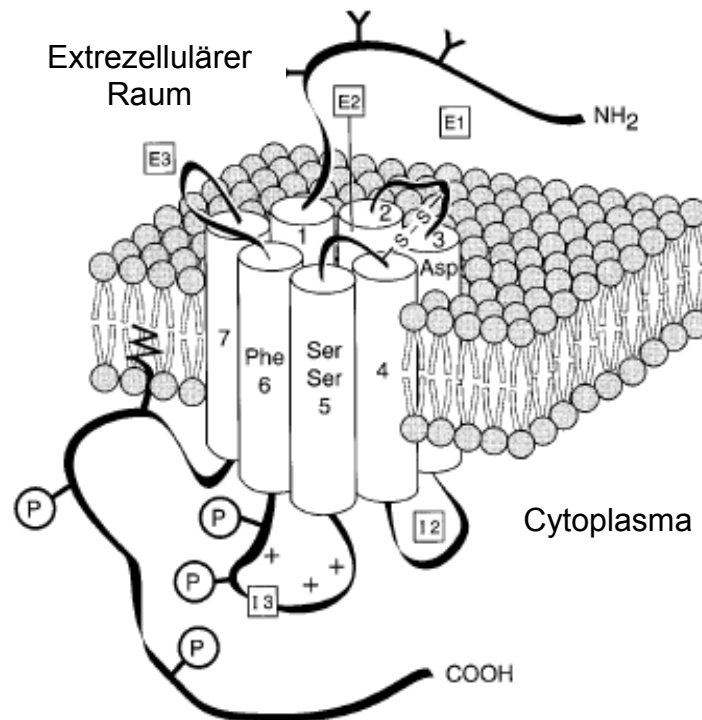


Abb. 1.9. Struktur eines D1-ähnlichen Dopamin-Rezeptors. Die Abbildung zeigt die charakteristischen sieben Transmembran-Helices, zwei der drei intrazellulären Schleifen, die drei extrazellulären Schleifen sowie den N- und den C-Terminus. Im Gegensatz zu D1-ähnlichen Rezeptoren zeichnen sich D2-ähnliche Rezeptoren durch einen kürzeren COOH-Terminus und eine größere dritte intrazelluläre Schleife aus. An der Bindung von Dopamin beteiligte Aminosäuren sind in den verschiedenen Transmembran-Helices angezeigt. (P) Potentielle Phosphorylierungsstellen, (Y) potentielle Glycosylierungsstellen am N-Terminus, (E1-E3) extrazelluläre Schleifen, (1-7) Transmembran-Helices, (I2-I3) intrazelluläre Schleifen. (Quelle: Missale *et al.*, 1998).

Für die Insekten *D. melanogaster*, *Apis mellifera* und *A. gambiae* sind jeweils drei verschiedene Dopamin-Rezeptoren beschrieben (Tab. 1.2). Generell lassen sich auch diese drei Rezeptoren in die D1- bzw. D2-ähnlichen Klassen einteilen. Die Dopamin-Rezeptoren I und II der Insekten wurden als D1-ähnliche Rezeptoren klassifiziert und aktivieren die Adenylatzyklase, wogegen Dopamin-Rezeptoren III als D2-ähnliche Rezeptoren bezeichnet wurden und die Adenylatzyklase entsprechend inhibieren. Tabelle 1.2 zeigt die Rezeptoren der einzelnen Organismen und in welchen Systemen die Rezeptoren funktionell exprimiert wurden. Die Dopamin-Rezeptoren von *A. gambiae* sind mit Hilfe bioinformatischer Methoden vorhergesagt worden und sind bisher noch nicht kloniert und charakterisiert worden (Hill *et al.* 2002).

Tab.1.2. Dopamin-Rezeptoren der Insekten *D. melanogaster* (Dm), *A. mellifera* (Am) und *A. gambiae* (Ag).

Dopamin-Rezeptor	Genbank Accession Number	Originalbezeichnung	Expressionssystem	Literatur
DmDopRI	AAA85716	dDA1	COS7, Sf9	Gotzes <i>et al.</i> , 1994; Sugamori <i>et al.</i> , 1995
DmDopRII	Q24563	DAMB/ DopR99B	Oozyten, HEK293	Feng <i>et al.</i> , 1996; Han <i>et al.</i> , 1996
DmDopRIII	AAN15955	DD2R	HEK293	Hearn <i>et al.</i> , 2002
AmDopRI	CAA73841	AmDOP1	HEK293, Sf9, Sf21	Blenau <i>et al.</i> , 1998; Mustard <i>et al.</i> , 2003
AmDopRII	AAM19330	AmDOP2	Sf9, Sf21	Humphries <i>et al.</i> , 2003; Mustard <i>et al.</i> , 2003
AmDopRIII	AY921573	AmDOP3	HEK293	Beggs <i>et al.</i> , 2005
AgDopRI	EAA10574	GPRdop1	-	Hill <i>et al.</i> , 2002
AgDopRII	EAA06824	GPRdop2	-	Hill <i>et al.</i> , 2002
AgDopRIII	EAA09118	GPRdop3	-	Hill <i>et al.</i> , 2002

1.7.2 Funktion von Dopamin und Dopamin-Rezeptoren für den Menschen

Dopaminerge Neuronen befinden sich im Zentralnervensystem, wobei sie vor allem im Mittelhirn lokalisiert sind. Besonders häufig treten diese in der *Substantia nigra*, dem Kernkomplex des Mittelhirns, auf. Diese Neuronen projizieren normalerweise zum Striatum, wo sie von großer Bedeutung für die Kontrolle der Informationsverarbeitung durch die Basalganglien sind (Kandel *et al.*, 1996). Der Neurotransmitter Dopamin ist weiterhin auch in einigen Systemen des vegetativen Nervensystems zu finden und reguliert die Durch-

blutung innerer Organe (Missale *et al.*, 1998). Unter anderem beeinflusst Dopamin die extrapyramidale Motorik und spielt eine wichtige Rolle bei Suchterkrankungen. So kommt es beim Gebrauch von verschiedenen Rauschgiften zur erhöhten Ausschüttung von Endorphinen, Dopamin, Serotonin und γ -Aminobuttersäure. Die Störung des Dopaminhaushalts ist zum Teil auch für die Entzugssymptome verantwortlich und steht in Verbindung mit zahlreichen weiteren Erkrankungen wie Schizophrenie und der Parkinson Krankheit (Kandel *et al.*, 1996). Die letztgenannte Erkrankung wird aufgrund ihrer enormen Bedeutung und der wichtigen Rolle von Dopamin näher erläutert:

Die Parkinson Krankheit ist eine langsam fortschreitende neurologische Erkrankung. Sie zählt zu den degenerativen Erkrankungen des extrapyramidalmotorischen Systems und wurde erstmals von dem englischen Arzt James Parkinson im Jahre 1817 beschrieben (Parkinson, 1817). Die ersten Symptome der Erkrankung treten meist zwischen dem 50. und 60. Lebensjahr auf. Zum Teil wird Parkinson vererbt oder durch Medikamente induziert. Am häufigsten ist die idiopathische Parkinson-Erkrankung, bei der die Ursache nicht zu erklären ist. Ohne erkennbaren Anlass sterben die dopaminergen Nervenzellen in der *Substantia nigra* ab und führen zur Erkrankung (Kandel *et al.*, 1996). Es besteht aber nicht nur ein Mangel an Dopamin, sondern es finden auch Verschiebungen im Verhältnis zu anderen Überträgerstoffen wie Glutamat und Acetylcholin statt. Durch die Verminderung von Dopamin kommt es z.B. zu einem funktionellen Überschuss an Glutamat. Das für die Erkrankung charakteristische Zittern und die erhöhte Muskelspannung gehen wahrscheinlich vor allem auf den Überschuss von Acetylcholin zurück. Erst wenn ca. 80% der dopaminergen Zellen abgestorben sind, treten die ersten Symptome auf. Typische Symptome sind der Rigor (Muskelsteifheit, Rigidität), der Ruhetremor (Zittern von Armen und Beinen im Ruhezustand) und die Akinese (Verarmung der Mimik, verwaschene Sprache, vermindertes Schlucken und daraus resultierend ein Speichelfuß). Zurzeit gibt es keine Behandlung, die die Ursachen des Parkinson-Syndroms bekämpft. Die Degeneration der Nerven kann nicht aufgehalten werden. Lediglich die Symptome können behandelt werden. Die Behandlung erfolgt in den meisten Fällen mit einer Vorstufe des Dopamins, dem L-Dopa (Levodopa; siehe Abb. 1.8) (Kandel *et al.*, 1996; ROTE LISTE® 2006, Arzneimittelsverzeichnis für Deutschland; <http://www.rote-liste.de/> Online). Dopamin ist als Medikament ungeeignet, da es über die Niere sofort wieder ausgeschieden wird. Im Gegensatz zum Dopamin kann L-Dopa die Blut-Hirn-Schranke passieren. Im Hirn wird dann L-Dopa in Dopamin umgewandelt und kann bis zu einem

gewissen Grad das fehlende Dopamin ersetzen. Allerdings treten nach mehrjähriger Einnahme unwillkürliche Bewegungen (Dyskinesien bzw. Hyperkinesen) und Schwankungen (Fluktuationen) der Beweglichkeit (*on-off*-Phänomene) auf, da dieser Agonist nur eine Wirkzeit von wenigen Stunden hat (Kandel *et al.*, 1996). Deswegen werden am Anfang der Behandlung häufig länger wirkende Dopaminagonisten eingesetzt, z.B. Mutterkornalkaloide (Pergolid, Cabergolin, Bromocriptin und Lisurid) sowie die neueren selektiven D2-ähnlichen Rezeptoragonisten (Pramipexol, Ropinirol und Rotigotin) (Radad *et al.*, 2005). Zusätzlich wird mit MAO-B-Hemmern, die das Enzym Monoaminoxydase B inhibieren, der Abbau von Dopamin im Gehirn verlangsamt. Hemmstoffe der Catechol-O-Methyl-Transferase (COMT-Hemmer) inhibieren den Abbau des L-Dopa. Durch die Kombination von Levodopa mit MAO-B- und COMT-Hemmern ist eine geringere Dosis an L-Dopa ausreichend und die Nebenwirkungen werden verringert. Darüber hinaus wird ein Decarboxylasehemmer (Carbidopa oder Benserazid) den L-Dopa-Präparaten zugesetzt, um einen Abbau vor Passage der Blut-Hirn-Schranke zu verhindern. Die ältesten Antiparkinson-Präparate sind Anticholinergika, welche seit 1950 synthetisch hergestellt werden. Ihr Wirkmechanismus besteht darin, dass sie das relative Überwiegen von Acetylcholin gegenüber Dopamin vermindern und damit beide Neurotransmitter wieder in ein Gleichgewicht bringen, wenngleich auf einem niedrigeren Niveau. Da diese Präparate zahlreiche Nebenwirkungen verursachen, werden sie seltener verordnet (<http://www.rote-liste.de>; Kandel *et al.*, 1996; Voet und Voet, 1994; ROTE LISTE® 2006, Arzneimittelsverzeichnis für Deutschland; <http://www.rote-liste.de/Online>).

1.7.3 Funktion von Dopamin und Dopamin-Rezeptoren in Insekten

Obwohl die Rolle von Dopamin und Dopamin-Rezeptoren im Menschen aufgrund zahlreicher Erkrankungen wie z.B. Parkinson sehr gut untersucht wurde, ist über die Funktion in Insekten bisher wenig bekannt. Lediglich für den Modell-Organismus *D. melanogaster* wurde beschrieben, dass Dopamin in Verbindung mit der Fortbewegung (Yellman *et al.*, 1997), der Fruchtbarkeit (Neckameyer, 1996, Pendleton *et al.*, 1996), dem Sexualverhalten (Neckameyer, 1998) und dem Erinnerungsvermögen steht (Tempel *et al.*, 1984, Neckameyer, 1998). Allerdings sind für Dopamin-Rezeptoren keine Mutanten in *D. melanogaster* beschrieben, die genaueren Aufschluss über die *in vivo* Funktion geben könnten. Alternativ zu einem solchen *knock-out*-Ansatz

ist es möglich, mit transgenem RNA *interference* spezifisch Gene der Fruchtfliege in ihrer Expression zu reprimieren (Kennerdell und Carthew, 2000). Ein Haarnadelkonstrukt eines Genfragments (*inverted repeat*) wird dabei mittels Keimbahntransformation stabil ins Genom integriert. Bei der Expression dieses Konstruktes in den Fliegen entsteht dann RNA, die sich mittels Basenpaarung zu einer Haarnadelschleife zusammenlagert (Kennerdell und Carthew, 2000; Giordano *et al.*, 2002). Diese doppelsträngige RNA induziert dann genspezifisch die Degradation der mRNA und führt so zu einer stark verringerten Expression eines Gens (Hutvagner und Zamore, 2002). Ein solcher genspezifischer *knock-down*-Ansatz ermöglicht die Analyse der *in vivo* Funktion des Genprodukts in *D. melanogaster* und kann zur Beurteilung der Bedeutung eines Gens herangezogen werden (Lee und Carthew, 2003). Beispielsweise können Letalität oder phänotypische Veränderungen der Fliegen auftreten. Vergleichbare Analysen sind zurzeit in *C. felis* nicht durchführbar, aber eine analoge Übertragung der Ergebnisse von *D. melanogaster* auf den Floh ist möglich.

1.8 Strukturbasierte Identifikation von neuen Liganden für Zielproteine

Die Entwicklung neuer antiparasitischer Medikamente wird unter anderem nach dem *target based approach* (Medikamentenentwicklung am Zielprotein) durchgeführt. Es werden einzelne Gene identifiziert, deren Genprodukte für das Überleben dieser Parasiten essentiell sind. Anschließend werden spezifische chemische Antagonisten oder Agonisten gegen diese Genprodukte entwickelt (z.B. Enzyminhibitoren) und auf ihre Wirksamkeit getestet (Selzer *et al.*, 2000; Selzer *et al.*, 2004; Hiepe *et al.*, 2006, Selzer, S. 422-427). Die Identifikation von antagonistischen bzw. agonistischen Liganden kann prinzipiell über zwei Wege erfolgen. Zum einen können Wirkstoff-Bibliotheken direkt am *target* getestet werden. Hierfür wird das *target* Protein in einem *in vitro* Modell (z.B. Zellkultur) funktionell exprimiert und eine große Anzahl an Wirkstoffen wird in einem *high-throughput-screening* getestet. Zum anderen können mit Hilfe von chemoinformatischen Methoden die zu testenden Wirkstoffe zunächst einmal *in silico* gefiltert werden. Hierfür wird ein Strukturmodell des *target* Proteins erstellt, wobei realistische dreidimensionale Molekülstrukturen berechnet werden. Die Darstellung und Bearbeitung dieser Modelle wird auch als *Molecular Modelling* bezeichnet. Bei der Erstellung

eines Modells sollten möglichst experimentell erworbene Daten verwendet werden (Böhm *et al.*, 2002).

Für die Aufklärung von chemischen Strukturen sind vor allem zwei Verfahren, die Kristallstrukturanalyse und die hochauflösende NMR-Spektroskopie von Bedeutung. Das erste Verfahren ist die ältere Methode: Sie geht auf ein Experiment von Max Laue im Jahr 1912 zurück. Mit Hilfe von Kupfersulfat-Kristallen konnte die Wellennatur der Röntgenstrahlen demonstriert werden. Gleichzeitig wurde so der Gitteraufbau von Kristallen bewiesen. Ein Jahr später konnte mit dieser Methode die Kristallstruktur von Kochsalz bestimmt werden. Bei der Kristallstrukturanalyse erfahren Röntgenstrahlen eine Beugung an Kristallen. Mit Hilfe der Beugungserscheinungen wird die räumliche Anordnung der Atome im Kristall abgeleitet. Das Verfahren wurde über die Jahre hinweg immer weiter verfeinert. In letzter Zeit erweist sich die Elektronenmikroskopie als eine weitere, sehr leistungsfähige Methode zur Strukturaufklärung membrangebundener Proteine (Böhm *et al.*, 2002).

Realistische Strukturmodelle von GPCRs sind von großem Interesse für die Entwicklung neuer Medikamente. Zuerst konnte die Kristallstruktur des Photoreaktionszentrums des Bakteriums *Rhodospseudomonas viridis* aufgeklärt werden (Deisenhofer *et al.*, 1984). Einen Zugang zum strukturellen Aufbau von 7-Transmembran-Rezeptoren ermöglichte die 1990 publizierte 3D-Struktur des Bacteriorhodopsins (Henderson *et al.*, 1990). Henderson gelang die Strukturaufklärung mit Hilfe der hochauflösenden Elektronenmikroskopie an zweidimensionalen Kristallen. Bacteriorhodopsin selbst ist kein GPCR, sondern eine Protonenpumpe, die an einer Membran einen pH-Gradienten aufbaut. Es besitzt allerdings eine GPCR-typische Struktur mit sieben Transmembran-Helices. Im Jahre 2000 konnte die Kristallstruktur von Rinder-Rhodopsin mit einer Auflösung von 0,28 nm (entspricht 2,8 Ångström) bestimmt werden (Abb. 1.10) (Palczewski *et al.*, 2000).

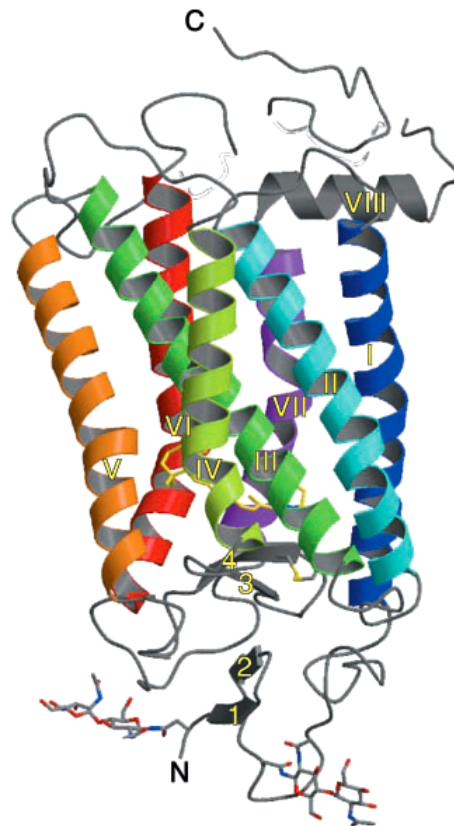


Abb. 1.10. Struktur von Rinder-Rhodopsin. Im Jahr 2000 konnte erstmals die dreidimensionale Struktur eines GPCRs durch Kristallstrukturanalyse aufgeklärt werden. (Quelle: Palczewski *et al.*, 2000)

Diese neuen Daten zeigen eine enge strukturelle Beziehung zum Bacteriorhodopsin. Rinder-Rhodopsin, ein lichtempfindliches Chromoprotein, besteht aus 348 Aminosäuren und ist in Membranscheiben der Photorezeptoren, den Stäbchen-Zellen, lokalisiert. Sein Proteinanteil Opsin enthält den Aldehyd Retinal. Die Absorption eines Photons löst im Retinal eine Isomerisierung von der 11-*cis*-Form zum all-*trans*-Retinal aus. Dieser photochemische Prozess führt innerhalb von Millisekunden zu einer allosterischen Konformationsänderung des Rhodopsins. Die aktive Konformation bindet und aktiviert das G-Protein Transducin durch den Austausch von GDP gegen GTP. Im aktivierten Transducin dissoziiert die GTP-haltige α -Untereinheit vom Rest des Moleküls und aktiviert ihrerseits eine membranständige cGMP-Phosphodiesterase. Rhodopsin transferiert also die Aktivierung über ein gekoppeltes G-Protein in die Zelle. Allerdings ist das aktivierende Signal kein Ligand, sondern ein Photon (Koolman und Röhm, 2002).

Bisher ist es nicht gelungen die Struktur weiterer GPCRs aufzuklären, da die Kristallisation membranständiger Proteine extrem schwierig ist. Aufgrund des

einheitlichen Aufbaus der GPCRs lässt sich anhand der Raumkoordinaten des charakterisierten Biopolymers ein Modell des unbekanntes Proteins konstruieren, was auch als *homology modelling* bezeichnet wird. Dabei ist die Struktur der Bindetasche eines Proteins von besonderem Interesse, da diese festlegt, welche funktionellen Gruppen auf der Seite der niedermolekularen Liganden für eine Bindung erforderlich sind. Die räumliche Anordnung dieser funktionellen Gruppen im Liganden bezeichnet man als den Pharmakophor. Dabei kann es sich um wasserstoffbrückenbildende Gruppen (Donoren und Akzeptoren), hydrophobe Molekülteile, geladene Gruppen etc. handeln (Abb. 1.11). Mit Hilfe eines Pharmakophor-Modells können virtuelle Substanz-Datenbanken nach Molekülgerüsten durchsucht werden, die den erforderlichen Pharmakophor enthalten (Böhm *et al.*, 2002; Davis *et al.*, 2003). Die neu identifizierten Substanzen können dann in einem *in vitro Assay*-System auf ihre biologische Aktivität getestet werden. Die beschriebene Vorgehensweise wird auch als Ligand-basierter Ansatz bezeichnet (Böhm *et al.*, 2002; Oellien *et al.*, 2006). Er findet z.B. auch Anwendung bei der Analyse von GPCR-Subtypen. Häufig existieren mehrere Subtypen eines bestimmten Rezeptors, die in unterschiedlichen Geweben verschiedene Reaktionen regulieren. Soll mittels eines Medikaments ein GPCR regulierend beeinflusst werden, ist es häufig schwierig, einen spezifischen Subtyp zu adressieren. Ist der Wirkstoff nicht spezifisch genug, so kann dies zu schweren Nebenwirkungen führen (Trabanino *et al.*, 2004).

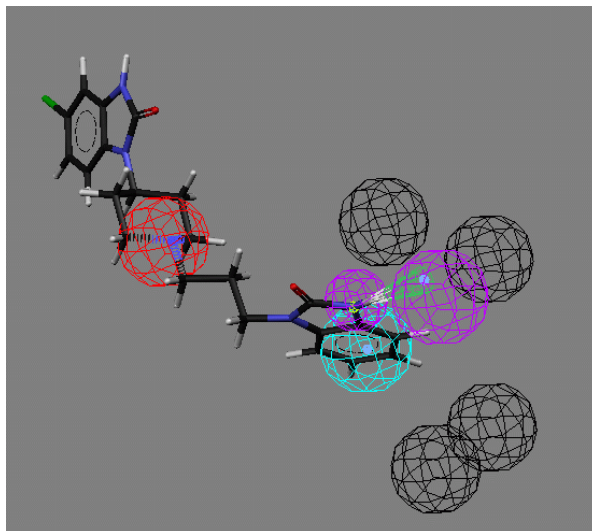


Abb. 1.11. Pharmakophor-Modell. Stellt die räumliche Anordnung der funktionellen Gruppen eines Moleküls z.B. eines Liganden dar. Dabei entsprechen die farblich markierten Sphären unterschiedlichen chemischen Eigenschaften. Bei einer Suche nach neuen Liganden kann es hilfreich sein, Bereiche zu definieren, in denen keine Molekülstrukturen liegen sollen. Solche *excluded volumes* werden durch schwarze Sphären dargestellt. (Quelle: Die Abbildung wurde von Dr. Anette Klinger und Dr. Jörg Cramer der BioChemInformatics, Intervet Innovation GmbH erstellt.)

1.9 Zielsetzung der Arbeit

Obwohl GPCRs im humanen Pharmabereich molekulare *targets* unterschiedlichster Medikamente sind, kennt man in der Veterinärmedizin lediglich das Akarizid Amitraz als GPCR-aktives Antiparasitikum. Für den Floh *C. felis* ist bisher noch kein GPCR beschrieben. Ziel dieser Arbeit war die Identifikation und die eingehende Charakterisierung der ersten GPCRs von *C. felis*. Das Genom von *C. felis* ist noch nicht sequenziert und die Identifikation neuer Gene kann nur mit Hilfe bereits bekannter Orthologer aus anderen Insekten erfolgen. Orthologe sind homologe Proteine, die in verschiedenen Organismen die gleiche Funktion ausüben (Selzer *et al.*, 2004). Je höher die Konservierung zwischen den Orthologen ist, desto höher ist die Wahrscheinlichkeit, die neuen Gene identifizieren zu können. Aus diesem Grund sollte zunächst eine bioinformatische Analyse durchgeführt werden, um die Frage zu beantworten, welche GPCRs der Insekten am höchsten konserviert sind. Dafür mussten sämtliche zur Verfügung stehenden Sequenzinformationen von Insekten zusammengetragen werden. Es war vorgesehen, die Analyse mit dem *genome comparison tool* Genlight (Beckstette *et al.*, 2004)

durchzuführen. Im Anschluss sollte versucht werden, die Orthologen der hochkonservierten Insekten-GPCRs im Floh zu identifizieren. Bei der erfolgreichen Klonierung eines neuen Gens stellt sich die Frage, ob dieses tatsächlich bei einer Expression zu einem funktionellen Protein führt. Daher sollte ein geeignetes System etabliert werden, um die ersten GPCRs von *C. felis* funktionell zu exprimieren und zu charakterisieren.

Es war geplant, mit einem der GPCRs eine chemoinformatische Analyse durchzuführen, um Antagonisten zu identifizieren. Hierfür sollte ein dreidimensionales Modell des GPCRs und ein ligandenbasiertes Pharmakophor-Modell erstellt werden. Mit Hilfe dieser Modelle sollten virtuelle Substanzbibliotheken durchsucht werden. Im Anschluss war vorgesehen, eine Selektion der Hit-Substanzen *in vitro* zu testen und so die Analyse zu bestätigen.

2. Material und Methoden

2.1 Materialien

2.1.1 Geräte

Folgende Geräte und Materialien wurden von den angegebenen Quellen bezogen und in den beschriebenen Experimenten verwendet.

- Autoklav: Autoklavi Spa von Fedegari (Albuzzano, Italien)
- Binokulare: Stemi 2000 von Zeiss (Wetzlar)
- Brutschrank: WTB Binder (Tuttlingen)
Memmert (Schwabach)
- Brutschrank für die Zellkultur: BBD6220 von Heraeus (Hanau)
- Bunsenbrenner: Fireboy von Integra Biosciences (Chur, Schweiz)
- Elektroporationsapparatur: Gene Pulser II von Bio-Rad (München)
Capacitance Extender Plus von Bio Rad (München);
Pulse Controller Plus von Bio-Rad (München)
- Gelektrophoreseapparatur: Power Pac 300 BioRAD (München)
Diagnostik ComPhor Gelektrophorese-System Mini und Midi von BIOzym (Oldendorf)
- Geldokumentationsapparatur: Image Documentation & Analysis von Raytest (Straubenhardt);
Drucker P91 von Mitsubishi (New York, USA);
Bildschirm von Hitachi (Düsseldorf)

- Glasplatte mit poröser Beschichtung zur Feinverteilung von CO₂ (Zur Betäubung von Fliegen): Carbon Dioxide Staging von Labscientific, Inc. (Fly Equipment; Livingston, USA)
- Injektor zur Injektion von Lösungen: FemtoJet von Eppendorf (München)
- Lichtquelle: KL 750 von Schott (Mainz)
KL 1500 electronic von Schott (Mainz)
- Mikrodismembrator (zur Homogenisation v. Fliegen): Mikrodismembrator S von Braun
- Mikromanipulator: MK1 von Singer (Watchet, Großbritannien)
- Mikropistill (autoklavierbar): Eppendorf (München)
- Mikroskop: CK2 von Olympus (Hamburg)
- Mikroskop: IX70 von Olympus (Hamburg)
- Mikrowelle: Micromat von Bosch (Stuttgart)
- Multipette: BRAND GMBH + CO KG (Wertheim)
- Photometer: Victor² v Wallac 1420 von Perkin Elmer (Wellesley, USA)
- Pipetten (2, 10, 100, 200, 1000 µl): Gilson (Middleton, USA)
- Schüttel-Inkubator für Bakterienkulturen: Orbital Shaker von Forma Scientific (Marietta, USA)
- Spectrophotometer: DU 640 von Beckman (Unterschleißheim)
- Stahlkugeln: 3 mm Durchmesser von Sartorius (Göttingen)
- Sterilbank: LaminAir von Holten (Allerød, Dänemark);
HERAsafe von Heraeus Instruments (Hanau)

- Thermocycler: PTC-200 Peltier Thermal Cycler von MJ Research (Waltham, USA);
PTC-225 Peltier Thermal Cycler von MJ Research (Waltham, USA)
- Thermomixer: Thermomixer comfort von Eppendorf (München)
- Tischzentrifugen: Zentrifuge 5415R von Eppendorf (München);
Microfuge 18 von Beckmann (Unterschleißheim)
- UV-Tisch: UV-Transilluminator von INTAS (Brüssel, Belgien)
- Vacusafe: Integra Biosciences (Chur, Schweiz)
- Vakuumpumpe: ASF Thomas (Wuppertal)
- Zentrifuge: Evolution RC von Sorvall (Langenselbold)

Für die Oocyteninjektion:

- Binokular: Leica GZ 6 (Leica, Bensheim)
- Kapillarziehmaschine: Eingenbau (Werkstatt des pharmakologischen Institutes)
- Kaltlichtquelle: KL 1500 electronic (Schott, Mainz)
- Mikroelectrode puller: PN-30 von Narishige (Tokyo, Japan)
- Mikromanipulator: M3301R (npi electronic GmbH, Tamm)
- Okular mit Messskala: Carl Zeiss (Jena, Oberkochen)
- Pneumatischer Injektor: Transjector 5245 (Eppendorf, München)

2.1.2 Gebrauchswaren

Folgende Gebrauchswaren wurden in den beschriebenen Experimenten verwendet:

- Cellstar Zellkultur Schalen, 60 mm: Greiner (Nürtingen)
- Cellstar Zellkultur Schalen, 100 mm: Greiner (Nürtingen)
- Cellstar 6 well Platte: Nunc (Wiesbaden)

- Gewebekulturplatte 24 well: Greiner (Nürtingen)
- Glaskapillaren für Oozyten: World Precision Instruments, Inc.
Sarasota, USA
- Microloader zum Befüllen
von Glaskapillaren: Eppendorf (München)
- Nahtmaterial, chirurgisches: Vicryl® 2/0 (3-metric) V-6, resorbier-
bar Prolene® 3-0 usp (2-metric) V-7
(Ethicon, Johnson & Johnson)
- Nadeln: Neolus Durchmesser: 0,6 mm
(Terumo, Somerset, New Jersey,
USA)
- Kryo-Einfriergerät: Qualifreeze (Qualilab, Olivet,
Frankreich)
- Kryoöhrchen zum Einfrieren
von Zellen: Cryogenic Vial 2 ml Corning (New
York, USA)
- Pasteur-Pipetten (Glas): VWR (Darmstadt)
- Petrischalen für Bakterien: Greiner (Nürtingen)
- Pipettenspitzen: Gilson (Middleton, USA)
- Plastikbecher zum Befüllen mit
Futter für die Haltung von
Fliegen: Greiner (Nürtingen)
- Reaktionsgefäße (2,0 ml; 1,5
ml; 0,5 ml): Eppendorf (München)
- Reservoirschalen für
Multipette: Matrix (Hudson, USA)
- Serologische Pipetten: Sarstedt (Nümbrecht)
- Spritzen: Syringe 20 ml und 2 ml (Terumo,
Somerset, New Jersey, USA)
- Sterilfiler: Filter 0,2 µM (Schleicher & Schuell,
Dassel)
- Thermo Tube (0,2 ml) für PCR: Abgene (Epsom Surrey, UK)
- Zellkulturflaschen EasyFlask: T25 und T75 (Nunc, Wiesbaden)

2.1.3 Chemikalien

Die Chemikalien waren, sofern erhältlich, analysenrein. Alle nicht aufgeführten Chemikalien wurden von den Firmen Sigma (München), Serva (Heidelberg) und Merck (Darmstadt) bezogen.

- 3-Aminobenzoessäure-ethylester: Sigma (München)
- Bacillol: Bode (Hamburg)
- 5-Brom-4-chlor-3-indoxyl- β -D-galaktosid (X-Gal): Roth (Karlsruhe)
- (+)-Butaclamolhydrochlorid: Sigma (München)
- (+/-)-Chloro-APB Hydrobromid: Sigma (München)
- cis (Z)-Flupenthixoldihydrochlorid: Sigma (München)
- DMSO: Sigma (München)
- Domperidone: Sigma (München)
- Dopaminhydrochlorid: Sigma (München)
- dNTP-Lösung: NEB (Beverly, USA) und Roche (Mannheim)

- Formaldehyd (36,5-38% Formalin): Sigma (München)
- Formamid: Riedel-de-Haen (Hannover)
- Forskolin (*Coleus forskohlii*): Sigma (München)
- 3-Isobutyl-1-methylxanthine: Sigma (München)
- Kaliumpermanganat: Sigma (München)
- L-(-)-Norepinephrinbitartratsalz (Monohydrat): Sigma (München)
- Natriumhydroxid: Fluka (Buchs, Schweiz)
- Natronlauge: Fluka (Buchs, Schweiz)
- (+) Octopaminhydrochlorid: Sigma (München)
- Poly-L-Lysin: Sigma (München)
- Propanol: Applichem (Darmstadt)
- R (+)-SCH-23390 hydrochlorid: Sigma (München)
- Serotonin (5-Hydroxytryptamine): Sigma (München)
- Spiperone: Sigma (München)

- TAE/TBE-Puffer (10x): Applichem (Darmstadt)
- Tyraminhydrochlorid: Sigma (München)

Für die Herstellung des Standardnährbodens für *D. melanogaster*.

- Grafschafter Goldsaft: Reformhaus (Ingelheim)
- Hefeflocken: Reformhaus (Ingelheim)
- Maisgrieß: Reformhaus (Ingelheim)
- Malzextrakt: Reformhaus (Ingelheim)
- Nipagin (4-Hydroxibenzoesäuremethylester): Sigma (München)
- Propionsäure: Merck (Darmstadt)
- Sojamehl: Reformhaus (Ingelheim)
- Stangen – Agar: Freundlicherweise von der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. G. Technau, Johannes Gutenberg Universität Mainz, Fachbereich Biologie zur Verfügung gestellt.

2.1.4 Enzyme, Enzymsets, *Primer* und Vektoren

Folgende Enzyme, Enzymsets, *primer* und Vektoren wurden von den angeführten Quellen bezogen und verwendet.

- Alkalische Phosphatase (CIP): Roche (Mannheim)
- Anti-CAT-Dioxigenin: Roche (Mannheim)
- BD SMART RACE cDNA Amplification Kit: BD Biosciences (Palo Alto, CA, USA)
- cAMP Biotrak Enzymimmunoassay: Amersham Biosciences (Buckingham-shire, UK)
- Deoxyribonuklease I Amplification Grade: Invitrogen (Carlsbad, USA)
- EndoFree Plasmid Maxi Kit: Qiagen (Hilden)
- Expressionsvektor für HEK293-Zellen: pcDNA3.1 (+) von Invitrogen (Carlsbad, USA)

- Expressionsvektor für Oozyten: pSP64T; Freundlicherweise zur Verfügung gestellt von der Arbeitsgruppe von Frau Prof. Dr. Ellen I. Closs der Johannes Gutenberg Universität.
- Gel-Extraction-Kit: Qiagen (Hilden)
- Genomic DNA Kit: Qiagen (Hilden)

- Gentamycin-Lösung (50 mg/ml): Invitrogen (Carlsbad, USA)
- Kollagenase: Roche (Mannheim)
- mMessage mMachine High Yield Capped RNA Transcription Kit: Ambion (Huntingdon, Cambridge-shire, UK)
- Oligonukleotide (*primer*): MWG (Ebersberg)
- OneStep RT-PCR-Kit: Qiagen (Hilden)
- PCR-Purification-Kit: Qiagen (Hilden)
- Pellet Paint™ Co-Precipitant: Novagen (Madison, USA)
- PfuUltra High-Fidelity DNA Polymerase: Stratagene (Cedar Creek Texas, USA)
- Platinum Pfx- Polymerase: Invitrogen (Carlsbad, USA)
- Platinum Taq-Polymerase: Invitrogen (Carlsbad, USA)
- Platinum Taq-Polymerase High Fidelity: Invitrogen (Carlsbad, USA)
- Plasmid-Mini/Midi/ Maxiprep-Kit: Qiagen (Hilden)
- PolyFect Transfection Reagent: Qiagen (Hilden)
- Qiashredder: Qiagen (Hilden)
- Restriktionsendonukleasen: New England BioLabs (Beverly, USA)
- Restriktionsendonukleasen: Roche (Mannheim)
- RNaseOUT™: Invitrogen (Carlsbad, USA)
- RNeasy-Micro/Mini-Kit: Qiagen (Hilden)
- Super Script First-Strand Synthesis System for RT-PCR: Invitrogen (Carlsbad, USA)

- T4 DNA Ligase: New England BioLabs (Beverly, USA)
 - TOPO TA – Cloning Kit: Invitrogen (Carlsbad, USA)
- Für die Zellkultur:
- Dulbecco's PBS: Cambrex (Kopenhagen, Dänemark)
 - Foetal Bovine Serum: PAN Biotech (Aidenbach)
 - L-Glutamin: Invitrogen (Carlsbad, USA)
 - MEM Non Essential Amino Acids: Invitrogen (Carlsbad, USA)
 - Minimum Essential Medium Eagle with Earl: Sigma (München)
 - Penicillin-Streptomycin Lösung
100.000 units/ml Penicillin und
100.000 µg/ml Streptomycin: Invitrogen (Carlsbad, USA)
 - Trypsin-EDTA: Invitrogen (Carlsbad, USA)

2.1.5 Puffer, Medien und Lösungen

In den meisten Fällen wurden die Lösungen mit doppelt deionisiertem und autoklaviertem Wasser angesetzt. Alle Prozentangaben beziehen sich auf Gewichts- pro Volumeneinheit. Bei Lösungen, die als vielfach konzentrierte Stammlösung angesetzt wurden, ist der Konzentrationsfaktor in Klammern angegeben.

1 Kb Plus DNA Ladder von Invitrogen (Carlsbad, USA):	20 µl DNA 40 µl Auftragspuffer 140 µl TBE
Ampicillin-Lösung:	100 mg/ml
Auftragspuffer für DNA (5x), pH 8,3:	50% Glycerin 10 mM EDTA 0,445 mM Tris 0,1% Bromphenolblau 0,1 % Xylencyanol

Material und Methoden

Auftragspuffer für RNA-Proben, pH 8,0:	50% Glycerin 1 mM EDTA 0,25% Bromphenolblau 0,25% Xylencyanol
Ca ²⁺ -freier Puffer	96 mM NaCl 2 mM KCl 1 mM MgCl ₂ 5 mM Hepes (pH 7,6)
Chloramphenicol-Lösung:	20 mg/ml in Ethanol
dNTP-Lösung:	2 mM dATP 2 mM dCTP 2 mM dGTP 2 mM dTTP
DTT:	0,1 M Dithiothreitol
EB-Puffer, pH 8,5:	10 mM Tris-HCl
EDTA, pH 8,0:	25 mM
Lambda DNA/ <i>Hind</i> III Marker, 2 von MBI Fermentas (St. Leon-Rot):	100 µl DNA 300 µl TBE 100 µl Auftragspuffer
LB-Agar: Das Medium wurde mit deionisiertem Wasser angesetzt und anschließend autoklaviert. Nachdem das Medium auf 50°C abgekühlt war, wurde dieses in Plastikpetrischalen gegossen.	1000 ml LB-Medium 15 g Agar-Agar
LB-Medium, pH 7,0: Das Medium wurde mit deionisiertem Wasser angesetzt und anschließend autoklaviert.	10 g Tryptone 5 g Hefeextrakt 5 g NaCl ad 1000 ml

TE-Puffer, pH 8,0:	10 mM Tris/HCl 1 mM EDTA
Tris-Puffer, pH 8,5 : (eingestellt mit konz.HCl)	1 M
X-Gal:	40 mg/ml 5-Brom-4-Chlor-3- Indoyl- β -D-Galaktosid

2.1.6 Verwendete kompetente Bakterienstämme

Folgende *Escherichia coli* Bakterienstämme wurden für Transformationen von Ligationsansätzen genutzt (aufgeführt in Tab. 2.1). Die Bakterienstämme wurden kommerziell erworben und für Transformationen verwendet. Darüber hinaus wurden elektrokompente Bakterien eigenständig hergestellt (2.2.1.5).

Tab. 2.1. Für Transformationen verwendete Bakterienstämme und ihre Herkunft.

<i>E. coli</i> -Stamm	Herkunft
DH5 α	Invitrogen
Top10	
SURE	Stratagene

2.1.7 Humane Dopamin-Rezeptoren

Die humanen Dopamin-Rezeptoren 1 und 5 (hD1 und hD5) im Expressionsvektor pcDNA3 (Kassack *et al.*, 2002) wurden freundlicherweise von Herrn PD Dr. M.U. Kassack (Pharmazeutisches Institut der Universität Bonn) zur Verfügung gestellt.

2.2 Molekularbiologische Methoden

Unter 2.2 werden molekularbiologische Methoden angeführt, die von Sambrook und Russel (2001) beschrieben wurden.

2.2.1 Klonierungen

2.2.1.1 DNA-Verdau mit Restriktionsendonukleasen

Für die Charakterisierung, Isolierung und Linearisierung von DNA wurden Restriktionsendonukleasen verwendet. Das erste dieser Enzyme wurde von Hamilton Smith entdeckt. Sie spalten (verdauen) DNA an einer spezifischen Stelle innerhalb einer Erkennungssequenz (Kelly und Smith, 1970; Smith und Wilcox, 1970). Die Spaltung entspricht einer Hydrolyse der Phosphodiesterbindung der DNA in beiden Strängen und erfolgt an Positionen, die symmetrisch versetzt um das Zentrum der Erkennungssequenz gruppiert sind. Meist sind die Erkennungssequenzen palindromische DNA-Sequenzen einer zweizähligen Rotationssymmetrie, die vier bis sechs Basenpaare lang sind. Dabei entstehen Restriktionsfragmente mit komplementären Einzelstrang-Enden von ein bis vier Nukleotiden Länge mit kohäsiven Enden (*sticky ends*). Bei einigen Endonukleasen erfolgt allerdings eine Spaltung mit stumpfen Enden (*blunt ends*): Dies ist der Fall, wenn die Restriktionsschnittstellen mit der zweizähligen Palindromachse zusammenfallen (Voet und Voet, 1994). Eine Enzymeinheit ist definiert als Menge einer Restriktionsendonuklease, die innerhalb von 1 h bei optimaler Temperatur (meist 37°C) 1 µg DNA komplett verdaut (Angabe nach Roche, Mannheim). Für analytische Ansätze wurde maximal 1 µg DNA mit der entsprechenden Restriktionsendonuklease ad 20 µl für 1 bis 2 h bei optimaler Reaktionstemperatur inkubiert. Für präparative Ansätze kann auch über Nacht inkubiert werden. Wird ein Verdau mit zwei Enzymen vorgenommen, kann die DNA mit beiden Enzymen inkubiert werden, wenn die Puffer- und Temperaturbedingungen der Restriktionsendonukleasen übereinstimmen. Ist dies nicht der Fall, müssen die Verdau nacheinander durchgeführt werden. Pufferbedingungen müssen für den zweiten Verdau angeglichen werden: entweder durch Aufreinigung des Ansatzes und Zugabe des zweiten Puffers oder durch Ergänzung der eventuell fehlenden Komponenten des ersten Puffers. Nach einem Restriktionsverdau

wurden die DNA-Fragmente mittels Agarosegelelektrophorese (siehe 2.2.1.11) auf Größe, Menge und Verunreinigungen kontrolliert.

2.2.1.2 Ligation von DNA-Fragmenten

Nach dem Restriktionsverdau von DNA können einzelne Fragmente mit Hilfe von Ligasen miteinander verknüpft werden. Hierbei wird eine Phosphodiester-Bindung zwischen einem 3'-Hydroxyl-Ende und einem 5'-Phosphat-Ende einer doppelsträngigen DNA gebildet. Diese Reaktion wird von der DNA-Ligase des Bakteriophagen T4 katalysiert (Weiss *et al.*, 1968). In den meisten Fällen besitzen die DNA-Fragmente zueinander komplementäre überhängende Nucleotide (*sticky ends*). Allerdings können manche Restriktionsendonukleasen auch glatte Enden (*blunt ends*) erzeugen, welche ebenfalls mit Hilfe von Ligasen verknüpft werden können.

Es wurden Ansätze mit einem Gesamtvolumen von 20 µl verwendet:

Bis zu 1 µg DNA wurde eingesetzt (das molare Verhältnis von Vektor zu Insert betrug bei vergleichbarer Länge \approx 1:3) 2 µl 10 x T4 DNA Ligase Puffer und 1 bis 5 Einheiten Ligase wurden ad 20 µl zusammengegeben. Der Reaktionsansatz wurde über Nacht bei 16°C inkubiert. Anschließend wurde der Ligationsansatz in einer Transformation eingesetzt (2.2.1.6).

2.2.1.3 Dephosphorylierung von DNA-Fragmenten

Vektor-DNA, die mit Hilfe eines Restriktionsenzymes linearisiert wurde, kann durch Religation zirkularisieren. Um diesen Vorgang zu erschweren, kann das DNA-Fragment mit einer alkalischen Phosphatase (2 units CIP= *calf intestinal alkaline phosphatase*) behandelt werden (Sambrook und Russel, 2001). Das Enzym kann direkt zum Restriktionsansatz hinzugefügt werden. Die Inkubation betrug 30 min bei 37°C und anschließend 15 min bei 56°C. Nach der Zugabe von einem weiteren Mikroliter Enzym wurde für 30 min bei 37°C inkubiert. Die alkalische Phosphatase katalysiert die Dephosphorylierung des 5'-Endes der doppelsträngigen DNA, wodurch eine Religation durch Bildung einer Phosphodiester-Bindung verhindert wird.

2.2.1.4 Klonierung von PCR-Produkten mittels Topoisomerasen

Es wurden pCRII-TOPO-Vektoren von Invitrogen (Carlsbad, USA) verwendet (siehe Anhang). Diese Vektoren liegen linearisiert mit Desoxythymidin-Überhängen vor. An diesen Enden ist die Topoisomerase des *Vaccinia*-Virus kovalent gebunden (Shuman, 1991). Mit Hilfe eines solchen Vektors können PCR-Produkte direkt in ein Plasmid kloniert werden. Die Taq-Polymerase fügt an die 3'-Enden eines PCR-Produktes ein einzelnes, überhängendes Desoxyadenosin an. Dieses Fragment kann in den linearisierten pCRII-TOPO-Vektor inseriert werden, der an seinen 3'-Enden ein einzelnes überhängendes Desoxythymidin besitzt. Durch Insertion des PCR-Produkts in den Vektor wird die Topoisomerase entfernt (Shuman, 1994). Für diese Klonierung wurde der TOPO TA Cloning Kit (Invitrogen, Carlsbad, USA) verwendet. Das Produkt wurde in chemokompetente Bakterien transformiert (2.2.1.6) und auf eine LB-Agarplatte mit geeignetem Antibiotikum (Ampicillin oder Kanamycin) ausplattiert. Anschließend wurden die unter dem Selektionsdruck gewachsenen Kolonien einer Plasmidpräparation und Restriktionsanalyse unterzogen (2.2.1.1), um zu überprüfen ob das PCR-Produkt korrekt in den Vektor eingefügt wurde.

2.2.1.5 Herstellung elektrokompetenter Zellen

Die Vermehrung von elektrokompetenten Zellen zur Transformation wurde nach Sambrook und Russel (2001) durchgeführt. Für die Herstellung elektrokompetenter Zellen wurden 5 ml LB-Medium mit einer Kolonie der *E. coli* Bakterien angeimpft und über Nacht bei 37°C im Schüttler bei 200 Umin⁻¹ inkubiert. Mit dieser Kultur wurden 500 ml LB-Medium angeimpft und im Schüttler bei 37°C und 200 Umin⁻¹ inkubiert, bis eine OD₆₀₀ von 0,5 bis 0,6 erreicht war. Die optische Dichte gibt bei einer Welllänge von $\lambda = 600$ nm Auskunft über die Anzahl der Zellen. Für Transformationen sollte die *E. coli*-Kultur nicht mehr als 10⁸ Zellen/ml aufweisen. Dies ist bei den meisten *E. coli*-Stämmen bei einer OD₆₀₀ von ~0,5 der Fall (Sambrook und Russel, 2001). In gekühlten Zentrifugenbechern wurde die Kultur mit der Sorvall-Zentrifuge 20 min, 1800 g und 4°C zentrifugiert. Das Pellet wurde in 250 ml kaltem 10 mM HEPES gewaschen und nochmals zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen, das Pellet wurde in 1,5 ml 10% Glycerin resuspendiert und aliquotiert (jeweils 100 µl). Anschließend wurden die Zellen in flüssigen Stickstoff schockgefroren und bei -80°C aufbewahrt.

2.2.1.6 Transformation von Bakterien

Unter Transformation versteht man die Aufnahme freier DNA in Bakterien und damit verbunden deren genetische Veränderung (Hanahan, 1983). Transformierbare Bakterien werden als kompetent bezeichnet. Die Transformation von Plasmid-DNA in Wirtszellen dient der Amplifikation von neukombinierter DNA. Die Transformation kann grundsätzlich durch Elektroporation bzw. durch chemische Transformation erfolgen. Mit Hilfe eines Elektroporationsgerätes können Pulse von elektrischen Feldern erzeugt werden. Diese können kleine Poren in der Membran von *E. coli* hervorrufen, was eine Aufnahme von Plasmid-DNA ermöglicht (Dower *et al.* 1988; Mercenier und Chassy, 1988). Hierfür wurde ein Aliquot von elektrokompetenten Zellen auf Eis aufgetaut. Ein bis zwei Mikroliter des Ligationsansatzes wurden mit 40 μl Zellsuspension vermischt und in eine gekühlte Elektroporationsküvette gegeben. Es ist darauf zu achten, dass sich keine Luftblasen in der Küvette befinden. Die Elektroden der Küvette wurden mit einem Tuch getrocknet und das Gefäß wurde in das Elektroporationsgerät eingesetzt. Mit dem Capacitance „Extender Plus von Bio-Rad“ wurde (Spannung: 2 kV, Widerstand: 200 Ω , Kapazität: 25 μF) elektroporiert. Sofort nach der Elektroporation wurden 200 μl LB-Medium auf die Zellen gegeben, anschließend wurden diese in ein Reaktionsgefäß (15 ml) überführt und 1 h bei 37°C ohne Zugabe eines Antibiotikums mit einem Schüttelinkubator geschüttelt (300 Umin^{-1}). Die 200 μl der Bakteriensuspension wurden auf LB-Agarplatten mit geeignetem Antibiotikum zur Selektion ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert. Wurde ein Vektor lediglich retransformiert, so wurde die Bakteriensuspension mit Hilfe einer Impföse verdünnt ausgestrichen. Die zweite Methode ist die Transformation chemisch kompetenter Bakterien nach der Methode von Inoue *et al.* (1990). Chemisch kompetente Zellen (40 μl einer Bakteriensuspension) wurden mit 2 bis 10 μl des Ligationsansatzes zusammengegeben und gemischt. Nach einer Inkubation von 30 min auf Eis wurde die Bakteriensuspension für 45 sec einem Hitzeschock bei 42°C unterzogen. Die Zellen wurden sofort wieder auf Eis gestellt und mit 200 μl LB-Medium resuspendiert. Eine weitere Inkubation des Ansatzes erfolgte für 1 h unter Schütteln bei 37°C ohne Zugabe eines Antibiotikums. Anschließend wurden die Bakterien auf LB-Agarplatten mit einem Antibiotikum ausplattiert bzw. mit einer Impföse ausgestrichen.

Die verwendeten Plasmide codierten für Resistenzgene (z.B. Ampicillin-Resistenzgen). Diese sind im Genom der kompetenten Bakterien (*E. coli*) nicht vorhanden. Durch den Selektionsdruck des Mediums konnten nur Bakterien wachsen, die über das entsprechende Plasmid verfügten. Mit jedem

Teilungszyklus der Bakterien wurde jede Kopie des Plasmids und somit die neukombinierte DNA repliziert. Damit verbunden wurde das Plasmid amplifiziert und konnte durch geeignete Methoden (2.2.1.8) aufgereinigt werden.

Für beide Methoden wurden Kontrollen durchgeführt. Zur Überprüfung der Selektivität der LB-Agarplatten mit Antibiotikum wurden Transformationen ohne DNA und zur Überprüfung der Transformationseffizienz mit Vektoren bekannter Konzentrationen durchgeführt. Bei Ligationsansätzen (2.2.1.2) wurde die Religationshäufigkeit des Vektors ermittelt, indem identische Ansätze ohne Insertions-DNA ausplattiert wurden.

2.2.1.7 Test auf Abbau von X-Gal („Blau-Weiß-Selektion“)

Der Test auf Abbau von X-Gal durch Transformanten mit religiertem Vektor dient dem *Screening* von Bakterienkolonien und wurde nach Sambrook und Russel (2001) durchgeführt. Mit Hilfe dieser Methode wurden Kolonien mit religiertem Vektor von Kolonien mit integriertem Insert unterschieden. Hierfür muss der bei der Klonierung verwendete Vektor zwei Voraussetzungen erfüllen:

1. Der Vektor besitzt eine Resistenz gegen Ampicillin oder ein anderes geeignetes Antibiotikum, um eine Selektion auf erfolgreiche Transformation vornehmen zu können.
2. Die Insertionsstelle befindet sich in einem *lacZ*-Gen, welches für β -Galaktosidase codiert. Das Enzym katalysiert die Umsetzung von 5-Brom-4-Chlor-3-Indoyl- β -D-Galaktosid (X-Gal) in Galaktose und den Farbstoff 5-Bromo-4-Chloro-3-Indol, der die Kolonien blau färbt. Die funktionstüchtige β -Galaktosidase wird nur im Fall einer Religation gebildet. Also erscheinen nur die Kolonien blau, die den religierten Vektor besitzen. Weiße Kolonien enthalten einen Vektor, in dem die β -Galaktosidase durch Aufnahme eines Inserts funktionsunfähig geworden ist.

Mit dieser Methode lassen sich Religanten einfach von Kolonien unterscheiden, die das klonierte Gen enthalten. Für eine „Blau-Weiß-Selektion“ wurden 80 μ l X-Gal-Lösung auf einer LB-Agarplatte ausplattiert. Ferner kann dem Medium Isopropylthiogalaktosid (IPTG) zugesetzt werden, welches als Induktor für die β -Galaktosidase dient und die Reaktion verstärkt. Anschließend wurde der Transformationansatz (wie bereits unter 2.2.1.6 beschrieben) ausplattiert.

2.2.1.8 Präparation von Plasmid-DNA

Die Präparation von Plasmid-DNA durch Chromatographie mit Hilfe von Silikamembranen ist von Sambrook und Russel (2001) beschrieben worden. Für die Durchführung der Präparation sind von Qiagen Plasmid-Mini/Midi/Maxi-Kits erhältlich. Je nach Menge der flüssigen Bakterienkultur wurde entweder eine Mini- (3 ml), Midi- (50 ml) oder Maxi-Präparation (100 ml) durchgeführt. Zunächst wurden Bakterien unter alkalischen Bedingungen lysiert. Das Lysat wurde neutralisiert. Bei hohen Salzkonzentrationen kann die DNA an eine Silikagel-Membran adsorbieren. Durch Waschschriffe wurde die DNA aufgereinigt und konnte anschließend eluiert werden. Im Folgenden wird eine Plasmid-Mini-Präparation beschrieben: Mit Hilfe einer Pipettenspitze wurde eine Bakterienkolonie von einer LB-Agarplatte abgehoben und in 3 ml LB-Medium überführt (gegebenenfalls wurde zur Selektion ein Antibiotikum zugesetzt). Die Kultur wurde über Nacht (37°C, 200 Umin⁻¹) im Schüttler inkubiert. Ein Volumen von 1,5 ml der Bakterienkultur wurden in einem 1,5 ml Reaktionsgefäß mit einer Tischzentrifuge (5 min, 16.000 g) zentrifugiert. Das Pellet wurde in 250 µl gekühltem P1-Puffer resuspendiert. Anschließend wurden 250 µl P2-Puffer zugegeben, was zur alkalischen Lyse der Zellen führt. Durch Hinzufügen von 350 µl N3-Puffer wurden Zelltrümmer und genomische DNA gefällt und mittels Zentrifugation mit einer Tischzentrifuge (16.000 g, 10 min) abgetrennt. Der Überstand wurde auf eine Säule gegeben, deren Silikamembran die Plasmid-DNA bindet. Die Säule wurde mit 750 µl PE-Puffer gewaschen und die DNA mit 30 bis 50 µl EB-Puffer eluiert.

Eine Midi- bzw. Maxi-Präparation wurde wie folgt durchgeführt (Angaben in Klammern beziehen sich auf die Maxi-Präparation): Es wurden 50 ml (100 ml) LB-Medium (gegebenenfalls unter Zusatz eines Antibiotikums) mit einer Bakterienkolonie oder mit 100 µl einer Bakteriensuspension (Übernachtskultur) angeimpft und über Nacht (37°C, 200 Umin⁻¹) im Schüttler inkubiert. Die Bakteriensuspension wurde (5.500 g, 4°C, 15 min) abzentrifugiert und in 4 ml (10 ml) Puffer P1 resuspendiert. Dann wurden 4 ml (10 ml) P2 zur alkalischen Lyse zugegeben und nach 6-maligem Invertieren 5 min inkubiert. Nach Zugabe von 4 ml (10 ml) gekühltem Puffer P3 zur Präzipitation von genomischer DNA, Proteinen, Zell Debris und SDS wurde der Ansatz auf den Qiafilter Cartridge gegeben und für 10 min inkubiert, damit sich das Präzipitat an der Oberfläche absetzen konnte. Währenddessen wurde das Qiagen-tip 100 (500) mit 4 ml (10 ml) Puffer QBT equilibriert. Anschließend wurde die Lösung aus dem Qiafilter Cartridge in das Qiagen-tip gedrückt, um die

Bindung der Plasmid-DNA an das Säulenmaterial des Qiagen-tips zu ermöglichen. Nachdem die gesamte Flüssigkeit durch Gravitation durch das Qiagen-tip geflossen war, wurde die Säule zweimal mit 10 ml (30 ml) QC gewaschen. Die Plasmid-DNA wurde mit 5 ml (15 ml) Puffer QF eluiert, mit 3.5 ml (10,5 ml) Isopropanol präzipitiert und (18.000 g, 4 °C, 30 min) abzentrifugiert. Die pelletierte Plasmid-DNA wurde in 50 µl (100 µl) EB-Puffer resuspendiert.

Bei einer Endotoxin-freien Plasmid-Maxi-Präparation für die Verwendung der Plasmide in der Zellkultur wurde die Lösung nach der Filtration mit dem Qiafilter Cartridge zusätzlich mit 2,5 ml ER-Puffer für 30 min auf Eis inkubiert, um Endotoxine zu entfernen. Die Elution vom Qiagen-tip erfolgt mit dem Endotoxin-freien QN-Puffer. Die übrigen Schritte wurden entsprechend der aufgeführten Maxi-Präparation durchgeführt.

Die so präparierte Plasmid-DNA wurde mittels Restriktionsverdauen (2.2.1.1) und Gelelektrophorese (2.2.1.11) auf ihr Restriktionsmuster überprüft und die Konzentration wurde photometrisch bestimmt (2.2.1.10).

2.2.1.9 DNA-Präzipitation: Ethanol-fällung

Eine Fällung von DNA kann genutzt werden, um DNA von Salzen und Proteinen zu reinigen und sie durch Resuspension in einem geringeren Volumen zu konzentrieren. Für die Präzipitation wird Ethanol verwendet, da dieses der DNA die Hydrathülle entzieht. Gegenionen wie Na⁺ binden an die negativ geladenen Gruppen der DNA, wodurch sich ein Präzipitat bilden kann (Sambrook und Russel, 2001). Hierfür wurden zu 30 µl Ansatz 3 µl 3 M Na Acetat (pH 5,2), 2 µl Pellet Paint von Novagen (Madison, USA) und 60 µl Ethanol (absolut) zugegeben. Nach einer Inkubation von 2 min wurde das Präzipitat mit einer Tischzentrifuge abzentrifugiert (18.000 g, 5 min). Der Überstand wurde mit einer Pipette abgenommen und das pinkfarbene Pellet mit 90 µl 70% igem Ethanol gewaschen und mit einer Tischzentrifuge zentrifugiert (18.000 g, 5 min). Der Überstand wurde erneut abgenommen und das Pellet mit 3 Volumen 100% igem Ethanol gewaschen und zentrifugiert (18.000 g, 5 min). Der Überstand wurde vorsichtig abgenommen und das Pellet an der Luft getrocknet. Ethanol muss unbedingt restlos entfernt werden, allerdings darf das Pellet nicht zu lang getrocknet werden, da es sonst schlecht resuspendiert werden kann. Die Resuspension erfolgte je nach Anforderungen in 3 – 30 µl nuklease-freiem Wasser oder in EB-Puffer (Qiagen, Hilden).

2.2.1.10 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Für Klonierungen ist es notwendig, die eingesetzten Mengen an Nukleinsäure zu bestimmen. DNA absorbiert aufgrund der aromatischen Basen UV-Licht. Die Absorption ist maximal bei einer Wellenlänge von 260 nm. Delokalisierte π -Elektronen der Basen können durch Energie dieser Wellenlänge angeregt werden und absorbieren Energie. Diese Eigenschaft von Nukleinsäuren kann zur Konzentrationsbestimmung nach dem Lambert-Beerschen Gesetz mit Hilfe eines Photometers genutzt werden (Sambrook und Russel, 2001).

Lambert-Beersches Gesetz (Gonsior, 1994):

$$E = \varepsilon \times c \times d$$

E = Extinktion

ε = molarer Extinktionskoeffizient [$\text{mol}^{-1}\text{cm}^{-1}$]

c = Konzentration des absorbierenden Materials [mol/l]

d = Schichtdicke [cm]

Die Absorption ist zur Konzentration der absorbierenden Atome oder Moleküle und zur Schichtdicke proportional. Wenn die Schichtdicke gleich 1 cm ist, wird die Extinktion als optische Dichte (OD) einer bestimmten Wellenlänge λ bezeichnet (Sambrook und Russel, 2001):

$$\text{OD}_\lambda = \varepsilon \times c$$

Der molare Extinktionskoeffizient beträgt bei 260 nm für doppelsträngige DNA $6,6 \text{ mol}^{-1}\text{cm}^{-1}$ und für einzelsträngige DNA bzw. RNA $7,4 \text{ mol}^{-1}\text{cm}^{-1}$. Mit Hilfe dieser Angaben kann die DNA-Konzentration einer Lösung berechnet werden.

Es gelten folgende Zusammenhänge (Sambrook und Russel, 2001):

$$OD_{260} = 1 = 50 \mu\text{g dsDNA/ml}$$

$$OD_{260} = 1 = 40 \mu\text{g ssDNA/ml}$$

$$OD_{260} = 1 = 40 \mu\text{g ssRNA/ml}$$

2.2.1.11 Agarosegelelektrophorese zur Auftrennung von DNA und Gel-extraktion

Die Auftrennung von DNA erfolgte mittels Agarosegelelektrophorese (Sambrook und Russel, 2001). Makromoleküle wie DNA-Fragmente lassen sich in einem elektrischen Feld mit Hilfe eines Agarosegels autrennen. Die Trennung erfolgt nach Molekülgröße als auch nach elektrophoretischer Beweglichkeit. DNA-Fragmente wandern aufgrund ihrer negativen Ladung zur Anode. Die Wanderungsgeschwindigkeit hängt u.a. von der Länge der Moleküle, der DNA-Konzentration, der Agarose-Konzentration und der angelegten Spannung ab. Kleine Moleküle passieren das Molekularsieb der Agarose schneller als große, wodurch eine Auftrennung erfolgt (Voet und Voet, 1994). Der gewählte Anteil der Agarose im Gel ist abhängig von der Größe der DNA-Fragmente, die aufgetrennt werden sollen (siehe Tab.2.2).

Tab. 2.2. Konzentration von Agarose in Agarosegelen zur gelelektrophoretischen Auftrennung von DNA Fragmenten (nach Sambrook und Russel, 2001).

Agarose [g/50ml]	Größe der linearen DNA-Fragmente (kb) für optimale Auftrennung
0,5	30 bis 1
0,7	12 bis 0,8
1,0	10 bis 0,5
1,2	7 bis 0,4
1,5	3 bis 0,2

Agarose wurde wahlweise in 1x TAE- oder 1x TBE-Puffer aufgekocht und mit Ethidiumbromid-Lösung (10 mg/ml) versetzt (2 µl EtBr je 50 ml). Die auf ca. 60°C abgekühlte Lösung wurde in eine Gelkammer gegossen. Als Laufpuffer dienten jeweils 1x TAE- bzw. 1x TBE-Puffer, mit dem das Gel in der Kammer bedeckt wurde (Sambrook und Russel, 2001). Die DNA-Proben wurden mit 1/5 Volumen Auftragspuffer versetzt und in die Geltaschen gegeben. Die

Gelelektrophorese wurde in einem Spannungsbereich von 15 bis 80 Volt durchgeführt. Dabei gilt, dass die Auftrennung umso genauer erfolgt je geringer die Laufgeschwindigkeit ist. Deshalb wurden präparative Agarosegelelektrophoresen generell bei geringer Spannung durchgeführt. Zur Identifikation der Fragmentlängen der DNA wurde ein 1 Kb Plus DNA Ladder von Invitrogen mit aufgetragen und aufgetrennt. Für Mengenabschätzungen wurde der Lambda DNA/*Hind*III Marker² verwendet. Nach der Auftrennung wurden die Agarosegele im UV-Licht bei 312 nm betrachtet. Ethidiumbromid interkaliert in DNA und lässt die Fragmente fluoreszieren. Durch die UV-Bestrahlung wird Licht der Wellenlänge 560 nm emittiert.

Für die Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen wurde das QIAquick Gel Extraction Kit verwendet. Hierfür wurde die Gelextraktionsmethode angewandt (Sambrook und Russel, 2001). Das DNA-Fragment wurde mittels UV-abhängiger Fluoreszenz von interkaliertem Ethidiumbromid identifiziert und mit einem Skalpell ausgeschnitten. In Abhängigkeit vom Gewicht des Gelstücks wurde der chaotrope Puffer QG zugegeben (Gewicht des Gelstücks in mg x 5 entspricht dem Volumen des Puffers QG in µl) und das Gelstück bei 50°C in diesem Puffer aufgelöst. Durch die Eigenschaften des Puffers konnte die DNA an die Silikamembran der Säule adsorbieren. Die Verunreinigungen wie Salze und Agarose konnten mit Hilfe des Waschpuffers PE entfernt werden. Die Elution erfolgte mit EB-Puffer.

2.2.2 Amplifikation von DNA-Sequenzen

2.2.2.1 Polymerase-Kettenreaktion

Zur Amplifikation von DNA wurde die PCR (*polymerase chain reaction*; Polymerasekettenreaktion) verwendet (Saiki *et al.*, 1985). In einer PCR bindet ein *primer*-Paar an beide Stränge einer als Matrize bezeichneten DNA. Das zwischen den *primern* liegende Fragment wird in einer Polymerase abhängigen Reaktion amplifiziert. In einem zyklischen Prozess wird die DNA hitzedenaturiert, die *primer* binden während der Hybridisierung spezifisch an jeweils einen DNA-Strang und schließlich werden die komplementären Nukleinsäure-Stränge durch eine DNA-Polymerase synthetisiert. Mit jedem Zyklus findet etwa eine Verdopplung der DNA-Menge im Reaktionsansatz statt, d.h. die Amplifikation des gesamten Prozesses ist exponentiell. Durch Verwendung von hitzestabilen DNA-Polymerasen (Platinum Pfx- Polymerase

von Invitrogen und Platinum Taq DNA Polymerase High Fidelity ebenfalls von Invitrogen, Carlsbad, USA) sind diese Enzyme auch im hitzedenaturierenden Schritt stabil (Voet und Voet, 1994). Die PCR wurde zur Amplifikation von DNA-Fragmenten für Klonierungen verwendet. Für eine PCR wurden in der Regel 5 µl PCR-Puffer, 1 µl dNTP-Mix (10 mM), 2 µl MgSO₄ (50 mM), jeweils 0,3 µl der *primer* (100 mM), 10 pg – 200 ng Matrizen-DNA und 1 µl DNA-Polymerase mit Wasser ad 50 µl zu einem Ansatz zusammengefügt.

Bedingungen:

95°C	2 min		} 40 x
94°C	30 sec	Denaturierung	
X°C	30 sec	Hybridisierung	
68°C	1 min pro kb	Synthese	
68°C	10 min		

X°C entspricht der *annealing*-Temperatur der *primer*, zur Berechnung siehe 2.2.2.2

Abschließend wurde der Ansatz mittels Agarosegelelektrophorese auf Größe, Menge und Verunreinigungen analysiert, bevor das Produkt in weiteren Reaktionen eingesetzt wurde.

2.2.2.2 Bestimmung der *Annealing* Temperatur für PCR *Primer*

Die Schmelztemperatur T_m wurde von der Firma MWG, Ebersberg anhand des GC-Gehaltes kalkuliert:

- Die Schmelztemperatur von *primern* mit bis zu 14 Nukleotiden wurde nach der Methode von Suggs *et al.* (1981) und Thein *et al.* (1986) berechnet. Wobei (A + T) die Summe der Adenin- und Thyminreste im Oligonukleotid und (G + C) die Summe der Guanin- und Cytosin-Reste im Oligonukleotid sind:

$$T_m \text{ (in } ^\circ\text{C)} = 2 (A + T) + 4 (G + C)$$

- Die Schmelztemperatur von *primern* mit mehr als 14 Nukleotiden wurde nach der von Sambrook und Russel beschriebenen Methode (2001) berechnet. Wobei GC% der Gehalt an Guanin- und Cytosin-Resten im Oligonukleotid in Prozent und n die Anzahl der im *primer* enthaltenen Nukleotide ist:

$$T_m = 69,3^{\circ}\text{C} + (0,41 \times \text{GC}\%) - 650/n$$

Das PCR-Produkt wurde mittels Agarosegelelektrophorese (siehe 2.2.1.11) auf Größe, Menge und Verunreinigungen kontrolliert. Anschließend wurde die DNA-Matrize in einer Transkriptionsreaktion eingesetzt.

2.2.2.3 DNA-Sequenzierungen

DNA-Sequenzierungen wurden von der Firma GATC, Konstanz durchgeführt. Die Reaktionsansätze wurden entweder manuell oder mit einem Pipettierroboter (Hamilton Microlab Star) für die Sequenzierung vorbereitet. Die Analyse der aufgereinigten Reaktionsansätze wurde entweder auf dem ABI 3730xl DNA Analyzer oder dem ABI 3100 Genetic Analyzer von Applied Biosystems (Foster City, USA) durchgeführt. Grundlage der Sequenzierung war die Didesoxynukleotidmethode (Sanger *et al.*, 1977).

2.2.3 Herstellung von genomischer DNA und cDNA

2.2.3.1 Gewinnung von genomischer DNA aus *D. melanogaster*

Zur Gewinnung von genomischer DNA aus *D. melanogaster* wurde ein von Qiagen (Hilden) vertriebenes Kit (Genomic DNA Kit) verwendet. Es wurden 20 mg, d.h. ca. 15 Wildtyp-Fliegen (*OreR*) in flüssigem Stickstoff schockgefroren und anschließend mit Hilfe eines Eppendorf-Mikropistills in 2 ml Puffer G2 mechanisch homogenisiert. Das Homogenisat wurde mit 100 µl Protease versetzt, gemischt und anschließend für zwei Stunden bei 50°C inkubiert. Der verwendete Puffer G2 lysiert den Zellkern und denaturiert Proteine wie Nukleasen, Histone und virale Partikel. Die Protease verdaut die denaturierten Proteine in kleine Fragmente. Die Kombination von Puffer G2 und Protease gewährleistet, dass alle an die DNA gebundenen Proteine zur Aufreinigung

der genomischen DNA abgelöst werden. Die im Puffer G2 enthaltene RNase A bewirkt eine Degradierung von RNA, die später über die Säule entfernt wird. Nach der zweistündigen Inkubation wurde das Homogenisat für 10 Minuten bei 2300 g und 4°C abzentrifugiert, der Überstand abgenommen, gemischt und auf eine Säule gegeben. (Die Säule besteht aus einem Anionenaustauscherharz, an das die genomische DNA bei niedrigen Salzkonzentrationen bindet). Die genomische DNA auf der Säule wurde dreimal mit 1 ml Puffer QC gewaschen. Auf diese Weise konnten RNA, Proteine und Verunreinigungen geringen Molekulargewichts entfernt werden. Eine zweimalige Zugabe von 1 ml Puffer QF, der eine hohe Salzkonzentration besitzt, bewirkte die Elution der genomischen DNA, die anschließend durch Zugabe von 1,4 ml Isopropanol präzipitiert wurde. Nach Zentrifugation bei mindestens 2300 g bei 4°C für mindestens 15 Minuten wurde das entstandene Pellet mit 1 ml 70% Ethanol gewaschen. 70% Ethanol bewirkt eine Entfernung von präzipitierten Salzen. Das luftgetrocknete Pellet wurde in 100 µl EB-Puffer aufgenommen und bei 55°C für eine Stunde gelöst.

2.2.3.2 Präparation von RNA aus adulten Flöhen und Fliegen

Die Präparation von RNA aus adulten Flöhen erfolgte nach der Methode von Han *et al.* (1987) mit dem RNeasy Mini Kit von Qiagen. Für die Präparation von RNA aus *C. felis* wurden Flöhe in flüssigem Stickstoff tiefgefroren, um die Tiere zu töten. Für den weiteren Umgang mit den gefrorenen Flöhen mussten alle Geräte mit einer Natrium-Hypochlorit-Lösung (10%ig) und einem RNase Away Spray (Molecular BioProducts, San Diego, USA) behandelt werden, um DNA- und RNase-Kontaminationen zu verhindern. Die Flöhe wurden in einen Mörser gegeben und unter Zugabe von flüssigem Stickstoff aufgeschlossen. Etwa 50 mg des Flohmaterials wurden in ein Eppendorf Reaktionsgefäß gegeben. Anschließend wurden 600 µl RLT-Puffer zugegeben und die Probe wurde geschüttelt. RLT-Puffer enthält Guanidinisothiocyanat, welches stark denaturierend wirkt und so RNasen inaktiviert. Das Homogenisat wurde mit einer Tischzentrifuge bei 16.000 g für eine Minute zentrifugiert und anschließend auf einen QIAshredder (Qiagen, Hilden) gegeben. Durch erneutes Zentrifugieren wurde das Homogenisat mit Hilfe der Säule von den unlöslichen Bestandteilen der Flöhe getrennt. Der Durchfluss wurde nochmals für 3 min bei 16.000 g zentrifugiert und der Überstand abgenommen für nachfolgende Schritte. Ein Volumen von 600 µl 70 %igem RNase-freiem Ethanol wurde zugefügt. Das Gemisch wurde auf eine RNeasy-Säule gege-

ben und für 1 min bei 16.000 g zentrifugiert, damit die RNA an die Membran binden konnte und Kontaminationen abgeschieden wurden. Die Probe wurde durch Waschen mit 700 µl RW1-Puffer und 2 x 500 µl RPE-Puffer gereinigt und mit 30 bis 50 µl RNase-freiem Wasser eluiert. Abschließend wurde die Konzentration der RNA mittels photometrischer Messung bestimmt und mit einer Formaldehyd-Agarosegelelektrophorese auf Menge und Verunreinigungen kontrolliert (siehe 2.2.3.3).

Bei der RNA-Präparation von Fliegen wurden die Tiere anders aufgeschlossen: Etwa 30 Fliegen wurden mit flüssigem Stickstoff schockgefroren und anschließend mit 6 Stahlkugeln (Durchmesser: 3 mm) und 600 µl RLT-Puffer in einem Microdismembrator bei 2500 Bewegungen pro Minute für 2 min geschüttelt. Anschließend wurde bei 16.000 g für 2 min zentrifugiert und der Überstand wurde auf einen QIAshredder (Qiagen, Hilden) gegeben. Alle übrigen Schritte wurden wie bei der RNA-Präparation von Flöhen durchgeführt.

2.2.3.3 Formaldehyd-Agarose Gel für RNA-Proben

RNA-Proben können - mit Formamid behandelt - in Agarosegelen elektrophoretisch aufgetrennt werden. Die Methode wurde nach Lehrach *et al.* (1977), Goldberg (1980) und Rosen *et al.* (1990) durchgeführt, siehe auch Sambrook und Russel (2001). Zur Überprüfung von RNA-Proben auf einem Agarosegel sind besondere Bedingungen notwendig, um einen Abbau der einzelsträngigen RNA durch RNasen zu verhindern. Für ein solches Gel wurden 1,2 g Agarose, 10 ml 10 x Formaldehyd-Gel Puffer *ad* 100 g mit RNase freiem Wasser aufgeköcht und auf 65°C abgekühlt. Anschließend wurden 1,8 ml 12,3 M Formaldehyd zugesetzt und das Gel wurde in eine Gelkammer gegossen. Nach der Polymerisation des Gels wurde das Gel mit 10 x Formaldehyd-Gel Puffer beschichtet. Ein Volumen von 3 µl Probe wurde mit 9 µl Puffer für RNA-Proben, 1,2 µl Auftragspuffer für RNA und 0,3 µl Ethidiumbromid versetzt und in eine Tasche des Gels gegeben. Die Auftrennung im elektrischen Feld erfolgte bei 100 V. Mit Hilfe eines UV-Transilluminators (312 nm) wurde die aufgetrennte RNA zur Fluoreszenz angeregt und konnte so betrachtet werden.

2.2.3.4 cDNA-Synthese

Die cDNA-Synthese erfolgte mit dem SUPERSCRIPT™ First Strand Synthesis System for RT-PCR von Invitrogen. Es wurden 10 µl DNase-verdaute RNA (2.2.3.2) mit 1 µl dNTP-Mix und 1 µl Oligo dT-*primer* versetzt und 5 min bei 65°C inkubiert. Oligo-dT-*primer* bestehen aus 16-20 Thymidinen, die an den Poly-A-Schwanz der mRNA binden. Anschließend erfolgte die Zugabe von 2 µl 10x RT Buffer, 4 µl 25 mM MgCl₂, 2 µl 0,1 M DDT und 1 µl RNaseOUT Recombinant RNase Inhibitor. Nach zweiminütiger Inkubation bei 42°C wurde SuperScript II Reverse Transkriptase (RT) zugesetzt. Bei diesem Enzym handelt es sich um eine modifizierte Reverse Transkriptase (RNA-abhängige DNA-Polymerase) aus dem *Moloney murine leukemia virus* (MMLV-RT). Die SuperScript™ besitzt im Vergleich zu MMLV-RTs ein höheres Temperaturoptimum und keine RNaseH-Aktivität mehr. Diese Eigenschaften ermöglichen die Herstellung deutlich längerer Transkripte. Die cDNA-Synthese erfolgte bei 42°C für 50 min, die anschließende Termination der Reaktion bei 70°C für 15min. Durch die Zugabe von 1 µl RNaseH konnte die anfangs eingesetzte RNA entfernt werden. Die auf diese Weise hergestellte cDNA wurde mit Hilfe des Pellet Paint™ Co-Precipitant Kits von Novagen gefällt und deren Konzentration abschließend photometrisch bestimmt.

2.2.4 Identifikation und Klonierung unbekannter Orthologer

2.2.4.1 cDNA *library* von *C. felis*

Für die degnerierte *nested* PCR und die Klonierung der Gene über die gesamte Länge wurde eine cDNA *library* von der Firma Life Technologies (Maryland, USA) verwendet.

Für die Herstellung dieser *cDNA library* wurde Gesamt-RNA von *C. felis* verwendet, welche anschließend in cDNA überführt wurde. Die cDNA-Sequenzen wurden dann in den Vektor pCMVSPORT6 kloniert. Die *library* wurde amplifiziert und präpariert:

100 ml LB-Medium wurden mit 3 ml Bakteriensuspension ($2,27 \times 10^8$ cfu) der Firma Life Technologies (Maryland, USA) angeimpft und bei 37°C und 200 Umin⁻¹ im Schüttler inkubiert, bis eine optische Dicht von 1 erreicht war. Anschließend wurde die Bakterienkultur für 15 min bei 6000 g abzentrifugiert.

Das Pellet wurde in einer Maxi-Präparation (Qiagen, Hilden) (2.2.1.8) aufgearbeitet und in 400 µl EB-Puffer aufgenommen.

2.2.4.2 Design degenerierter *Primer*

Für die Identifikation unbekannter orthologer Gene aus einem nicht sequenzierten Genom können keine spezifischen *primer* verwendet werden, weil die Sequenz nicht exakt bekannt ist. Deshalb werden degenerierte *primer* verwendet, da diese diverse Varianzen in einer DNA-Sequenz berücksichtigen. Zunächst wird ein *alignment* zwischen Proteinsequenzen verschiedener Organismen des gesuchten Gens erstellt, wobei immer Proteinsequenzen verwendet werden. Der Vergleich von Proteinsequenzen ergibt meist eine höhere Konservierung als der Vergleich von DNA-Sequenzen, da z.B. ein Codon in Genen verschiedener Spezies durch die Degenerierung des genetischen Codes oder durch Art-spezifische *codon usage* unterschiedlich sein kann, aber die Translation zur gleichen Aminosäure in den Proteinen führt.

Stark konservierte Sequenzabschnitte bieten sich für das Design von *primern* an, allerdings muss neben dem Konservierungsgrad zwischen den Sequenzen auch der Degenerierungsgrad berücksichtigt werden. Eine Aminosäure kann - wie bereits erwähnt - durch mehrere verschiedene Basentriplets codiert werden, z.B. wird Serin durch sechs verschiedene Codons determiniert. Aminosäuren, die von möglichst wenigen Codons bestimmt werden, z.B. Methionin und Tryptophan eignen sich besonders für das Design degenerierter *primer*. Für den Degenerierungsgrad der Aminosäuren siehe Tabelle 2.4. Ein *alignment* muss also auf den Konservierungsgrad und den Degenerierungsgrad hin betrachtet werden, um geeignete Bereiche für degenerierte *primer* festzulegen. Für den Dopamine Rezeptor I von *A. gambiae*, *D. melanogaster* und *A. mellifera* wird das Design der degenerierten *primer* beispielhaft gezeigt: Das *alignment* (Abb. 2.1) zeigt die Bereiche, für die *primer* hergestellt wurden. Die Herstellung des *primers*, der in der Abbildung mit einer 1 gekennzeichnet ist, wird hier beispielhaft beschrieben (siehe Tab. 2.3). Die Aminosäuresequenz wurde zunächst zurück übersetzt in die Basentriplets (für die Buchstabencodierung siehe Tab. 2.5). Die Buchstaben, welche für mehrere Basen verwendet werden, wurden auch bei der Bestellung der *primer* angegeben. Die Firma MWG Biotech AG (Ebersberg) stellt in diesem Fall ein *primer*-Gemisch her, das alle Varianten der Oligos enthält. Um den Grad der Degenerierung eines *primers* zu quantifizieren, wird jedem Buchstaben die Anzahl der Basen, für die er codiert, zugewiesen und die

Ziffern werden miteinander multipliziert. Für den Beispiel-*primer* würde die Degeneration $4 \times 2 \times 4 = 32$ betragen. Ein degenerierter *primer* sollte eine Degeneration von 150 nicht überschreiten, da er dadurch zu unspezifisch würde und in einer PCR zu viele unspezifische Produkte gebildet würden. Um den Degenerierungsgrad zu verringern, kann für ein N die Base Inosin eingesetzt werden. Diese kann mit Uracil, Cytosin und Adenin paaren (Knippers, 2006). Am 5'- und 3'- Ende eines *primers* sollte darauf geachtet werden, dass keine mehrfach codierenden Buchstaben eingesetzt werden, um die Bindung der *primers* an das *template* während der PCR nicht unnötig zu erschweren (Mühlhardt, 2003).

Tab.2.3. Rückübersetzung der Sequenz des *Primers 1* aus Abb. 2.1.

M	T	F	A	G	V	N	Aminosäure
ATG	ACN	TTY	GCN	GGN	GTN	AAY	Rückübersetzung
ATG	ACN	TTY	GCI	GGN	GTI	AA	Endgültiger Primer
	4	2		4			Degeneration

Die Tabelle zeigt die Vorgehensweise beim Design eines degenerierten *primers*: eine Aminosäuresequenz möglichst hoher Konservierung und möglichst geringer Degenerierung wird zurück-übersetzt in die korrespondierende Nukleotidsequenz unter Berücksichtigung der Degenerierung. Der Buchstabe N, der für alle vier Basen codiert, wird an einigen Stellen durch ein Inosin ersetzt, um die Degenerierung zu begrenzen. Am Anfang und am Ende eines degenerierten *primers* werden variable Buchstaben entfernt. Die Degeneration ergibt sich aus den übrigen Buchstaben im *primer*, die nicht eindeutig sind. Der endgültige Degenerierungsgrad ergibt sich aus der Multiplikation der einzelnen Werte: $4 \times 2 \times 4 = 32$.

Tab.2.4. Degenerierter genetischer Code.

	Aminosäure	Codons	Revers & Komplementär	Anzahl Codons
A	Alanin (Ala)	GCN	NGC	A
C	Cytein (Cys)	TGY	RCA	C
D	Aspartat (Asp)	GAY	RTC	D
E	Glutamat (Glu)	GAR	YTC	E
F	Phenylalanin (Phe)	TTY	RAA	F
G	Glycin (Gly)	GGN	NCC	G
H	Histidin (His)	CAY	RTG	H
I	Isoleucin (Ile)	ATH	DAT	I
K	Lysin (Lys)	AAR	YTT	K
L	Leucin (Leu)	YTN	NAR	L
M	Methionin (Met)	ATG	CAT	M
N	Asparagin (Asn)	AAAY	RTT	N
P	Prolin (Pro)	CCN	NGG	P
Q	Glutamin (Gln)	CAR	YTG	Q
R	Arginin (Arg)	MGN	NCK	R
S	Serin (Ser)	WSN	NSW	S
T	Threonin (Thr)	CAN	NGT	T
V	Valin (Val)	GTN	NAC	V
W	Tryptophan (Trp)	TGG	CCA	W
Y	Tyrosin (Tyr)	TAY	RTA	Y
*	Stop	TRR	YYA	*

Die Tabelle zeigt den Grad der Degenerierung der Codons, die für Aminosäuren codieren und wurde für das Design der degenerierten *primer* verwendet. Methionin und Tryptophan werden nur über ein Basentriplett bestimmt und sind damit für das *primer* Design besonders gut geeignet. Siehe auch <http://www.bioinformatics.vg/geneticcode.shtml>

Tab.2.5. Buchstabencodierung.

Abk.	M	R	W	S	Y	K	V	H	D	B	N
Basen	AC	AG	AT	CG	CT	GT	ACG	ACT	AGT	CGT	ACGT

Quelle: <http://www.mwg-biotech.com> und <http://www.bioinformatics.vg/geneticcode.shtml>

2.2.4.3 Degenerierte *nested* PCR

Die degenerierten *primer* wurden in *nested* PCRs eingesetzt. In einer solchen „verschachtelten“ PCR wird eine erste PCR durchgeführt und das Produkt wird als *template* für eine zweite Amplifikation mit anderen *primern* verwendet. Das zweite *primer*-Paar liegt dabei zwischen dem ersten (Abb. 2.2). Durch diese Methode wird die Spezifität erhöht und es werden weniger unerwünschte Nebenprodukte amplifiziert. Es können extrem geringe *template*-Mengen nachgewiesen werden (Mühlhardt, 2003). Z.B. wurde mit den *primern* deg_Primer2R und deg_Primer5F (siehe Anhang) die erste PCR und mit den *primern* deg_Primer3F und deg_Primer10R (siehe Anhang) eine zweite PCR für den CfDopRI durchgeführt. Als *template* wurde die cDNA *library* (2.2.4.1) verwendet.

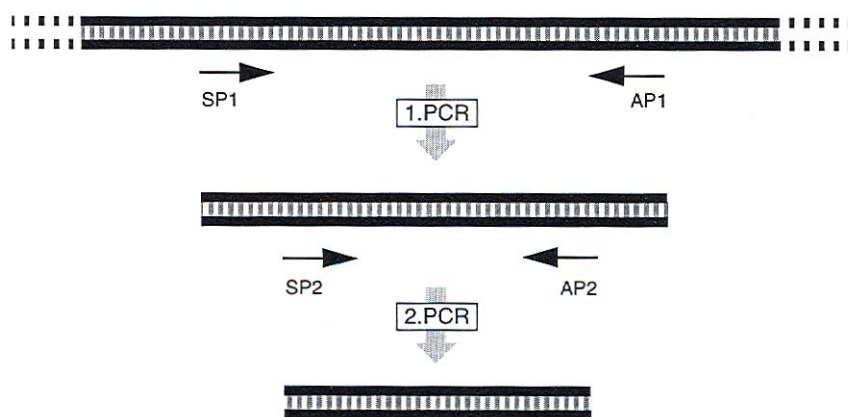


Abb. 2.2. Prinzip einer *nested* PCR. Für eine *nested* PCR wird zunächst eine erste PCR mit einem äußeren *primer*-Paar (*sense-primer*, SP1 und *antisense-primer*, AP1) durchgeführt. Das Amplifikat der ersten PCR dient in einer zweiten PCR mit einem zweiten inneren *primer*-Paar (*sense-primer*, SP2 und *antisense-primer*, AP2) als *template*. (Quelle: Mühlhardt, 2003)

Nach folgendem Beispiel wurden die Ansätze erstellt:

1. PCR:

MgCl ₂	1,5 µl
Puffer	5 µl
dNTP	1 µl
H ₂ O	39 µl
Taq	0,5 µl
<i>primer</i> jeweils	0,5 µl
<i>template</i>	2 µl

Dieser Ansatz wurde zwei Mal erstellt, um zwei verschiedene *annealing*-Temperaturen verwenden zu können. Folgendes Programm wurde im Thermocycler genutzt:

94°C	2 min	} 35 Zyklen
94°C	0,5 min	
45°C/50°C	0,5 min	
72°C	1 min	
72°C	10 min	
4°C	forever	

Anschließend wurde eine 2. PCR mit folgendem Ansatz und Programm durchgeführt:

MgCl ₂	1,5 µl
Puffer	5 µl
dNTP	1 µl
H ₂ O	39 µl
Taq	0,5 µl
<i>primer</i> jeweils	0,5 µl
1. PCR	2 µl

94°C	2 min	}	35 Zyklen
94°C	0,5 min		
50°C	0,5 min		
72°C	1 min		
72°C	10 min		
4°C	forever		

Der gesamte Ansatz der zweiten PCR wurde auf ein präparatives Agarosegel aufgetragen und die Proben wurden elektrophoretisch aufgetrennt (2.2.1.11). Konnten Banden der erwarteten Größe identifiziert werden, so wurden diese mittels Gelextraktion (2.2.1.11) isoliert und in den pCRII-TOPO-Vektor kloniert (2.2.1.4) und anschließend sequenziert und bioinformatisch analysiert.

2.2.4.4 *Rapid amplification of cDNA ends (RACE)*

Für die Amplifikation der 3'- und 5'-Enden der unbekanntenen Gene wurde das BD SMART RACE cDNA Amplification Kit (BD Biosciences, Palo Alto, CA, USA) verwendet. Durchführung des 3'-RACE: Zunächst wurde mit RNA von *C. felis* (2.2.3.2) und einem modifiziertem Oligo-dT-*primer* des Kits (3'-RACE CDS *primer* A) cDNA für die Amplifikation von 3'-Enden hergestellt. Der Oligo-dT-*primer* besitzt zusätzlich eine 5'-überhängende Sequenz von 23 Basen. Die PCR wird mit einem genspezifischen *primer* (GSP) und einem *universal primer* A Mix durchgeführt. Der *primer*-Mix des Kits enthält einen langen und einen kurzen *universal primer*. Lediglich der lange *universal primer* besitzt die revers komplementäre Sequenz, welche während der cDNA-Synthese angehängt wurde. Dieser fügt erneut eine Sequenz an den neu synthetisierten DNA-Strang an und ermöglicht im nächsten Zyklus die Bindung des kurzen *primers*, der genau zu dieser Sequenz passt (siehe Abb. 2.3). Das Einfügen von Sequenzen mit Hilfe von Überhängen an den *primern* erhöht die Spezifität bei der Amplifikation (Mühlhardt, 2003).

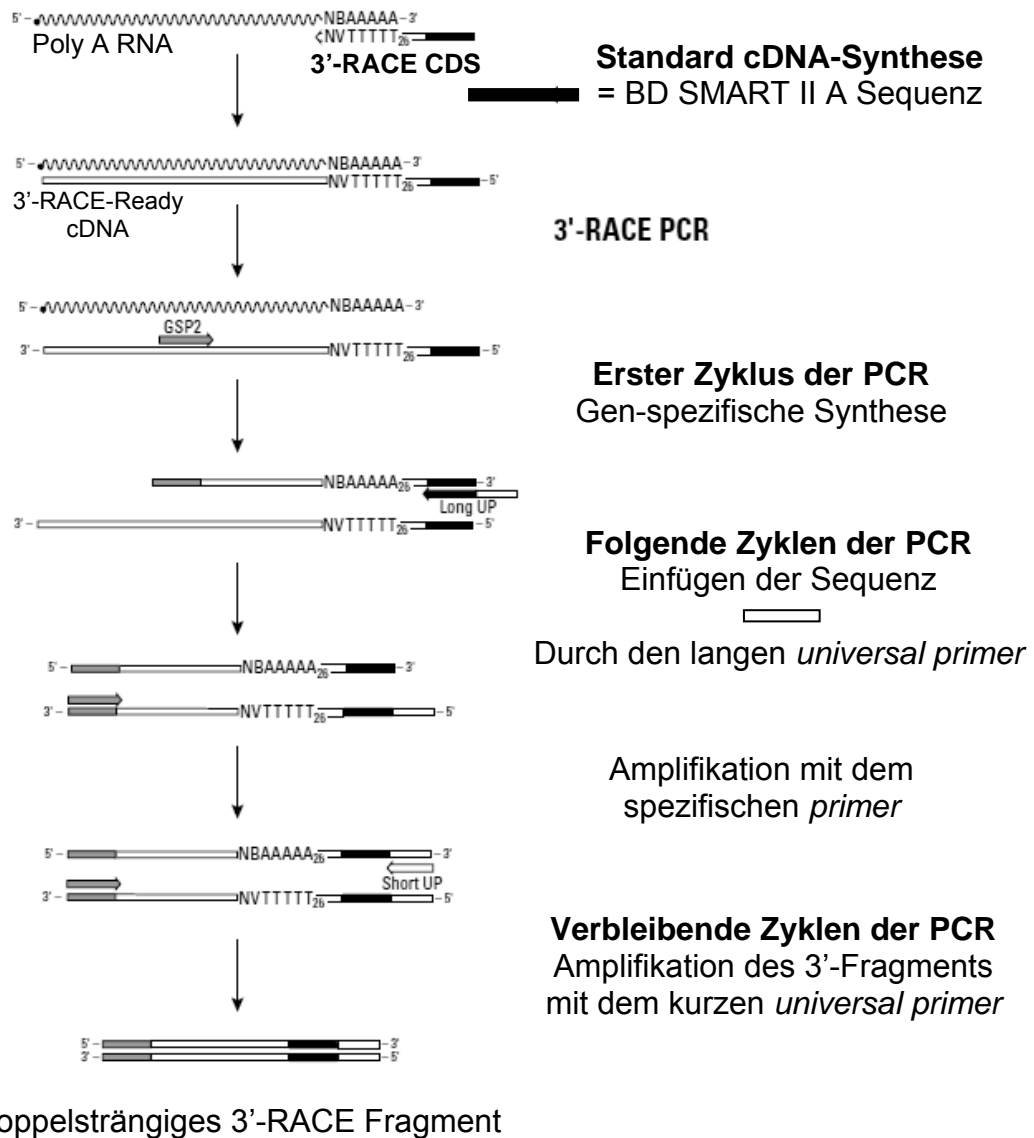


Abb. 2.3. Herstellung einer 3'-RACE-cDNA und anschließende RACE-PCR. Mit RNA von *C. felis* und dem BD SMART RACE cDNA Amplification Kit wurde 3'-RACE-cDNA hergestellt. Diese wurde anschließend in einer RACE-PCR eingesetzt, um die 3'-Enden der unbekannt Genes zu identifizieren. (Quelle: BD SMART RACE cDNA Amplification Kit).

Durchführung des 5'-RACE: Am 5'-Ende einer eukaryotischen mRNA befindet sich kein Poly-A-Schwanz, sondern eine andere Modifikation. Hierfür wird das 5'-Triphosphatende einer neu entstehenden mRNA modifiziert: Durch Hydrolyse wird zunächst ein Phosphatrest entfernt. Das 5'-Diphosphatende greift dann ein α -Phosphoratom eines GTP an und bildet eine sehr ungewöhnliche 5',5'-Triphosphatbindung. Dieses charakteristische Ende wird als Cap („Kappe“) bezeichnet. Caps tragen zur Stabilität der mRNAs bei, indem sie deren 5'-Ende vor Phosphatasen und Nucleasen schützen (Berg *et al.*, 2003). Diese Modifikation kann allerdings nicht zur Bindung eines *primers* verwendet werden. Deshalb muss zu Beginn der 5'-cDNA-Synthese zunächst auf einen Oligo-dT-*primer* zurückgegriffen werden. Am Ende der Synthese des cDNA-Strangs hängt die verwendete BD PowerScript Reverse Transcriptase (Variante der *Moloney murine leukemia virus reverse transcriptase*) drei bis fünf Basen Cytosin an. Dadurch kann in den weiteren Synthese-Zyklen ein *primer* des Kits über Guanin-Reste binden. Dieser *primer* fügt eine weitere Sequenz an. Diese zusätzliche Sequenz am 5'-Ende der RACE-cDNA wird in der PCR vom langen *universal primer* zur Bindung genutzt. Analog zur 3'-RACE-PCR führt der lange *universal primer* erneut eine Sequenz ein, an die der kurze *universal primer* im nächsten Synthesezyklus binden kann. Zusammen mit einem genspezifischen *primer* (GSP) kann so das 5'-Ende eines Gens amplifiziert werden (siehe Abb. 2.4) (Mühlhardt, 2003).

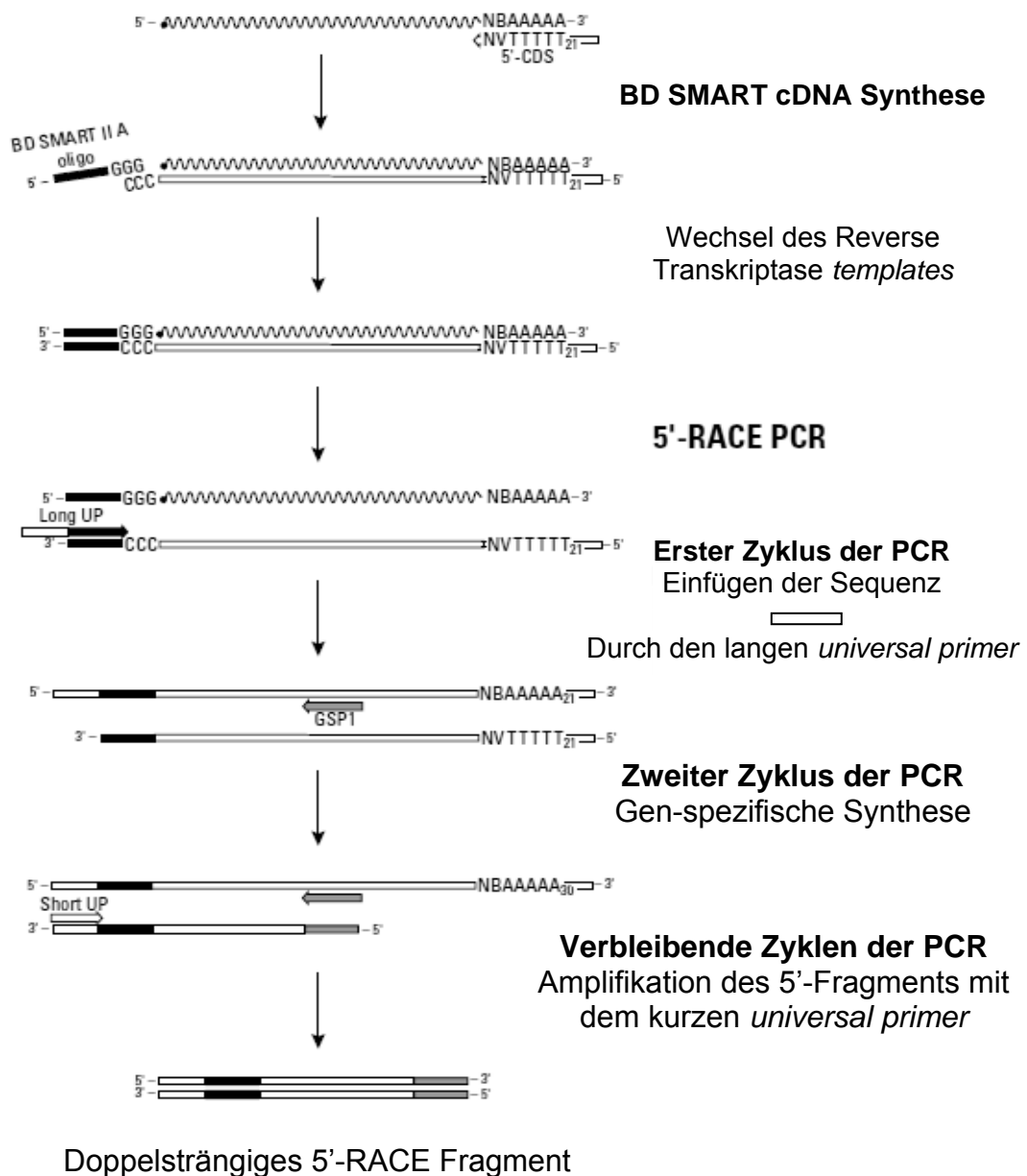


Abb. 2.4. Herstellung einer 5'-RACE-cDNA und anschließende RACE-PCR. Mit RNA von *C. felis* und dem BD SMART RACE cDNA Amplification Kit wurde 5'-RACE-cDNA hergestellt. Diese wurde anschließend in einer RACE-PCR eingesetzt, um die 5'-Enden der unbekannt Genes zu identifizieren. (Quelle: BD SMART RACE cDNA Amplification Kit).

Anschließend an eine erste 5'- bzw. 3'-RACE PCR kann eine zweite *nested* PCR durchgeführt werden. Im BD SMART RACE cDNA Amplification Kit ist ein *nested universal primer A* enthalten. In Kombination mit Gen-spezifischen *nested primern* kann eine erhöhte Spezifität für die RACE-PCR erreicht werden.

Für die Herstellung von RACE-cDNA wurden folgende Ansätze pipettiert:

5'-RACE-cDNA:

700 ng RNA
1 µl 5' CDS *primer*
1 µl BD SMART II A Oligo

3'-RACE-cDNA:

700 ng RNA
1 µl 3'-RACE CDS *primer A*
1 µl H₂O

Mischen durch Auf- und Abpipettieren.

Inkubation: 70°C für 2 min und anschließend 4°C für 2 min

Anschließend wurde der Ansatz auf Eis gestellt.

Zugabe von:

2 µl 5 x First-Strand Buffer
1 µl DTT (20 mM)
1 µl dNTP Mix
1 µl BD Power Script Reverse Transcriptase

Mischen durch Auf- und Abpipettieren.

Inkubation: 42°C für 1,5 h

Anschließend wurde der Ansatz in 100 µl Tricine-EDTA-Puffer verdünnt und bei 72°C für 7 min inkubiert.

PCR-Ansätze:

34,5 µl	H ₂ O
10 µl	Puffer
2 µl	dNTP Mix
2 µl	Polymerase
2,5 µl	RACE cDNA
5 µl	<i>universal primer</i> Mix
1 µl	Spezifischer <i>primer</i> (10 µM)

Programm:

94°C	3 min	} 29 Zyklen
94°C	0,5 min	
63°C	0,5 min	
72°C	3 min	
72°C	5 min	
4°C	forever	

Zweiter PCR-Ansatz:

Verdünnung von 0,5 µl des ersten PCR-Ansatzes in 12,5 µl Trincine-Puffer.

34,5 µl	H ₂ O
10 µl	Puffer
2 µl	dNTP Mix
2 µl	Polymerase
5 µl	des verdünnten ersten PCR-Ansatzes
5 µl	<i>nested universal primer</i> Mix
1 µl	Spezifischer <i>primer</i> (10 µM)

Programm:

94°C	3 min	}	20 Zyklen
94°C	0,5 min		
63°C	0,5 min		
72°C	1 min		
72°C	5 min		
4°C	forever		

Der Reaktionsansatz der zweiten PCR wurde auf ein präparatives 1%iges Agarosegel aufgetragen und elektrophoretisch aufgetrennt (2.2.1.11). Banden der erwarteten Größe wurden aus dem Gel extrahiert (2.2.1.11) und in den pCRII-TOPO-Vektor kloniert (2.2.1.4) und anschließend sequenziert (2.2.2.3).

2.2.4.5 *In silico* Analyse der Sequenzen aus degenerierter *nested* PCR und RACE-PCRs

Die Sequenzen der degenerierten *nested* PCR und der RACE-PCRs wurden mit Hilfe von Vector NTI Advance version 9.0 (Invitrogen, Carlsbad, USA) auf überlappende Bereiche untersucht und zu einer Sequenz zusammengelegt. Es wurde ein *open reading frame* (ORF) vorhergesagt und die Sequenz des potentiellen neuen Gens wurde näher untersucht: Es wurde eine Blast Analyse (Altschul *et al.*, 1990) mit der Software Metalife Trinity 2006 version 2.2 durchgeführt. Im Fall einer positiven Analyse – wenn die Best Hits einen orthologen Dopamin-Rezeptor eines Insekts wie z.B. *A. mellifera*, *D. melanogaster* oder *A. gambiae* ergaben – wurde die Sequenz weiter auf Transmembran-Helices (TMH) (2.3.1) untersucht. Enthielt die Sequenz die für GPCRs typischen sieben Transmembran-Helices, wurden *primer* entworfen, die für die Amplifikation des gesamten Gens mittels PCR geeignet waren.

2.2.4.6 Identifikation fehlerfreier Gensequenzen

Bei der Amplifikation von Sequenzen durch PCR können Fehler entstehen, dann entspricht das Amplifikat an einigen Stellen nicht mehr dem *template*. Deshalb muss bei der Identifikation neuer Gensequenzen darauf geachtet

werden, dass die Sequenzen in mehreren unabhängigen Ansätzen bestätigt werden.

Für den CfDopRI und CfDopRII wurden neben den *nested*-PCR-Ansätzen und RACE-PCR-Ansätzen mehrere unabhängige PCRs zur Amplifikation des Gens über die gesamte Länge angesetzt. Hierfür wurde sowohl cDNA als auch die *cDNA-library* (Life Technologies; Maryland, USA) von *C. felis* verwendet. Die Sequenzen wurden in den pCRII-TOPO-Vektor kloniert und anschließend sequenziert. Alle Sequenz-Informationen wurden mit Vector NTI Advance Version 9.0 von Invitrogen (Carlsbad, USA) in einem *contig* zusammengelegt und ausgewertet. Mittels dieser Vorgehensweise wurden die fehlerfreien Sequenzen ermittelt und in allen Experimenten wurden nur Klone mit diesen fehlerfreien Sequenzen verwendet.

2.2.4.7 Klonierung des Dopamin-Rezeptors I und II von *C.felis*

Mit den *primern*, die im Anhang (*primer* für die Klonierung des CfDopRI und CfDopRII über die gesamte Länge) angegeben sind, wurden PCRs durchgeführt und die Dopamin-Rezeptoren I und II wurden über die gesamte Länge amplifiziert und anschließend kloniert.

Der CfDopRI wurde in den Vektor pCRII-TOPO kloniert. Um den CfDopRI in den pSP64T umzuklonieren, wurden *primer* mit *Bgl*II-Überhängen (siehe Anhang) in einer PCR verwendet. Das Amplifikat wurde in den pSP64T einkloniert. Der CfDopRI wurde anschließend aus dem pCRII-TOPO-Vektor in den pcDNA3.1(+) umklont. Hierfür wurden die Restriktionsschnittstellen *Eco*RV und *Spe*I des pCRII-TOPO-Vektors und die Restriktionsschnittstellen *Eco*RV und *Xba*I des pcDNA3.1(+) verwendet. Da die Enzyme *Spe*I und *Xba*I den gleichen 5'-Überhang (5'-CTAG) erzeugen, konnten die erzeugten *sticky ends* miteinander ligiert werden.

Da *primer* mit überhängenden Restriktionsschnittstellen für *Bgl*II zur Klonierung des CfDopRII verwendet wurden, wurde dieser Rezeptor zunächst in den pSP64T und parallel in den pCRII-TOPO-Vektor kloniert. Über die *Eco*RI Schnittstellen des pCRII-TOPO-Vektors wurde der Rezeptor in den pcDNA3.1(+) eingebracht.

2.2.4.8 Klonierung des Dopamin-Rezeptors II von *D. melanogaster*

Der DmDopRII (Feng *et al.*, 1996) wurde mit *primern*, die Überhänge für *Bcl*-Schnittstellen besaßen (siehe Anhang), mittels PCR aus cDNA von *D. melanogaster* amplifiziert. Das Restriktionsenzym *Bcl* erzeugt den gleichen 5'-Überhang (5'-GATC) wie *Bgl*II. Da der DmDopRII eine interne *Bgl*II-Schnittstelle besitzt, wurde das PCR-Fragment mit den *Bcl*-Überhängen mit *Bcl* verdaut und in den zuvor mit *Bgl*II linearisierten pSP64T einkloniert.

Um den DmDopRII in den pcDNA3.1(+) zu klonieren, wurde eine PCR mit *primern* mit einem *Eco*RI-Überhang für den *forward primer* und einem *Not*I-Überhang für den *reverse primer* (siehe Anhang) und der *proof-reading* Polymerase Pfu durchgeführt. Das PCR-Fragment wurde in den pcDNA3.1(+) kloniert und durch Sequenzierung wurde bestätigt, dass keine Fehler durch die PCR eingeführt wurden.

2.3 Bioinformatik

2.3.1 Bioinformatische Analysen

Für den Vergleich größerer Sequenzdatensätze wurde die Software Genlight (Beckstette *et al.*, 2004) verwendet. GPCR Sequenzen von *D. melanogaster* stammen von der Flybase (batch download from <http://flybase.bio.indiana.edu/>; Brody und Cravchik, 2000). Zusätzlich wurden GPCRs von *A. gambiae* (Hill *et al.*, 2002) und genomische Sequenzen von *Aedes aegypti* (www.ensembl.org; *Aedes_aegypti*. AEDES1. august.pep_tigr.fa und *Aedes_aegypti*.AEDES1.august.pep_vector base.fa), *A. gambiae* (www.ensembl.org; *Anopheles_gambiae*.A gamP3-feb.pep.fa), *A. mellifera* (www.ensembl.org; *Apis_mellifera*.AMEL 2.0.february.pep.fa), *Bombyx mori* (<http://silkworm.genomics.org.cn>; SW_ge2k_ BGF.pep) und von *D. melanogaster* (www.ensembl.org; *Drosophila_melanogaster*.BDGP4. february.pep.fa) verwendet.

Die Vorhersage von Transmembran-Helices wurde mit dem TMHMM server Version 2.0 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/>; Krogh *et al.*, 2001) durchgeführt. *Alignments* wurden mit ClustalW Version 1.82 (<http://www.ebi.ac.uk/clustalw/>; Thompson *et al.*, 1994) erstellt und mit der Software GeneDoc Version 2.6.001 editiert. Blast-Suchen wurden auf der Internetseite des *National Center for Biotechnology Information* - NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) durchgeführt.

nlm.nih.gov/BLAST/; Altschul *et al.*, 1990) bzw. mit der Software Metalife Trinity 2006 Version 2.2 durchgeführt.

Phylogenetische Stammbäume wurden ebenfalls mit der Software Metalife Trinity 2006 Version 2.2 (Metalife AG, Winden) erstellt. Identitäten und *contigs* zwischen verschiedenen Sequenzen wurden mit Vector NTI Advance Version 9.0 von Invitrogen, Carlsbad, USA (Score Matrix BLOSUM62) bestimmt.

2.4 Zellkultur

2.4.1 Humane embryonale Nierenzellen

Humane embryonale Nierenzellen (*human embryonic kidney cells*; HEK293 von der *European Collection of Cell Cultures*, Salisbury, UK) wurden als zelluläres Expressionssystem für die Dopamin-Rezeptoren von *C. felis* ausgewählt. Die Kultivierung von HEK-Zellen wurde bereits 1950 erstmals beschrieben. John Enders, Frederick Robbins und Thomas Weller von der Harvard Universität untersuchten den Polio-Virus in verschiedenen humanen embryonalen Nierenzellen. Dafür wurde ihnen der Nobel-Preis für Medizin im Jahre 1954 verliehen (Robbins *et al.*, 1950).

2.4.2 Medium

Als Medium wurde *Minimum Essential Medium Eagle with Earl* (MEM von Sigma, München) mit folgenden Zusätzen verwendet:

- 10 % Foetal bovine serum (PAN Biotech, Aidenbach)
- 5% L-Glutamine 200 mM (100x) liquid (Invitrogen, Karlsruhe)
- 5% Penicillin-Streptomycin Lösung (10.000 units/ml Penicillin und 10.000 µg/ml Streptomycin von Invitrogen, Karlsruhe)
- 5% MEM Non Essential Amino Acids (100x) liquid (Invitrogen, Karlsruhe)

Zum Waschen der Zellen wurde der Puffer DPBS (PAN Biotech, Aidenbach) verwendet. Alle Angaben entsprechen den Empfehlungen der *European Collection of Cell Culture* (<http://www.ecacc.org.uk>).

2.4.3 Kultivierung

Für die Kultivierung von HEK293 Zellen wurden Cellstar Zellkultur Schalen (Greiner, Nürtingen) mit einem Durchmesser von 10 cm verwendet. Die Zellen wurden zweimal wöchentlich passagiert: Zunächst wurde das alte Medium abgesaugt und die Zellen wurden mit 10 ml DPBS (PAN Biotech, Aidenbach) gewaschen. Anschließend wurden die Zellen mit 1 ml Trypsin/EDTA (Invitrogen, Karlsruhe) für 2 min inkubiert. Dieses Reagenz wurde abgesaugt und die Zellen wurden mit Medium suspendiert. Dabei wurde das Volumen der Zelldichte angepasst. In neuen Zellkulturschalen wurde Medium vorgelegt und die Zellsuspension wurde zugefügt. Insgesamt betrug das Volumen der neuen Schalen immer 10 ml mit einer Zelldichte von 10^{-5} bis 10^{-6} Zellen pro ml. Die Zellen wurden bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert. Alle Angaben entsprechen den Empfehlungen der *European Collection of Cell Culture* (<http://www.ecacc.org.uk>).

2.4.4 Transiente Transfektion

Für die Transfektion von HEK293-Zellen wurde das PolyFect Transfection Reagent (Qiagen, Hilden) verwendet. Das Reagenz assembliert DNA in kompakte Strukturen, wodurch das Einführen von Nucleinsäuren in die Zellen optimiert wird. Der PolyFect-DNA-Komplex besitzt insgesamt eine positive Ladung, um eine Bindung an negativ geladene Rezeptoren (z.B. mit Sialinsäure verknüpfte Glycoproteine) auf der Oberfläche von eukaryotischen Zellen zu ermöglichen. In der Zelle puffert das Reagenz das Lysosom nach der Fusion mit dem Endosom und führt so zu einer pH-abhängigen Inhibition der lysosomalen Nucleasen. Dies sichert die Stabilität des PolyFect-DNA-Komplexes und den Transport der intakten DNA in den Nucleus (Qiagen Handbuch).

Etwa 24 h vor der Transfektion wurden die HEK293-Zellen subkultiviert. Entweder wurden 10 cm Zellkulturschalen (Greiner, Nürtingen) mit einer Zellzahl von 10^{-6} oder Zellkulturflaschen EasyFlask T75 (Fisher Scientific, Schwerte) mit 10^{-12} Zellen verwendet. Die Subkultivierung verbessert die Aufnahme des Komplexes, da dadurch ein normaler Zellmetabolismus gewährleistet wird. Am Tag der Transfektion sollten die Zellen eine Konfluenz von 60 bis 80% besitzen. Altes Medium wurde von den Zellen abgesaugt und neues Medium zugegeben. Es wurde folgendes Reaktionsgemisch vorbereitet (Tab.2.6):

Tab. 2.6: Reaktionsgemisch zur Transfektion von HEK293-Zellen

Kulturgefäß	DNA [μg]	MEM ohne Zusätze [μl]	PolyFect Transfection Reagent [μl]
Zellkulturschalen	8	ad 300	80
Zellkulturflaschen	16	ad 600	160

Das Reaktionsgemisch wurde für 5 bis 10 min bei RT inkubiert, damit sich der Komplex zwischen PolyFect Transfection Reagent und DNA bilden konnte. Anschließend wurde 1 ml (für die Zellkulturschalen) bzw. wurden 2 ml (für die Zellkulturflaschen) Medium mit Zusätzen zugegeben. Nach Mixen durch Pipettieren wurde das Gemisch zu den Zellen gegeben. Die Zellen wurden 24 h bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert.

2.4.5 Passage der transient transfizierten HEK293-Zellen

Um die Zellen nicht übermäßig zu schädigen, wurde das Transfektionsgemisch 24 h nach Zugabe entfernt. Die HEK293-Zellen wurden mit PBS gewaschen und mit Trypsin/EDTA (Inkubation: 2min bei RT) sowie Medium von der Zellkulturschale bzw. -flasche abgelöst. Die Zellzahl wurde mit Hilfe einer Neubauer-Zählkammer bestimmt (Lindl, 2002). Anschließend wurden die Zellen in eine 24 *well* Platte ausgesät, wobei in jedes *well* die gleiche optimierte Zellzahl gegeben wurde. Da sich gezeigt hat, dass die Zellen keine ausreichende Adhärenz in den *wells* besitzen, wurden die 24 *well* Platten vor Zugabe der Zellen mit Poly-L-Lysin beschichtet. Hierfür wurden 0,5 ml Poly-L-Lysin-Lösung (Sigma, München) in jedes *well* gegeben. Nach einer Inkubation von 30 min bei RT wurde die Lösung entfernt und die *wells* wurden drei mal mit 0,5 ml sterilem Wasser gewaschen und anschließend unter der Sterilbank getrocknet. Diese Maßnahme führte zu einer ausreichenden Haftung der HEK293-Zellen, um diese waschen und mit den jeweiligen Versuchslösungen inkubieren zu können. Eine Anzahl von 10⁶ Zellen wurde jeweils in ein 24 *well* gegeben. Anschließend wurde die Platte für 24 h bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert, damit die Zellen sich absetzen und an die Platte adhären konnten.

2.4.6 Kontrolle der Transfektionseffizienz

Mit Hilfe des Vektor-Konstruktes CAT-pcDNA3.1(+) (Invitrogen, Carlsbad, USA) und des Anti-CAT-Digoxigenin Systems (Roche, Mannheim) kann die Transfektionseffizienz von HEK293-Zellen überprüft werden. Das Enzym Chloramphenicol-Acetyl-Transferase (CAT) kommt nicht in Säugerzellen vor und wird als Reporter-Protein für Transfektion-Experimente von HEK293-Zellen verwendet. Mit Hilfe eines polyklonalen Antikörpers des Schafs kann die Expression der CAT nachgewiesen werden.

2.4.7 Stimulation der HEK293-Zellen

Eine 3-Isobutyl-1-methylxanthine (IBMX) Lösung (Sigma, München) wurde mit dem Puffer DPBS (PAN Biotech, Aidenbach) in einer Konzentration von 100 μ M hergestellt. Die Zellen wurden zunächst zwei Mal mit dieser Lösung gewaschen und anschließend mit 0,5 ml dieser Lösung für 15 min bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert, um zelleigene Phosphodiesterasen mit dem Inhibitor IBMX am Abbau des entstehenden cAMPs zu hindern. Alle Lösungen des natürlichen Liganden Dopamin und der Antagonisten wurden mit 100 μ M IBMX-PBS-Lösung angesetzt. Sollten Antagonisten getestet werden, so wurden nach dem Absaugen der IBMX-Lösung Antagonisten-Lösungen der jeweiligen Konzentration zugegeben und die Zellen wurden zusätzlich 15 min bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert. Anschließend wurde der Überstand von den Zellen abgesaugt. Nach der Zugabe von Dopamin-Lösungen verschiedener Konzentrationen in die jeweiligen *wells* wurde ebenfalls 15 min bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert. Sollten keine Antagonisten getestet werden, so wurden die Dopamin-Lösungen direkt zugefügt.

2.4.8 Bestimmung der cAMP-Konzentration

Mit Hilfe eines cAMP Enzymimmunoassays (Amersham Biosciences, Buckinghamshire, UK) wurde der cAMP-Gehalt der Zellen bestimmt. Das Prinzip des Assays beruht auf einer kompetitiven Bindung von markiertem bzw. unmarkiertem cAMP. Hierfür sind die *wells* einer 96 *well* Platte mit einem *donkey anti-rabbit* Immunglobulin beschichtet, welches einen Antikörper *rabbit anti-cAMP* binden kann. Im Laufe der Reaktion werden die unbekanntenen Proben mit unmarkiertem cAMP sowie ein cAMP-Peroxidase-Konjugat

zugefügt. Das unmarkierte und das markierte cAMP konkurrieren um die freien Bindungsstellen des Antikörpers. Nach sorgfältigem Waschen wird das Substrat 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine (TMB)/Wasserstoffperoxid zugegeben. TMB kann nur durch Peroxidase in einen blauen Komplex umgesetzt werden, der bei einer Wellenlänge von 630 nm photometrisch bestimmt werden kann. Das heißt, je mehr unmarkiertes cAMP in einer Probe enthalten ist, desto weniger cAMP-Peroxidase-Konjugat kann an den Antikörper binden. Dieses wird im ungebundenen Zustand durch Waschen von der Platte entfernt. Je niedriger der Gehalt an markiertem cAMP desto schwächer die Blaufärbung der Probe (Abb. 2.5). Die Reaktion kann mit 1 M Schwefelsäure abgestoppt werden, wobei der blaue Komplex in einen gelben Komplex zerfällt, welcher bei 450 nm quantifiziert wird.

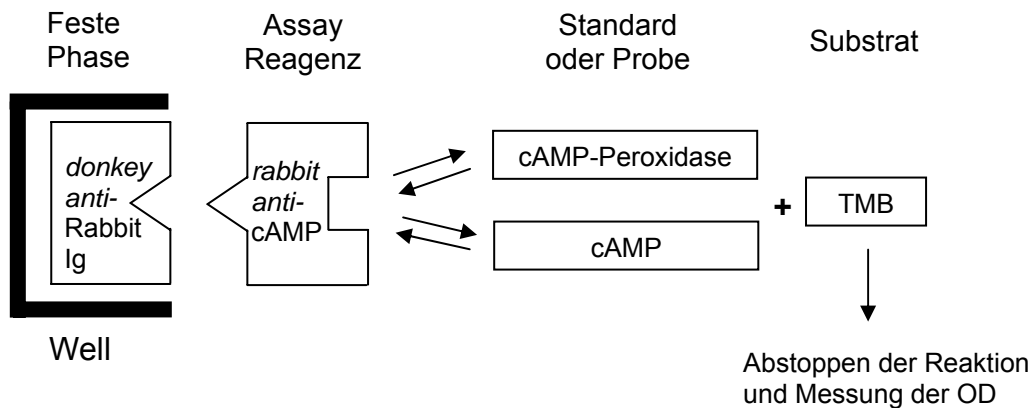


Abb. 2.5. Prinzip des cAMP-Assays. Die Methode basiert auf der Konkurrenzreaktion zwischen unmarkiertem cAMP und Peroxidase-markiertem cAMP um eine limitierte Anzahl an Bindungsstellen eines cAMP-spezifischen Antikörpers.

Nach der Inkubation der Zellen mit den jeweiligen Lösungen wurden die Überstände abgesaugt und 500 μl (für DopRII) bzw. 750 μl (für DopRI) Lysis Puffer 1B, enthalten im cAMP Biotrak Enzymeimmunoassay System (Amersham Biosciences, Buckinghamshire, UK), wurden zugefügt. Die Zellen wurden in diesem Puffer suspendiert und 10 min bei 200 Umin^{-1} geschüttelt. In den Assay wurden 100 μl dieser Suspension eingesetzt. Im Laufe der Reaktion wurden 100 μl Antiserum (Inkubation: 2 h bei 4°C) und 50 μl des Peroxidase-Konjugats (Inkubation: 1 h bei 4°C) zugegeben. Anschließend wurde der Überstand entfernt und jedes well vier Mal mit 400 μl des Waschpuffers gewaschen. Nach Zugabe des Substrats (TMB/Wasserstoffperoxid) wurde die Platte 1 h bei 200 Umin^{-1} und RT geschüttelt. Zum Abstoppen der Reaktion wurden 100 μl einer 1 M Schwefelsäure zugegeben. Anschließend

wurde die Absorption bei 450 nm bestimmt. Es wurde eine Standardkurve mit dem *Non-Acetylation-Standard* des Kits in Konzentrationen von 12,5; 25; 50; 100; 200; 400; 800; 1600 und 3200 fmol cAMP pro *well* erstellt. Anhand dieser Kurve konnten die absoluten cAMP-Konzentrationen der Proben bestimmt werden. Neben den Proben und den Werten für die Standardkurve wurden ein Null-Standard und eine Bestimmung von nicht-spezifischer Bindung (NSB) durchgeführt. Für den Null-Standard wurden 100 µl des Lysis Puffers 1B in ein *well* pipettiert. Ansonsten wurde der Null-Standard behandelt wie alle anderen Proben auch. Für den NSB-Wert wurden 100 µl des Lysis-Puffers 1B und 100 µl des Lysis-Puffers 2B in ein *well* pipettiert und kein Antiserum zugefügt. Alle nachfolgenden Schritte für den NSB-Wert entsprechen den der anderen Proben. Die Absorptionswerte wurden sowohl für die Standardkurve als auch für die Proben in den Wert %B/B₀ umgerechnet. Dafür wurde folgende Formel verwendet:

$$\%B/B_0 = \frac{\text{Standard/Probe OD} - \text{NSB OD}}{\text{0-Standard OD} - \text{NSB OD}} \times 100$$

2.4.9 Einfrieren von HEK293 Zellen

HEK293-Zellen verändern sich zunehmend mit ansteigender Passagen-Anzahl, sie altern. Aus diesem Grund wurde die Anzahl der Passagen immer dokumentiert und die Zellen wurden nicht länger als 20 bis 30 Passagen für Versuche verwendet. HEK293-Zellen können eingefroren werden und bei Bedarf aufgetaut werden. Zum Einfrieren sollte eine 10 cm Zellkulturschale zu 80% konfluent bewachsen sein und die Zellen sollten sich noch in der Wachstumsphase befinden. Mittels Trypsin-EDTA und Medium wurden die Zellen von der Platte gewaschen und anschließend bei 150 g für 5 min zentrifugiert. Der Überstand wurde vorsichtig abgesaugt und die Zellen wurden in 1 ml Medium mit 10% Dimethylsulfoxid (DMSO; Sigma, München) resuspendiert und in ein Kryoröhrchen (Corning, New York, USA) gegeben. DMSO verhindert die Kristallbildung innerhalb und außerhalb der Zelle sowie die partielle Dehydratation des Cytoplasmas, indem sie das Zellwasser ersetzt und bindet. Das Röhrchen wurde in eine mit Propanol gefüllte Einfrierbox (Kryo-Einfriergerät von Qualilab, Olivet, Frankreich) gegeben und für mindestens vier Stunden auf -80°C gestellt. Anschließend wurden die Zellen im flüssigen Stickstoff gelagert (Lindl, 2002).

2.4.10 Auftauen

Für das Auftauen von HEK293-Zellen wurden die Kryoröhrchen (Corning, New York, USA) aus dem flüssigen Stickstoff genommen und auf Eis gestellt. Das Röhrchen wurde mit einem Tuch, das mit Ethanol getränkt war, abgerieben und kurz mit dem Bunsenbrenner abgeflammt. In ein 15 ml Falcon wurden 10 ml Medium (mit Zusätzen) vorgelegt. Mit 2 ml des vorgelegten Mediums wurde die gefrorene Zellsuspension aufgenommen und in das Falcon gegeben. Anschließend wurden die Zellen für 5 min bei 100 g zentrifugiert. Der Überstand wurde vorsichtig abgenommen und die Zellen wurden in 10 ml Medium (mit Zusätzen) resuspendiert und in eine Zellkultur Schale mit 10 cm Durchmesser gegeben. Die Inkubation erfolgte bei 37°C und 5% CO₂. Nach drei bis vier Tagen konnten die Zellen dann wie bereits beschrieben (siehe 2.4.3) passagiert werden.

2.5 Oozyten von *Xenopus laevis* als Expressionssystem

2.5.1 Expression in Oozyten von *Xenopus laevis*

Der südafrikanische Krallenfrosch *Xenopus laevis* wird in der Entwicklungsbiologie als Modell-Organismus verwendet. Die Weibchen besitzen sehr große Oozyten. In den letzten Wachstumsstadien der Oogenese sind die Oozyten etwa 1 mm groß, weshalb sich diese im Vergleich zu anderen Zellen einfach handhaben lassen. Sie dienen als Expressionssystem für verschiedene Ionenkanäle, Transportproteine und Rezeptoren.

2.5.2 Präparation von Oozyten

Der Frosch wurde ca. 25 min in eiskaltem Wasser mit 0,1% 3-Aminobenzoesäureethylester anästhesiert. Neben der betäubenden Wirkung von 3-Aminobenzoesäureethylesters bewirkte auch die niedrige Temperatur der Lösung, dass die Sensorik des Frosches herabgesetzt wurde. Der anästhesierte Frosch wurde mit dem Rücken auf eine mit Eis gefüllte Wanne gelegt. Die Haut und die Bauchwand wurden mit Hilfe einer sterilen Schere für 1 cm an der Seite des Abdomens geöffnet. Ein Teil der Ovarien wurde mit einer sterilen Pinzette aus der Bauchhöhle entnommen und sofort in Ca²⁺-freien

Puffer überführt. Anschließend wurden die Bauchwand mit resorbierbarem und die Haut mit nicht resorbierbarem, sterilem chirurgischem Nahtmaterial zugenäht. Nach der Operation wurde der Frosch so in ein Wasserbecken gesetzt, dass sich die Nasenöffnungen oberhalb der Wasseroberfläche befanden. Das Tier wurde so lange beobachtet, bis die Narkose nachgelassen hatte und das Tier sich eigenständig über Wasser halten und Luft holen konnte. Um einer Infektion der Wunde vorzubeugen, wurden einige Körner Kaliumpermanganat zur Wunddesinfektion dem Wasser zugegeben.

Die Ovarienstücke wurden mit einer Schere grob zerkleinert und in ein 15 ml Falcon überführt. Die Oozyten wurden vier Mal mit Ca^{2+} -freiem Puffer gewaschen und anschließend mit Kollagenase A behandelt, um Follikelzellen zu entfernen und die Oozyten zu vereinzeln. Kollagenase A wird aus *Clostridium histolyticum* gewonnen und ist ein Enzym, welches Peptidbindungen zwischen Prolin und anderen Aminosäuren spaltet. Somit sind diese Proteasen auch in der Lage Kollagen abzubauen. Da Calcium Proteasen aktiviert, würde eine Behandlung mit Kollagenase in Anwesenheit von Calcium die Oozyten zerstören (Goldin, 1992), daher wurde die Kollagenaselösung (2 mg/ml) in Ca^{2+} -freiem Puffer hergestellt und vor der Anwendung durch einen 40 μm Filter filtriert. Die Oozyten wurden für etwa 30 min bei RT in der Kollagenaselösung unter leichtem Schütteln inkubiert. Zur Entfernung der Kollagenase wurden die Oozyten 15 mal mit Ca^{2+} -freiem Puffer gewaschen. Danach wurden die Oozyten in ND96-Puffer überführt. Unter dem Lichtmikroskop wurden Reifestadien V oder VI (siehe Abb. 2.6; Dumont, 1972) ausgesucht und in eine Petrischale mit ND96 gegeben. Bevor die Oozyten mit cRNA injiziert wurden, wurden diese über Nacht bei 4°C aufbewahrt. Oozyten können bis zu einer Woche nach der Präparation verwendet werden.

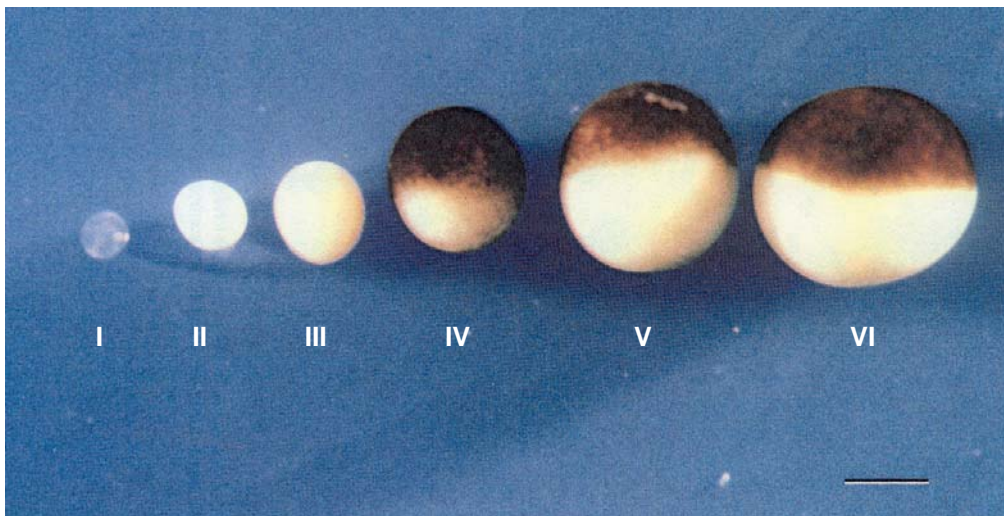


Abb. 2.6. Oozyten von *X. laevis* in verschiedenen Reifestadien (Smith *et al.*, 1991). Einteilung der Oozyten Reifestadien nach Dumont, 1972. Für die cRNA-Injektion wurden Oozyten des Reifestadiums V oder VI ausgewählt. Der schwarze Balken unten rechts entspricht 500 μm .

Die Frösche wurden freundlicher Weise von der Arbeitsgruppe von Frau Prof. Dr. Ellen I. Closs der Johannes Gutenberg Universität zur Verfügung gestellt.

2.5.3 Darstellung von *copy* RNA (cRNA)

Die Herstellung von *copy* RNA (cRNA) erfordert möglichst RNase-freies Arbeiten. Es wurden RNase-freie Gefäße (Eppendorf, München), Pipettenspitzen (Gilson, Middleton, USA) und DEPC behandeltes *Aqua bidest.* verwendet. Darüber hinaus wurde ausschließlich mit Handschuhen gearbeitet, um eine Kontamination mit den RNasen der menschlichen Haut zu verhindern.

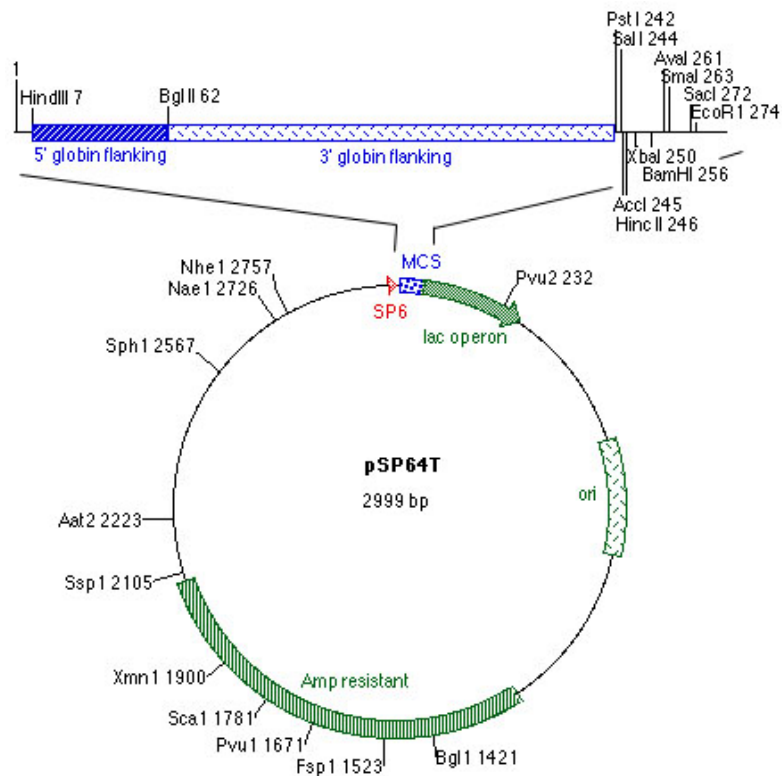


Abb. 2.7. Vektor pSP64T zur Herstellung von cRNA. Der Vektor wurde von Krieg und Melton 1984 beschrieben. Herkunft des Bildes: <http://faculty.washington.edu/rtmoon/vectors.php>

Der Vektor pSP64T (Abb. 2.7) ist ein SP6 Klonierungsvektor für die Herstellung von cRNA (Krieg und Melton, 1984). Die Gene werden in eine *Bgl*II Restriktionsschnittstelle einkloniert (2.2.1.1 und 2.2.1.2). Im 5' bzw. 3' Bereich flankieren untranslatierte Bereiche des β -Globin Gens von *X. laevis* das Insert. Diese Sequenzen erhöhen die Translationsrate der *in vitro* hergestellten cRNA. Die Herstellung der cRNA erfolgte mit dem mMessage mMachin High Yield Capped RNA Transcription Kit von Ambion (Huntingdon, Cambridgeshire, UK). Das Kit ermöglicht das Anfügen eines 5'-Cap-Analogons, eine Modifikation des 5'-Endes einer RNA. Diese Struktur ist bei allen eukaryotischen mRNAs vorhanden und erhöht die Stabilität der RNA. Zunächst wurde das pSP64T-Gen-Konstrukt mit einem Enzym dessen Restriktionserkennungssequenz in der *multiple cloning site* (MCS) vorhanden ist, z.B. *Xba*I linearisiert und anschließend gefällt: Nach Zugabe von 1/20tel Volumen 0,5 M EDTA, 1/10tel Volumen 3 M Natriumacetat und zwei Volumen Ethanol wurde die Probe für 15 min bei -20°C inkubiert und für 15 min zentrifugiert (16.000 g). Der Überstand wurde abgenommen und das Pellet wurde

in einer Konzentration von 0,5 bis 1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ mit RNase freiem Wasser resuspendiert. Für die Transkriptionsreaktion wurde folgender Ansatz erstellt:

2 x NTP/CAP	10 μl
10 x Reaktions Puffer	2 μl
Enzym Mix	2 μl
Lineares <i>template</i>	1 μg
Nuklease-freies Wasser	ad 20 μl

Mit Hilfe der im Enzym-Mix enthaltenen SP6-RNA-Polymerase wurde cRNA ausgehend vom SP6 Promotor des pSP64T synthetisiert. Die Inkubationszeit betrug 1 h bei 37°C. Um die im Ansatz enthaltene DNA zu zerstören, wurde 1 μl DNase I dem Reaktionsansatz zugegeben und 15 min bei 37°C inkubiert. Abschließend wurde eine Lithiumchlorid Präzipitation durchgeführt: 30 μl RNase-freies Wasser und 30 μl Lithiumchlorid Präzipitationslösung des Kits (7,5 M Lithiumchlorid, 50 mM EDTA) wurden zugegeben. Nach 30 min bei -20°C wurde die Probe für 15 min bei 16.000 g zentrifugiert. Das Pellet wurde in 10 μl RNase-freiem Wasser resuspendiert. Die Konzentration und die Qualität der RNA-Probe wurden sowohl mittels Absorptionsbestimmung (2.2.1.10) als auch mittels eines Formaldehyd-Agarose Gels (2.2.3.3) kontrolliert.

2.5.4 Injektion von cRNA in Oozyten

Die Injektion der cRNA erfolgte mit Hilfe eines pneumatischen Injektors, eines Binokulars und eines Mikromanipulators. Als Injektionsnadel diente eine Glaskapillare, die mit einer Kapillarziehmaschine hergestellt wurde. Die Spitze der Kapillare wurde mit einer Pinzette abgebrochen, bis die Öffnung für die Injektion groß genug war. Die Kapillaren wurden mit Hilfe eines Microloaders (Eppendorf, München) mit 1 bis 2 μl der cRNA luftblasenfrei befüllt und am Kapillarenhalter des pneumatischen Injektors festgeschraubt. Dieser wurde mit einem Mikromanipulator verbunden, der es ermöglichte die Kapillare in alle drei Raumrichtungen zu bewegen.

Die angeführten Parameter können der Bedienungsleitung folgend am Transjector verändert werden:

1. Gegendruck P_0

Durch den Gegendruck wird verhindert, dass z.B. das Cytoplasma der Oozyten durch Kapillarkräfte in die Glaskapillare gesaugt wird. Bei der Injektion der Oozyten wurden 45 hPa angelegt.

2. Injektionsdruck P_i

Während der Injektion liegt der Injektionsdruck P_i an. Es wurde etwa ein Druck von 1300 hPa angelegt.

3. Injektionszeit t_i

Für die Dauer der Injektionszeit wird der eingestellte Injektionsdruck aufrechterhalten. Die Injektionszeit lag bei etwa 4 s.

Die Injektion erfolgte stets manuell mit einer Handtaste. Das Injektionsvolumen wurde mit Hilfe einer Skala im Okular bestimmt. Zunächst wurde der Durchmesser eines Tropfens an der Luft bestimmt. Der Radius wurde dann verwendet, um mit folgender Formel das Volumen des Tropfens zu bestimmen:

$$V = 4/3 \pi r^3$$

Anhand des Volumens und der Konzentration der cRNA-Lösung konnte die Menge der injizierten cRNA bestimmt werden. Für alle Experimente wurde eine Menge von 50 ng cRNA in die Oozyten injiziert. Die Tropfengröße wurde regelmäßig vor der Injektion der Oozyten kontrolliert, um ein Verstopfen der Kapillare auszuschließen. Die Oozyten wurden in einer Petrischale auf ein Netz mit einer Maschengröße von 1 mm gelegt und mit ND96-Puffer überdeckt. Die Injektion der cRNA erfolgte in den vegetativen Pol, um zu vermeiden, dass RNA in den Zellkern injiziert wurde, da dieser in der animalen Hälfte der Oozyte lokalisiert ist. Als Kontrolle wurden Oozyten mit 40 nl RNase-freiem Wasser injiziert.

2.5.5 Inkubation der Oozyten

Nach der Injektion wurden die Oozyten fünf Tage in einer Petrischale mit ND96 (Zusatz: 1% Penicillin-Streptomycin Lösung; 10.000 units/ml Penicillin und 10.000 µg/ml Streptomycin von Invitrogen, Karlsruhe und 0,4 % Gentamycin-Lösung; 50 mg/ml von Invitrogen, Karlsruhe) bei 18°C inkubiert. Der Puffer wurde einmal täglich gewechselt und beschädigte Oozyten aussortiert,

da diese Salze bzw. Proteasen abgeben, welche die Lösung toxisch für die verbleibenden Oozyten machen (Goldin, 1992). Kontroll-Oozyten ohne Injektion wurden unter den gleichen Bedingungen inkubiert wie injizierte Oozyten, um eine Vergleichbarkeit der Ergebnisse zu ermöglichen. Nach der Inkubationszeit wurde der interne cAMP-Gehalt der Oozyten bestimmt.

2.5.6 Bestimmung der cAMP-Konzentration

Für die Bestimmung der cAMP-Konzentration von Oozyten wurde ebenfalls der cAMP Enzymimmunoassay (Amersham Biosciences, Buckinghamshire, UK) verwendet (siehe 2.4.7 und 2.4.8). Eine 3-Isobutyl-1-methylxanthine (IBMX) Lösung (Sigma, München) wurde mit ND96 in einer Konzentration von 100 μM hergestellt. Alle Oozyten wurden mit dieser Lösung für 30 min präinkubiert, um Phosphodiesterasen am Abbau des entstehenden cAMPs zu hindern. Anschließend wurden die Zellen mit Dopamin-IBMX-ND96-Lösungen verschiedener Konzentrationen für 30 min inkubiert. Kontroll-Oozyten wurden lediglich mit IBMX-ND96-Lösung inkubiert. Die einzelnen Oozyten wurden mit 200 μl Lysis Puffer 1B des Assay-Systems suspendiert und für 10 min bei 1000 Umin^{-1} geschüttelt. In den Assay wurden 100 μl dieser Suspension eingesetzt. Im Laufe der Reaktion wurden 100 μl Antiserum (Inkubation: 2 h bei 4°C) und 50 μl des Peroxidase-Konjugats (Inkubation: 1 h bei 4°C) zugegeben. Anschließend wurde der Überstand entfernt und jedes *well* vier Mal mit 400 μl des Waschpuffers gewaschen. Nach Zugabe des Substrats (TMB/Wasserstoffperoxid) wurde die Platte 1 h bei 200 Umin^{-1} und RT geschüttelt. Zum Abstoppen der Reaktion wurden 100 μl einer 1 M Schwefelsäure zugegeben. Es wurde eine Standardkurve mit dem *Non-Acetylation-Standard* des Kits in Konzentrationen von 12,5; 25; 50; 100; 200; 400; 800; 1600 und 3200 fmol cAMP pro *well* erstellt. Anhand dieser Kurve konnten die absoluten cAMP-Konzentrationen der Proben bestimmt werden. Neben den Proben und den Werten für die Standardkurve wurden ein Null-Standard und eine Bestimmung von nicht-spezifischer Bindung (NSB) durchgeführt. Für den Null-Standard wurden 100 μl des Lysis Puffers 1B in ein *well* pipettiert. Ansonsten wurde der Null-Standard behandelt wie alle anderen Proben auch. Für den NSB-Wert wurden 100 μl des Lysis-Puffers 1B und 100 μl des Lysis-Puffers 2B in ein *well* pipettiert und kein Antiserum zugefügt. Alle nachfolgenden Schritte für den NSB-Wert entsprechen den der anderen Proben.

Die Absorptionswerte wurden sowohl für die Standardkurve als auch für die Proben in den Wert %B/B umgerechnet. Dafür wurde folgende Formel verwendet:

$$\%B/B_0 = \frac{\text{Standard/Probe OD} - \text{NSB OD}}{\text{0-Standard OD} - \text{NSB OD}} \times 100$$

2.6 Transgenes RNA *interference* in *D. melanogaster*

2.6.1 Standardnährboden für die Fliegenhaltung

Für die Haltung von Fliegen wurde ein Standardnährboden verwendet.

Bestandteile (1l-Ansatz):

Hefeflocken	16 g
Sojamehl	4,3 g
Maisgrieß	80,6 g
Malzextrakt	72 g
Zuckerrübensirup (Grafschafter Goldsaft)	36 g
Agar	0,72 g
Nipagin (4-Hydroxybenzoesäuremethylester)	1,6 g
Propionsäure	4 ml
Leitungswasser	1 l

Hefeflocken, Sojamehl, Maisgrieß, Malzextrakt, Zuckerrübensirup wurden mit dem Agar vermischt und mit einem Liter Leitungswasser versetzt. Das Gemisch wurde für 10 min auf 90°C erhitzt und anschließend für zwei Stunden bei 70°C mit 500 Umin⁻¹ gerührt. Abschließend wurden Nipagin (Fungizid) und Propionsäure zu dem Ansatz gegeben. Das Malzmedium wurde direkt im Anschluss im noch flüssigen Zustand in Plastikröhrchen gefüllt (Greenspan, 1997).

2.6.2 Fliegenhaltung

Die Fliegen wurden auf Standardnährböden in Plastikbechern bei 25°C und 70% Luftfeuchtigkeit im Brutschrank gehalten. Fliegen der Stammsammlung wurden alle vier Wochen in neue Futterröhrchen umgesetzt (Roberts, 1998).

Der Standardnährboden wurde mit etwas Trockenhefe bestreut, die von den Fliegen bevorzugt gefressen wurde.

2.6.3 Klonierung der *hairpin*-Konstrukte zur Herstellung transgener RNAi-Fliegen

Für die Transformation von *D. melanogaster* wurde der P-Element Vektor pUASTi (freundlicher Weise zur Verfügung gestellt von Amin Ghabrial, Stanford University; siehe Anhang) verwendet. Der pUASTi-Vektor enthält zwischen den *inverted repeats* (IR, P-Elemente) fünf hintereinander angeordnete UAS-Sequenzen, die dem Transkriptionsfaktor GAL4 als Bindungsstellen dienen. *Downstream* der UAS-Sequenzen befindet sich ein *hsp70*-Promotor, ein 244 bp langes Intron aus dem *trachealess*-Gen von *D. melanogaster* und schließlich eine SV40-Terminationssequenz. *Upstream* des Introns befinden sich im Vektor nur einmal vorkommende Restriktionsschnittstellen für die Restriktionsendonukleasen *NotI* und *XhoI*, *downstream* einmalige Restriktionsschnittstellen für *Asp718* und *XbaI*.

In diesen Vektor wurden *hairpin*-Konstrukte folgender Gene einkloniert: Dopamin-Rezeptoren I, II und III (CG9652, CG18741, CG9569), *white* (CG2759) und Phosphofruktokinase (CG4001). Ein Exon der jeweiligen cDNA wurde zunächst in 3'-5'-Orientierung *upstream* des Introns und anschließend in 5'-3'-Orientierung *downstream* des Introns kloniert, so dass eine *tail-to-tail*-Orientierung der beiden Inserts entstand. Die Exonfragmente wurden nach folgenden Kriterien ausgewählt (Lee *et al.*, 2003). Das Exon sollte vollständig (*single complete exon*), 500-1000 bp lang und in allen exprimierten Splicevarianten des jeweiligen Gens vorhanden sein. Weiterhin sollte das Fragment in *antisense*-Orientierung (3'-5') keine Sequenzen enthalten, die mit einer 5'-Konsensus-Splicestelle übereinstimmten, um *splicing* innerhalb der 3'-5'-Orientierung zu verhindern. Das Exon sollte keine Restriktionsschnittstellen für die Restriktionsendonukleasen *XhoI*, *NotI*, *Asp718*, *XbaI* enthalten, da diese in den für die PCR-Reaktion eingesetzten überhängenden *primern* vorhanden waren. Die für die fünf *hairpin*-Konstrukte verwendeten Bereiche der genomischen Sequenzen sind in Tab. 2.7 angegeben.

Tab. 2.7. Für die *hairpin* Konstrukte verwendeter Bereich der genomischen Sequenz.

Gen	CG-Nummer	Bereich d. genomischen Sequenz (flybase) für <i>hairpin</i> Konstrukt
DopRI	CG9652	37223-37732 bp
DopRII	CG18741	18907-19633 bp
DopRIII	CG17004	15532-16077 bp
<i>white</i>	CG2759	10124-10745 bp
<i>pfk</i>	CG4001	7126-7917 bp

In der Datenbank Flybase wurde mit Hilfe der CG-Nummer das jeweilige Gen aufgerufen und über die Schaltfläche „Get genome region“ wurde auf die zugehörige genomische Sequenz zugegriffen.

Das *trachealess*-Intron fungierte im pUASTi-Vektor als *spacer*, d.h. durch die Anwesenheit des Introns bestand zwischen den beiden Inserts ein Abstand von 244 bp, so dass die Rekombinationswahrscheinlichkeit der *hairpin*-Konstrukte nach der Transformation in Bakterien stark reduziert wurde.

Das Vorgehen der *hairpin*-Klonierung wird stellvertretend für alle fünf Konstrukte am Beispiel von CG 4001 (Phosphofruktokinase) dargestellt. Das gewählte Exonfragment von CG 4001 hat eine Länge von 790 bp. Für die erste Klonierung wurde diese Sequenz mit Hilfe überhängender *primer* in einer PCR amplifiziert, so dass am 5'-Ende eine Restriktionsschnittstelle für *XhoI* und am 3'-Ende für *NotI* angehängt wurde. Als Ausgangsmaterial (*template*) für die PCR-Reaktion diente der EST-Klon GH 12192. Das Fragment wurde in einer ersten Klonierung in den Vektor inseriert. Für die 2. Klonierung enthielten die Exonfragmente nach einer weiteren PCR-Reaktion überhängende Restriktionsschnittstellen für *Asp718* und *XbaI*, mit deren Hilfe die zweite Insertion durchgeführt wurde. So enthielt der pUASTi am Ende zwei identische Fragmente des Gens CG4001 in *tail-to-tail*-Orientierung.

2.6.4 Etablierung und Balancierung von transgenen Fliegenlinien

Die beschriebenen *hairpin*-Konstrukte wurden mit einem Helferplasmid gemischt und in *Drosophila*-Embryonen (*white*⁻; resultiert in dem Phänotyp weiße Augen) injiziert. Das Helferplasmid codiert für Transposase, die in der Lage ist, das *hairpin*-Konstrukt des pUASTi in das Genom von *D. melanogaster* zu integrieren. Dabei werden nur Bereiche in das Genom eingefügt, die von *inverted repeats* flankiert werden. Die Injektion in Embryonen von *D.*

melanogaster wurde von Frau Ann Mari Voie am *European Molecular Biology Laboratory*, EMBL (voie@embl.com) in Heidelberg durchgeführt. Die Konstrukte sollten nun in das Genom der Polzellen integrieren. Die injizierten Embryonen entwickelten sich über das embryonale, die drei verschiedenen Larvenstadien und über das pupale Stadium zu adulten Fliegen. Erfolgte eine Integration der injizierten Konstrukte in die Polzellen, so waren die Fliegen in einigen Ovarien bzw. Spermien produzierenden Zellen transgen für das jeweilige Konstrukt. Fliegen dieser Generation wurden mit *white*⁻-Fliegen gekreuzt. Dazu wurde gemäß Abb. 2.8 jedes Männchen mit 3-4 *white*⁻-Jungfrauen bzw. jede Jungfrau mit 3-4 *white*⁻-Männchen verpaart (Kreuzung 1). Vermittelt durch das mit dem Konstrukt integrierte *white*-Gen hatten transgene Nachkommen dieser Kreuzung rote Augen, da das P-Element in allen Körperzellen vorhanden war. Es wurden, sofern vorhanden, zehn rotäugige Männchen aus unabhängig angesetzten Kreuzungen selektiert und in Kreuzung 2 (vgl. Abb. 2.8) eingesetzt. Konnten rotäugige Weibchen aus Kreuzung 1 selektiert werden, wurden diese mit Männchen der Linie *white*⁻ gekreuzt. Daraus resultierende rotäugige Männchen wurden in Kreuzung 2 (Abb. 2.8) eingesetzt.

Jedes transgene, also rotäugige Männchen wurde in diesem Schritt sowohl mit 3-4 Jungfrauen der Linie *Sal/CyO* als auch mit Jungfrauen der Linie *Croc/TM3Sb* in einem Röhrchen gekreuzt. Diese beiden Linien sind sogenannte *balancer*-Linien, d.h. sie verfügen auf dem zweiten Chromosom (*CyO*) bzw. auf dem dritten Chromosom (*TM3Sb*) über ein *balancer*-chromosom. Solche Chromosomen besitzen folgende Eigenschaften. Sie codieren für dominante Marker wie *Cy* (gekrümmte Flügel) oder *Sb* (dicke, kurze Rückenhaare), die die klassische Genetik erst ermöglichen und einen klaren Rückschluss auf den Genotyp erlauben. Außerdem rekombinieren sie schlecht mit einem Schwesterchromosom, d.h. die homologe Rekombination wird erschwert. Sie bewirken damit eine Stabilisierung transgener Linien. *balancer*-Chromosomen sind homozygot letal. Entsprechend kann ein Transgen entweder nur heterozygot oder homozygot vorliegen und kann auch über mehrere Generationen nicht verloren gehen. Nachkommende Geschwister dieser Kreuzung mit den Phänotypen rote Augen und *Cy* bzw. rote Augen und *Sb* wurden in jeweils getrennten Ansätzen (Kreuzung 3) miteinander verpaart (Abb. 2.8). Der Insertionsort des P-Elements konnte anhand der resultierenden Phänotypen aus den einzelnen Geschwisterkreuzungen bestimmt werden. Hatten alle Nachkommen aus der Kreuzung der Fliegen, die den *Cy*-Marker zeigten, rote Augen und traten bei der parallelen Kreuzung der Geschwister, die *Sb* waren, auch weißäugige Fliegen auf, so

hatte die Insertion des P-Elements auf dem zweiten Chromosom stattgefunden. Die Nachkommen aus der Sb-Geschwisterkreuzung wurden daher verworfen, während die Nachkommen aus der CyO-Geschwisterkreuzung automatisch stabil waren. Analog dazu hatte das P-Element auf dem dritten Chromosom inseriert, wenn aus der Kreuzung der Sb-Fliegen nur rotäugige Fliegen resultierten und aus der Kreuzung der Geschwister mit CyO-Phänotyp auch Fliegen mit weißen Augen auftraten. In diesem Fall waren entsprechend die Fliegen aus der Sb-Kreuzung stabil, während die Nachkommen aus der CyO-Geschwisterkreuzung verworfen wurden. Die stabilen zweit- bzw. drittchromosomalen Linien konnten entweder homozygot oder nur heterozygot lebensfähig sein. Sind die Linien homozygot lebensfähig, ist der dominante Marker (Cy oder Sb) nicht mehr vorhanden.

Traten in der Nachkommenschaft aus der Kreuzung mit Sal/CyO und Croc/TM3Sb nur Weibchen auf, die rote Augen besaßen und ausschließlich Männchen mit weißen Augen, hatte die Integration des P-Elements auf dem X-Chromosom stattgefunden. Diese Linien wurden aufgrund der aufwendigen Balancierung verworfen. Die Abwesenheit des dominanten Markers (Cy oder Sb) zeigt an, dass viele Linien homozygot lebensfähig sind, d.h. das Vorhandensein des P-Elements auf beiden Allelen resultiert nicht in Letalität (die Insertion betrifft keinen essentiellen Bereich des Genoms).

Kreuzung 1	<p><u>ANSATZ 1</u> alle injizierten Fliegen werden separat gekreuzt:</p> <p>je nur 1 injiziertes ♂ mit 3-4 white ♀ kreuzen</p> <p>je nur 1 injizierte ♀ mit 3-4 white ♂ kreuzen</p>
	<p><u>NACHKOMMEN</u> werden auf rote Augenfarbe untersucht</p>

↓

Kreuzung 2	<p><u>ANSATZ 2</u> nur 1 rotes ♂ mit 3-4 ♀ $w^-; \frac{sal}{CyO}; \frac{+}{+}$ und 3-4 ♀ $w^-; \frac{+}{+}; \frac{croc}{TM3sb}$</p> <p>in einem Fliegen-Röhrchen kreuzen</p> <p>(wenn in Kreuzung 1 nur ♀ mit roten Augen auftreten, dann mit white ♂ kreuzen und anschließend ♂ aus Nachkommen in Kreuzung 2 einsetzen)</p>

Fortsetzung siehe S. 85.

	<p><u>NACHKOMMEN</u> auf rote Augenfarbe und Cy bzw. Sb selektieren: ♂ mit CyO und ♀ mit CyO bzw. ♂ mit TM3sb und ♀ mit TM3sb kreuzen (in zwei getrennten Ansätzen!) (wenn alle ♀ rote und alle ♂ weiße Augen besitzen, dann erfolgte die Integration auf dem X-Chromosom)</p>			
	↓	↓		
<p>Kreuzung 3a</p> <p>wenn Insertion auf Chr II:</p>	<p><u>ANSATZ 3a</u> ♂ $w^-; \frac{P}{CyO}; \frac{+}{+}$ X ♀ $w^-; \frac{P}{CyO}; \frac{+}{+}$ (Geschwister)</p>		<p><u>ANSATZ 3a</u> ♂ $w^-; \frac{P}{+}; \frac{+}{TM3sb}$ X ♀ $w^-; \frac{P}{+}; \frac{+}{TM3sb}$ (Geschwister)</p>	
	<p><u>NACHKOMMEN</u></p>		<p><u>NACHKOMMEN</u></p>	
	<p>Genotypen: $\left[\frac{P}{CyO} \right] \left[\frac{P}{+} \right]$</p>	<p>Phänotypen: 100% rot</p>	<p>Genotypen $\left[\frac{P}{+} \right] \left[\frac{P}{+} \right] \left[\frac{+}{+} \right] \left[\frac{+}{+} \right]$</p>	<p>Phänotypen 75% rot 25% weiß</p>
	Linie etabliert		verwerfen	
	↓	↓		
<p>Kreuzung 3b</p> <p>wenn Insertion auf Chr III</p>	<p><u>ANSATZ 3b</u> ♂ $w^-; \frac{+}{CyO}; \frac{P}{+}$ X ♀ $w^-; \frac{+}{CyO}; \frac{P}{+}$ (Geschwister)</p>		<p><u>ANSATZ 3b</u> ♂ $w^-; \frac{+}{+}; \frac{P}{TM3sb}$ X ♀ $w^-; \frac{+}{+}; \frac{P}{TM3sb}$ (Geschwister)</p>	
	<p><u>NACHKOMMEN</u></p>		<p><u>NACHKOMMEN</u></p>	
	<p>Genotypen $\left[\frac{P}{+} \right] \left[\frac{P}{+} \right] \left[\frac{+}{+} \right] \left[\frac{+}{+} \right]$</p>	<p>Phänotypen 75% rot 25% weiß</p>	<p>Genotypen $\left[\frac{P}{TM3sb} \right] \left[\frac{P}{+} \right]$</p>	<p>Phänotypen 100% rot</p>
	verwerfen		Linie etabliert	

Abb. 2.8. Kreuzungsschema zur Etablierung transgener Fliegenlinien. 1) Die aus den injizierten Embryonen resultierenden Fliegen wurden mit der Linie *white*⁻ rückgekreuzt. 2) In der nachfolgenden Generation wurden Männchen mit roten Augen selektiert und mit den *balancer*-Linien Sal/CyO und Croc/TM3sb verpaart. 3) Die

Kreuzung mit diesen beiden Linien erlaubte einen Rückschluss auf den Insertionsort des P-Elements. *Sal* bzw. *Croc* sind letale Mutationen auf dem zweiten bzw. dritten Chromosom. *CyO* ist ein zweitchromosomaler *balancer*, dessen dominanter Marker *Cy* gekrümmte Flügel vermittelt. Der dominante Marker *Sb* des drittchromosomalen *balancers* *TM3Sb* vermittelt kurze, dicke Rückenhaare.

P = P-Element Insertion; + = Wildtyp

2.6.5 Aktivierung der Expression der *hairpin*-Konstrukte in den transgenen Fliegen

Der pUASTi-Vektor besitzt - wie bereits unter 2.6.3 beschrieben - UAS-Sequenzen, welche bei der Transformation ebenfalls in das Genom der Fliegen integriert wurden. Die UAS-Sequenzen regulieren die Expression der *hairpin*-Konstrukte. Diese kann erst stattfinden, wenn durch eine Kreuzung mit einer Treiberlinie der Transkriptionsfaktor GAL4 hinzukommt. Alle homozygot lebensfähigen transgenen Fliegenlinien wurden jeweils mit den ubiquitären Treiberlinien *actin-GAL4* bzw. *tubulin-GAL4* gekreuzt. Anschließend wurde die Letalität der RNAi-Fliegen bestimmt.

2.7 Chemoinformatik

2.7.1 Chemoinformatische Methoden zur Erstellung von 3-D-Modellen

Das 3D-Modell des CfDopRII wurde freundlicherweise von Herrn Prof. Dr. Didier Rognan (CNRS, Illkirch) mit der Software GPCRmod (Bissantz *et al.*, 2004) erstellt. Mit Hilfe dieses Modells wurde ein Homologie-Modell des CfDopRI angefertigt. Die Modelle wurden lediglich für die transmembranalen Bereiche der Rezeptoren erstellt, da über die extra- und intrazellulären Schleifen und die Termini zu wenig Informationen bekannt sind, um eine räumliche Ausrichtung sinnvoll vorhersagen zu können. Zunächst wurde mit der Software Insight II Version 2005 (Accelrys, Inc., San Diego, USA) ein *alignment* zwischen CfDopRII und CfDopRI erstellt. Ferner wurde mit Hilfe dieser Software das 3D-Modell des CfDopRI berechnet. Bei einer solchen Berechnung wird zunächst das Rückgrat des Proteins für die Erstellung des Modells berücksichtigt. Dabei werden identische Seitenketten an das *template* angepasst. Unterschiedliche Seitenketten werden anhand einer Rotamer-Bibliothek (InsightII) ausgerichtet. Die Ausrichtung der Aminosäure-Seiten-

ketten Asp3.32, Ser5.42, Ser5.43, Ser5.46 und Tyr5.38 wurde manuell durchgeführt. Die Visualisierung des Modells erfolgte mit der Software Sybyl 7.0 (Tripos Inc., St. Louis). Bilder wurden mit der Software MOLCADI1.3 (Brickmann *et al.*, 1995, Brickmann *et al.*, 2000) erstellt.

2.7.2 Pharmakophor-Modelle, virtuelle Substanzbibliothek und Docking

Pharmakophor-Modelle verschiedener Antagonisten humaner Dopamin-Rezeptoren wurden mit der Software Catalyst (Accelrys, Inc., San Diego, USA) erstellt. Für die Suche wurde eine virtuelle Substanzbibliothek mit ca. vier Millionen Einträgen verwendet. Die Hit-Substanzen wurden mit der Docking-Software GOLD Version 3.0 (Cambridge Crystallographic Data Centre, CCDC) in das Protein eingepasst. Die Hit-Substanzen wurden anschließend selektiert, indem Deskriptoren (z.B. Moleküleigenschaften oder Interaktionen zwischen Ligand und Protein) mit der Software SILVER (CCDC) berechnet wurden, was ein Filtern nach bestimmten chemischen Eigenschaften der Verbindungen ermöglichte. Anschließend an diese Selektion wurden die restlichen Docking-Lösungen visuell analysiert. Anhand der zu erwartenden Interaktionen wurden Wirkstoffe ausgewählt, welche im *in vitro* Assay getestet werden sollten.

Die chemoinformatischen Arbeiten wurden von Herrn Prof. Dr. Didier Rognan (CNRS, Illkirch), Dr. Anette Klinger und Dr. Jörg Cramer (Intervet Innovation GmbH, Drug Discovery, BioChemInformatics, Schwabenheim) durchgeführt.

3. Ergebnisse

3.1 Bioinformatische Analyse

Im Rahmen dieser Arbeit sollten die ersten G-Protein gekoppelten Rezeptoren (G-protein coupled receptors, GPCRs) des Flohs identifiziert werden. Das Genom des Flohs ist bisher nicht sequenziert worden. Die Klonierung von neuen Orthologen basiert daher auf der Konservierung zu anderen bereits bekannten Genen phylogentisch nah verwandter Organismen. Aus diesem Grund sollten alle beschriebenen GPCRs der Insekten auf den Grad ihrer Konservierung untersucht werden. Mit Hilfe der bioinformatischen Analyse sollten GPCRs identifiziert werden, die über mehrere Spezies hinweg hoch konserviert und somit für eine Klonierung besonders geeignet sind. Hierfür wurde die Software Genlight (Beckstette *et al.*, 2004) verwendet, welche den Vergleich großer Sequenzpakete (z.B. Genome) ermöglicht. Alle gängigen Blast-Algorithmen sind in diesem Programm verfügbar. Die in Tab. 3.1 aufgeführten Sequenzen der verschiedenen Insekten wurden in Genlight importiert. Für den Moskito *A. gambiae* sind 293 GPCRs (Hill *et al.*, 2002) und für *D. melanogaster* 297 GPCRs (Brody und Cravchik, 2000; Flybase) annotiert. Diese neu erstellte Datenbank wurde dazu genutzt, um Blast-Analysen zwischen den GPCR-Sequenzen von *D. melanogaster* bzw. *A. gambiae* und den ESTs (*C.felis*, *A.aegypti*, *G. morsitans*, *B. mori*, *A. mellifera*, *S. calcitrans*, *R. sanguineus*) bzw. cDNAs (*A. gambiae* und *D. melanogaster*) und den genomischen Sequenzen (*A. mellifera*) durchzuführen. Als Ergebnis einer Blast-Analyse gibt Genlight eine Hitliste an, in der bioinformatische Parameter wie z.B. *E-Value* und Identität aufgeführt sind (Abb. 3.1). Die Identität gibt die Übereinstimmungen zwischen Sequenzen in einem *alignment* in Prozent an. Der *E-value* ist ein Maß für die Wahrscheinlichkeit, mit einer zufälligen Aminosäure-Abfolge einen Treffer der gleichen Güte zu produzieren und sollte entsprechend seiner mathematischen Definition möglichst klein sein (Selzer *et al.*, 2004).

Tab. 3.1 Inhalt der in Genlight erstellten Datenbank. Die Sequenzen verschiedener Insekten wurden in die Software Genlight eingeladen, um Blast-Suchen durchzuführen.

Organismus	Sequenzart	Anzahl	Herkunft	Proteom	GPCR
<i>C. felis</i>	ESTs	4841	NCBI, dbEST	-	-
<i>A. aegypti</i>	ESTs, GSS	123055 (4072 ESTs)	NCBI, Genbank	-	-
<i>G. morsitans</i>	ESTs	21471	NCBI, dbEST	-	-
<i>B. mori</i>	ESTs	116541	NCBI, dbEST	-	-
<i>D. pseudoobscura</i>	Scaffold	759	Baylor College	-	-
<i>A. mellifera</i>	Genome, contigs	36406	Baylor College	-	-
<i>A. mellifera</i>	ESTs	22652	NCBI, dbEST	-	-
<i>S. calcitrans</i>	ESTs	12059	Proprietäre Daten	-	-
<i>R. sanguineus</i>	ESTs	20560	Proprietäre Daten	-	-
<i>A. gambiae</i>	cDNA	16148	Ensembl	+ (16148)	+ (293) (Publikation)
<i>D. melanogaster</i>	cDNA	18289	Ensembl	+ (17335)	+ (297) (flybase; Publikation)

Sämtliche Sequenzdaten wurden im Zeitraum von April bis Mai 2004 heruntergeladen.

Hit Table: blasthits_obj_833_q307_db259 Number of Hits: 2639 Hit Type: PROTEIN vs. DNA Method: tblastn

Query Sequence Set: *GPCR_Dm* Query Sequence Description: *result_set_description* Creation Date: 2004-05-13 13:27:43.137276+02 Creator: *sgerber*
 Database Sequence Set: *Apis* Database Sequence Description: *Baylor* Creation Date: 2004-04-30 15:12:39.91291+02 Creator: *sgerber*

Search with

Total number of hits: 2639 . Number of hits with unique query sequence: 223 Page: 1 / 106 . Show only unique best matches:

No.	E-Value	Bit-Score	Score	Query len	Hit len	Match Query	Match Hit	Strand	Alignment len	identities	positives	Query Description [GPCR_Dm]	Hit Description [Apis]	Hit rank
1	0	781.941	2018	3579	3020	1042 - 1689	1047 - 3020	+	669	423(63.23%)	505(75.49%)	CG11895-PA type=protein; loc=2R:join(5771229..5772.....	Contig24536 users hgsc bli1 honeybee bli1 HoneyBe.....	1
2	4.67475e-134	477.248	1227	539	12016	99 - 516	5011 - 6225	+	426	273(64.08%)	303(71.13%)	CG18741-PB type=protein; loc=3R:complement (2545410.....	Contig12853 users hgsc bli1 honeybee bli1 HoneyBe.....	1
3	1.35371e-133	475.707	1223	537	12016	99 - 483	5011 - 6102	+	385	265(68.83%)	290(75.32%)	CG18741-PA type=protein; loc=3R:complement (2544786.....	Contig12853 users hgsc bli1 honeybee bli1 HoneyBe.....	1

Abb. 3.1. Ausschnitt der Ergebnisliste einer Blast-Analyse in Genlight. In dieser Analyse wurden GPCRs von *D. melanogaster* (Query Sequence Set: GPCR_Dm) mit genomischen Sequenzen von *A. mellifera* (Database Sequence Set: Apis) verglichen. Es wurde ein tblastn durchgeführt, der den Vergleich von Protein und DNA ermöglicht. Dabei wird der DNA-Datensatz in alle sechs Leserahmen übersetzt. Das Ergebnis dieser Analyse ist eine Hitliste (hier sind nur die besten drei der insgesamt 2639 Hits angegeben), wobei die Hits nach ihrer Qualität sortiert sind. Die wichtigsten Parameter sind der *E-value*, die Identität und die Länge des *alignments*. Die Länge des *alignments* gibt den Bereich an, in dem die Such-Sequenz mit einer Sequenz des zu analysierenden Datensatzes Übereinstimmungen aufweist. In der Liste sind die GPCRs von *D. melanogaster* mit CG-Nummern aufgeführt, welche jeweils für ein spezifisches Gen stehen (z.B. CG11895 = *starry night*; CG18741 = Dopamin-Rezeptor II). Anhand der bioinformatischen Parameter konnte die Qualität der Hits beurteilt und zwischen verschiedenen Analysen verglichen werden.

Für die Auswertung der Hitlisten wurden Kriterien zur Abgrenzung von signifikanten Hits gegenüber unspezifischen Treffern festgelegt: Ein *E-Value* von 10^{-30} und eine Identität von 56% waren Voraussetzung für die erste Selektion der Hits und wurden aufgrund der Datenlage so gesetzt. Darüber hinaus wurde die Länge des *alignments* zwischen Anfrage- und Hit-Sequenz sowie die Anzahl der Hits für ein Gen in den verschiedenen Sequenzdatensätzen berücksichtigt. Diese Auswertung führte zu einer Quantifizierung des Konservierungsgrads. Die in Tab. 3.2 aufgeführten Gene besaßen in der Analyse zahlreiche signifikante Hits und zählen somit zu den am höchsten konservierten GPCRs der untersuchten Insekten. Eine GPCR-Familie fiel besonders auf: Die Familie der Dopamin-Rezeptoren mit allen drei im Insektenreich beschriebenen Mitgliedern war besonders hoch konserviert.

Tab. 3.2. Ergebnis der bioinformatischen Analyse durchgeführt mit der Software Genlight zur Bestimmung hoch konservierter Insekten GPCRs.

GPCR-Familie	<i>A. gambiae</i>	<i>D. melanogaster</i>
Muskarinische Acetylcholin-Rezeptoren	GPCRmac1 und 2	CG4356 und CG7918
Atypische GPCRs Friled/Smoothened Rezeptor	GPRstn	CG11895
Dopamin-Rezeptoren	GPRdop1, 1a, 2 und 3	CG9652, CG18741 und CG9569
Somatostatin-Rezeptor	GPRsms	CG7285
GABA-B-Rezeptoren	GPRgbb1, 2 und 3	CG15274, CG6706 und CG3022
Galanin/Allostatin-Rezeptor	GPRals 3	CG13702
Leukokinin-Rezeptor	GPRlkk	CG10626
Metabotrophe Glutamat-Rezeptoren	GPRmgl 2, 4 und 5	CG11923, CG7155 und CG8692
Opsin-Rezeptoren	GPRop1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 und 10	CG5192, CG10888, CG9668, CG5279, CG5638
Serotonin-Rezeptor	GPR5ht7	CG12073

Die Sequenzen wurden zur Überprüfung und Quantifizierung des Konservierungsgrads eingehender untersucht. Hierfür wurden Alignments der Dopamin-Rezeptoren der Insekten *A. gambiae*, *A. mellifera* und *D. melanogaster* angefertigt (siehe Anhang, Abb. 7.4, 7.5 und 7.6). Die *alignments* verdeutlichen, dass die Rezeptoren über weite Bereiche eine hohe Konservierung aufweisen, die in den Regionen der Transmembran-Helices besonders hoch ist. Lediglich in den intra- und extrazellulären Schleifen ist die Übereinstimmung geringer. Interessanter Weise sind die dritte intrazelluläre Schleife und der C-Terminus, die eine geringe Konservierung aufweisen, an der Kopplung des G-Proteins beteiligt (Gether, 2000; Hermans, 2003). Für die Dopamin-Rezeptoren der Insekten *A. mellifera*, *D. melanogaster* und *A. gambiae* wurden jeweils paarweise *alignments* mit der Software Vector NTI angefertigt und zur Quantifizierung der Konservierung wurden die Identitäten der Sequenz-Paare bestimmt (Tab.3.3). Der Grad der Identitäten bestätigte die hohe Konservierung der Dopamin-Rezeptoren und somit auch die Genlight-Analyse. Aufgrund dieser Ergebnisse wurde die GPCR Sub-Familie der Dopamin-Rezeptoren ausgewählt, um die ersten GPCRs des Flohs *C. felis* zu identifizieren.

Tab.3.3. Identität zwischen den Dopamin-Rezeptoren der Insekten *A. mellifera* (Am), *D. melanogaster* (Dm) und *A. gambiae* (Ag).

Organismen	DopRI Identität [%]	DopRII Identität [%]	DopRIII Identität [%]
Am - Dm	48	58	54
Am - Ag	61	57	42
Ag - Dm	60	48	55

3.2 Identifikation der Dopamin-Rezeptoren I, II und III von *C. felis*

Für die Klonierung der orthologen Dopamin-Rezeptoren des Flohs wurden aus hoch konservierten Bereichen der unter 3.1 beschriebenen *alignments* Sequenzen mit einem geringen Grad an Degenerierung ausgewählt, um degenerierte *primer* zu konstruieren. Das Design degenerierter *primer* ist ausführlich unter 2.2.4.2 beschrieben. Die degenerierten *primer*-Paare wurden zunächst in PCR-Ansätzen eingesetzt, was zu keinem Ergebnis führte. Daraufhin wurden degenerierte *nested* PCRs (2.2.4.3) durchgeführt, wobei in

einer ersten PCR ein äußeres *primer*-Paar eingesetzt wurde. Der Reaktionsansatz dieser ersten PCR wurde anschließend als *template* für eine zweite PCR mit einem zweiten inneren *primer*-Paar verwendet. Es wurden zahlreiche verschiedene *primer*-Kombinationen sowohl für die erste als auch für die zweite PCR getestet. Die amplifizierten Sequenzen wurden in den pCRIITOPPO-Vektor kloniert und sequenziert (2.2.4.3). Diese DNA-Fragmente wurden in BLAST-Analysen auf ihre Übereinstimmung mit anderen Sequenzen untersucht. Beispielsweise ergab ein Sequenzfragment wie in Abb. 3.2 gezeigt, die höchste Übereinstimmung mit den Dopamin-Rezeptoren I von *D. melanogaster*, *A. gambiae* und *A. mellifera*. Konnte ein solches Genfragment erfolgreich identifiziert werden, so wurden daraufhin RACE-PCRs mit spezifischen *primern* durchgeführt, um die 5'- und 3'-Enden des neuen Gens aus *C. felis* zu identifizieren. Das Prinzip einer RACE-PCR ist ausführlich unter 2.2.4.4 erläutert.

```

-----TMH5-----
CfDopRI : -----C-YA-QKQVKNIRAVTRTAEQKDDETT : 25
AgDopRI : YETCALDLTPTYAVVSSCISFYVPCIVMIGIYCRLYCYA-QKHVKSIRAVTRPGE----- : 159
DmDopRI : YPTCALDLTPTYAVVSSCISFYFPCVVMIGIYCRLYCYA-QKHVKSIRAVTRPGE----- : 226
AmDopRI : HPTCALDLTPTYAVVSSSISFYVPCIVMLGIYCRLYCYA-QKHVKSIRAVTK----- : 231

-----TMH6-----
CfDopRI : RCPAVRCKHKHKVNQMS TSNHQHRSHHSSPYHVS DHKAAITVGVIMGVFLIC----- : 78
AgDopRI : ISEKRYRSIRRPKSSKNLKLRLAHTASSPYHVS DHKAAITVGVIMGVFLICWVPFFCVN : 220
DmDopRI : VAEKQRYKSIIRPKNQPKFKVRLHHTSSPYHVS DHKAAITVGVIMGVFLICWVPFFCVN : 287
AmDopRI : LPDTSMAKSFVRKVHATKPPKPTKTKPTSPYHVS DHKAAITVGVIMGVFLICWVPFFCVN : 292

----
CfDopRI : ----- : -
AgDopRI : IIAAFCKTCIGQTFKVLWLGYSNSAFNP IISIFNTEFREAFKRILTSRSSWCCGQEMG : 281
DmDopRI : IIAAFCKTCIGQTFKILTWLGYSNSAFNP IISIFNKEFRDAFKRILTMRNPWCCAQDVG : 348
AmDopRI : IIVTSYCKTCISGRAFQVLTWLGYSNSAFNP IISIFNTEFREAFKRILTKGARARGNQ PST : 353

```

Abb. 3.2. Ausschnitt eines *alignments* zwischen dem in der *nested* PCR identifizierten Fragment und Dopamin-Rezeptoren der Insekten *A. gambiae*, *D. melanogaster* und *A. mellifera*. Zur Orientierung sind die Transmembran-Helices (TMH) 5 und 6 eingezeichnet. Die hohe Sequenz-Identität zwischen den Rand-Bereichen des Fragments und den Dopamin-Rezeptoren ist deutlich zu erkennen.

Amplifikate der RACE-PCRs wurden in den pCRIITOPPO-Vektor kloniert und sequenziert (2.2.4.4). *In silico* wurden die Gen-Fragmente zusammengesetzt und in BLAST-Analysen und *alignments* auf ihre Übereinstimmung mit den orthologen Sequenzen der anderen Insekten untersucht. Waren die Gene vollständig, wurden spezifische *primer* für die Enden des jeweiligen Dopamin-

Rezeptors von *C. felis* konstruiert. Dabei wurde darauf geachtet, dass sowohl das Start- als auch das Stopcodon des Gens erfasst wurden. Anschließend wurden die Gene über die gesamte Länge kloniert. Diese Klonierung wurde mehrmals wiederholt, wobei sowohl die cDNA-library (2.2.4.1) als auch cDNA (2.2.3.4) von *C. felis* (2.2.4.6) verwendet wurden. Dadurch konnten mögliche Sequenz-Fehler, welche durch die reverse Transkription zur Herstellung der cDNA oder durch die Amplifikation während der PCR entstehen können, ausgeschlossen werden.

Im Rahmen dieser Arbeiten konnten die Dopamin-Rezeptoren I, II und III von *C. felis* erfolgreich identifiziert und kloniert werden. Das Gen des Dopamin-Rezeptors I (CfDopRI, wurde beim NCBI in die Datenbank eingestellt, *Genbank accession number: DQ645628*) ist 1290 Basenpaare lang und codiert vermutlich für ein Protein mit 430 Aminosäuren. Das Gen des Dopamin-Rezeptors II (CfDopRIIa, *Genbank accession number: DQ459405*) ist 1392 Basenpaare lang und codiert vermutlich für ein Protein mit 463 Aminosäuren. Für dieses Gen wurden zwei weitere kürzere Varianten identifiziert (CfDopRIIb, *Genbank accession number: DQ459406* und CfDopRIIc, *Genbank accession number: DQ459407*). Vermutlich entstehen diese Varianten durch alternatives *splicing*. Da CfDopRIIa die längste Sequenz besitzt und die höchste Ähnlichkeit zu den Orthologen der anderen Insekten aufweist, wurden alle weiteren Arbeiten zur Charakterisierung des CfDopRII mit dieser Variante durchgeführt. Darüber hinaus konnte der Dopamin-Rezeptor III (CfDopRIII) erfolgreich identifiziert und kloniert werden. Die Gensequenz des CfDopRIII ist 1821 Basenpaare lang und codiert vermutlich für ein Protein mit 606 Aminosäuren. Sie wurde noch nicht beim NCBI in die Datenbank eingestellt.

3.3 Sequenzvergleiche der Dopamin-Rezeptoren von *C. felis* mit Orthologen anderer Insekten

Für alle drei Rezeptoren wurde jeweils ein *alignment* mit den orthologen Dopamin-Rezeptoren der Insekten *A. mellifera*, *A. gambiae* und *D. melanogaster* erstellt (exemplarisch für den CfDopRI in Abb. 3.3 gezeigt) und die Transmembran-Helices wurden mit Hilfe des TMHMM Servers vorhergesagt (Abb. 3.5). Die Sequenzen von *C. felis* zeigen wie die bereits bekannten Rezeptoren eine hohe Konservierung besonders in den Bereichen der Transmembran-Helices. Die stärksten Unterschiede treten in den N- und C-terminalen Bereichen sowie in der dritten intrazellulären Schleife auf. Die

dritte intrazelluläre Schleife und der C-Terminus sind an der Kopplung des G-Proteins beteiligt (Gether, 2000; Hermans, 2003).

Weiterhin ist aus den *alignments* ersichtlich, dass bestimmte Aminosäuren über alle Dopamin-Rezeptoren der verschiedenen Insekten konserviert sind. Diese Aminosäuren sind in den Abbildungen 3.3, 3.4 und 3.6 gelb markiert. Im Folgenden werden diese Aminosäuren beschrieben: Der Aspartat-Rest der Transmembran-Helix III spielt für die Bindung der Aminogruppe von Katecholaminen wie dem Dopamin eine entscheidende Rolle. Die zwei Serin-Reste in Transmembran-Helix V sind vermutlich an der Bildung von Wasserstoffbrücken mit den Hydroxylgruppen des Dopamins beteiligt. Es wurde beschrieben, dass der Phenylalanin-Rest in Transmembran-Helix VI mit dem aromatischen Ring des Dopamins interagiert. Ebenfalls vorhanden ist der Aspartat-Rest in Transmembran-Helix II und die DRY Sequenz, welche in Verbindung mit der Rezeptoraktivierung beschrieben werden (Strader *et al.*, 1995; Mustard *et al.*, 2005).

Ergebnisse

```

CfDopRI : ----- : -
AmDopRI : ----- : -
DmDopRI : MYTPHPFGFLIILVPMTNAMRAIAAIAAGVGSVAATVATSTTSSISSSTTIINTSSATTIGG : 62
AgDopRI : ----- : -

CfDopRI : -----MPNTSWE : 7
AmDopRI : -----MILSQN : 6
DmDopRI : NHTSGSTGFSTNSTLLDADHLLPLQLTTAKVDLDIEIDIQLLTNGYDGTTLTTSFYNESSWTNA : 124
AgDopRI : ----- : -

-----TMH1-----
CfDopRI : EAELDSVEARGDLQDPVTILLIGSFLVLIIFLSVAGNILVCAIYSDRGLRRIGNLFLASLA : 69
AmDopRI : NLTGKEDQENFTSLLSVLLVGFLLILIFLSVAGNILVCAIYTDRLRRIGNLFLASLA : 68
DmDopRI : SEMDTIVGEEPEPLSLVSVIVVGIFLSVLIFLSVAGNILVCAIYTERSLRRIGNLFLASLA : 186
AgDopRI : -----TFVSYAIAGVFLSIVIFLSVAGNILVCAIYTERSLRRIGNLFLASLA : 48

TMH2-----
CfDopRI : IADLFVASLVMTFAGVNDLLGYWVFGAQFCDTWVAFDVMCSTASILNLCAISLDRYIHIKDP : 131
AmDopRI : IADLFVGCCLVMTFAGVNDLLGYWVFGPRFCDTWIAFDVMCSTASILNLCAISLDRYIHIKDP : 130
DmDopRI : IADLFVASLVMTFAGVNDLLGYWIFGAQFCDTWVAFDVMCSTASILNLCAISMDRYIHIKDP : 248
AgDopRI : IADLFVASLVMTFAGVNDLLGYWIFGAQFCDTWVAFDVMCSTASILNLCAISLDRYIHIKDP : 110

-----TMH3-----
CfDopRI : LRYGRWITRRIAVATIVVIWLLAAVFSFVPIISLGLHRPPEATV--VYIGNDRNLPTCALDLT : 191
AmDopRI : LRYGRWVTRRIAVAGIADVWLLAGLISFVPIISLGLHRANEPVV---LDDSKEEHPTCALDLT : 189
DmDopRI : LRYGRWVTRRVAVITIAAIWLLAAVFSFVPIISLGIHRPDQPLI---FEDNGKKYPTCALDLT : 307
AgDopRI : LRYGRWVTRRVAIGTIAVIWLLAAVFSFVPIISLDLHRDKRDKTDTSLKINGIKYETCALDLT : 172

-----TMH4-----
CfDopRI : PTYAVVSSCISFYVPCIVMIGIYCRLYCYAQKHVKNIIRAVTRTAEQKDDETTRCPAVRCKHK : 253
AmDopRI : PTYAVVSSSISFYVPCIVMLGIYCRLYCYAQKHVKSIRAVTKLPDTSMAK-----SF : 241
DmDopRI : PTYAVVSSCISFYFPCVVMIGIYCRLYCYAQKHVKSIAKAVTRPGEVAEKQ-----RYKSI : 362
AgDopRI : PTYAVVSSCISFYVPCIVMIGIYCRLYCYAQKHVKSIRAVTRPGEISEKR-----YRSIR : 227

-----TMH5-----
CfDopRI : HKVNQMSSTNHQHRSSHHSPPYHVDHKAATVGVIMGVFLICWVPFFCVNIVAFCCKTCIP : 315
AmDopRI : VRKVHATKPPKQTKTKPTSPYHVDHKAATVGVIMGVFLICWVPFFCVNIVTSYCKTCIS : 303
DmDopRI : RRPKNQPKKFKVRNLHTHSSPYHVDHKAATVGVIMGVFLICWVPFFCVNITAAFCKTCIG : 424
AgDopRI : RPKSSKNKLLRQLAHTASSPYHVDHKAATVGVIMGVFLICWVPFFCVNITAAFCKTCIG : 289

-----TMH6-----
CfDopRI : DLTFKILSWLGYSNSAFNPPIIYSIFNKEFRDAFKKILTSNRVCTGGEQRLITEIRHRDHY : 377
AmDopRI : GRAFQVLTWLGYSNSAFNPPIIYSIFNTEFREAFKRILTKGARARGNQPSTSECGEFRSVVVQ : 365
DmDopRI : GQTFKILTWLGYSNSAFNPPIIYSIFNKEFRDAFKRILTMRNPWCQAQDVGNIHP--RNSDRF : 484
AgDopRI : QQTFKVLVSWLGYSNSAFNPPIIYSIFNTEFREAFKRILTSRSSWCCQEMGNIYP--RSSDRY : 349

CfDopRI : VTDYGTKSMAAIKERRNGSFRCTSMHSSAESIHHTRIHQTNIDLVDSEISAI : 429
AmDopRI : KRNGSMIECNISPRSSADSCQVIMAQRRDITVSAI----- : 402
DmDopRI : ITDYAAKNVVVMNSGRSSAELEQVSAI----- : 511
AgDopRI : VTDYAAKNVV-MNSGRSSADLEQVSAI----- : 375

```

Abb. 3.3. Alignment der Dopamin-Rezeptoren I von *C. felis*, *A. mellifera* (Am), *D. melanogaster* (Dm) und *A. gambiae* (Ag). Über alle Sequenzen konservierte Aminosäuren sind rot, blaue Aminosäuren sind über drei, grüne Aminosäuren über zwei Sequenzen konserviert. Die Transmembran-Helices (TMH) sind eingezeichnet. Aminosäuren mit gelber Schattierung sind typisch für Dopamin-Rezeptoren und übernehmen wichtige Funktionen (siehe Text).

```

-----
CfDopRIIa : MNISFNDVWTDANSSDYPTVDYKNLWNDTEIDNIETDLWLHWSKLAQKKAGLLIF : 56
CfDopRIIb : MNISFNDVWTDANSSDYPTVDYKNLWNDTEIDNIETDLWLHWSKLAQKKAGLLIF : 56
CfDopRIIc : MNISFNDVWTDANSSDYPTVDYKNLWNDTEIDNIETDLWLHWSKLAQKKAGLLIF : 56

-----TMH1-----                -----TMH2-----
CfDopRIIa : LLLFSTSTLFGNMLVILAVARERYLHTSTNYFVTS LAVADCLVGMVMPFSAIYEV : 112
CfDopRIIb : LLLFSTSTLFGNMLVILAVARERYLHTSTNYFVTS LAVADCLVGMVMPFSAIYEV : 112
CfDopRIIc : LLLFSTSTLFGNMLVILAVARERYLHTSTNYFVTS LAVADCLVGMVMPFSAIYEV : 112

-----TMH3-----                --
CfDopRIIa : LDNTWFFGSDWC DIWRS L D VLFSTASILNLCVISL DRY WAITDPFTYPPKMKTRKRA : 168
CfDopRIIb : LDNTWFFGSDWC DIWRS L D VLFSTASILNLCVISL DRY WAITDPFTYPPKMKTRKRA : 168
CfDopRIIc : LDNTWFFGSDWC DIWRS L D VLFSTASILNLCVISL DRY WAITDPFTYPPKMKTRKRA : 168

-----TMH4-----                -----TMH5---
CfDopRIIa : ILLIATVWICSSAISFP AIAWWRVRTSKLPDYKCPFTEHLGYLVFS STIS FYLPL : 224
CfDopRIIb : ILLIATVWICSSAISFP AIAWWRVRTSKLPDYKCPFTEHLGYLVFS STIS FYLPL : 224
CfDopRIIc : ILLIATVWICSSAISFP AIAWWRVRTSKLPDYKCPFTEHLGYLVFS STIS FYLPL : 224

-----
CfDopRIIa : FVMVFTYYRIYRAAIIQTQSLKIGTKQVMMASGELELTLRIHRGGTAKEHSGAVYL : 280
CfDopRIIb : FVMVFTYYRIYRAAIIQTQSLKIGTKQVMMASGELELTLRIHRGGTAKEHSGAVYL : 280
CfDopRIIc : FVMVFTYYRIYRAAIIQTQSLKIGTKQVMMASGELELTLRIHRGGTAKEHSGAVYL : 280

CfDopRIIa : TPTATSTPEEAPDIDDSPTVLH HNGVGR LNSNRMGTKHINKNFSLSRKIAKFAKEK : 336
CfDopRIIb : TPTATSTPEEAPDIDDSPTVLH HNGVGR LNSNRMGTKHINKNFSLSRKIAKFAKEK : 336
CfDopRIIc : TPTATSTPEEAPDIDDSPTVLH HNGVGR LNSNRMGTKHINKNFSLSRKIAKFAKEK : 336

-----TMH6-----                -----TMH7---
CfDopRIIa : KAAKTLGIVMGVFIIICWLPFFVNNLLSGLCVNCIQHEEIVSAVVTWLGWINSSMNP : 392
CfDopRIIb : KAAKTLGIVMGVFIIICWLPFFVNNLLSGLCVNCIQHEEIVSAVVTWLGWINSSMNP : 392
CfDopRIIc : KAAKTLGIVMGVFIIICWLPFFVNNLLSGLCVNCIQHEEIVSAVVTWLGWINSSMNP : 392

-----
CfDopRIIa : VIYACWSKDFRRAFARILCACCPRKVRKRYRPTLKSQYRSGRLSSRRYYSTCSL : 448
CfDopRIIb : VIYACWSKDFRRAFARILCACCPRKVRKRYRPTLKSQYRSGRLSSRRYYSTCSL : 436
CfDopRIIc : VIYACWSKDFRR----- : 404

CfDopRIIa : HGIQVRQNNYGQSYI : 463
CfDopRIIb : ----- : -
CfDopRIIc : ----- : -

```

Abb. 3.4. Dopamin-Rezeptor II von *C. felis* (Cf). Die drei Varianten des CfDopRII sind dargestellt, welche sich am C-Terminus unterscheiden. Die Transmembran-Helices (TMH) sind eingezeichnet. Aminosäuren mit gelber Schattierung sind typisch für Dopamin-Rezeptoren und übernehmen wichtige Funktionen (siehe Text).

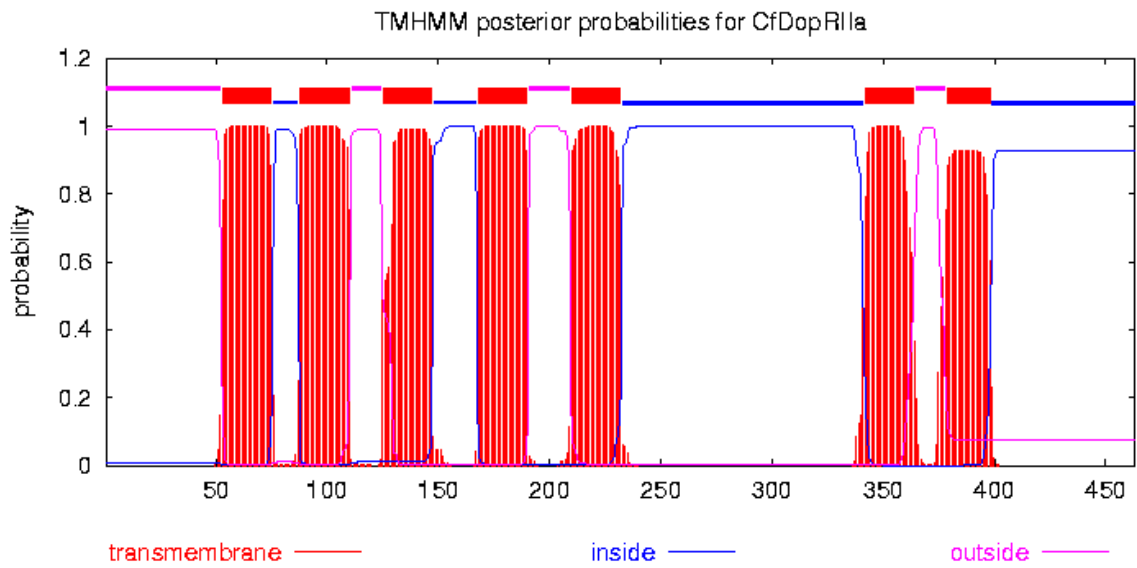


Abb. 3.5. Vorhersage der Transmembran-Helices des CfDopRII. Die Vorhersage von Transmembran-Helices wurde mit dem TMHMM Server Version 2.0 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/>; Krogh *et al.*, 2001) durchgeführt.

CfDopRIII : MERHISLSSHDAFAFSNLSTNLLENAIAKSNIGSIYNETSNSSSQESFIIIFLEDFNDY : 56

CfDopRIII : FYNYNDSQITAEAPLEANGDFYEHFLNCTGDAFALYPDQALNECARNTTYFEGAG : 112

-----TMH1----- TMH2---
CfDopRIII : IEYNYWALILMVFPFLTLFGNVLVIMAVARERTLQTVTNYFIVSLALA^DLLVAVVV : 168

----- TMH3-----
CfDopRIII : MPFAVYVLFNGTWGLPPFVCFDYIAM^DVICSTSSIFNLVAISI^{DRY}IAVTQPIKYA : 224

-----TMH4-----
CfDopRIII : KHKNNRRVWLTILLVWAISSAIGSPIVLGLNNTPDRLPDLCLFYNSDFIIS^SLS^S : 280

----TMH5-----
CfDopRIII : FYIPCIIMVFLYXNIFKALRLRALKHRATKRPHYSDLTTATVIENVSQTRKLAETV : 336

CfDopRIII : LGPXTTADERPTNTASGSNEEDDDQLERSSDVDDCHIIVNEKNAEFILATVVEEAG : 392

CfDopRIII : SVVTKLATPSVADANGNNDSGYAPSGVEYVLHKAPVSLPGSPARKVQLPSTTENVP : 448

CfDopRIII : HLRPSIKKNGLKQDLKHSTRGHTSGEGSAGLERKLSAKSSTGSKKERKSSTASKFT : 504

-----TMH6-----
CfDopRIII : IYKVNKASRKKREKNSAKKERKATKTLAIVLGVFLVCWVPF^FTCNIMDATCTKLNL : 560

-----TMH7-----
CfDopRIII : DCQPGVTAFILTTWLGYMNSFVNPIYITIFNPEFRKAFKKLMNIGT : 606

Abb. 3.6. Sequenz des Dopamin-Rezeptors III von *C. felis* (Cf). Die Transmembran-Helices (TMH) sind eingezeichnet. Aminosäuren mit gelber Schattierung sind typisch für Dopamin-Rezeptoren und übernehmen wichtige Funktionen (siehe Text).

3.4 Klassifizierung der Dopamin-Rezeptoren von *C. felis*

Für die Klassifizierung der neuen Dopamin-Rezeptoren von *C. felis* wurde zunächst der Grad der Identitäten zwischen CfDopRI, II und III (Tab. 3.4) sowie zu den orthologen Rezeptoren der Insekten *D. melanogaster*, *A.*

gambiae und *A. mellifera* bestimmt und verglichen (Tab. 3.5). Die Übereinstimmung zwischen den Dopamin-Rezeptoren des Flohs ist sehr gering. Der Vergleich mit den Rezeptoren der anderen Insekten zeigt einen eindeutigen Unterschied im Grad der Identitäten zwischen orthologen und nicht orthologen Sequenzen. Z.B. besitzt der CfDopRI die höchste Übereinstimmung (% Identität) mit den Dopamin-Rezeptoren I der anderen Insekten.

Tab.3.4. Identitäten zwischen den Dopamin-Rezeptoren von *C. felis*.

Rezeptor-Paar	Identität [%]
CfDopRIII und CfDopRI	17
CfDopRII und CfDopRIII	23
CfDopRII und CfDopRI	26

Tab.3.5. Identitäten zwischen den Dopamin-Rezeptoren von *C. felis*, *A. mellifera*, *D. melanogaster* und *A. gambiae*.

		Identität [%]		
		CfDopRI	CfDopRII	CfDopRIII
DopRI	<i>A. mellifera</i>	60	28	17
	<i>D. melanogaster</i>	49	24	19
	<i>A. gambiae</i>	62	25	16
DopRII	<i>A. mellifera</i>	30	66	21
	<i>D. melanogaster</i>	23	58	25
	<i>A. gambiae</i>	27	57	15
DopRIII	<i>A. mellifera</i>	16	23	52
	<i>D. melanogaster</i>	19	23	53
	<i>A. gambiae</i>	18	22	44

Weiterhin sollte die Klassifizierung anhand einer phylogenetischen Analyse bestätigt werden. Ein phylogenetischer Baum spiegelt die evolutionäre Beziehung und Verwandtschaft zwischen den verschiedenen Rezeptoren wider. Die Analyse wurde mit Dopamin-Rezeptoren der Insekten *C. felis* (Cf), *D. melanogaster* (Dm), *A. mellifera* (Am), *A. gambiae* (Ag) und den Dopamin-Rezeptoren von *H. sapiens* (Hm) durchgeführt. Zunächst wurde ein *alignment* zwischen den verschiedenen Rezeptoren berechnet (ClustalW Version 1.82 (<http://www.ebi.ac.uk/clustalw/>; Thompson *et al.*, 1994). Die Ähnlichkeiten und Unterschiede im *alignment* wurden vom Programm für die Erstellung eines phylogenetischen Baums verwendet. Die Abb. 3.7 zeigt das Ergebnis der Analyse: Die Dopamin-Rezeptoren I bis III von *C. felis* werden jeweils mit den Orthologen der anderen Insekten gruppiert, was die Einordnung und Nummerierung der Rezeptoren CfDopRI, CfDopRII und CfDopRIII bestätigt. Die humanen Dopamin-Rezeptoren (HsDopR1 bis 5) bilden zwei abgegrenzte Gruppen. Die erste Gruppe besteht aus den Rezeptoren HsDopR1 und 5, welche D1-ähnlich sind. Wie erwartet werden diese Rezeptoren mit den Dopamin-Rezeptoren I und II der Insekten zusammengelegt, da diese ebenfalls D1-ähnlich sind. Die zweite Gruppe besteht aus den D2-ähnlichen Rezeptoren HsDopR2, 3 und 4 mit einer näheren Verwandtschaft zu den Dopamin-Rezeptoren III der Insekten. Der Histamin-Rezeptor von *D. melanogaster* wurde als ein Kontrollgen in die Analyse eingefügt und zeigt den erwarteten großen Abstand zu den anderen Rezeptoren. Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Dopamin-Rezeptoren von *C. felis* mit Hilfe von BLAST-Analysen, *alignments* und der Bestimmung der Identitäten sowie der beschriebenen phylogenetischen Analyse eindeutig klassifiziert werden konnten.

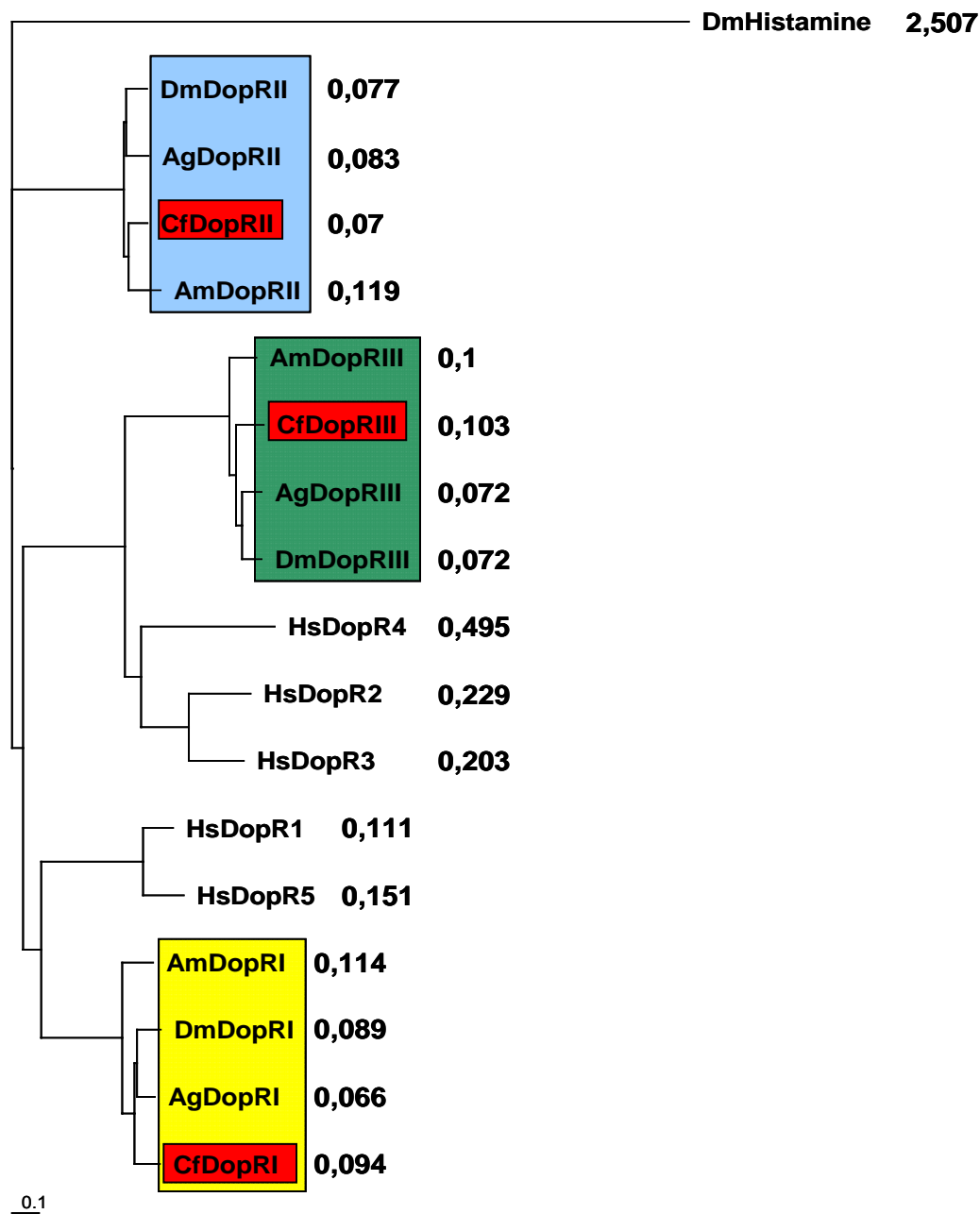


Abb. 3.7. Phylogenetischer Baum der Dopamin-Rezeptoren von *C. felis* (Cf), *D. melanogaster* (Dm), *A. mellifera* (Am), *A. gambiae* (Ag) sowie von *H. sapiens* (Hm). Die Länge der Äste ist proportional zum geschätzten Grad der evolutionären Veränderung (Thompson *et al.*, 1994). Der Histamin-Rezeptor von *D. melanogaster* wurde als Kontrollgen in die Analyse aufgenommen. Genbank *Accession Numbers* der verwendeten Sequenzen: CfDopRII – DQ459405; AmDopRI – CAA73841; DmDopRI – AAA85716; HsDopR5 – NP_000789; HsDopRI – NP_000785; DmDopRII – Q24563; AmDopRII – AAM19330; AmDopRIII – AY921573; DmDopRIII – AAN15955; HsDopR4 – NP_000788; HsDopR3 – NP_000787; HsDopR2 – NP_000786; AgDopRI – EAA10574; AgDopRII – EAA06824; AgDopRIII – EAA09118; DmHistamin – AAF56578

3.5 Funktionelle Expression des CfDopRII in Oozyten von *X. laevis*

Es wurde für *A. mellifera* und *D. melanogaster* beschrieben, dass Dopamin-Rezeptoren an G-Proteine koppeln, die den cAMP-Spiegel beeinflussen (Mustard *et al.*, 2005; Beggs *et al.*, 2005; Feng *et al.*, 1996; Sugamori *et al.*, 1995; Hearn *et al.*, 2002). Deshalb wurde in dieser Arbeit für die funktionelle Expression eine Methode zur Quantifizierung intrazellulärer cAMP-Spiegel etabliert. Hierfür wurde der cAMP Biotrak Enzym Immunoassay (Amersham Biosciences, Buckinghamshire, UK) verwendet (siehe 2.4.8 und 2.5.6). Zur Etablierung des Systems wurde zunächst der von Feng *et al.* (1996) beschriebene Dopamin-Rezeptor II von *D. melanogaster* in Oozyten von *X. laevis* funktionell exprimiert. Der Rezeptor wurde aus cDNA von *D. melanogaster* amplifiziert und in den pSP64T kloniert (2.2.4.8). Mit Hilfe dieses Vektor-Konstruktes wurde cRNA hergestellt (2.5.3), welche auf einem Formaldehyd-Agarosegel kontrolliert (Abb. 3.8) und anschließend in Oozyten injiziert wurde (2.5.4). Nach einer Inkubation von fünf Tagen (2.5.5) wurden die Oozyten mit Hilfe des cAMP-Assays analysiert (2.5.6). Für jede Messung wurde eine Standardkurve erstellt, um mit Hilfe dieser Kurve die Absolutwerte der cAMP-Konzentrationen zu bestimmen (Abb. 3.9).

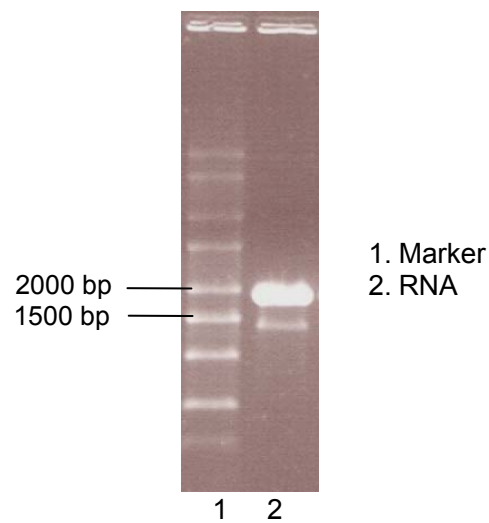


Abb. 3.8. Formaldehyd-Agarose Gel mit cRNA des Gens DmDopRII. Zur Abschätzung der Größe sind Größenmarker aufgetragen (siehe Anhang). Das Gen DmDopRII besitzt 1611 Basenpaare. Darüber hinaus kommen noch 5'- und 3'-flankierende Bereiche des Globin-Gens, welche im Vektor pSP64T (Abb. 2.6) enthalten sind und während der cRNA-Synthese angehängt wurden, hinzu. Daraus ergibt sich eine Größe der cRNA von etwa 1860 bp. Die cRNA besaß die erwartete Größe und war nicht degradiert. Neben dem Hauptprodukt ist noch eine schwache kleinere Bande zu erkennen. Solche Nebenprodukte können nach Angabe von Ambion (Huntingdon, Cambridgeshire, UK) bei der Herstellung der cRNA entstehen, haben aber auf die funktionelle Expression des Hauptprodukts keinen Einfluss.

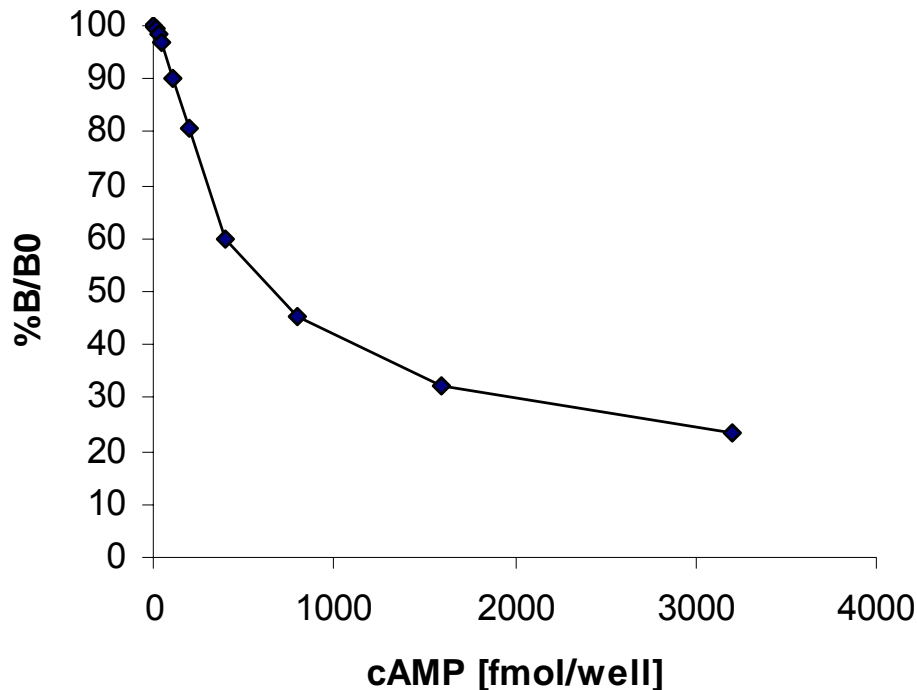


Abb. 3.9. Standardkurve zur Bestimmung des intrazellulären cAMP-Gehalts. Mit den Absorptionswerten wurden die Werte $\%B/B_0$ für die entsprechenden cAMP-Konzentrationen der Standardkurve berechnet und gegeneinander aufgetragen. Anhand dieser Standardkurve können die absoluten cAMP-Werte der Proben einer Messung bestimmt werden. Für jede Messung wurde eine entsprechende Standardkurve erstellt.

Oozyten mit einer DmDopRII-cRNA-Injektion wurden mit Dopamin inkubiert. Wie erwartet stieg der intrazelluläre cAMP-Spiegel in Abhängigkeit von der Konzentration der verwendeten Dopamin-Lösung signifikant an. Als Kontrollen wurden die intrazellulären cAMP-Spiegel von nicht-injizierten Oozyten ohne Dopamin Inkubation bzw. mit Dopamin Inkubation ($10 \mu\text{M}$) bestimmt. Die Kontrollen zeigten keine Veränderung der intrazellulären cAMP-Konzentration und bestätigen, dass der Anstieg des cAMP-Spiegels der mit cRNA injizierten Zellen auf den Dopamin-Rezeptor II von *D. melanogaster* zurückzuführen ist (Abb. 3.10).

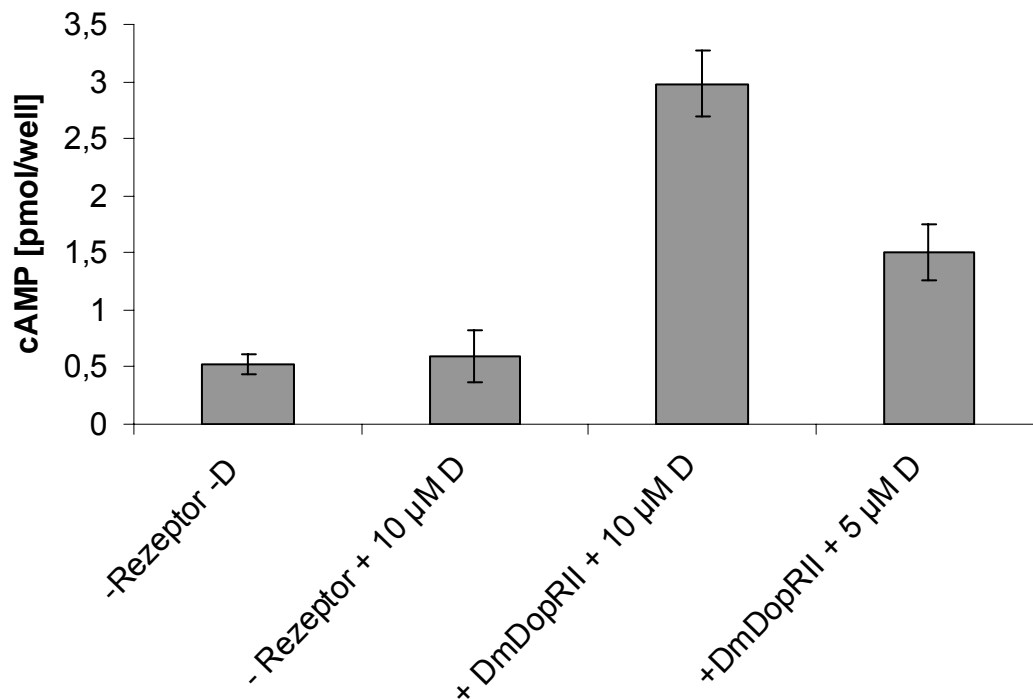


Abb. 3.10. Funktionelle Expression des DmDopRII in Oozyten von *X. laevis*.

Oozyten, welche mit cRNA des DmDopRII injiziert wurden, zeigen einen signifikanten Anstieg des intrazellulären cAMP-Spiegels in Abhängigkeit der Dopamin-Konzentration. Die Kontrollen zeigen auch nach Inkubation mit Dopamin keine Veränderung der cAMP-Konzentration. Für jeden Wert wurden die cAMP-Konzentrationen von mindestens fünf einzelnen Oozyten bestimmt und der Mittelwert wurde berechnet. Die Ergebnisse wurden in drei unabhängigen Experimenten bestätigt. Aufgrund der biologischen Variabilität der Oozyten wurden die Mittelwerte und die Standardabweichungen von einem repräsentativen Experiment berechnet.

Durch diese funktionelle Expression des DmDopRII wurde sichergestellt, dass Oozyten in Verbindung mit dem cAMP-Biotrak Enzymimmunoassay (Amersham Biosciences, Buckinghamshire, UK) zur Analyse von Dopamin-Rezeptoren geeignet sind. Analog zur beschriebenen Vorgehensweise für die Expression des DmDopRII wurde der Rezeptor CfDopRII in den pSP64T kloniert und es wurde cRNA hergestellt (2.2.4.7). Zur Kontrolle wurde die RNA auf ein Formaldehyd-Agarose Gel (2.2.3.3) aufgetragen und auf Größe und eine mögliche Degradation hin überprüft (Abb. 3.11).

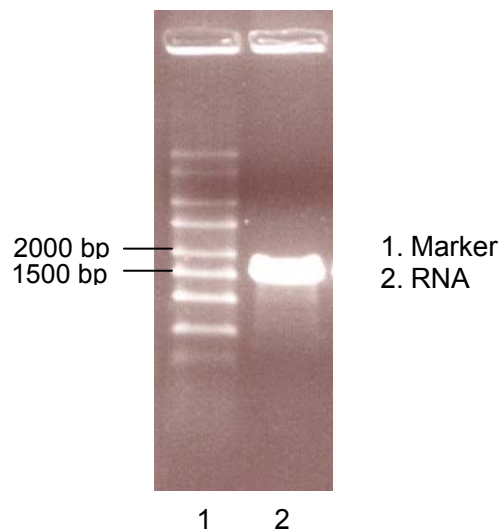


Abb. 3.11. Formaldehyd-Agarose Gel mit cRNA des Gens CfDopRII. Zur Abschätzung der Größe sind Größenmarker aufgetragen (siehe Anhang). Auf dem Bild ist gut zu erkennen, dass die RNA keine Degradation durch RNasen aufweist. Das Gen des CfDopRII ist 1392 bp groß. Zusätzlich besitzt die cRNA noch 5'- und 3'-flankierende Regionen des Globin-Gens, welche im Vektor pSP64T (Abb. 2.6) enthalten sind und während der cRNA-Synthese angehängt wurden. Daraus ergibt sich eine Größe der cRNA von etwa 1640 bp. Mit Hilfe dieser Agarosegelelektrophorese wurde nachgewiesen, dass die cRNA die erwartete Länge besaß.

Die *in vitro* hergestellte cRNA des CfDopRII wurde in Oozyten injiziert, die anschließend fünf Tage inkubiert wurden (2.5.4 und 2.5.5). Als Kontrollen wurden Oozyten ohne Injektion bzw. mit Wasser-Injektion unter gleichen Bedingungen mitgeführt. Zum einen wurden die Kontroll-Oozyten und cRNA-injizierten Oozyten mit Dopamin-Lösungen der Konzentrationen 10 bzw. 5 μ M inkubiert. Um den Basiswert der intrazellulären cAMP-Konzentration zu bestimmen, wurden parallel Kontroll-Oozyten und cRNA-injizierte Oozyten mit einer entsprechenden Lösung ohne Dopamin inkubiert. Die Bestimmung des cAMP-Spiegels ergab einen signifikanten Anstieg des intrazellulären cAMPs in cRNA-injizierten Oozyten in Abhängigkeit von der verwendeten Dopamin-Konzentration. Die Kontrollen zeigten keine Veränderung der cAMP-Konzentration durch Inkubation mit Dopamin (Abb. 3.12). Damit konnte der Dopamin-Rezeptor II (CfDopRII) von *C. felis* erstmals funktionell exprimiert werden.

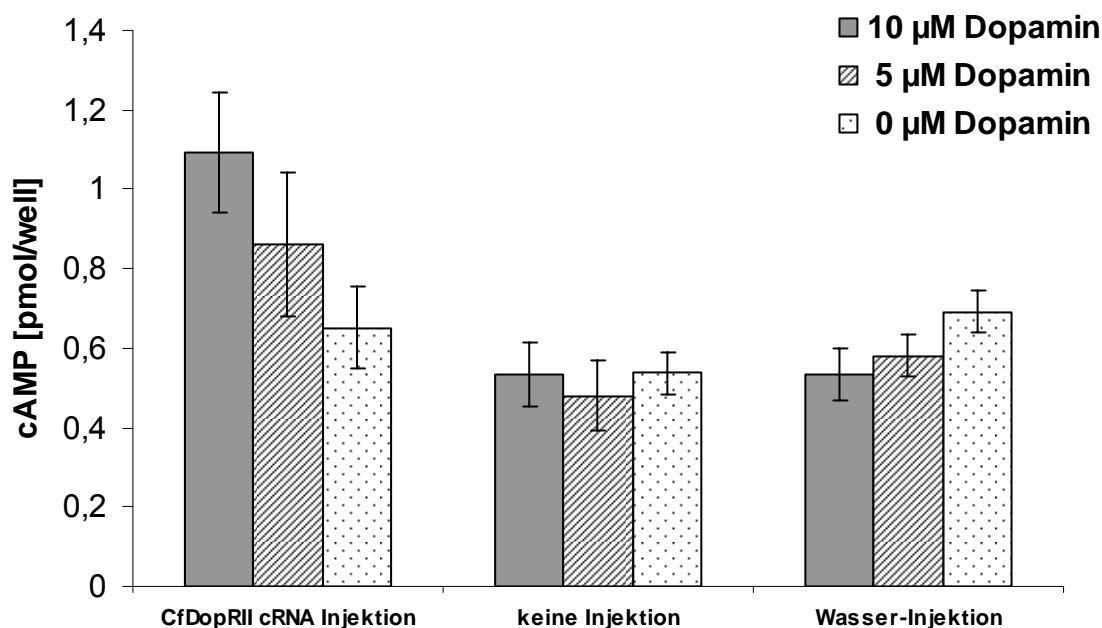


Abb. 3.12. Funktionelle Expression des CfDopRII in *X. laevis* Oozyten. Oozyten wurden mit cRNA des CfDopRII bzw. mit Wasser injiziert und fünf Tage bei 19°C inkubiert. Parallel wurden nicht-injizierte Oozyten mitgeführt. Nach fünf Tagen wurden die Oozyten für 30 min mit einer IBMX-ND96-Lösung inkubiert, um Phosphodiesterasen zu inhibieren. Anschließend wurden die Oozyten mit einer Lösung des natürlichen Liganden Dopamin inkubiert. Die cRNA-injizierten Oozyten zeigten im Vergleich zu den Kontrollen einen signifikanten Anstieg des intrazellulären cAMP-Spiegels in Abhängigkeit von der Dopamin-Konzentration. Für jeden Wert wurde der cAMP-Spiegel von mindestens fünf unabhängigen Oozyten bestimmt und die Standardabweichung berechnet. Die Ergebnisse wurden in drei unabhängigen Experimenten bestätigt. Aufgrund der biologischen Variabilität der Oozyten wurden die Mittelwerte und die Standardabweichungen von einem repräsentativen Experiment berechnet.

3.6 Funktionelle Expression des CfDopRII in HEK293-Zellen

Die Ergebnisse zur funktionellen Expression des CfDopRII in Oozyten von *X. laevis* sollten in einem unabhängigen System bestätigt werden. Im Gegensatz zu Oozyten sollte das zweite Expressionssystem für ein *high-throughput-screening* (HTS) geeignet sein. Daher wurden humane embryonale Nierenzellen (HEK293-Zellen) für diese Experimente ausgewählt. Um die Messung des intrazellulären cAMP-Gehalts von HEK293-Zellen in Verbindung mit dem cAMP-Assay (2.5.6) zu etablieren, wurde der Wirkstoff Forskolin verwendet. Dieser stammt aus dem Harfenkraut *Coleus forskohlii* und wirkt

aktivierend auf das Enzym Adenylatzyklase, was in einem Anstieg des intrazellulären cAMP-Gehalts resultiert (De Souza *et al.*, 1983). Mit Hilfe dieser Substanz sollte eine erste Kalibrierung vorgenommen werden zur grundsätzlichen Überprüfung der Funktionalität des Systems. Für diese und auch für alle nachfolgenden Messungen wurden Standardkurven - wie in Abbildung 3.9 gezeigt - erstellt. Die HEK293-Zellen wurden in 24-well-Platten mit einer Dichte von 10^6 Zellen kultiviert. Nach einer Inkubation mit einer 100 μM IBMX-PBS-Lösung bei 37°C und 5% CO_2 für 15 min zur Inhibition der Phosphodiesterase wurde anschließend mit den verschiedenen konzentrierten Forskolin-IBMX-PBS-Lösungen bei 37°C und 5% CO_2 für 15 min inkubiert. Die Kontrolle zur Bestimmung des cAMP-Basiswerts wurde währenddessen weiter in einer IBMX-PBS-Lösung inkubiert. Die Messung der intrazellulären cAMP-Werte der unterschiedlich behandelten HEK293-Zellen zeigte einen signifikanten Anstieg der cAMP-Konzentration in Abhängigkeit von der verwendeten Forskolin-Konzentration (Abb. 3.13).

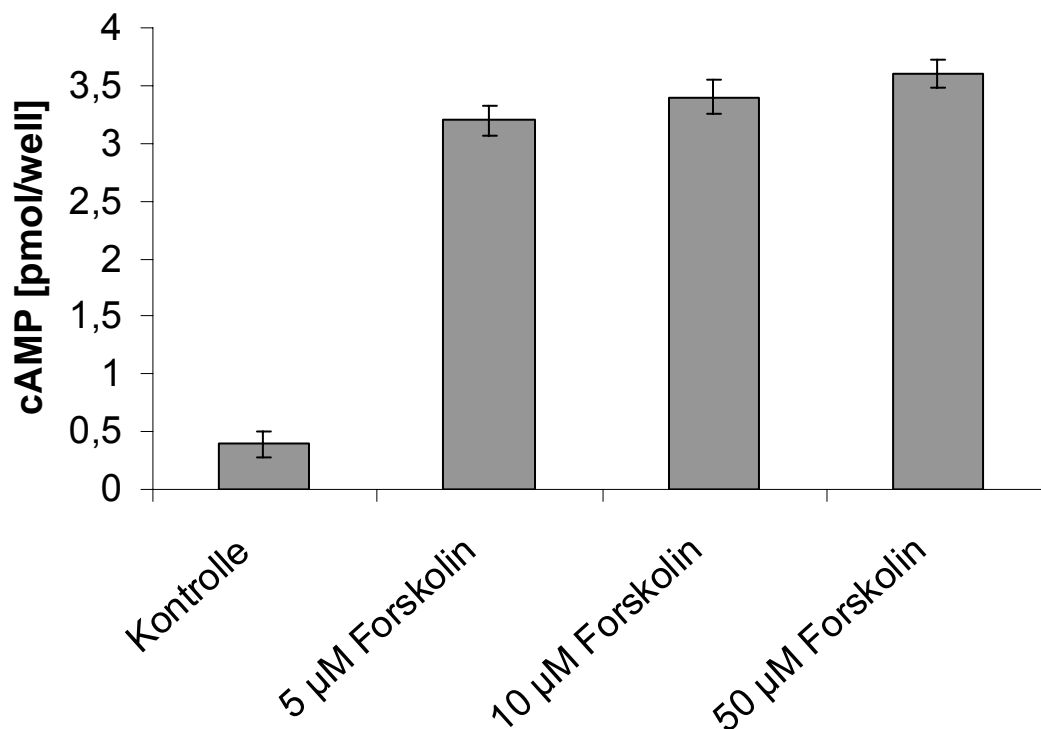


Abb. 3.13. Forskolin-abhängiger cAMP-Anstieg in HEK293-Zellen. Zur Kalibrierung der cAMP-Bestimmung von HEK293-Zellen wurde der Wirkstoff Forskolin des Harfenkrauts verwendet. Dieser führte zu einem signifikanten Anstieg des intrazellulären cAMP-Gehalts von HEK293-Zellen in Abhängigkeit von der eingesetzten Konzentration. Die Ergebnisse wurden in drei unabhängigen Experimenten bestätigt. Aufgrund unterschiedlicher Transfektionseffizienzen und der biologischen Variabilität der HEK293-Zellen wurden die Mittelwerte und die Standardabweichungen für ein repräsentatives Experiment berechnet.

Anschließend sollte das System weiter etabliert werden, indem bereits beschriebene Dopamin-Rezeptoren funktionell in HEK293-Zellen exprimiert werden. Hierfür eigneten sich besonders der DmDopRII (Feng *et al.*, 1996) und die humanen Dopamin-Rezeptoren HsDopR1 und HsDopR5, da deren Funktionalität bereits getestet wurde. Außerdem sind die beiden humanen Rezeptoren D1-ähnliche Rezeptoren (Kassack *et al.*, 2002), welche die höchste Konservierung zu den Dopamin-Rezeptoren I und II der Insekten aufweisen. Für die Transfektion der HEK293-Zellen wurde der DmDopRII in den Expressionsvektor pcDNA3.1(+) (Invitrogen, Carlsbad, USA) kloniert (2.2.4.8). Die humanen Rezeptoren wurden freundlicherweise von Herrn PD Dr. M.U. Kassack (Pharmazeutisches Institut der Universität Bonn) zur Verfügung gestellt. Die HEK293-Zellen wurden mit diesen Konstrukten transient transfiziert (2.4.4) und anschließend mit einer Kontroll-Lösung ohne Dopamin bzw. mit Dopamin-Lösungen der Konzentrationen 1 μM und 10 μM inkubiert. Bei den Rezeptoren HsDopR1 und DmDopRII konnte ein von der eingesetzten Dopamin-Konzentration abhängiger cAMP-Anstieg nachgewiesen werden. Für den HsDopR5 konnte ebenfalls ein signifikanter Anstieg der cAMP-Konzentration durch Inkubation mit den Dopamin-Lösungen detektiert werden. Allerdings war der Anstieg bei der Inkubation mit der 10 μM Dopamin-Lösung geringer als mit der 1 μM Dopamin-Lösung. Möglicherweise ist die maximale Aktivierung für den HsDopR5 bereits bei der Inkubation mit der 1 μM Dopamin-Lösung erreicht (Abb. 3.14).

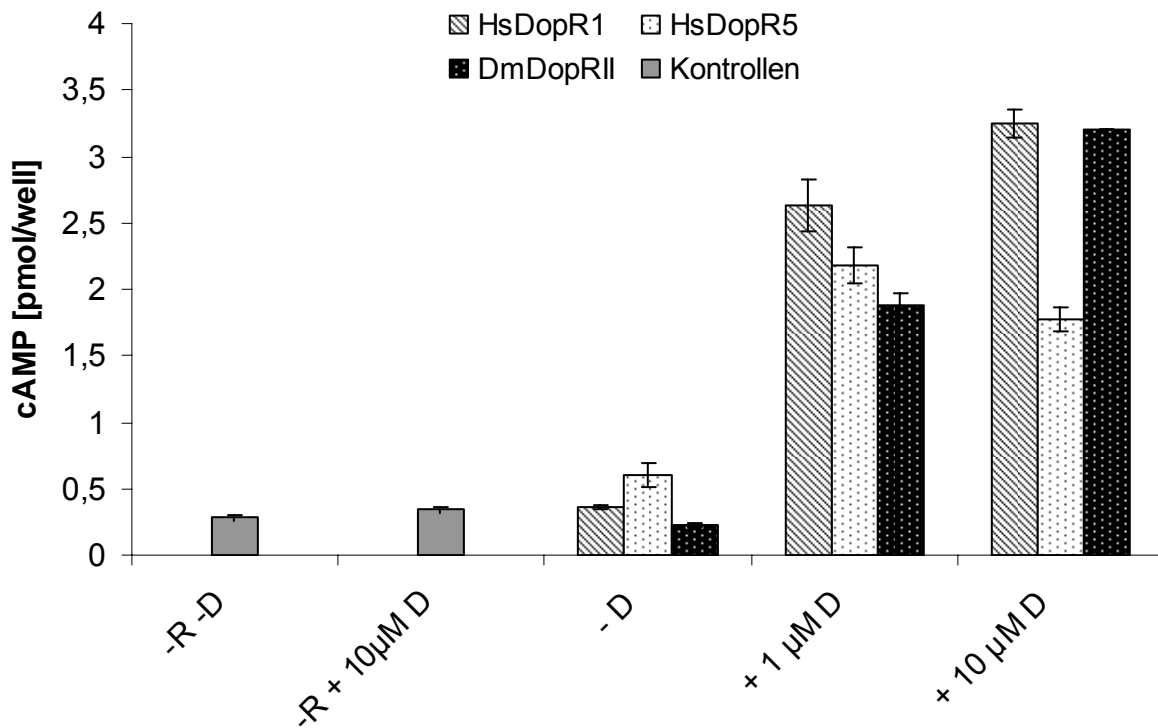


Abb. 3.14. Funktionelle Expression der humanen Dopamin-Rezeptoren HsDopR1 und HsDopR5 sowie des DmDopRII in HEK293-Zellen. Im Vergleich zu den untransfizierten Kontrollen (ohne Rezeptor = - R) konnte bei allen Dopamin-Rezeptoren ein signifikanter Anstieg der intrazellulären cAMP-Konzentration nach Inkubation mit einer Dopamin-Lösung nachgewiesen werden. Bei den Rezeptoren HsDopR1 und DmDopRII konnte eine Dosisabhängigkeit von Dopamin (D) detektiert werden. Lediglich mit HsDopR5 transfizierte HEK293-Zellen zeigten keine Erhöhung des cAMP-Anstiegs bei einer Inkubation mit einer 10 µM Dopamin-Lösung im Vergleich zur Inkubation mit einer 1 µM Dopamin-Lösung. Möglicherweise ist die maximale Aktivierung des Rezeptors bereits bei 1 µM Dopamin erreicht. Die Ergebnisse wurden in drei unabhängigen Experimenten bestätigt. Aufgrund unterschiedlicher Transfektionseffizienzen und der biologischen Variabilität der HEK293-Zellen wurden die Mittelwerte und die Standardabweichungen für ein repräsentatives Experiment berechnet.

Durch dieses Experiment konnte sichergestellt werden, dass die Funktionalität von Dopamin-Rezeptoren mit Hilfe der beschriebenen experimentellen Vorgehensweise nachgewiesen und analysiert werden kann. Um die Effizienz der Transfektion beurteilen zu können, wurden HEK293-Zellen mit einem CAT-pcDNA3.1(+)-Konstrukt transfiziert, wobei CAT für Chloramphenicol-Acetyl-Transferase steht. Dieses Enzym wird als Reporter-Protein verwendet. Da eukaryontische Zellen kein entsprechendes Protein besitzen, ist es zu einem Standardmarker für Transfektionsexperimente mit Säugerzellen geworden (Roche, Mannheim). HEK293-Zellen wurden mit CAT transfiziert und

anschließend mit einem polyklonalen CAT-spezifischen Antikörper aus dem Schaf des Anti-CAT-Digoxigenin-Systems (Roche, Mannheim) untersucht. Dabei färben sich Zellen, welche die Chloramphenicol-Acetyl-Transferase besitzen, nach der Zugabe des Substrats blau. So können erfolgreich transfizierte Zellen von CAT-negativen Zellen unterschieden werden. Der Vergleich von untransfizierten und mit CAT transfizierten HEK293-Zellen zeigt deutlich, dass die verwendete Transfektionsmethode geeignet ist, um DNA in die Zellen einzubringen und dass diese anschließend exprimiert wird (Abb. 3.15). Eine ausreichende Anzahl von HEK293-Zellen (Abb. 3.15 B) konnte erfolgreich transfiziert werden.

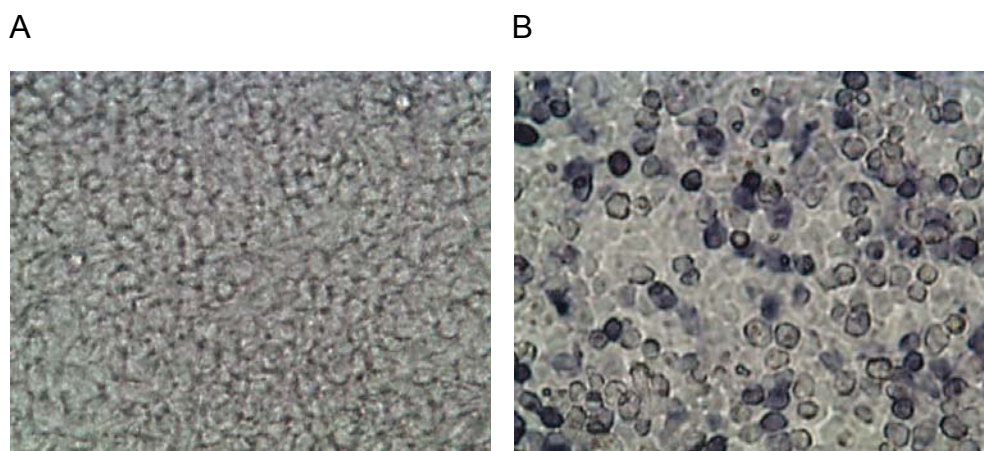


Abb. 3.15. Vergleich von untransfizierten (A) und transfizierten (B) HEK293-Zellen. HEK293-Zellen wurden mit dem Konstrukt CAT-pcDNA3.1(+) transfiziert. Mit Hilfe eines Antikörpers (Roche, Mannheim) wurde die Expression der Chloramphenicol-Acetyl-Transferase von transfizierten und untransfizierten HEK293-Zellen miteinander verglichen. CAT-positive Zellen, welche den Antikörper binden können, sind in der Lage das verwendete Substrat (TMB) in einen blauen Komplex zu überführen.

Zunächst wurde also getestet, ob die Stimulation von HEK293-Zellen durch Forskolin nachgewiesen werden kann. Dopamin-Rezeptoren verschiedener Organismen (HsDopRI, V und DmDopRII) wurden funktionell exprimiert und es wurde überprüft, ob mit Hilfe der verwendeten Methode eine ausreichende Transfektionseffizienz gegeben ist. Nach dieser Etablierung des Systems konnten die Dopamin-Rezeptoren I und II von *C. felis* analysiert werden.

Für die funktionelle Expression des CfDopRII in HEK293-Zellen wurde der Rezeptor in den pcDNA3.1(+) kloniert (2.2.4.7). Die Zellen wurden transient mit diesem Konstrukt transfiziert (2.4.4) und anschließend mit Dopamin-Lösungen verschiedener Konzentrationen inkubiert (2.4.7). Mit Hilfe des cAMP Biotrak Enzymimmunoassays (Amersham Biosciences, Buckinghamshire, UK) wurde der intrazelluläre cAMP-Spiegel der HEK293-Zellen

bestimmt (2.4.8). Für die Quantifizierung des basalen cAMP-Wertes wurden transfizierte Zellen ohne Dopamin-Inkubation im cAMP-Assay eingesetzt. Als eine weitere Kontrolle wurden untransfizierte Zellen mit einer Dopamin-Lösung inkubiert. Da die Zellen keine Erhöhung des intrazellulären cAMP-Spiegels zeigten, konnte eine Interaktion zwischen dem Liganden Dopamin und einem endogenen Rezeptor ausgeschlossen werden (Daten nicht gezeigt). Es ist beschrieben, dass durch die Transfektion von HEK293-Zellen endogene Rezeptor-Populationen exprimiert werden, die auf Dopamin ansprechen (Beggs *et al.*, 2005). Aus diesem Grund wurden für alle Experimente zwei Kontrollen durchgeführt: Zum einen wurde eine Transfektion ohne DNA durchgeführt (*mock transfection*) (Daten nicht gezeigt). Zum anderen wurden HEK293-Zellen mit dem leeren Expressionsvektor pcDNA3.1 (+) transfiziert. In beiden Fällen wurden die Zellen mit Dopamin-Lösungen unterschiedlicher Konzentrationen inkubiert und der cAMP-Gehalt wurde bestimmt. Der Vergleich der Kontrollen mit den CfDopRII-transfizierten Zellen ergab, dass der intrazelluläre cAMP-Spiegel der Rezeptor-exprimierenden Zellen signifikant erhöht war in Abhängigkeit von der eingesetzten Dopamin-Konzentration (Abb. 3.16). Wie erwartet war für beide Kontrollen ein leichter Anstieg der cAMP-Konzentrationen zu beobachten, allerdings lag dieser Anstieg deutlich niedriger als bei CfDopRII exprimierenden Zellen. Mit Hilfe dieser Werte konnte eine Dosisabhängigkeitskurve erstellt werden (Abb. 3.17). Der EC_{50} stellt die Konzentration eines Agonisten dar, bei der eine halbmaximale Antwort erzeugt wird. Zur Berechnung des EC_{50} -Wertes wurde der cAMP-Gehalt der pcDNA3.1 (+) transfizierten Zellen von den Werten der CfDopRII exprimierenden Zellen abgezogen. Der höchste Wert wurde gleich hundert Prozent gesetzt und mit der Software Excel Fit wurde der EC_{50} bestimmt (Abb. 3.18). Der EC_{50} des CfDopRII beträgt 2,4 μ M Dopamin.

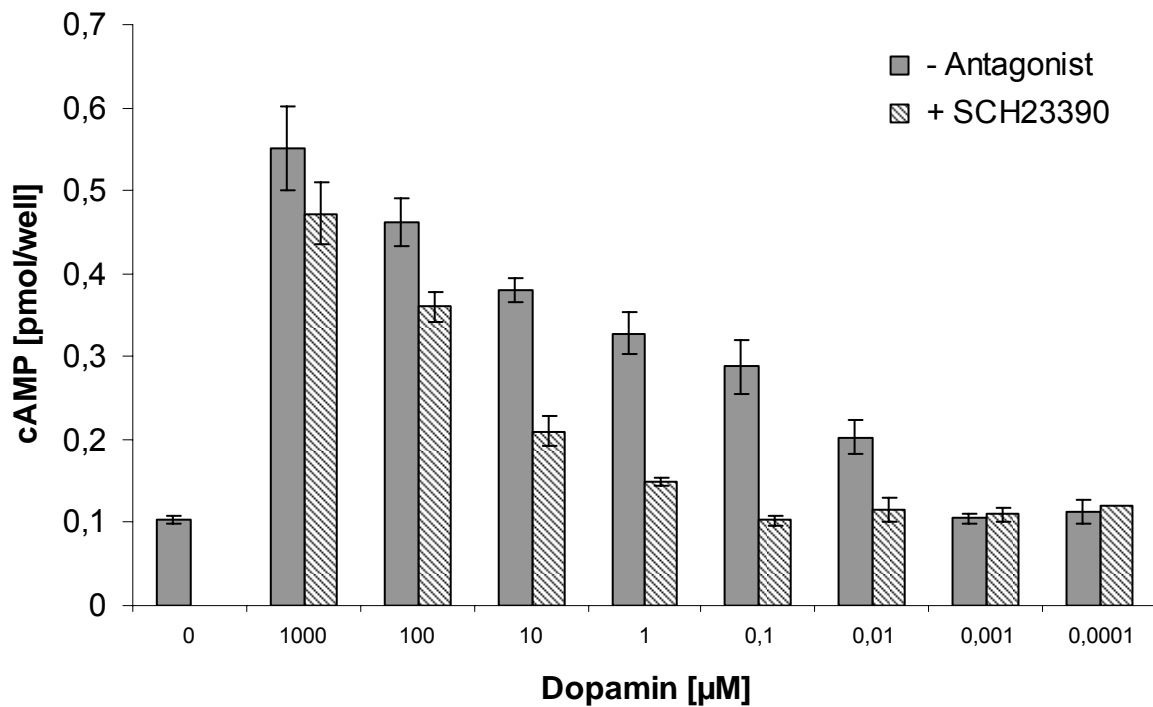


Abb. 3.16. Funktionelle Expression des CfDopRII in HEK293-Zellen. Im Vergleich zu den Kontrollen, welche mit dem leeren pcDNA3.1 (+) transfiziert wurden, und den Basalwerten ohne Dopamin-Inkubation zeigen die CfDopRII-transfizierten Zellen einen signifikanten Anstieg des intrazellulären cAMP-Gehalts in Abhängigkeit von der Dopamin-Konzentration. Die Ergebnisse wurden in drei unabhängigen Experimenten bestätigt. Aufgrund unterschiedlicher Transfektionseffizienzen und der biologischen Variabilität der HEK293-Zellen wurden die Mittelwerte und die Standardabweichungen für ein repräsentatives Experiment berechnet.

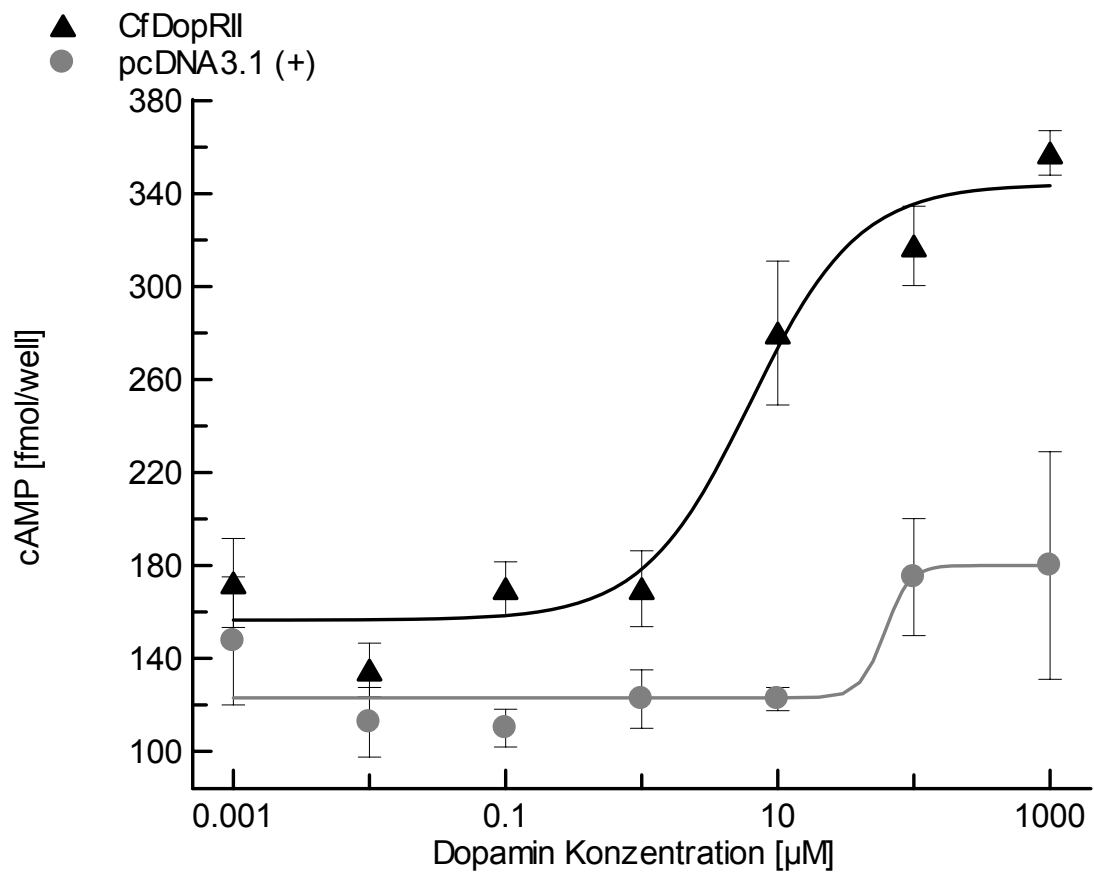


Abb. 3.17. Dosisabhängigkeitskurve des CfDopRII. Die Daten der funktionellen Expression des CfDopRII (Abb. 3.16) wurden zur Erstellung einer Dosisabhängigkeitskurve verwendet.

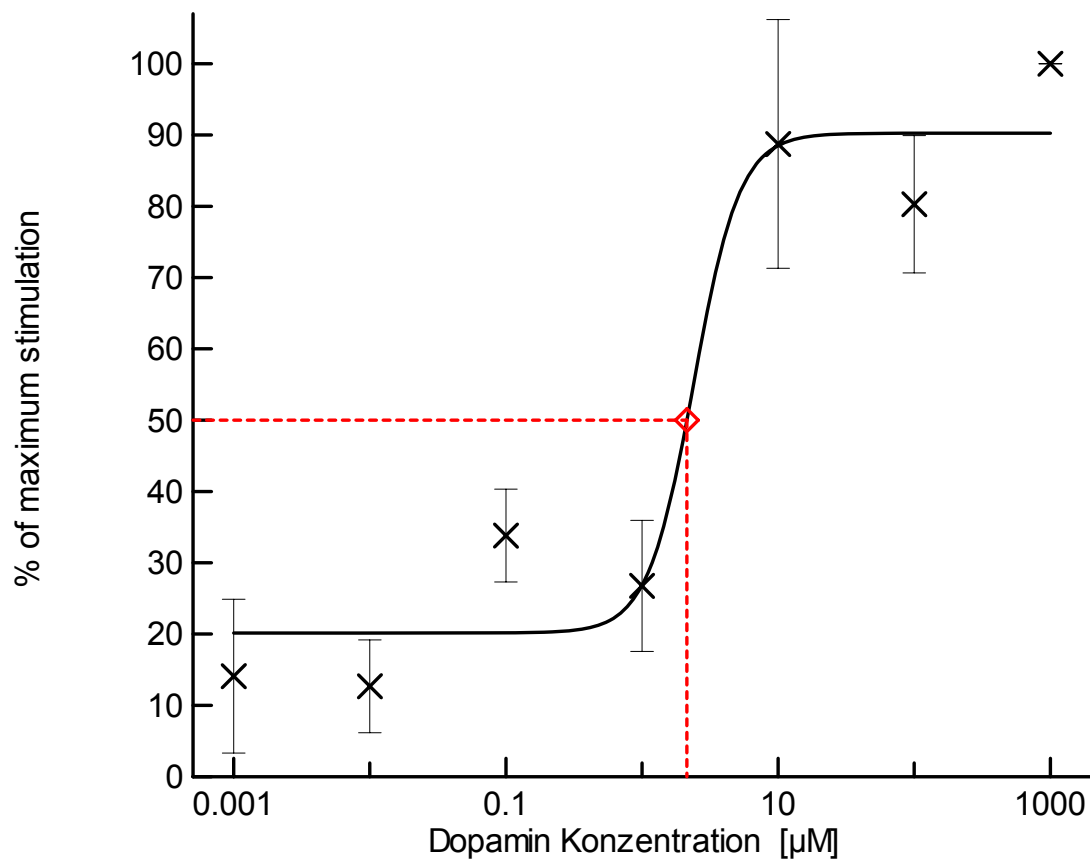


Abb. 3.18. Bestimmung des EC_{50} -Wertes des CfDopRII. Für die Berechnung wurden die Werte der pcDNA3.1 (+)-transfizierten Zellen von den Werten der CfDopRII-transfizierten Zellen abgezogen. Darüber hinaus wurde der höchste Wert gleich hundert Prozent gesetzt. Mit Hilfe der Software Excel Fit wurde der EC_{50} bestimmt. Er beträgt 2,4 μM Dopamin.

Rezeptoren für biogene Amine können zum Teil durch mehrere Liganden aktiviert werden. Aus diesem Grund sollte überprüft werden, ob Dopamin tatsächlich der Ligand mit der höchsten Effektivität ist. Die in Abbildung 3.19 gezeigten biogenen Amine wurden ausgewählt, um den Effekt auf den CfDopRII zu testen.

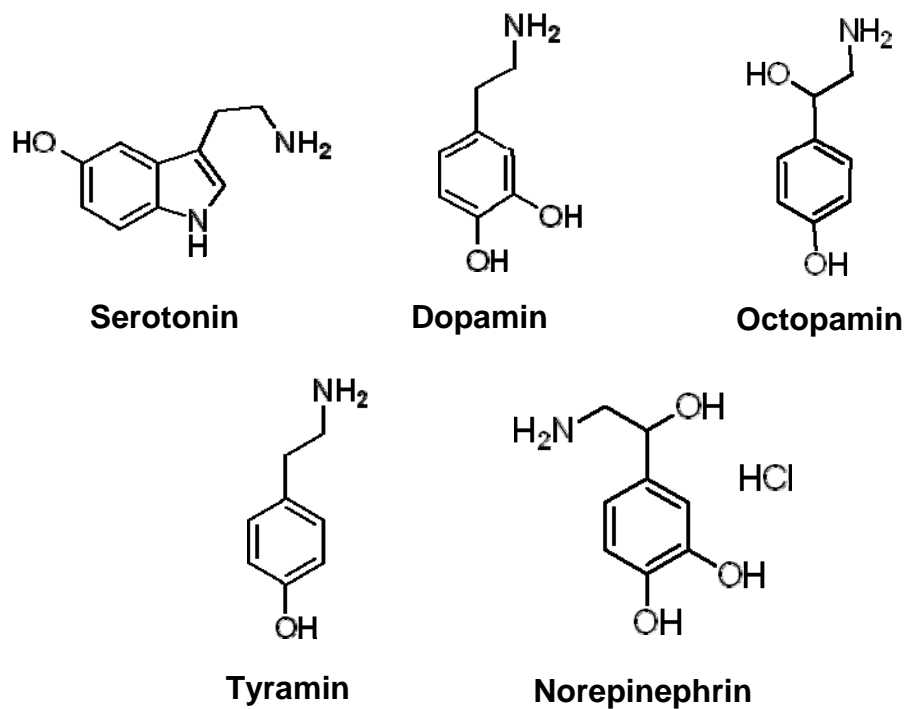


Abb. 3.19. Biogene Amine. Die gezeigten biogenen Amine wurden auf ihre Fähigkeit den CfDopRII zu aktivieren getestet.

HEK293-Zellen wurden mit dem CfDopRII transfiziert und anschließend mit Lösungen der biogenen Amine (10 μM) inkubiert. Es ist beschrieben, dass HEK293-Zellen wahrscheinlich durch endogene adrenerge Rezeptoren auf eine Inkubation mit Norepinephrin reagieren (Beggs *et al.*, 2005; Gerhardt *et al.*, 1997; Ohta *et al.*, 2003; Grohmann *et al.*, 2003). Aus diesem Grund ist ein starker Anstieg der intrazellulären cAMP-Konzentration sowohl in CfDopRII transfizierten als auch in pcDNA3.1 (+) transfizierten Zellen nach Behandlung mit Norepinephrin zu beobachten. Schließt man dieses Ergebnis aus der Betrachtung aus, so ist Dopamin der Ligand mit der höchsten Aktivität. Der Effekt der übrigen biogenen Amine nahm in folgender Reihenfolge ab: Dopamin > Tyramin > Octopamin > Serotonin (Abb. 3.20). Dieses Ergebnis bestätigt, dass der CfDopRII ein Dopamin-Rezeptor ist.

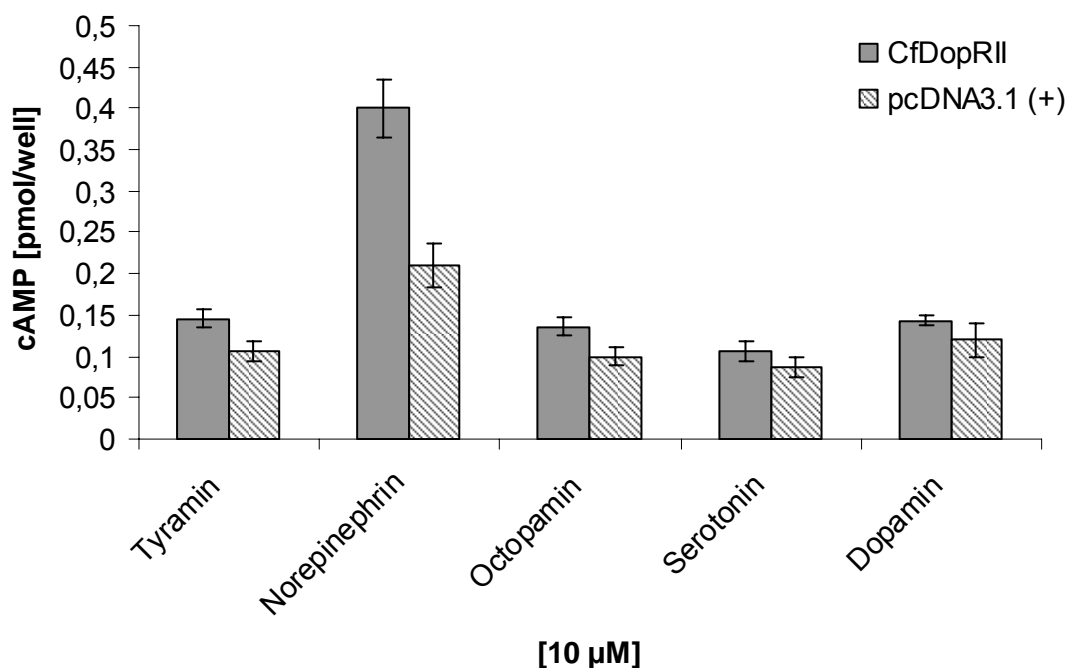


Abb. 3.20. Test der Effektivität verschiedener biogener Amine auf den CfDopRII. Norepinephrin spricht endogene adrenerge Rezeptoren der HEK293-Zellen an, weshalb sowohl die Kontrolle der pcDNA3.1 (+) transfizierten Zellen als auch die CfDopRII-transfizierten Zellen stark erhöhte cAMP-Konzentrationen aufweisen. Davon abgesehen ist Dopamin der Ligand mit dem höchsten Effekt. Die Ergebnisse wurden in drei unabhängigen Experimenten bestätigt. Aufgrund unterschiedlicher Transfektionseffizienzen und der biologischen Variabilität der HEK293-Zellen wurden die Mittelwerte und die Standardabweichungen für ein repräsentatives Experiment berechnet.

3.7 Funktionelle Expression des CfDopRI in HEK293-Zellen

An die Charakterisierung des CfDopRII schloss sich die Analyse des zweiten D1-ähnlichen Dopamin-Rezeptors des Flohs *C. felis* an. Für die funktionelle Expression des CfDopRI wurde die gleiche Vorgehensweise wie für den CfDopRII gewählt: Der Rezeptor wurde in den pcDNA3.1 (+) kloniert (2.2.4.7), der zur transienten Transfektion der HEK293-Zellen verwendet wurde (2.4.4). Die Stimulation erfolgte mit verschiedenen konzentrierten Dopamin-Lösungen (2.4.7) und die cAMP-Konzentrationen wurden mit dem cAMP Biotrak Enzymimmunoassay (Amersham Biosciences, Buckinghamshire, UK) bestimmt (2.4.8). Als Kontrollen wurden HEK293-Zellen ohne DNA (*mock transfection*) (Daten nicht gezeigt) bzw. mit dem leeren Vektor pcDNA3.1 (+) transfiziert und mit Dopamin-Lösungen inkubiert. Der Vergleich von Kontrollen und CfDopRI transfizierten Kontrollen zeigt, dass in Abhängigkeit vom Rezeptor

und den eingesetzten Dopamin-Konzentrationen die cAMP-Konzentration signifikant anstieg (Abb. 3.21). Anschließend wurde eine Dosisabhängigkeitskurve erstellt (Abb. 3.22). Zur Berechnung des EC₅₀-Wertes wurde die cAMP-Konzentration der pcDNA3.1 (+)-transfizierten Zellen von den Werten der CfDopRI exprimierenden Zellen abgezogen. Der höchste Wert wurde gleich hundert Prozent gesetzt und mit der Software Excel Fit wurde der EC₅₀ bestimmt (Abb. 3.23). Der EC₅₀ des CfDopRI beträgt 0,12 µM Dopamin.

Für den CfDopRI wurden ebenfalls andere biogene Amine auf ihre Aktivität getestet. Allerdings wurde Norepinephrin bei diesem Experiment nicht berücksichtigt, da bereits nachgewiesen wurde, dass dieses biogene Amin endogene Rezeptoren der HEK293-Zellen anspricht (Abb. 3.20). Dopamin ist der Ligand, welcher eindeutig den höchsten Effekt in CfDopRI-transfizierten Zellen auslöst. Ein geringer Anstieg der intrazellulären cAMP-Konzentration wird durch Tyramin verursacht. Durch Serotonin und Octopamin ist nur eine sehr geringe Steigerung des cAMP-Gehalts zu beobachten (Abb. 3.24).

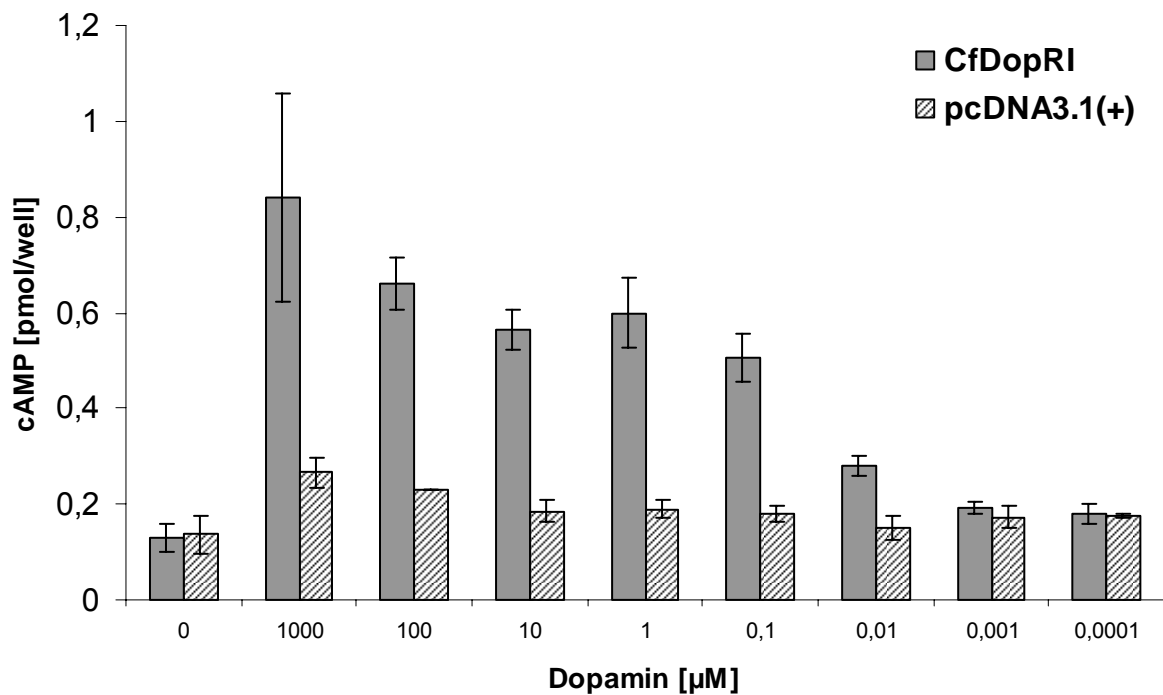


Abb. 3.21. Funktionelle Expression des CfDopRI in HEK293-Zellen. CfDopRI-transfizierte Zellen zeigten im Vergleich zu den Kontrollen einen signifikanten Anstieg der intrazellulären cAMP-Konzentration in Abhängigkeit von der Dopamin-Konzentration. Die Ergebnisse wurden in drei unabhängigen Experimenten bestätigt. Aufgrund unterschiedlicher Transfektionseffizienzen und der biologischen Variabilität der HEK293-Zellen wurden die Mittelwerte und die Standardabweichungen für ein repräsentatives Experiment berechnet.

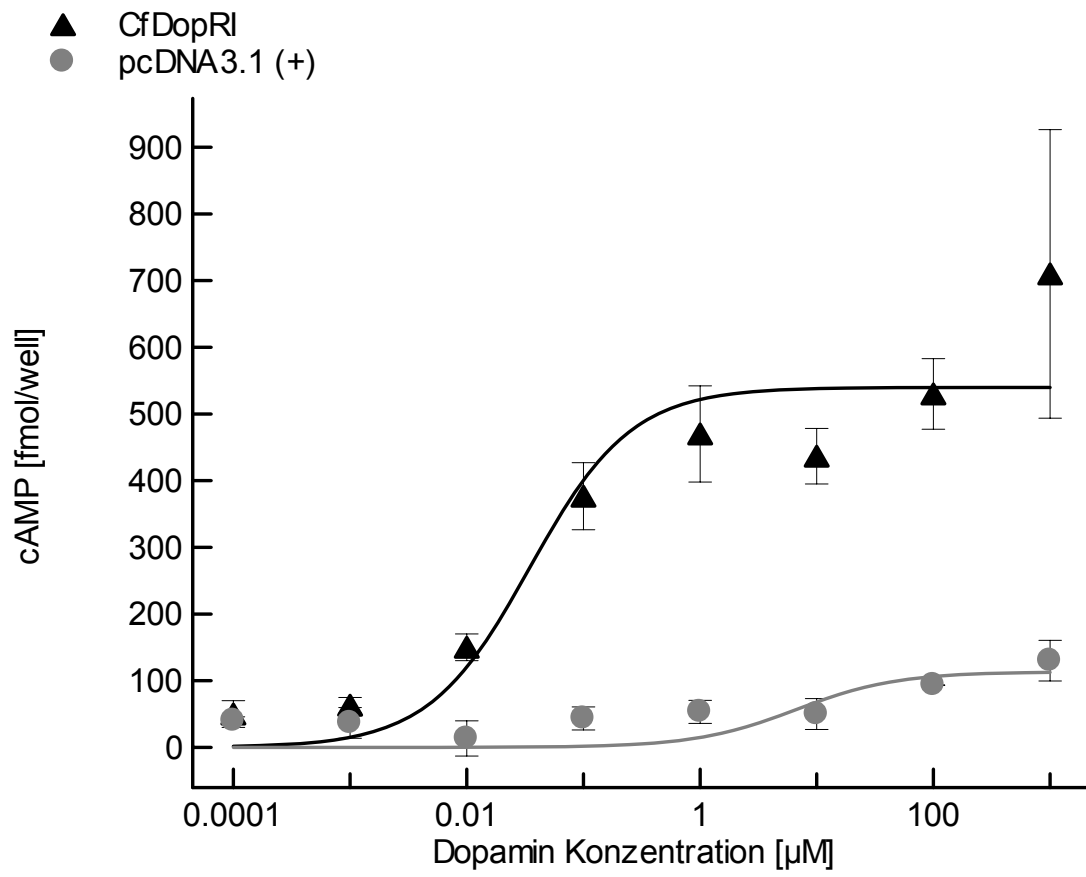


Abb. 3.22. Dosisabhängigkeitskurve des CfDopRI. Mit den Daten der funktionellen Expression des CfDopRI (Abb. 3.21) wurde eine Dosisabhängigkeitskurve erstellt.

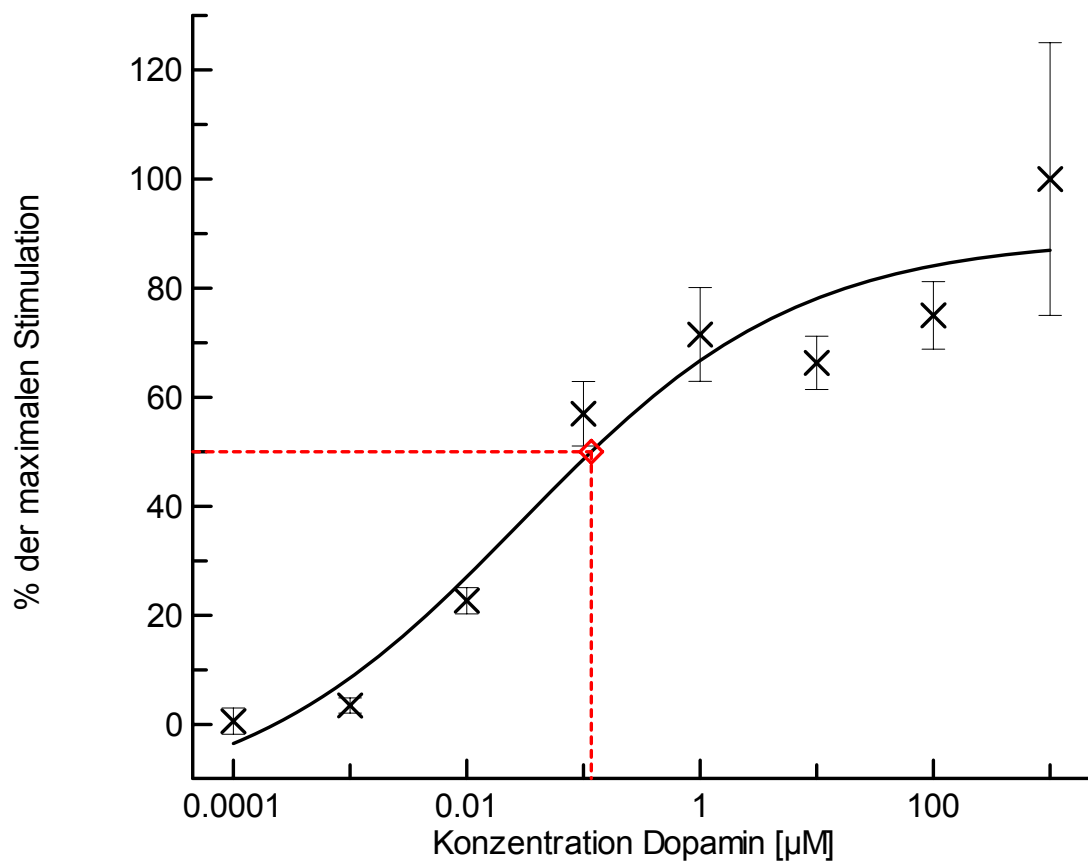


Abb. 3.23. Bestimmung des EC_{50} -Wertes des CfDopRI. Für die Berechnung wurden die cAMP-Konzentrationen der pcDNA3.1 (+)-transfizierten Zellen von den Konzentrationen der CfDopRII-transfizierten Zellen abgezogen. Der höchste Wert wurde gleich hundert Prozent gesetzt. Mit Hilfe der Software Excel Fit wurde der EC_{50} bestimmt. Er beträgt 0,12 μM Dopamin.

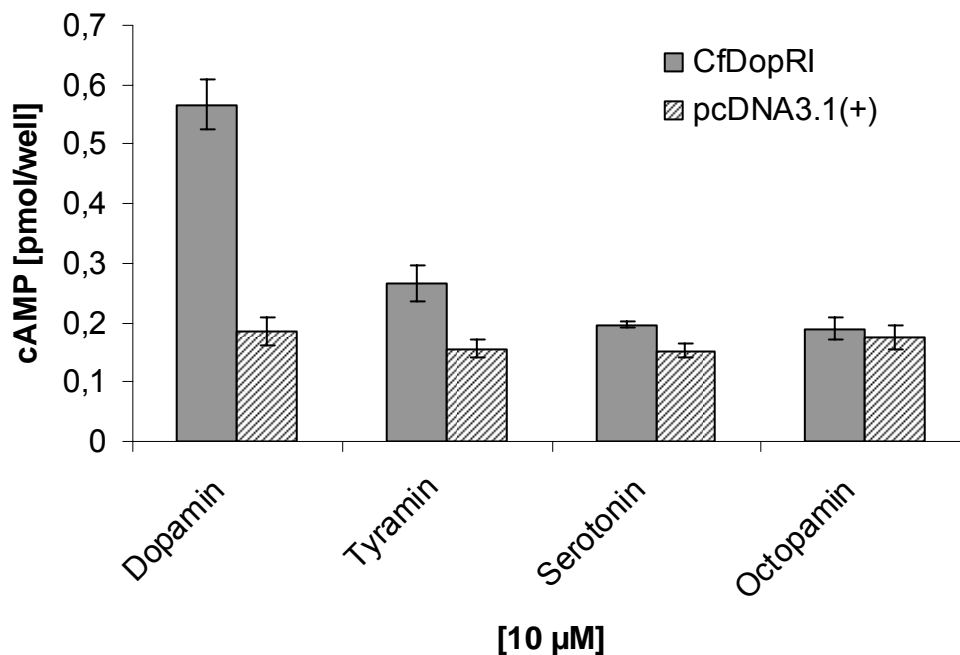


Abb. 3.24. Test der Effektivität verschiedener biogener Amine auf den CfDopRI. Dopamin verursacht eindeutig den höchsten Anstieg der intrazellulären cAMP-Konzentration in CfDopRI-transfizierten Zellen. Ein geringfügiger Effekt ist auch durch Inkubation mit Tyramin zu beobachten. Serotonin und Octopamin verursachen beide einen sehr geringen Anstieg des cAMP-Spiegels. Die Ergebnisse wurden in drei unabhängigen Experimenten bestätigt. Aufgrund unterschiedlicher Transfektionseffizienzen und der biologischen Variabilität der HEK293-Zellen wurden die Mittelwerte und die Standardabweichungen für ein repräsentatives Experiment berechnet.

Zusammenfassend konnten die drei Dopamin-Rezeptoren CfDopRI, II und III des Flohs identifiziert und klassifiziert werden. Die D1-ähnlichen Rezeptoren wurden funktionell exprimiert und charakterisiert. Der CfDopRII wurde sowohl in Oozyten von *X. laevis* als auch in HEK293-Zellen funktionell exprimiert. Nach Etablierung dieser Expressionssysteme konnte auch die Funktionalität des CfDopRI in HEK293-Zellen erfolgreich analysiert werden.

3.8 *In vivo* RNAi-Analyse der Dopamin-Rezeptoren von *D. melanogaster*

Bei der Verwendung von *in vitro* Analysen werden Gene eines Organismus isoliert und in geeigneten Expressions-Systemen wie HEK293-Zellen oder den Oozyten von *X. laevis* charakterisiert. Mit Hilfe solcher Experimente können die funktionellen Eigenschaften eines Proteins in einer artifiziellen Umgebung bestimmt werden. Durch *in vitro* Experimente kann hingegen nicht bestimmt werden, welche Bedeutung das Protein für den ursprünglichen Organismus hat. Eine solche Analyse kann jedoch durch *in vivo* Experimente durchgeführt werden (Böhm *et al.*, 2002). Allerdings ist im Floh derzeit keine *in vivo* Analyse von Genen möglich, da die genetische Transformation dieses Insekts bisher nicht etabliert ist. Aus diesem Grund wurde die *in vivo* Analyse im Modell-Organismus *D. melanogaster* durchgeführt. Bisher wurden keine *knock-out* Mutanten für die Dopamin-Rezeptoren I, II und III von *D. melanogaster* (DmDopRI, II und III) beschrieben. Neben der Mutagenese besteht die Möglichkeit durch RNA *interference* (RNAi, Kennerdell und Carthew, 2000; Gura, 2000) spezifisch Gene der Fliegen zu reprimieren (*knock-down*). Im Rahmen dieser Arbeit sollte die Bedeutung dieser Rezeptoren für die Fruchtfliege durch *knock-downs* bestimmt werden. Um gezielt die Expression von Genen mittels RNA *interference* zu reprimieren, wurden transgene Fliegen hergestellt. Diese besitzen ein genspezifisches *hairpin*-Konstrukt als Insertion im Genom. Durch die Expression dieses Konstrukts bildet sich doppelsträngige RNA, welche zur spezifischen Degradation der mRNA des entsprechenden endogenen Gens führt (Abb. 3.25). So kann die mRNA des endogenen Gens nicht oder nur in einem stark verminderten Maß zu einem funktionellen Protein translatiert werden. Durch die anzunehmende funktionelle Ähnlichkeit zwischen den Insekten *D. melanogaster* und *C. felis* sollte die Analyse Rückschlüsse auf die Bedeutung der Orthologen des Flohs (CfDopRI, II und III) ermöglichen.

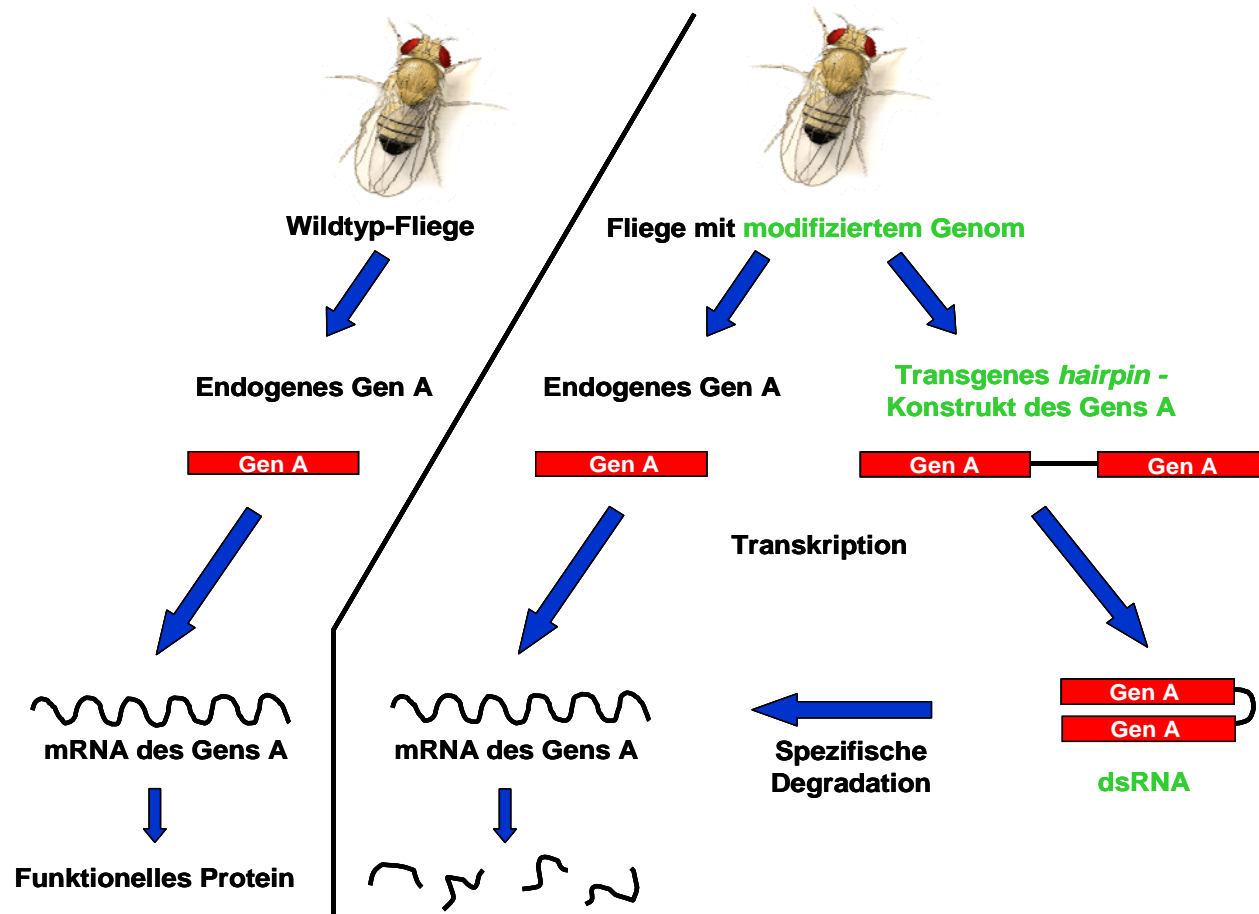


Abb. 3.25. Vergleich einer Wildtyp-Fliege mit einer transgenen RNAi-Fliege. Die Expression des transgenen *hairpin*-Konstrukts in den modifizierten Fliegen führt zur Bildung von dsRNA. Diese induziert die spezifische Degradation der mRNA des entsprechenden endogenen Gens und die mRNA kann nicht zu einem funktionellen Protein translatiert werden. Allerdings werden nicht alle mRNA-Moleküle des spezifischen Gens degradiert, weshalb es zu einem *knock-down* der Expression kommt.

3.8.1 Herstellung der transgenen RNAi-Fliegen

Für die Herstellung von *hairpin*-Konstrukten wurde der Vektor pUASTi (freundlicher Weise von Amin Ghabrial zur Verfügung gestellt, Stanford University; siehe Anhang) verwendet. Der pUASTi-Vektor ist ein Transformationsvektor zur Herstellung transgener Fliegenlinien. Zunächst wurden Fragmente der zu analysierenden Gene in einer PCR amplifiziert und in einer ersten Klonierung in den pUASTi-Vektor eingefügt. Im zweiten Schritt wurde das gleiche Fragment in umgekehrter Orientierung inkloniert, so dass eine *tail-to-tail*-Orientierung der Fragmente entstand (Abb. 3.26). Die gerichtete Klonierung der Fragmente erfolgte dabei mit Hilfe von spezifischen Restriktionsschnittstellen, die in den PCR-Amplifikationen den Fragmenten durch verlängerte *primer* angehängt wurden. Das Intron des pUASTi-Vektors fungierte als *spacer*, wodurch die Rekombinationswahrscheinlichkeit der *hairpin*-Konstrukte nach Transformation in Bakterien stark reduziert wurde.

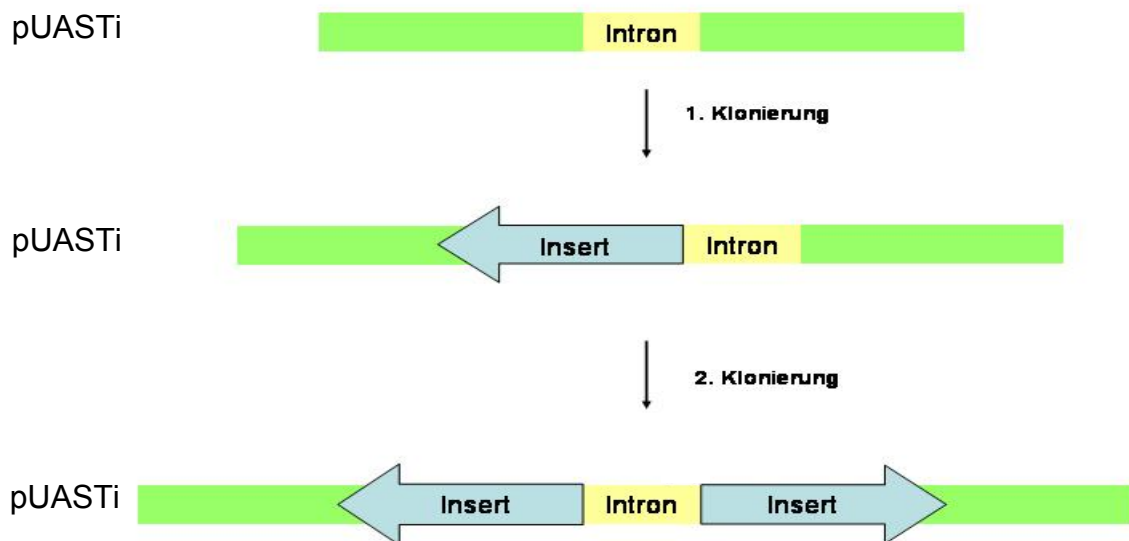


Abb. 3.26. Schema der *hairpin*-Klonierung im pUASTi-Vektor. Ein 500-800 bp langes Fragment des jeweiligen Zielgens wird in zwei Klonierungsschritten zunächst in 3'-5'- und anschließend in 5'-3'-Orientierung in den Vektor inseriert, so dass eine *tail-to-tail*-Orientierung der Fragmente vorliegt.

Die hier beschriebene Transformation von *D. melanogaster* beruht auf der Transposase-abhängigen Integration eines P-Elements. Mit Hilfe der Transposase können Sequenzen, die von *inverted repeat*-Sequenzen flankiert werden, an eine zufällige Position im Genom von *D. melanogaster* integriert

werden. Zur Transformation von *D. melanogaster* werden zwei Vektoren verwendet: Der P-Element Vektor enthält, flankiert von *inverted repeats*, die Sequenzen, die transformiert werden sollen (im Fall des pUASTi das *hairpin*-Konstrukt). Als Markergen wird das mini *white* Gen verwendet, das für rote Augen codiert. Der zweite Vektor (Helferplasmid) codiert für das Enzym Transposase, enthält aber keine *inverted repeats*, damit diese Sequenz nicht in das Genom eingebaut wird (Abb. 3.27).

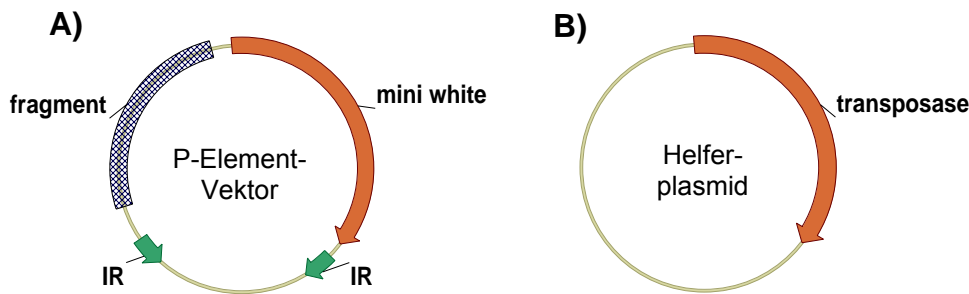


Abb. 3.27. Vektoren für die genetische Transformation von *D. melanogaster*. A) Im P-Element-Vektor wird das zu transformierende Fragment von *Inverted Repeats* (IR) flankiert. Außerdem enthält er ein Markergen (mini-*white*-Gen), das der Selektion von transgenen Fliegen über die Augenfarbe dient. Der P-Element-Vektor codiert nicht für Transposase. B) Das Helferplasmid enthält den codierenden Teil der Transposase, die die Integration des IR-flankierten Bereichs in das Genom von *D. melanogaster* ermöglicht.

Für die Herstellung transgener RNAi-Fliegen wurde ein Gemisch des pUASTi-Vektors mit den jeweiligen *hairpin*-Konstrukten und des Helfervektors in Transposase-defiziente Embryonen von *D. melanogaster* injiziert. Die Injektion erfolgte in einen Bereich, in dem sich die Polzellen (spätere Keimzellen) bilden. Zu diesem Zeitpunkt sind noch keine Zellgrenzen ausgebildet. In einem kurzen Zeitfenster wird das Transposase-Gen des Helfervektors exprimiert und vermittelt die genomische Integration des P-Elements in das Genom von Polzellen. Diese Insertion ist stabil, da die transformierten Fliegen nicht über Transposase verfügen. In Abb. 3.28 ist die genetische Transformation von *D. melanogaster* zur Etablierung transgener Fliegenlinien dargestellt. In der F₀-Generation nach der Injektion sind noch keine transgenen Fliegen identifizierbar, da das P-Element nur in den Keimzellen vorhanden ist. Erst die Kreuzung mit *white*⁻ Fliegen führt in der F₁-Generation zur Selektion von transgenen Fliegen anhand der roten Augen, welche durch die Transformation des Markergens *white* entstehen (zur Beschreibung der exakten Durchführung siehe 2.6.4).

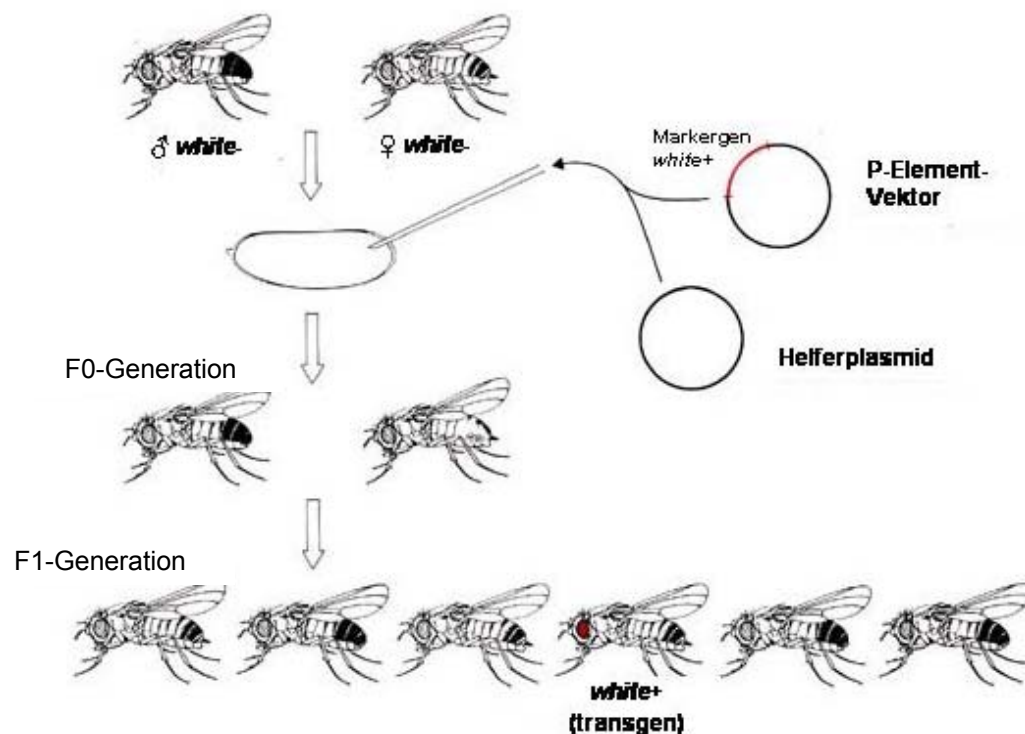


Abb. 3.28. Genetische Transformation von *D. melanogaster* zur Etablierung transgener Fliegenlinien. In der ersten Generation (F0) nach Injektion der beiden Plasmide in den Embryo sind transgene Fliegen noch nicht anhand der Augenfarbe erkennbar, erst in der F1-Generation ist das P-Element in allen Zellen vorhanden. Transgene Fliegen sind anhand der roten Augenfarbe zu erkennen und können mit *balancer*-Linien stabilisiert werden.

Die P-Element-Insertionen im Genom der transformierten Fliegenlinien wurden durch Kreuzungen mit *balancer*-Linien stabilisiert. *Balancer* sind spezielle Chromosomen, die Rekombinationsereignisse zwischen Schwesterchromosomen verhindern und damit die Insertion des P-Elements stabilisieren. Sie sind homozygot nicht lebensfähig. Durch dominante Marker ermöglichen *balancer*-Chromosomen in Kombination mit ausgewählten Kreuzungsexperimenten einen Rückschluss auf den Insertionsort des P-Elements (zur Beschreibung der exakten Durchführung siehe 2.6.4). Die auf diese Weise hergestellten transgenen Fliegenlinien sind in Tabelle 3.6 aufgelistet. Sie gibt an, auf welchem Chromosom die Insertion des P-Elements bei den einzelnen Linien stattgefunden hat.

Tab. 3.6. Hergestellte transgene Fliegenlinien.

Linie	Zielprotein	Insertionsort Chromosom	Eigenschaften	
			homozygot lebensfähig = +	heterozygot lebensfähig = -
1	<i>pfk</i>	3.	+	
2	<i>pfk</i>	2.	+	
3	<i>pfk</i>	3.	+	
4	<i>pfk</i>	3.	-	
5	<i>pfk</i>	3.	+	
6	<i>white</i>	2.	+	
7	<i>white</i>	3.	+	
8	<i>white</i>	2.	+	
9	<i>white</i>	3.	+	
10	<i>white</i>	3.	+	
11	<i>white</i>	3.	+	
12	<i>white</i>	2.	-	
13	DmDopRI	2.	+	
14	DmDopRI	2.	+	
15	DmDopRI	2.	+	
16	DmDopRI	2.	+	
17	DmDopRI	3.	+	
18	DmDopRI	3.	+	
19	DmDopRII	3.	+	
20	DmDopRII	3.	+	
21	DmDopRII	3.	+	
22	DmDopRII	2.	+	
23	DmDopRIII	3.	-	
24	DmDopRIII	3.	-	
25	DmDopRIII	2.	+	
26	DmDopRIII	3.	+	

Die Tabelle gibt an, auf welchem Chromosom das P-Element integriert wurde und ob die jeweilige Fliegenlinie homozygot lebensfähig ist.

3.8.2 Aktivierung der Expression des *hairpin*-Konstrukts durch das UAS-GAL4-System

Die in das Genom von *D. melanogaster* integrierten *hairpin*-Konstrukte stehen in Abhängigkeit von UAS-Elementen (*upstream activating sequences*). Das bedeutet, dass die Transkription des *downstream* liegenden *hairpin*-Konstrukts erst nach der Kreuzung der RNAi-Fliegen (Effektorlinie) mit den Fliegen einer Treiberlinie ablaufen kann. Treiberlinien besitzen ein Gen, welches für den Transkriptionsfaktor GAL4 codiert. Dieser bindet an die UAS-Elemente und induziert die Transkription der *downstream* liegenden Sequenzen (Brand und Perrimon, 1993). Zur Aktivierung wurden die RNAi-Fliegenlinien mit den Treiberlinien *actin*- und *tubulin*-GAL4 gekreuzt (Abb. 3.29).

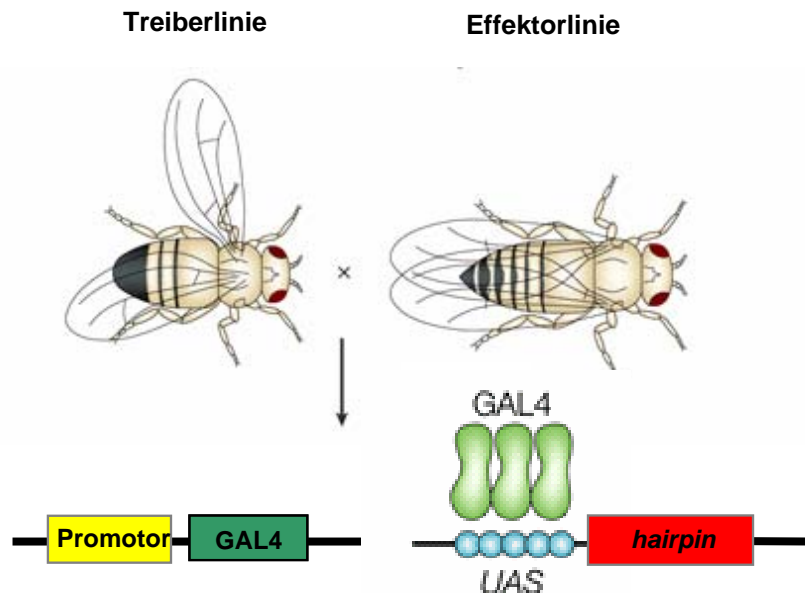


Abb. 3.29. Das UAS-GAL4-System. Das System basiert auf zwei separaten transgenen Fliegenlinien (Treiber- und Effektorlinie), die jeweils alleine inaktiv sind. In der Treiberlinie wird das GAL4-Protein in Anhängigkeit eines endogenen *enhancers* exprimiert. In der Effektorlinie steht ein Gen oder RNAi-Konstrukt in Abhängigkeit von fünf hintereinander angeordneter GAL4-Bindungsstellen, die als UAS-Elemente (*upstream activating sequences*) bezeichnet werden. Werden Treiber- und Effektorlinie miteinander verpaart, wird in der folgenden Generation der Transkriptionsaktivator GAL4 exprimiert. Dieser bindet an UAS-Sequenzen und aktiviert damit die Expression des UAS-abhängigen Gens (modifiziert nach: Brand und Perrimon, 1993).

Die Treiberlinien exprimieren den Transkriptionsfaktor GAL4 als Transgen in Abhängigkeit ubiquitärer Promotoren. Der *actin*-GAL4-Treiber ist auf dem zweiten Chromosom über den *balancer* CyO (*Curly of Oyster*) mit dem dominanten Marker Cy stabilisiert. Alle Fliegen dieser Linie haben daher nach oben gekrümmte Flügel. In der anderen unabhängigen Treiberlinie steht der GAL4-Transkriptionsfaktor in Abhängigkeit des Promotors des *tubulin*-Gens, welcher ebenfalls zu einer ubiquitären Expression führt. In dieser Linie ist das Transgen auf dem dritten Chromosom über TM3Sb (*third multiple #3*) mit dem dominanten Marker Sb (*stubble bristle*) stabilisiert. Die Fliegen dieser Linie haben kurze und dicke Rückenhaare. Bei der Verwendung dieser Treiberlinien ist zu beachten, dass sowohl der dominante Marker des *balancers* als auch das Transgen (Treiber) in homozygoter Form letal sind. Somit sind nur die Fliegen mit dem heterozygoten Treiber bzw. *balancer* lebensfähig.

Durch die Kreuzung der nur heterozygot lebensfähigen Treiberlinien mit homozygot lebensfähigen UAS-RNAi-Linien wurde an alle Nachkommen das RNAi-Konstrukt und an 50% der Nachkommen der dominante Marker der Treiberlinie weitergegeben. In diesen Fliegen war RNAi entsprechend nicht aktiv, sie dienten als interne Kontrolle. Die übrigen Nachkommen enthielten dagegen den Treiber *actin*- bzw. *tubulin*-GAL4, der die Expression des UAS-abhängigen *hairpin*-Konstrukts aktivieren und damit einen genspezifischen *knock-down* des zu untersuchenden Gens induzieren sollte. Auch im Fall von 100%-iger Letalität, induziert durch den RNAi-Effekt, würden aus der Kreuzung der heterozygoten Treiberlinie mit einer homozygoten Effektorlinie 50% aller Nachkommen überleben (Abb. 3.30). Diese wären durch den dominanten Marker der Treiberlinie gekennzeichnet, d.h. es könnte 100%-ige, durch RNAi vermittelte Letalität gezeigt werden, wenn alle überlebenden Nachkommen im adulten Stadium den dominanten Marker der für die Kreuzung eingesetzten Treiberlinie tragen würden. Die 50%, die den Treiber enthielten, würden entsprechend vor Erreichung des adulten Stadiums sterben. Ein ausgeglichenes Verhältnis von F1-Fliegen, die den dominanten Marker der Treiberlinie enthielten, zu solchen, die keinen Marker enthielten, würde dagegen keine RNAi vermittelte Letalität anzeigen.

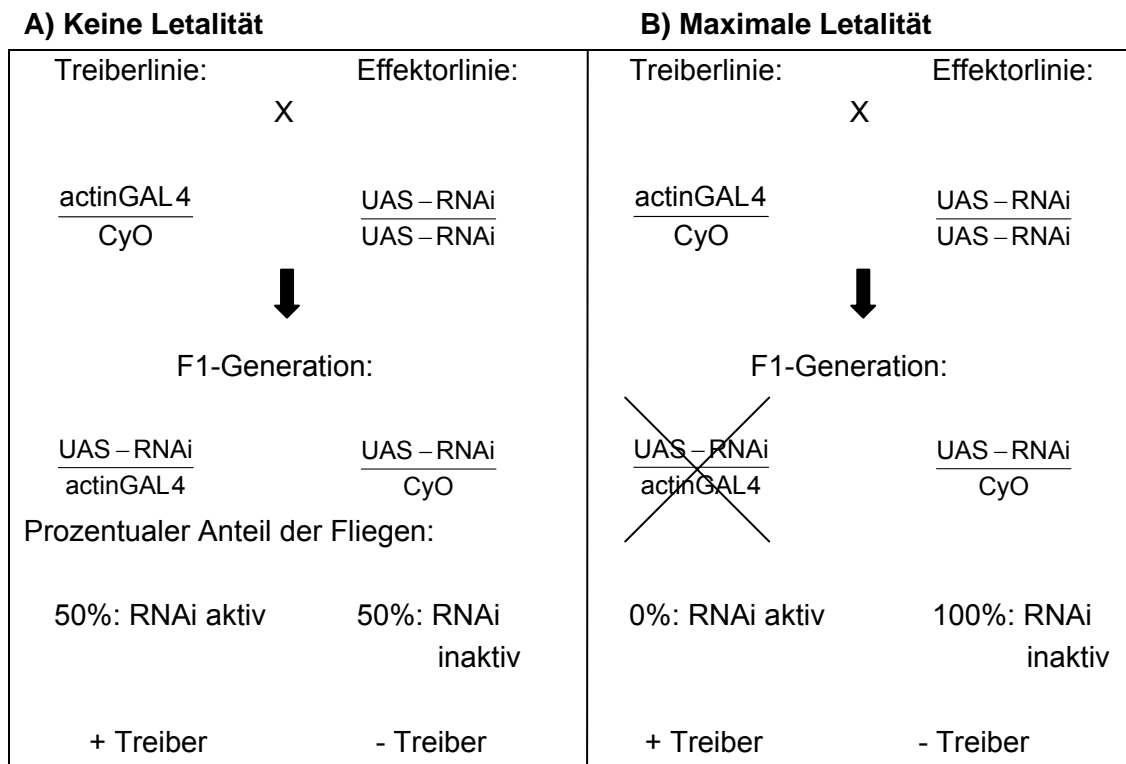


Abb. 3.30. Phänotypen, die aus Kreuzungen einer heterozygoten Treiberlinie *actin-GAL4* mit homozygoten UAS-RNAi-Linien resultieren. Kreuzt man die heterozygote Treiberlinie *actin-GAL4* mit einer homozygoten Effektorlinie, enthalten alle Nachkommen das RNAi-Konstrukt, während nur 50% den Treiber enthalten (RNAi ist in diesen Fliegen aktiv). Die übrigen Nachkommen enthalten den dominanten Marker der Treiberlinie Cy. In diesen Fliegen kann der RNAi-Mechanismus aufgrund der Abwesenheit des Treibers nicht aktiviert werden. Falls durch den RNAi-Mechanismus keine Letalität induziert werden kann, treten sowohl Nachkommen mit als auch ohne den dominanten Marker auf (Fall A). Im Fall von 100%-iger, durch RNAi induzierter Letalität treten nur Fliegen mit dem dominanten Marker der Treiberlinie auf (Fall B). Entsprechendes gilt für die Treiberlinie *tubulin-GAL4* mit dem dominanten Marker Sb.

Nach ca. 5 Tagen wurden die F0-Fliegen, die in die Kreuzung eingesetzt wurden, aus den Plastikröhrchen entfernt. Die geschlüpften F1-Fliegen wurden anschließend hinsichtlich ihres Phänotyps untersucht. Aus dem Verhältnis der Phänotypen der adulten F1-Fliegen konnte die durch RNAi vermittelte Letalität in % nach folgender Formel berechnet werden:

actin-GAL4 als Treiberlinie:

$$Letalität[\%] = \frac{\text{Anzahl}(Cy) - \text{Anzahl}(RNAi)}{\text{Anzahl}(Cy)} * 100$$

tubulin-GAL4 als Treiberlinie:

$$\text{Letalität[\%]} = \frac{\text{Anzahl(Sb)} - \text{Anzahl(RNAi)}}{\text{Anzahl(Sb)}} * 100$$

Bei der Transformation der Fliegen erfolgt die Insertion der Konstrukte zufällig. Deshalb kann nicht gesteuert werden, an welcher Stelle die *hairpin*-Konstrukte im Genom eingebaut werden und von welchen regulatorischen Elementen diese beeinflusst werden. Die in der Tabelle 3.7 aufgeführten Fliegenlinien wurden alle durch unabhängige Transformationsereignisse gewonnen, was bedeutet, dass der Insertionsort im Genom bei allen Linien unterschiedlich ist. Sämtliche homozygot lebensfähigen Linien wurden daher in unabhängigen Ansätzen mit den Treiberlinien *actin* GAL4 und *tubulin* GAL4 gekreuzt und die Letalität der Fliegen wurde quantifiziert. In Tabelle 3.8 sind die Ergebnisse der einzelnen Kreuzungen angegeben. Durch die Berechnung des Mittelwerts der Letalität aus verschiedenen Kreuzungen unabhängiger RNAi-Fliegenlinien können Effekte durch regulatorische Elemente minimiert werden.

Mit Hilfe von Kontrollen sollte bewiesen werden, dass die Bedeutung der Gene mit der Lebensfähigkeit der Fliegen korreliert. Dafür wurden zwei Kontrollgene ausgewählt, wobei das eine (*white*) nicht essentiell und das andere (*pfk*) essentiell war. Das Gen *pfk* hat durch seine Schlüsselstellung in der Glykolyse eine essentielle Bedeutung für die Fliegen (Voet und Voet, 1994; Currie und Sullivan, 1994).

Die Repression des *pfk*-Gens führte zur erwarteten Letalität von 100 % in allen Kreuzungen. Dagegen ist das *white*-Gen der Fruchtfliegen für die Einlagerung des roten Augenfarbstoffs in die Ocellen verantwortlich und ist somit an keiner essentiellen Reaktion beteiligt. Der *knock-down* dieses Gens führte zu dem charakteristischen *white-eye*-Phänotyp mit weißen Augen der Fliegen (Daten nicht gezeigt). Es war keine signifikante Letalität dieser Fliegen zu beobachten. Mit diesen Kontrollen konnte gezeigt werden, dass der *knock-down* eines essentiellen Gens in RNAi-Fliegen zur Letalität führt. Die Repression nicht essentieller Gene kann zwar zu einem sichtbaren Phänotyp führen, aber es wird keine Letalität verursacht.

Tab.3.7. Letalität der RNAi-Linien nach der Kreuzung mit den Treiberlinien *actin*-GAL4 und *tubulin*-GAL4.

Zielprotein	Treiberlinie	Letalität [%]					
		A	B	C	D	E	F
DmDopRI	<i>actin</i> -GAL4	100	0	100	77	62	58
	<i>tubulin</i> -GAL4	100	0	49	69	72	68
DmDopRII	<i>actin</i> -GAL4	98	3	60	48	-	-
	<i>tubulin</i> -GAL4	74	23	70	34	-	-
DmDopRIII	<i>actin</i> -GAL4	0	0	0	0	-	-
	<i>tubulin</i> -GAL4	42	0	19	0	-	-
Phosphofrukto-kinase	<i>actin</i> -GAL4	100	100	100	100	100	100
	<i>tubulin</i> -GAL4	100	100	100	100	100	100
White	<i>actin</i> -GAL4	0	0	4	0	0	0
	<i>tubulin</i> -GAL4	0	18	0	0	0	0

Tab. 3.8. Durchschnittliche Letalität der *knock-down*-Ansätze für die Gene DmDopRI, II und III sowie der Kontrollgene.

	Treiberlinie	
	<i>actin</i> -GAL4 Letalität [%]	<i>tubulin</i> -GAL4 Letalität [%]
DmDopRI	66	59
DmDopRII	52	50
DmDopRIII	0	30
Phosphofruktokinase	100	100
White	1	3

Der *knock-down* der Rezeptoren DmDopRI, DmDopRII bzw. DmDopRIII führte zu Letalitäts-Werten, die zwischen den Ergebnissen der beiden Kontrollgene *pfk* und *white* lagen. Die Ergebnisse der unterschiedlichen Kreuzungen mit den beiden Treiberlinien *actin*-GAL4 und *tubulin*-GAL4 waren vergleichbar. In Tabelle 3.8 sind die Durchschnittswerte aufgeführt. Daraus ergibt sich, dass keiner der drei Dopamin-Rezeptoren eine vergleichbar essentielle Funktion besitzt wie die Phosphofruktokinase. Allerdings ist die Funktion dieser GPCRs nicht im gleichen Maße verzichtbar wie im Fall des *white*-Gens, da vor allem für die Dopamin-Rezeptoren I und II eine deutliche Reduktion der Lebensfähigkeit der Fliegen zu beobachten war. Der höchste Effekt war für den *knock-down* des DmDopRI zu beobachten, gefolgt vom DmDopRII. Die geringste Letalität trat bei der Repression des DmDopRIII auf. Mit Hilfe des RNAi-Ansatzes konnte also für jeden einzelnen Dopamin-Rezeptor von *D. melanogaster* gezeigt werden, dass der *knock-down* zu einer reduzierten Lebensfähigkeit der Fliegen führt. Der Schluss liegt nahe, dass die orthologen Rezeptoren CfDopRI, II und III eine vergleichbare Bedeutung für den Floh besitzen.

3.9 Homologie-Modellierung und rationales Wirkstoff-Design

Nachdem die GPCRs CfDopRI und CfDopRII funktionell charakterisiert worden waren, sollte getestet werden, ob mit Hilfe chemoinformatischer Methoden neue antagonistische Substanzen gefunden werden können. Hierfür wurde der CfDopRI ausgewählt, da dieser in transfizierten HEK293-Zellen bei Aktivierung zu höheren cAMP-Konzentrationen führte als der CfDopRII und somit besser für den Test von Antagonisten geeignet war. In der Abteilung BioChemInformatics haben Dr. Anette Klinger und Dr. Jörg Cramer in Kooperation mit Prof. Dr. Didier Rognan (CNRS, Illkirch) ein 3D-Modell des CfDopRI erstellt und anschließend sämtliche chemoinformatische Arbeiten durchgeführt. Das Modell wurde mit Hilfe des Programms GPCRmod (Bissantz *et al.*, 2004) berechnet. Bisher konnte nur eine GPCR-Struktur und zwar von Rinder-Rhodopsin (Palczewski *et al.*, 2000) mittels Röntgenstrukturanalyse aufgeklärt werden. Da allerdings Dopamin-Rezeptoren wie das Rinder-Rhodopsin zur ersten Klasse der Rhodopsin-ähnlichen Rezeptoren zählen, ist eine ausreichende Konservierung gegeben. Basierend auf dem Wissen über die Struktur des Rinder-Rhodopsins wurde ein dreidimensionales Modell des CfDopRI angefertigt. Die extra- und intrazellulären Schleifen wurden dabei nicht berücksichtigt, weil diese Bereiche gering konserviert sind. So wurde ein Modell der räumlichen Ausrichtung der sieben Transmembran-Helices erstellt. Die Abbildung 3.31 zeigt das Modell der Transmembran-Helices des CfDopRI sowie die Aminosäuren, welche an der Interaktion mit Dopamin beteiligt sind. Der natürliche Ligand Dopamin ist ebenfalls dargestellt. Abbildung 3.32 zeigt das Modell in Aufsicht ohne den Liganden.

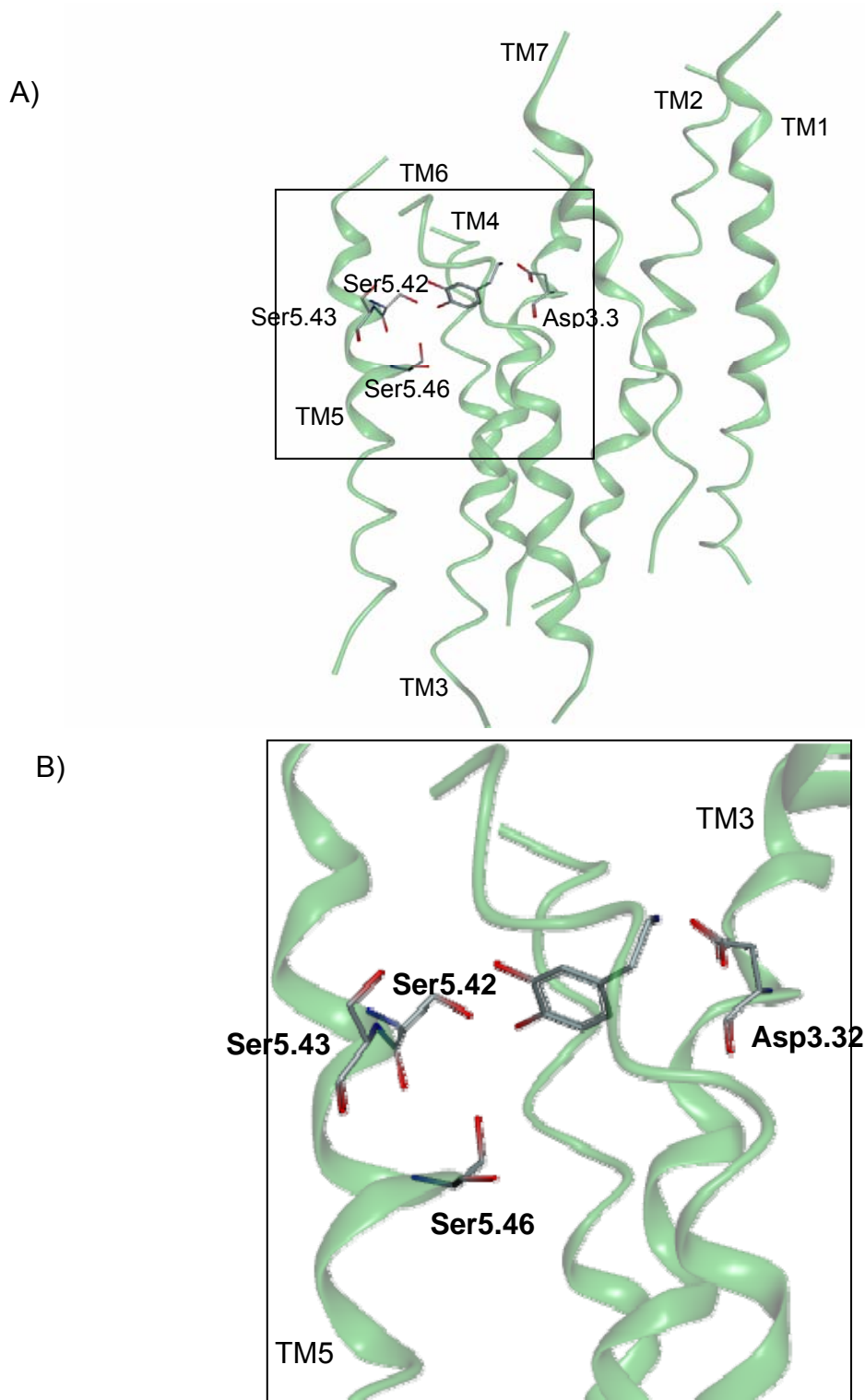


Abb. 3.31. Homologie-Modell der Transmembran-Helices des CfDopRI mit eingepasstem Dopamin (Seitenansicht). (A) Die räumliche Ausrichtung der Serin-Reste (Ser5.42, Ser5.43 und Ser5.46) und des Aspartat-Restes (Asp3.32) im Verhältnis zum natürlichen Liganden Dopamin ist gezeigt. (B) Ausschnittsvergrößerung des Interaktionsbereichs zwischen Protein und Ligand. Die Nummerierung der Aminosäuren erfolgt entsprechend der Zugehörigkeit zu einer Transmembran-Helix, z.B. Ser5.42 gehört zur TM5 und ist der 42. Rest dieser Helix.

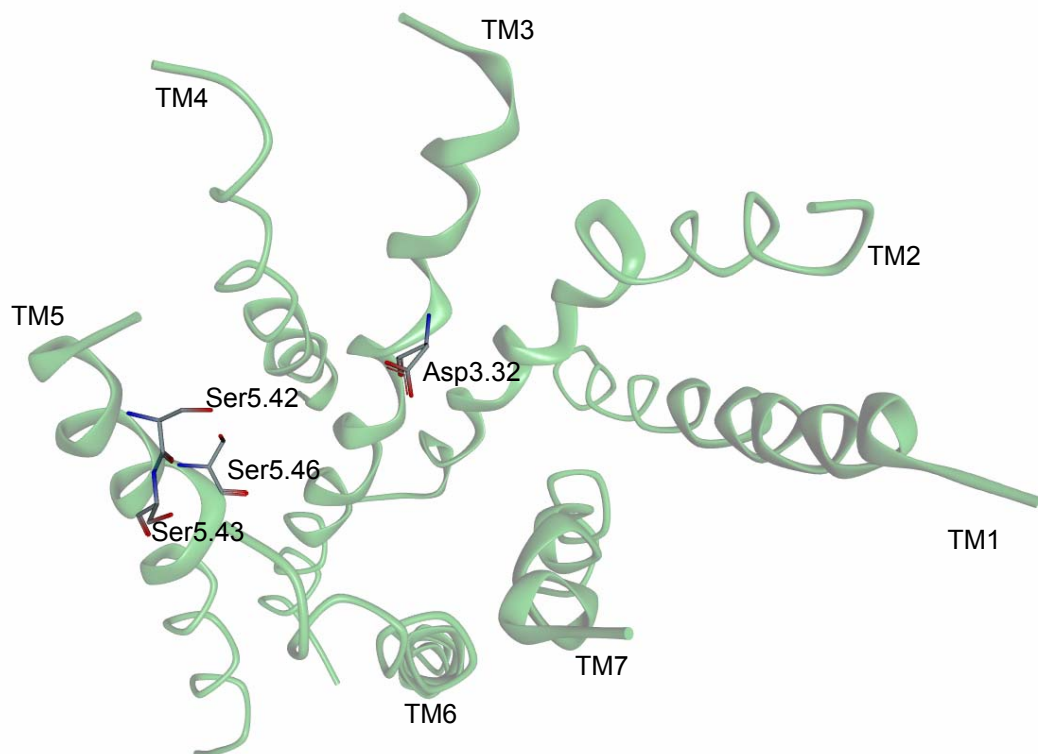


Abb. 3.32. Homologie-Modell der dreidimensionalen Ausrichtung der Transmembran-Helices des CfDopRI (Aufsicht). Die räumliche Ausrichtung der Serin-Reste (Ser5.42, Ser5.43 und Ser5.46) und des Aspartat-Restes (Asp3.32) sind dargestellt, da diese mit dem natürlichen Liganden Dopamin interagieren.

Für humane Dopamin-Rezeptoren sind aufgrund der Parkinson-Erkrankung zahlreiche Agonisten aber auch Antagonisten beschrieben (Kassack *et al.*, 2002). Die antagonistische Substanz SCH23390 wirkt spezifisch auf D1-ähnliche Dopamin-Rezeptoren (Feng *et al.*, 1996). Es sollte überprüft werden, ob diese Substanz auch antagonistisch auf den CfDopRI wirkt. Deshalb wurden wie unter 3.7 bereits beschrieben HEK293-Zellen transient mit dem CfDopRI transfiziert und mit Dopamin Lösungen verschiedener Konzentrationen behandelt. Der Anstieg des intrazellulären cAMP-Spiegels wurde mit Hilfe des cAMP Biotrak Enzym Immunoassay (Amersham Biosciences, Buckinghamshire, UK) quantifiziert. Zur Untersuchung der Wirkung von SCH23390 wurden im Vergleich die CfDopRI-transfizierten Zellen zunächst mit einer 10 μM Lösung des Antagonisten inkubiert und anschließend mit Dopamin Lösungen verschiedener Konzentrationen. Der Vergleich zeigte, dass SCH23390 den Anstieg der cAMP-Konzentration signifikant reduzierte (Abb. 3.33). Der Wirkstoff SCH23390 wurde in das Modell des CfDopRI eingepasst, um die Interaktionen zwischen dem Antagonisten und dem Rezeptor zu überprüfen (Abb. 3.34).

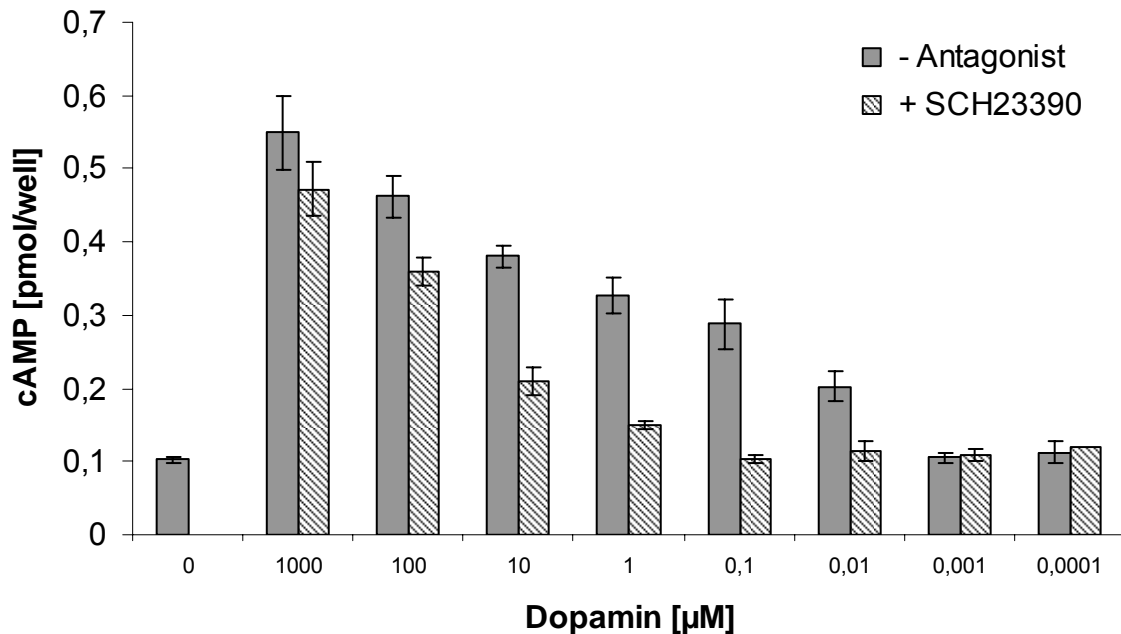


Abb. 3.33. Funktionelle Expression des CfDopRI und Überprüfung der antagonistischen Wirkung der Substanz SCH23390. HEK293-Zellen wurden transient mit CfDopRI transfiziert und mit verschiedenen konzentrierten Dopamin-Lösungen inkubiert. Gleichzeitig wurden ebenfalls CfDopRI-exprimierende Zellen zunächst mit einer 10 μM Lösung des Antagonisten SCH23390 und anschließend mit den Dopamin-Lösungen verschiedenen Konzentrationen inkubiert. Man kann deutlich die Reduktion der Antwort durch den Antagonisten erkennen. Die Ergebnisse wurden in drei unabhängigen Experimenten bestätigt. Aufgrund unterschiedlicher Transfektionseffizienzen und der biologischen Variabilität der HEK293-Zellen wurden die Mittelwerte und die Standardabweichungen für ein repräsentatives Experiment berechnet.

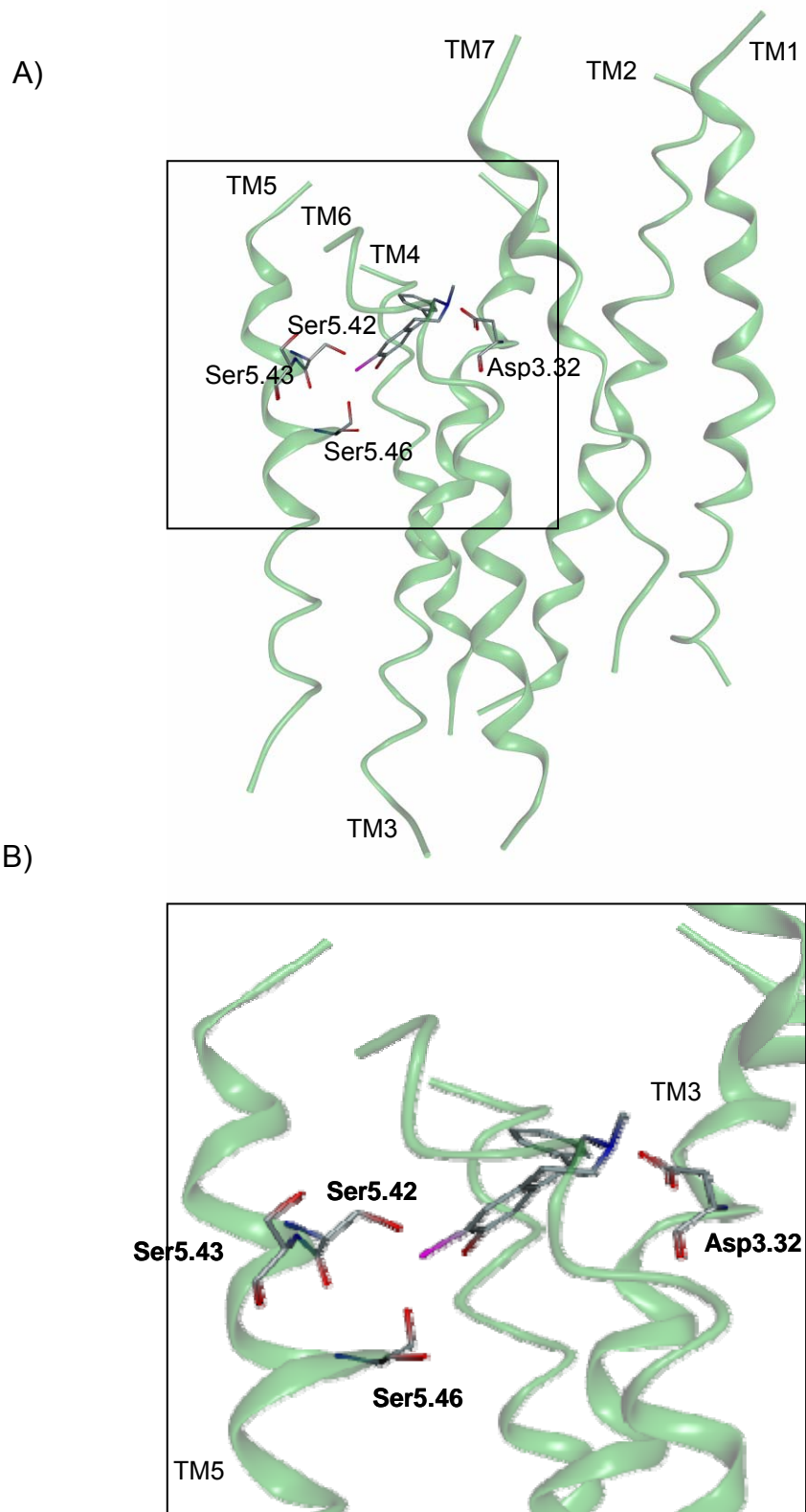


Abb. 3.34. Dreidimensionale Ausrichtung der Transmembran-Helices des CfDopRI mit eingepasstem SCH23390 (Seitenansicht). (A) Die räumliche Ausrichtung der Serin-Reste (Ser5.42, Ser5.43 und Ser5.46) und des Aspartat-Restes (Asp3.32) im Verhältnis zum eingepassten Antagonisten SCH23390 ist gezeigt. (B) Ausschnittsvergrößerung des Interaktionsbereichs zwischen Protein und dem Antagonisten SCH23390.

Nach der Erstellung des Modells des CfDopRI wurde ein Pharmakophor-Modell des Antagonisten SCH23390 erstellt (Abb. 3.35). Ein Pharmakophor-Modell zeigt die räumliche Ausrichtung von chemischen Eigenschaften von funktionellen Gruppen (Böhm *et al.*, 2002). In einem solchen Modell wird der Einflussbereich von den funktionellen Gruppen räumlich als Sphäre dargestellt. Die Verwendung unterschiedlicher Farben codiert für verschiedene chemische Eigenschaften. Rot steht für positiv geladene oder ionisierbare Gruppen, Magenta für einen Wasserstoffbrücken-Donor, Cyan für hydrophobe Gruppen und Schwarz für Bereiche, in denen keine Atome liegen sollen (*excluded volumes*). Mit Hilfe eines solchen Modells können virtuelle Substanzdatenbanken durchsucht werden. Da die Suche mit dem gezeigten Pharmakophor-Modell des Antagonisten SCH23390 zu stringent gewesen wäre, wurde ein weiteres Modell erstellt. Dieses beinhaltet nur noch die wichtigsten chemischen Substrukturen und wird als *shape* bezeichnet (Abb. 3.36). Mit diesem Modell wurde eine Substanzdatenbank mit 4,2 Millionen Einträgen durchsucht. Etwa 7.800 Substanzen ergaben Hits und wurden mit der Docking-Software GOLD Version 3.0 (Cambridge Crystallographic Data Centre, CCDC) in das Protein Modell des CfDopRI eingepasst. Weiterhin wurden diese Hits anhand folgender Kriterien selektiert: Die Interaktionen mit dem Aspartat-Rest 3.32 und optional mit den Serin-Resten Ser 5.42 bzw. 5.43 und einem Molekulargewicht von höchstens 400 g/mol. Die 18 Substanzen mit den besten Docking-Lösungen wurden ausgewählt, um ihre antagonistische Wirkung auf den CfDopRI zu testen. CfDopRI exprimierende HEK293 Zellen wurden zunächst mit einer 20 μM Lösung der jeweiligen Substanz inkubiert und anschließend mit einer 10 μM Dopamin-Lösung behandelt. Im Vergleich wurde der Anstieg des intrazellulären cAMP-Spiegels durch Stimulation mit der 10 μM Dopamin-Lösung gemessen. Eine der 18 Substanzen reduzierte die Antwort um 30 %. Das bedeutet, dass bereits mit diesem Ansatz eine Substanz mit antagonistischer Wirkung auf CfDopRI identifiziert werden konnte. Abbildung 3.37 zeigt die neue Substanz mit den interagierenden Aminosäuren des CfDopRI.

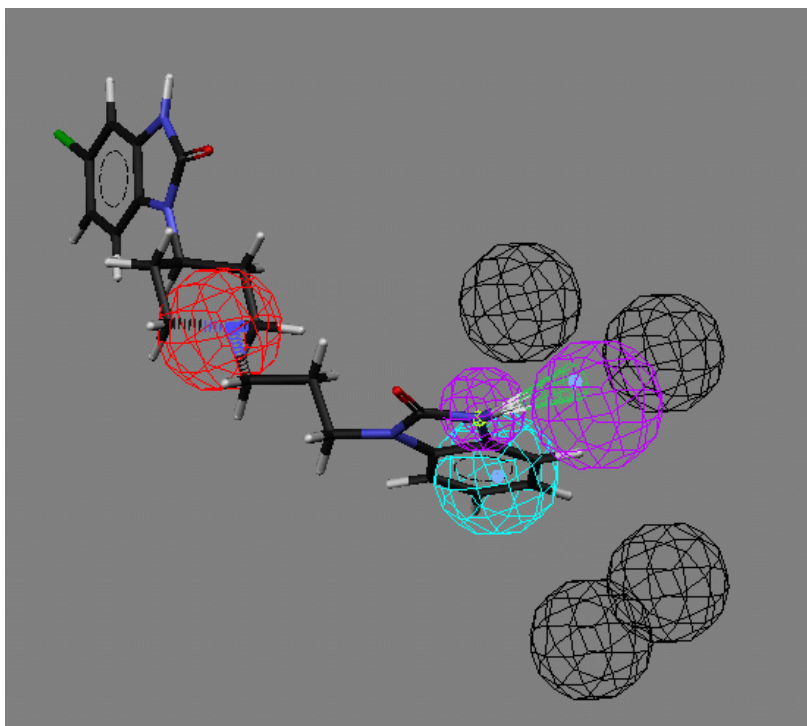


Abb. 3.35. Pharmakophor-Modell des Antagonisten SCH23390. Der Einflussbereich der chemischen Eigenschaften wird als Sphäre dargestellt. Die unterschiedlichen Farben codieren für verschiedene chemisch Eigenschaften. Rot steht für positiv geladene oder ionisierbare Gruppen, Magenta für einen Wasserstoffbrücken-Donor, Cyan für hydrophobe Gruppen und Schwarz für Bereiche in denen keine Atome liegen sollen (*excluded volumes*).

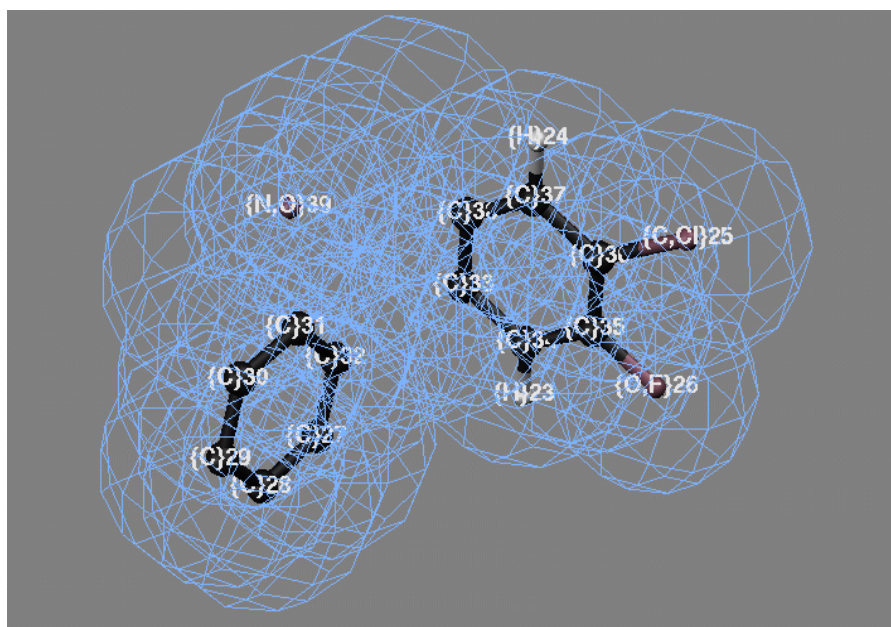


Abb. 3.36. Modell von Substrukturen basierend auf dem Antagonisten SCH23390. Mit diesem Modell wurde die Substanzdatenbank durchsucht.

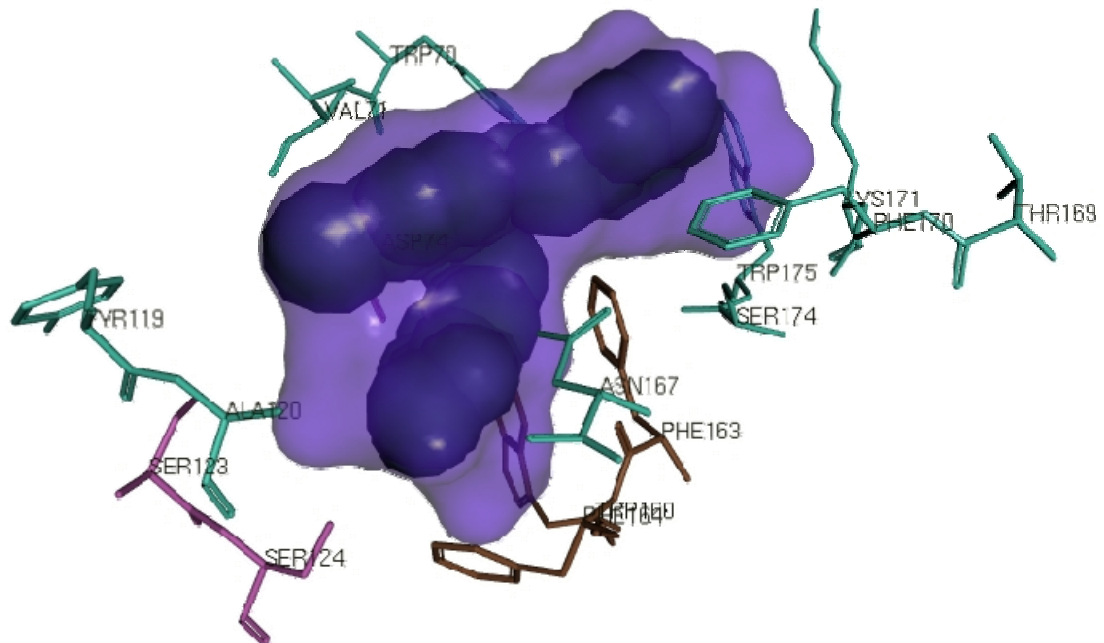


Abb. 3.37. Antagonist mit interagierenden Aminosäuren des CfDopRI. Gezeigt ist der neue Antagonist des CfDopRI, welcher über ligandenbasiertes *Screening* einer Substanzbibliothek identifiziert werden konnte.

4. Diskussion

4.1 Konservierung orthologer GPCRs der Klasse *Insecta*

Für *D. melanogaster* und *A. gambiae* sind etwa 300 GPCRs beschrieben (Hill *et al.* 2002, Brody und Cravchik, 2000, FlyBase). Darüber hinaus gibt es zahlreiche weitere Sequenzinformationen von anderen Insekten (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank>). Mit Hilfe der Software Genlight (Beckstette *et al.*, 2004) wurden diese Sequenzen miteinander verglichen und hinsichtlich ihrer Konservierung beurteilt. Für die Auswertung wurden bioinformatische Parameter, z.B. *E-value* und Identität, herangezogen. Es wurden Kriterien entwickelt, um signifikante Hits von unspezifischen Treffern abzugrenzen. Hierfür wurden die von Genlight erstellten Hitlisten ausgewertet und es wurde eine Grenze zwischen spezifischen und unspezifischen Hits gesetzt. Anschließend wurden die Grenzen und dazugehörigen bioinformatischen Parameter zwischen den einzelnen Hitlisten verglichen, wobei anwendungsorientierte *cut-off*-Kriterien definiert wurden. Zusätzlich wurden die Länge des *alignments* zwischen Anfrage- und Hitsequenz sowie die Anzahl der Hits für ein Gen in den verschiedenen Sequenzdatensätzen berücksichtigt. Als Ergebnis der bioinformatischen Analyse konnten die in Tabelle 3.2 (siehe Kapitel 3.1) aufgeführten Gene als hochkonservierte Sequenzen identifiziert werden. Selbstverständlich ist das Ergebnis dieser Analyse abhängig von den verfügbaren Sequenzinformationen. Möglicherweise würde eine Analyse mit neuen genomischen Sequenzinformationen, wie sie z.B. mittlerweile von *B. mori* oder *A. gambiae* erhältlich sind (<http://www.genomesonline.org>), zu anderen hochkonservierten GPCRs führen.

Diese vorliegende Analyse ergab, dass die gesamte Familie der Dopamin-Rezeptoren zu den GPCRs mit der höchsten Konservierung gehört. Neben den Dopamin-Rezeptoren von *D. melanogaster* (Gotzes *et al.*, 1994; Sugamori *et al.*, 1995; Feng *et al.*, 1996; Han *et al.*, 1996; Hearn *et al.*, 2002) und *A. gambiae* (Hill *et al.*, 2002) waren auch drei Dopamin-Rezeptoren der Honigbiene *A. mellifera* beschrieben (Blenau *et al.*, 1998; Mustard *et al.*, 2003; Humphries *et al.*, 2003; Beggs *et al.*, 2005). Zur weiterführenden Untersuchung wurden die Dopamin-Rezeptoren dieser drei Insekten über die gesamte Länge in *alignments* miteinander verglichen und die Identitäten wurden mit der bioinformatischen Software Vector NTI Advance version 9.0 (Invitrogen, Carlsbad, USA) berechnet. Diese Analyse bestätigte die hohe

Konservierung der Dopamin-Rezeptoren und somit auch die Genlight Analyse. Das folgende Beispiel verdeutlicht den signifikanten Unterschied zwischen hoch und niedrig konservierten GPCRs: Die Histamin-Rezeptoren der Insekten *A. gambiae* (Hill *et al.*, 2002) und *D. melanogaster* (Genbank Accession Number: AAF56578) besitzen lediglich eine Identität von 33%. Diese beiden Rezeptoren sind in der bioinformatischen Analyse als besonders niedrig konservierte orthologe GPCRs aufgefallen. Im Vergleich dazu besitzen Dopamin-Rezeptoren der drei Insekten im Durchschnitt eine Identität von 54%. Die Orthologen dieser hoch konservierten Dopamin-Rezeptoren sollten anschließend für den Floh *C. felis* identifiziert werden.

4.2 Identifikation orthologer Dopamin-Rezeptoren des Flohs

Für die Identifikation der orthologen Dopamin-Rezeptoren des Flohs wurden degenerierte *primer* konstruiert. Die Verwendung dieser *primer* in einfachen PCRs führte zu keinem Ergebnis. Es traten nur unspezifische Produkte auf, welche vermutlich auf falsche *primer*-Paarungen zurückzuführen sind. Erst die Durchführung von *nested* PCRs (Mülhardt, 2003) mit den degenerierten *primern* führte zur erfolgreichen Identifikation von Fragmenten neuer Dopamin-Rezeptoren des Flohs. Mittels anschließenden RACE-PCRs (Mülhardt, 2003) wurden die Enden der neuen Gene kloniert. So konnten alle drei orthologen Dopamin-Rezeptoren des Flohs identifiziert und kloniert werden. Obwohl für *D. melanogaster*, *A. gambiae* und *A. mellifera* nur drei Dopamin-Rezeptoren beschrieben sind (Gotzes *et al.*, 1994; Sugamori *et al.*, 1995; Feng *et al.*, 1996; Han *et al.*, 1996; Hearn *et al.*, 2002; Hill *et al.*, 2002; Blenau *et al.*, 1998; Mustard *et al.*, 2003; Humphries *et al.*, 2003; Beggs *et al.*, 2005), kann nicht ausgeschlossen werden, dass der Floh möglicherweise noch weitere GPCRs besitzt, die durch den Liganden Dopamin aktiviert werden. Erst durch eine Sequenzierung und vollständige Annotierung des Genoms von *C. felis* sowie einer funktionellen Charakterisierung könnte die Frage beantwortet werden, ob die Familie der Dopamin-Rezeptoren im Floh mit den Vertretern CfDopRI, II und III vollständig ist. Die Rezeptoren CfDopRI, II und III wurden auf Transmembran-Helices untersucht. In allen drei Rezeptoren konnten die GPCR-typischen sieben Transmembran-Helices mit Hilfe des TMHMM-Servers (Krogh *et al.*, 2001) vorhergesagt werden. Anschließend wurden die neuen Dopamin-Rezeptoren mit den Orthologen von *D. melanogaster*, *A. gambiae* und *A. mellifera* in *alignments* verglichen. Die Bereiche der

Transmembran-Helices sind in allen Orthologen wie erwartet hoch konserviert. Vermutlich kann diese große Übereinstimmung der membrandurchspannenden Helices durch die essentielle Funktion dieser Bereiche für die Aktivierung der GPCRs und die Übertragung der extrazellulären Signale in die Zelle begründet werden (Broeck, 2001; Strader *et al.*, 1995; Mustard *et al.*, 2005; Wess, 1997). Die intra- und extrazellulären Schleifen und die Enden der Rezeptoren sind hingegen geringer konserviert. Die Funktion dieser Sequenzabschnitte ist nicht im gleichen Maße konserviert wie bei den Transmembran-Helices. Zum Beispiel kann der N-Terminus an der Interaktion mit dem Liganden maßgeblich beteiligt sein. In anderen Fällen ist der N-Terminus überhaupt nicht für die Liganden-Bindung verantwortlich (Bissantz *et al.*, 2004). Weiterführend ist für die dritte intrazelluläre Schleife und den C-Terminus beschrieben, dass diese an der Kopplung des G-Proteins beteiligt sind (Gether, 2000; Hermans 2003). Eine mögliche Erklärung für die geringe Konservierung dieser Bereiche ist die Interaktion mit den G-Proteinen der verschiedenen Insekten, die eine besondere Anpassung erfordern könnte.

Für Dopamin-Rezeptoren sind funktionell wichtige und hoch konservierte Aminosäuren beschrieben. Diese konnten auch in den Rezeptoren CfDopRI, II und III identifiziert werden. Der Nachweis dieser Aminosäuren war von großer Bedeutung, da dies die Einordnung der Rezeptoren als Dopamin-Rezeptoren bestätigte. Diese im Abschnitt 3.2 in den Abbildungen 3.3, 3.4 und 3.6 markierten Aminosäuren sind z.B. an der Interaktion mit dem Liganden Dopamin und der Aktivierung des Rezeptors beteiligt. Sie sind über alle vier betrachteten Insekten hinweg konserviert (Strader *et al.*, 1995; Mustard *et al.*, 2005).

Nachdem die Dopamin-Rezeptoren des Flohs identifiziert waren, mussten die neuen Sequenzen klassifiziert werden. Hierfür wurden die Identitäten zwischen allen Dopamin-Rezeptoren der Insekten *D. melanogaster*, *A. gambiae* und *A. mellifera* und den neuen Sequenzen berechnet. Der Grad der Identitäten zeigte deutliche Unterschiede zwischen orthologen und nicht orthologen Rezeptoren. Außerdem offenbart der Vergleich der Dopamin-Rezeptoren CfDopRI, II und III untereinander (siehe Tab. 3.4), dass diese Rezeptoren sehr gering konserviert sind. Das bedeutet, dass z.B. die Identität zwischen CfDopRI und CfDopRIII sehr viel geringer ist (17%) als zwischen CfDopRI und den entsprechenden Orthologen (AmDopRI (Blenau *et al.*, 1998; Mustard *et al.*, 2003): 60%; DmDopRI (Gotzes *et al.*, 1994; Sugamori *et al.*, 1995): 49%; AgDopRI (Hill *et al.*, 2002): 62%). Zusammenfassend konnten die neuen Rezeptoren des Flohs bereits eindeutig über die beschriebenen Sequenzvergleiche eingeordnet werden.

Eine phylogenetische Analyse bestätigte die Klassifizierung des CfDopRI, II und III. Die Dopamin-Rezeptoren des Flohs wurden alle mit ihren jeweiligen Orthologen der anderen Insekten gruppiert. Dagegen besitzt der Histamin-Rezeptor von *D. melanogaster* (FlyBase: CG12290; Genbank Accession Number: AAF56578), welcher als Kontrollgen in die Analyse eingefügt wurde, wie erwartet, einen sehr großen Abstand zu den Dopamin-Rezeptoren. Es ist beschrieben, dass sich Dopamin-Rezeptoren von Insekten wie auch die humanen Dopamin-Rezeptoren in D1- und D2-ähnliche Rezeptoren einteilen lassen (Mustard *et al.*, 2005; Missale *et al.*, 1998). Im phylogenetischen Stammbaum (Abb. 3.7) ist zu erkennen, dass die Dopamin-Rezeptoren III der Insekten mit den D2-ähnlichen humanen Rezeptoren gruppiert werden. Die D1-ähnlichen humanen Rezeptoren (HsDopR1, HsDopR2) sind näher mit den Dopamin-Rezeptoren I und II der Insekten verwandt. Diese Gruppierungen im phylogenetischen Stammbaum entsprachen den Erwartungen. Allerdings können solche phylogenetischen Analysen nur als Hinweis auf eine Unterscheidung nach D1- und D2-ähnlichen Rezeptoren verwendet werden. Ein maßgebendes Kriterium für diese Einordnung ist nämlich das Kopplungsverhalten dieser GPCRs. D1-ähnliche Rezeptoren koppeln an G_s-Proteine und erhöhen bei einer Aktivierung den intrazellulären cAMP-Spiegel. Dagegen koppeln D2-ähnliche Rezeptoren an G_i-Proteine und senken bei Aktivierung die cAMP-Konzentration in den Zellen (Mustard *et al.*, 2005; Missale *et al.*, 1998). Für eine eindeutige Einordnung war es also notwendig die Rezeptoren funktionell zu exprimieren.

4.3 Funktionelle Charakterisierung des CfDopRII

Zur funktionellen Expression von GPCRs gibt es zahlreiche *in vitro* Assay-Systeme. Zellen unterschiedlichster Herkunft werden verwendet: z.B. Insektenzellen (Sf9-Zellen, von der Schmetterlingsart *Spodoptera frugiperda*, Mustard *et al.*, 2003; S2-Zellen, von *D. melanogaster*, Hyun *et al.*, 2005), humane Zellen (human embryonic kidney cells, HEK293-Zellen; Gotzes und Baumann, 1996), Amphibienzellen (Oozyten des Krallenfroschs *X. laevis*, Feng *et al.*, 1996) und Hefezellen (*Pichia pastoris*, Andre *et al.*, 2006). Alle diese Zellen besitzen einen unterschiedlichen genetischen Hintergrund. Das bedeutet, dass z.B. die G-Proteine, welche an GPCRs koppeln, für jedes System unterschiedlich sein können. Die funktionelle Expression der GPCRs hängt essentiell von dieser Interaktion zwischen den G-Proteinen der verwendeten Zellen und dem Rezeptor ab. Die Wahl eines geeigneten Expressions-

systems ist also entscheidend für den Nachweis der Funktionalität eines Gens.

Die Kombination von Insekten GPCRs mit Zellsystemen von Vertebraten kann hierbei eine besondere Schwierigkeit darstellen, da die Konservierung zwischen diesen Organismen in vielen Fällen gering ist und für die funktionelle Expression eine Kopplung zwischen Insekten GPCRs und Vertebraten G-Proteinen notwendig ist. Daher kann es möglicherweise hilfreich sein, die von Insekten stammenden GPCRs in Insektenzellen (z.B. Sf9-Zellen oder S2-Zellen) zu exprimieren. Allerdings beschreibt eine Publikation über den orthologen Rezeptor DmDopRII die funktionelle Expression dieses GPCRs in Oozyten von *X. laevis* (Feng *et al.*, 1996). Deshalb wurde dieses System für die funktionelle Expression des CfDopRII ausgewählt und zunächst wurde eine Implementierung des Systems im Labor mit dem DmDopRII durchgeführt: Durch die Injektion von cRNA des Gens DmDopRII konnte nach Inkubation mit Dopamin ein Anstieg des intrazellulären cAMP-Spiegels in Oozyten nachgewiesen werden, der abhängig war von der eingesetzten Dopamin Konzentration. Vom CfDopRII wurden drei verschiedene Varianten kloniert (CfDopRIIa - **DQ459405**, b - **DQ459406** und c - **DQ459407**). Zur funktionellen Expression wurde die längste Form ausgewählt, da diese die höchste Konservierung zu den Orthologen besaß. Es wurde cRNA des CfDopRII in Oozyten injiziert. Die Inkubation dieser Oozyten mit Dopaminlösungen verschiedener Konzentrationen führte zu einem konzentrationsabhängigen Anstieg des intrazellulären cAMP-Spiegels der Oozyten. Als Kontrollen wurden nicht-injizierte und mit Wasser injizierte Oozyten mit den gleichen Lösungen (0,5 und 10 µM Dopamin) inkubiert, vergleichbar zur Behandlung der cRNA-injizierten Oozyten. Die Kontrollen zeigten keine signifikante Veränderung des cAMP-Spiegels und bewiesen, dass der beobachtete Effekt nicht auf einen endogenen Rezeptor oder auf die Injektion zurückzuführen war. Damit konnte die Funktionalität des ersten Dopamin-Rezeptors des Flohs (CfDopRII) funktionell nachgewiesen werden. Dieses Ergebnis sollte in einem unabhängigen System bestätigt werden. Bei der Wahl des zweiten Expressionssystems sollte darauf geachtet werden, dass die Möglichkeit zum Test zahlreicher Substanzen besteht. Die Verwendung von Oozyten setzt voraus, dass jede einzelne Oozyte injiziert werden muss, was die Zahl der möglichen Messungen deutlich einschränkt. HEK293-Zellen hingegen erlauben die Transfektion einer großen Anzahl an Zellen, die anschließend in verschiedenen experimentellen Ansätzen sowie in *high-throughput-screenings* verwendet werden können.

Zunächst sollte eine Etablierung des HEK-Zell-Systems durchgeführt werden. Es ist von großer Bedeutung, ein neues System in solchen einführenden Experimenten zu überprüfen, da auf diesem Weg bereits mögliche Fehler in der Handhabung erkannt und verbessert werden können. Die Zellen wurden für die Etablierung mit dem Wirkstoff Forskolin behandelt. Dieser stammt aus dem Harfenkraut *Coleus forskohlii* und aktiviert das Enzym Adenylatzyklase, was zu einer Erhöhung der intrazellulären cAMP-Konzentration führt (De Souza *et al.*, 1983). Der Anstieg konnte mit Hilfe des cAMP Enzymimmunoassays nachgewiesen werden. Auch in diesem Fall sollte weiterführend überprüft werden, ob die Expression bereits bekannter funktioneller Dopamin-Rezeptoren durchgeführt werden kann. Der Rezeptor DmDopRII (Feng *et al.*, 1996; Han *et al.*, 1996) wurde erneut ausgewählt, da er bereits in Oozyten erfolgreich verwendet wurde. Da HEK293-Zellen eine humane Zelllinie darstellen, erschien es sinnvoll zusätzlich humane Dopamin-Rezeptoren zu testen. Die D1-ähnlichen Rezeptoren, welche im Falle einer Aktivierung zu einer Erhöhung des cAMP-Spiegels führen, wurden ausgewählt (Kassack *et al.*, 2002). Die Rezeptoren DmdopRII, HsDopR1 und 5 konnten erfolgreich funktionell in HEK293-Zellen exprimiert werden. Als Abschluss der Etablierung sollte noch die Transfektionseffizienz überprüft werden. Mit Hilfe des Anti-CAT-Digoxigenin-Systems konnte gezeigt werden, dass die verwendete Transfektionsmethode ausreichend effizient ist. In der Literatur ist beschrieben, dass durch die Transfektion von HEK293-Zellen endogene Rezeptor-Populationen exprimiert werden, die auf Dopamin ansprechen (Beggs *et al.*, 2005). Aus diesem Grund wurde sehr großer Wert auf Kontrollen gelegt, um die Ergebnisse abzusichern. Zum einen wurde eine Transfektion ohne DNA durchgeführt (*mock transfection*), zum anderen wurde der leere Expressionsvektor (pcDNA3.1 (+)) transfiziert. Die so behandelten HEK293-Zellen wurden mit Dopamin-Lösungen verschiedener Konzentrationen behandelt und es konnte ein geringer Anstieg der intrazellulären cAMP-Konzentration nachgewiesen werden. Im Anschluss an die ausführliche Etablierung des HEK-Expressionssystems wurde die Funktionalität des CfDopRII in HEK293-Zellen getestet. Im Vergleich zu den beschriebenen Kontrollen (*mock transfection* und Transfektion des leeren Vektors) konnte ein signifikanter Anstieg der intrazellulären cAMP-Konzentration durch Aktivierung des CfDopRII nachgewiesen werden. Das positive Ergebnis basierend auf der Expression in Oozyten konnte in diesem unabhängigen System bestätigt werden. Der Rezeptor CfDopRII konnte also sowohl in den Oozyten des Frosches *X. laevis* als auch in Säugetierzellen funktionell exprimiert werden.

Anschließend wurden verschiedene biogene Amine getestet. Mit diesem Experiment sollte überprüft werden, ob weitere biogene Amine agonistische Wirkung auf den CfDopRII besitzen. Serotonin, Dopamin, Octopamin, Tyramin und Norepinephrin wurden getestet. Es ist beschrieben, dass Norepinephrin endogene adrenerge Rezeptoren der HEK293-Zellen anspricht (Beggs *et al.*, 2005; Gerhardt *et al.*, 1997, Ohta *et al.*, 2003; Grohmann *et al.*, 2003). Sowohl in der Kontrolle als auch in CfDopRII-exprimierenden Zellen war eine Konzentrations-Erhöhung des intrazellulären cAMPs zu beobachten. Klammert man dieses Ergebnis aus, so war Dopamin der Ligand mit dem größten Effekt auf den CfDopRII. Vergleichbare Ergebnisse wurden für die Orthologen der Fruchtfliege und der Honigbiene beschrieben. Der Rezeptor DmDopRII reagiert auf folgende biogene Amine mit absteigendem Effekt (Han *et al.*, 1996):

Dopamin > Tyramin > Octopamin > Serotonin.

Für AmDopRII ist folgende Reihenfolge beschrieben (Mustard *et al.*, 2003):

Dopamin > Octopamin > Tyramin > Serotonin.

Für geringe Konzentrationen (< 50µM) der biogenen Amine Tyramin, Octopamin und Serotonin waren die Effekte auf den intrazellulären cAMP-Spiegel für alle Orthologen sehr gering. Diese Experimente zeigen, dass der Ligand Dopamin unter der Auswahl der biogenen Amine den höchsten Effekt auf den CfDopRII hat und bestätigen ihn als Dopamin-Rezeptor.

Für eine weiterführende Charakterisierung wurde eine Dosisabhängigkeitskurve aufgenommen und zur Berechnung des EC₅₀-Wertes verwendet. In Tabelle 4.1 sind die EC₅₀-Werte der orthologen Rezeptoren aufgeführt. Da der Dopamin-Rezeptor von *A. gambiae* bisher nicht kloniert und charakterisiert ist, sind hier nur die Werte der Rezeptoren von *D. melanogaster* (Feng *et al.*, 1996) und *A. mellifera* (Mustard *et al.*, 2003) angegeben. Die EC₅₀-Werte des CfDopRII und des AmDopRII sind ähnlich, wohingegen der EC₅₀ des DmDopRII sich deutlich abgrenzt. Interessanter Weise besitzt der CfDopRII auch die höchste Sequenz-Ähnlichkeit mit dem orthologen Rezeptor der Honigbiene (siehe Kapitel 3.3, Tab. 3.5). Der Grad der Identitäten zwischen den Orthologen der vier Insekten und die beschriebenen EC₅₀-Werte weisen auf eine hohe Konservierung der Dopamin-Rezeptoren II der Honigbiene und des Flohs hin.

Tab. 4.1. EC₅₀-Werte der Dopamin-Rezeptoren II von *C. felis*, *A. mellifera* und *D. melanogaster*.

Rezeptor	EC ₅₀ [µM]	Literatur
CfDopRII	2,4 µM	Gerber <i>et al.</i> , 2006
AmDopRII	2,2 µM	Mustard <i>et al.</i> , 2003
DmDopRII	0,35 µM	Feng <i>et al.</i> , 1996

In zwei unabhängigen Zellsystemen konnte die Funktionalität des CfDopRII nachgewiesen werden. In beiden Systemen führte die Aktivierung des Rezeptors durch Dopamin zu einem Anstieg der intrazellulären cAMP-Konzentration, was die Einordnung des CfDopRII als D1-ähnlichen Dopamin-Rezeptor bestätigt.

4.4 Funktionelle Charakterisierung des CfDopRI

Anschließend an die funktionelle Expression des CfDopRII sollte auch die Funktionalität des CfDopRI überprüft werden. Im Gegensatz zum CfDopRII wurde für den CfDopRI nur eine Variante im Floh identifiziert, welche mittels transienter Transfektion in HEK293-Zellen untersucht wurde. Die Funktionalität des CfDopRI konnte nachgewiesen werden und es wurde eine Dosisabhängigkeitskurve aufgenommen. Als EC₅₀ des CfDopRI wurde der Wert 0,12 µM Dopamin berechnet. In Tabelle 4.2 sind die Werte der Orthologen aufgeführt. Anders als bei den orthologen Dopamin-Rezeptoren II liegen die EC₅₀-Werte der Dopamin-Rezeptoren I eng zusammen. Die halbmaximale Aktivierung des CfDopRI ist bereits bei einer sehr niedrigen Dopamin Konzentration erreicht. Im Vergleich dazu erreicht der CfDopRII diese halbmaximale Aktivierung erst bei 2,4 µM Dopamin.

Tab. 4.2. EC₅₀-Werte der Dopamin-Rezeptoren I von *C. felis*, *A. mellifera* und *D. melanogaster*.

Rezeptor	EC ₅₀ [µM]	Literatur
CfDopRI	0,12 µM	Gerber <i>et al.</i> , in Vorbereitung
AmDopRI	0,36 µM	Mustard <i>et al.</i> , 2003
DmDopRI	0,3 µM	Blenau <i>et al.</i> , 1998

Auch für den CfDopRI wurde der Effekt der biogenen Amine Tyramin, Serotonin und Octopamin überprüft. Norepinephrin wurde aufgrund der unter 4.3 beschriebenen Wirkung auf HEK293-Zellen an dieser Stelle nicht mehr mitgeführt (Beggs *et al.*, 2005; Gerhardt *et al.*, 1997, Ohta *et al.*, 2003; Grohmann *et al.*, 2003). Dopamin wurde auch für den CfDopRI als effektivster Ligand unter den getesteten biogenen Aminen identifiziert. Tyramin, Serotonin und Octopamin beeinflussten den cAMP-Spiegel der HEK-Zellen nur geringfügig. Tyramin löste die zweithöchste Antwort nach Dopamin aus, wenngleich der Anstieg des cAMP-Spiegels gering war. Dies ist vergleichbar mit dem Ergebnis des CfDopRII. Für den orthologen Rezeptor der Honigbiene AmDopRI wurde ein Kompetitions-Assay mit einem radioaktiv markierten Liganden durchgeführt. In diesem wurde folgende Bindungsaffinität in abnehmender Reihenfolge festgestellt (Blenau *et al.*, 1998):

Dopamin > Serotonin > Tyramin > Octopamin.

Zwar lassen sich die zwei unterschiedlichen Methoden (funktionelle Expression und radioaktiv markierter Bindungsassay) nur bedingt miteinander vergleichen, aber für den AmDopRI war Dopamin ebenfalls eindeutig der Ligand mit dem stärksten Effekt. Lediglich die Reihenfolge der übrigen biogenen Amine ist im Vergleich zum CfDopRI verändert. Der Rezeptor DmDopRI der Fruchtfliege konnte nicht durch Tyramin, Octopamin oder Serotonin stimuliert werden, so dass keine Akkumulation von cAMP in transfizierten COS7-Zellen nachgewiesen werden konnte (Sugamori *et al.*, 1995).

Der CfDopRI des Flohs konnte funktionell exprimiert und charakterisiert werden. Es wurde nachgewiesen, dass der Rezeptor bei Aktivierung durch Dopamin einen Anstieg der cAMP-Konzentration vermittelt, was typisch ist für einen D1-ähnlichen Rezeptor, da diese das extrazelluläre Signal über ein G_s-Protein in die Zelle übertragen. So konnte die Einordnung des CfDopRI als D1-ähnlicher Rezeptor bestätigt werden.

4.5 Bedeutung der Dopamin-Rezeptoren für *D. melanogaster*

Durch RNAi-Analysen wurden die Dopamin-Rezeptoren DmDopRI, II bzw. III des Modell-Organismus *D. melanogaster* auf ihre Bedeutung für die Lebensfähigkeit des Insekts untersucht. In transgenen Fliegen wurden die Dopamin-Rezeptoren durch *knock-downs* reprimiert und es wurde eine reduzierte Lebensfähigkeit festgestellt. Als Kontrollen wurden Fliegenlinien untersucht, in denen das Gen der Phosphofruktokinase (Voet und Voet 1994; Currie und Sullivan 1994) bzw. das *white*-Gen (Sullivan *et al.*, 1996) reprimiert wurden. Der *knock-down* des Schlüsselenzyms der Glykolyse führte zur maximalen Letalität in allen unabhängigen Fliegenlinien. Dahingegen hatte der *knock-down* des *white*-Gens keine Letalität zur Folge, allerdings trat der erwartete weißäugige Phänotyp auf. Die Lebensfähigkeit der *knock-down*-Fliegenlinien für die Dopamin-Rezeptoren I bis III lagen zwischen den Werten der Kontrollen: Die gemittelten Letalitätswerte der fünf Gene (DmDopRI: 62,5%, DmDopRII: 51%, DmDopRIII: 15%, *white*: 2%, *pfk*: 100%), zeigen deutlich, dass die Dopamin-Rezeptoren eine gewisse Bedeutung für die Fruchtfliege besitzen.

Es stellt sich die Frage, warum die Dopamin-Rezeptoren nicht die gleiche Bedeutung für die Lebensfähigkeit der Fliegen wie z.B. die Phosphofruktokinase besitzen. Die Rezeptoren DmDopRI und DmDopRII vermitteln im Fall der Aktivierung durch Dopamin einen Anstieg des intrazellulären cAMP-Spiegels. Das bedeutet, dass bei einem *knock-down* des DmDopRI bzw. II der jeweils andere Rezeptor die ausgefallene Funktion teilweise übernehmen kann. Allerdings würde dies voraussetzen, dass die beiden Dopamin-Rezeptoren I und II tatsächlich in den gleichen Geweben und Zellen exprimiert werden, so dass ein Ausgleich der Funktion überhaupt möglich wäre.

Es ist beschrieben, dass der DmDopRI im Embryo exprimiert wird (Sugamori *et al.*, 1995). Für adulte Fliegen konnte die Expression in Hirnregionen wie den *Mushroom Bodies*, dem zentralen Komplex und Zellkörpern, die vermutlich für Neurosekretion zuständig sind, nachgewiesen werden. Darüber hinaus erfolgte eine Detektion in thorakalen und abdominalen Ganglien (Kim *et al.*, 2003). Die Expression des DmDopRII scheint hingegen enger begrenzt als die des DmDopRI. Die höchste Expression des DmDopRII wurde ebenfalls für die *Mushroom Bodies* nachgewiesen (Han *et al.*, 1996). In anderen Hirnregionen und Geweben wurde kein Signal nachgewiesen (Mustard *et al.*, 2005). Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Expressions-Bereiche des DmDopRI und II sich zwar überlappen aber dennoch verschieden sind.

Es ist also durchaus möglich, dass die Rezeptoren DmDopRI und II ihre Funktionen bei einem *knock-down* gegenseitig übernehmen können. Aus diesem Grund wäre es von Interesse beide Rezeptoren in einem doppelten *knock-down* zu analysieren. Über ein solches weiterführendes Experiment könnte die gemeinsame Bedeutung dieser Gene für die Lebensfähigkeit der Fliegen untersucht werden.

Die Letalität der Fliegen beim *knock-down* des DmDopRIII ist auffallend niedrig. Vor allem ist der DmDopRIII der einzigste beschriebene D2-ähnliche Dopamin-Rezeptor der Fruchtfliege, der im Fall einer Aktivierung eine Senkung des cAMP-Spiegels vermittelt (Hearn *et al.*, 2002). Möglicherweise ist aber die inhibierende Rolle des DmDopRIII nicht so essentiell wie die aktivierende der beiden anderen Dopamin-Rezeptoren. Leider wurden für den DmDopRIII keine *in situ* Hybridisierungen durchgeführt, es wurde lediglich mittels RT-PCR eine Expression in Larven, Puppen und adulten Tieren nachgewiesen (Hearn *et al.*, 2002).

Sowohl der Floh *C. felis* als auch die Fruchtfliege *D. melanogaster* gehören zu den Insekten und sind eng miteinander verwandt. Die hohe Ähnlichkeit zeigt sich z.B. auch in der hohen Sequenz-Übereinstimmung der orthologen Dopamin-Rezeptoren (siehe Tab.3.5). Daher können von den Ergebnissen der Fruchtfliege Rückschlüsse auf die Bedeutung der Dopamin-Rezeptoren im Floh gezogen werden und es ist anzunehmen, dass die Rezeptoren CfDopRI, II und III eine vergleichbare Bedeutung für die Lebensfähigkeit des Flohs besitzen.

4.6 Chemoinformatische Identifizierung neuer Antagonisten

Für die Identifizierung neuer Antagonisten können Substanzen in einem *in vitro* Assay getestet werden. In diesem Fall ist die Anzahl der Substanzen, die getestet werden können, sehr eingeschränkt. Eine weitere Möglichkeit ist das Filtern der Substanzen *in silico* (Böhm *et al.*, 2002). Bisher ist lediglich die Struktur eines GPCRs des Rinder-Rhodopsins aufgeklärt (Palczewski *et al.*, 2000). Allerdings ist es möglich, über ein *homology modelling* dennoch ein dreidimensionales Modell anderer GPCR-Strukturen zu erstellen, das als Arbeitsmodell ausreichend sein sollte, sofern man den Analogiecharakter berücksichtigt (Böhm *et al.*, 2002). Dopamin-Rezeptoren gehören zur Klasse der Rhodopsin-ähnlichen GPCRs (Brody und Cravchik, 2000). Daher besteht eine ausreichende Ähnlichkeit, um ein solches *homology modelling* mit den

Dopamin-Rezeptoren aus *C. felis* durchzuführen. Für den Dopamin-Rezeptor I von *C. felis* (CfDopRI) wurde entsprechend ein dreidimensionales Modell der sieben Transmembran-Helices erstellt. Darüber hinaus wurde ein Pharmakophor-Modell des bereits beschriebenen Antagonisten SCH23390 (lorio *et al.*, 1983; Sidhu *et al.*, 1986) angefertigt. Diese Substanz ist als spezifischer Antagonist von D1-ähnlichen Rezeptoren beschrieben (Feng *et al.*, 1996; lorio *et al.*, 1983; Sidhu *et al.*, 1986). Es sollte überprüft werden, ob diese Substanz tatsächlich auch antagonistische Wirkung auf den CfDopRI besitzt. Die antagonistische Wirkung konnte eindeutig nachgewiesen werden. Mit zwei Substrukturen des Pharmakophor-Modells des SCH23390 wurde eine Substanz-Bibliothek mit 4,2 Millionen Einträgen durchsucht. Die Hits wurden mittels Docking und Analyse der vermuteten chemischen Interaktionen mit dem Rezeptor weiter selektiert. Am Ende der Selektion wurden abschließend 18 Substanzen hinsichtlich ihrer biologischen Aktivität auf den CfDopRI überprüft. Eine dieser Substanzen konnte die Dopamin-abhängige Antwort bei einer Konzentration des Antagonisten von 20 μM um 30% senken. Im Vergleich dazu vermittelte SCH23390 in der Konzentration 10 μM bei der gleichen Dopamin Konzentration eine Reduktion um 45%. Aus einer virtuellen Datenbank mit 4,2 Millionen Einträgen konnte also eine antagonistische Substanz erfolgreich identifiziert werden, ohne jeden einzelnen chemischen Stoff testen zu müssen. Dieser Ansatz zeigt deutlich, dass chemoinformatische Methoden geeignet sind, um neue Liganden für GPCRs zu identifizieren. Obwohl nur eine Kristallstruktur eines GPCRs aufgeklärt ist, ist eine *in silico* Analyse möglich und sinnvoll. Allerdings hängt der Erfolg dieser Methode sehr stark von den vorhandenen Informationen ab: Die strukturellen Informationen sowohl über den Rezeptor als auch über aktive Liganden sind entscheidend. Deshalb wird man bei der Übertragung dieser Vorgehensweise auf andere GPCRs auf jeden Fall die vorhandene Datenlage überprüfen und abwägen müssen, ob die *in silico* Analyse sinnvoll erscheint.

4.7 Ausblick

Die Identifikation und Charakterisierung der Dopamin Rezeptoren I, II und III von *Ctenocephalides felis* kann für die weiterführende Suche nach potentiellen GPCR-*drug-targets* des Flohs genutzt werden. Zum einen können die Informationen über die hoch konservierten Regionen der Dopamin Rezeptoren des Flohs für das Design degenerierter *primer* zur Klonierung weiterer GPCRs genutzt werden. Zum anderen können die etablierten Assay-Systeme - die Oozyten des Krallenfroschs und die HEK293 Zellen - nun direkt zur funktionellen Expression weiterer GPCRs eingesetzt werden. Die hoch-konservierten GPCRs der bioinformatischen Analyse könnten als nächste Rezeptoren kloniert werden.

Für den CfDopRIII könnte weiterführend eine funktionelle Charakterisierung entsprechend der Analyse des CfDopRI und II durchgeführt werden, um das Zusammenwirken des dopaminergen Systems des Flohs besser zu verstehen. Die orthologen Dopamin Rezeptoren des Modell-Organismus *D. melanogaster* wurden mittels RNAi reprimiert. Die durch die Repression vermittelten Letalitätswerte sind nicht ausreichend, um diese als potentielle *targets* zu qualifizieren. Allerdings könnte vielleicht das komplette System als *target* adressiert werden, wobei in RNAi Experimenten überprüft werden könnte, welche Wirkung der gleichzeitige *knock-down* mehrerer Dopamin Rezeptoren hat. Z.B. wäre es von Interesse den DmDopRI und DmDopRII in einem doppelten *knock-down* auf ihre Bedeutung für die Fliege zu untersuchen.

Die chemoinformatische Analyse des CfDopRI konnte durch die Identifikation eines neuen Antagonisten bestätigt werden. Dadurch konnten sowohl das Pharmakophor-Modell zur ligandenbasierten Suche nach neuen Antagonisten als auch das dreidimensionale Modell des CfDopRI optimiert werden. Die neuen verbesserten Modelle können nun zur Identifikation weiterer wirksamerer Antagonisten verwendet werden. Darüber hinaus kann die Vorgehensweise zur Modellierung auf andere GPCRs des Flohs übertragen werden.

5. Zusammenfassung

Für die Identifikation und Klonierung der ersten GPCRs des Flohs *C. felis* wurde zunächst eine bioinformatische Analyse durchgeführt. Das Genom des Flohs ist bisher nicht sequenziert worden. Deshalb müssen neue Gene mittels degenerierter PCR identifiziert werden, was auf der Konservierung zwischen einem bekannten Orthologen und dem gesuchten Gen basiert. Dabei korreliert der Grad der Konservierung mit der Wahrscheinlichkeit, die Gene erfolgreich identifizieren zu können. Mit Hilfe der bioinformatischen Analyse wurden die Insekten-GPCRs mit der höchsten Konservierung bestimmt: die Familie der Dopamin-Rezeptoren. Die Sequenzen der Dopamin-Rezeptoren I, II und III des Flohs wurden anschließend in degenerierten *nested* und RACE-PCR-Ansätzen ermittelt. Aufgrund von Sequenzvergleichen wurden die Rezeptoren eingeordnet und klassifiziert und entsprechend als CfDopRI, II (D1-ähnlich) und III (D2-ähnlich) benannt.

Um die Funktionalität der neuen Gene überprüfen zu können, wurde zuerst die längste Variante des CfDopRII in Oozyten des Krallenfroschs *X. laevis* exprimiert. Es zeigte sich, dass dieser Rezeptor bei Stimulation mit Dopamin einen Anstieg des intrazellulären cAMP-Spiegels vermittelt. Dieses Ergebnis konnte in HEK293-Zellen bestätigt werden. Der EC_{50} des CfDopRII wurde bestimmt und beträgt 2,4 μ M Dopamin. Eine Auswahl an biogenen Aminen wurde hinsichtlich ihrer agonistischen Wirkung auf den CfDopRII untersucht. Im Vergleich führte die Inkubation mit Dopamin eindeutig zum höchsten Anstieg des intrazellulären cAMP-Spiegels. Der CfDopRI wurde ebenfalls funktionell in HEK293-Zellen exprimiert und sein EC_{50} beträgt 0,12 μ M Dopamin. Auch hier führte die Stimulation mit Dopamin im Vergleich zu Tyramin, Octopamin und Serotonin zur höchsten Antwort in Form der Erhöhung des cAMP-Spiegels der HEK293-Zellen. Der nachgewiesene cAMP-Anstieg in Abhängigkeit von der Aktivierung des CfDopRI und II bestätigt die Klassifizierung der Rezeptoren als D1-ähnliche Dopamin-Rezeptoren auf funktioneller Ebene.

Mit Hilfe des Modell-Organismus *D. melanogaster* wurde die funktionelle Bedeutung der Dopamin-Rezeptoren für die Fruchtfliege untersucht. Die Rezeptoren DmDopRI, II und III verursachten bei einem *knock-down* durch RNAi Letalitätsraten, die zwischen der negativ Kontrolle (*knock-down* der Expression des *white*-Gens) und der positiv Kontrolle (*knock-down* der Expression des Phosphofruktokinase-Gens) lagen. Die reduzierte

Lebensfähigkeit zeigte, dass ein Funktionsverlust der Dopamin-Rezeptoren physiologische Konsequenzen für die Fliegen hat. Allerdings ist der *knock-down* der Dopamin-Rezeptoren nicht im gleichen Maße essentiell, wie z.B. der *knock-down* der positiv Kontrolle. Eine vergleichbare Bedeutung wird für das Insekt *C.felis* erwartet.

Im Rahmen einer chemoinformatischen Analyse wurde ein dreidimensionales Modell des CfDopRI erstellt. Es wurde bestätigt, dass der bereits beschriebene Antagonist SCH23390 mit Spezifität für D1-ähnliche Rezeptoren auch biologische Aktivität auf dem Dopamin Rezeptor I von *C. felis* besitzt. Mit einem Pharmakophor-Modell dieses Antagonisten in Verbindung mit der Rezeptor-Struktur des CfDopRI wurden neue Substanzen *in silico* gesucht, die anschließend in der Zellkultur getestet wurden. So konnte aus einer Substanz-Bibliothek mit 4,2 Millionen Einträgen eine neue Substanz mit antagonistischer Wirkung auf den CfDopRI identifiziert werden.

6. Literaturverzeichnis

- Altschul,S.F., Gish,W., Miller,W., Myers,E.W. & Lipman,D.J. (1990) Basic local alignment search tool. *J Mol Biol* **215**, 403-410.
- Andre,N., Cherouati,N., Prual,C., Steffan,T., Zeder-Lutz,G., Magnin,T., Pattus,F., Michel,H., Wagner,R. & Reinhart,C. (2006) Enhancing functional production of G protein-coupled receptors in *Pichia pastoris* to levels required for structural studies via a single expression screen. *Protein Sci* **15**, 1115-1126.
- Axelrod,J. & Saavedra,J.M. (1977) Octopamine. *Nature* **265**, 501-504.
- Baxter,G.D. & Barker,S.C. (1999) Isolation of a cDNA for an octopamine-like, G-protein coupled receptor from the cattle tick, *Boophilus microplus*. *Insect Biochem Mol Biol* **29**, 461-467.
- Beckstette,M., Mailänder,J.T., Marhöfer,R.J., Sczyrba,A., Ohlebusch,E., Giegerich,R. & Selzer,P.M. (2004) Interactive high-throughput sequence analysis and comparative genomics. *Journal of Intergrative Bioinformatics*. 79-94.
- Beggs,K.T., Hamilton,I.S., Kurshan,P.T., Mustard,J.A. & Mercer,A.R. (2005) Characterization of a D2-like dopamine receptor (AmDOP3) in honey bee, *Apis mellifera*. *Insect Biochem Mol Biol* **35**, 873-882.
- Berg, J.M., Tymoczko, J.L. & Stryer, L. (2003) *Biochemie*. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg.
- Bissantz,C., Logean,A. & Rognan,D. (2004) High-throughput modeling of human G-protein coupled receptors: amino acid sequence alignment, three-dimensional model building, and receptor library screening. *J Chem Inf Comput.Sci* **44**, 1162-1176.
- Blenau,W., Erber,J. & Baumann,A. (1998) Characterization of a dopamine D1 receptor from *Apis mellifera*: cloning, functional expression, pharmacology, and mRNA localization in the brain. *J Neurochem*. **70**, 15-23.

- Böhm, H.-J., Klebe, G. & Kubinyi, H. (2002) *Wirkstoffdesign*. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg.
- Brand, A.H. & Perrimon, N. (1993) Targeted gene expression as a means of altering cell fates and generating dominant phenotypes. *Development* **118**, 401-415.
- Brickmann, J., Goetze, T., Heiden, W., Moeckel, G., Reiling, S., Vollhardt, H. & Zachmann, C.-D. (1995) Interactive Visualization of Molecular Scenarios with MOLCAD/SYBYL. *Data Visualization in Molecular Science* 83-97.
- Brickmann, J., Exner, T., Keil, M. & Marhöfer, R.J. (2000) Molecular Graphics - Trends and Perspectives. *J.Mol.Mod.* **6**, 328-340.
- Brody, T. & Cravchik, A. (2000) Drosophila melanogaster G protein-coupled receptors. *J Cell Biol* **150**, F83-F88.
- Broeck, J.V. (2001) Insect G protein-coupled receptors and signal transduction. *Arch Insect Biochem Physiol* **48**, 1-12.
- Bunzow, J.R., Van Tol, H.H., Grandy, D.K., Albert, P., Salon, J., Christie, M., Machida, C.A., Neve, K.A. & Civelli, O. (1988) Cloning and expression of a rat D2 dopamine receptor cDNA. *Nature* **336**, 783-787.
- Currie, P.D. & Sullivan, D.T. (1994) Structure and expression of the gene encoding phosphofructokinase (PFK) in Drosophila melanogaster. *J Biol Chem* **269**, 24679-24687.
- Davis, A.M., Teague, S.J. & Kleywegt, G.J. (2003) Application and limitations of X-ray crystallographic data in structure-based ligand and drug design. *Angew.Chem Int Ed Engl.* **42**, 2718-2736.
- de Souza, N.J., Dohadwalla, A.N. & Reden, J. (1983) Forskolin: a labdane diterpenoid with antihypertensive, positive inotropic, platelet aggregation inhibitory, and adenylate cyclase activating properties. *Med Res Rev* **3**, 201-219.
- Deary, A., Gingrich, J.A., Falardeau, P., Fremeau, R.T., Jr., Bates, M.D. & Caron, M.G. (1990) Molecular cloning and expression of the gene for a human D1 dopamine receptor. *Nature* **347**, 72-76.

- Deisenhofer, J., Epp, O., Miki, K., Huber, R. & Michel, H. (1984) X-ray structure analysis of a membrane protein complex. Electron density map at 3 Å resolution and a model of the chromophores of the photosynthetic reaction center from *Rhodospseudomonas viridis*. *J Mol Biol* **180**, 385-398.
- Dower, W.J., Miller, J.F. & Ragsdale, C.W. (1988) High efficiency transformation of *E. coli* by high voltage electroporation. *Nucleic Acids Res* **16**, 6127-6145.
- Dryden, M.W. & Rust, M.K. (1994) The cat flea: biology, ecology and control. *Vet Parasitol* **52**, 1-19.
- Dumont, J.N. (1972) Oogenesis in *Xenopus laevis* (Daudin). I. Stages of oocyte development in laboratory maintained animals. *J Morphol.* **136**, 153-179.
- Evans, P.D. & Robb, S. (1993) Octopamine receptor subtypes and their modes of action. *Neurochem. Res* **18**, 869-874.
- Feng, G., Hannan, F., Reale, V., Hon, Y.Y., Kousky, C.T., Evans, P.D. & Hall, L.M. (1996) Cloning and functional characterization of a novel dopamine receptor from *Drosophila melanogaster*. *J Neurosci.* **16**, 3925-3933.
- Folz, S.D., Ash, K.A., Conder, G.A. & Rector, D.L. (1986) Amitraz: a tick and flea repellent and tick detachment drug. *J Vet Pharmacol Ther* **9**, 150-156.
- Gerber, S., Krasky, A., Rohwer, A., Lindauer, S., Closs, E., Rognan, D., Gunkel, N., Selzer, P.M. & Wolf, C. (2006) Identification and characterisation of the dopamine receptor II from the cat flea *Ctenocephalides felis* (CfDopRII). *Insect Biochem Mol Biol* **36**, 749-758.
- Gerber, S., Rognan, D., Gunkel, N., Duszenko, M., Selzer, P.M. & Wolf, C. Identification and characterisation of the dopamine receptor I from the cat flea *Ctenocephalides felis* (CfDopRI). (*In Preparation*).
- Gerhardt, C.C., Lodder, H.C., Vincent, M., Bakker, R.A., Planta, R.J., Vreugdenhil, E., Kits, K.S. & van Heerikhuizen, H. (1997) Cloning and expression of a complementary DNA encoding a molluscan octopamine receptor that couples to chloride channels in HEK293 cells. *J Biol Chem* **272**, 6201-6207.

- Gether,U. (2000) Uncovering molecular mechanisms involved in activation of G protein-coupled receptors. *Endocr.Rev* **21**, 90-113.
- Gingrich,J.A. & Caron,M.G. (1993) Recent advances in the molecular biology of dopamine receptors. *Annu.Rev Neurosci.* **16**, 299-321.
- Giordano,E., Rendina,R., Peluso,I. & Furia,M. (2002) RNAi triggered by symmetrically transcribed transgenes in *Drosophila melanogaster*. *Genetics* **160**, 637-648.
- Goldberg,D.A. (1980) Isolation and partial characterization of the *Drosophila* alcohol dehydrogenase gene. *Proc Natl Acad.Sci U.S A* **77**, 5794-5798.
- Goldin,A.L. (1992) Maintenance of *Xenopus laevis* and oocyte injection. *Methods Enzymol.* **207**, 266-279.
- Gonsior, B. (1994) *Physik für Mediziner, Biologen und Pharmazeuten*. Schattauer Verlag, Stuttgart.
- Gotzes,F., Balfanz,S. & Baumann,A. (1994) Primary structure and functional characterization of a *Drosophila* dopamine receptor with high homology to human D1/5 receptors. *Receptors.Channels* **2**, 131-141.
- Gotzes,F. & Baumann,A. (1996) Functional properties of *Drosophila* dopamine D1-receptors are not altered by the size of the N-terminus. *Biochem Biophys.Res Commun.* **222**, 121-126.
- Greenspan, R.J. (1997) *Fly Pushing: The theory and practice of Drosophila genetics*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
- Grohmann,L., Blenau,W., Erber,J., Ebert,P.R., Strunker,T. & Baumann,A. (2003) Molecular and functional characterization of an octopamine receptor from honeybee (*Apis mellifera*) brain. *J Neurochem.* **86**, 725-735.
- Gura,T. (2000) A silence that speaks volumes. *Nature* **404**, 804-808.
- Han,J.H., Stratowa,C. & Rutter,W.J. (1987) Isolation of full-length putative rat lysophospholipase cDNA using improved methods for mRNA isolation and cDNA cloning. *Biochemistry* **26**, 1617-1625.

- Han,K.A., Millar,N.S., Grotewiel,M.S. & Davis,R.L. (1996) DAMB, a novel dopamine receptor expressed specifically in *Drosophila* mushroom bodies. *Neuron* **16**, 1127-1135.
- Hanahan,D. (1983) Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J Mol Biol* **166**, 557-580.
- Hashemzadeh,H., Hollingworth,R.M. & Voliva,A. (1985) Receptors for 3H-octopamine in the adult firefly light organ. *Life Sci* **37**, 433-440.
- Hearn,M.G., Ren,Y., McBride,E.W., Reveillaud,I., Beinborn,M. & Kopin,A.S. (2002) A *Drosophila* dopamine 2-like receptor: Molecular characterization and identification of multiple alternatively spliced variants. *Proc Natl Acad.Sci U.S A* **99**, 14554-14559.
- Henderson,R., Baldwin,J.M., Ceska,T.A., Zemlin,F., Beckmann,E. & Downing,K.H. (1990) Model for the structure of bacteriorhodopsin based on high-resolution electron cryo-microscopy. *J Mol Biol* **213**, 899-929.
- Hermans,E. (2003) Biochemical and pharmacological control of the multiplicity of coupling at G-protein-coupled receptors. *Pharmacol Ther* **99**, 25-44.
- Hiepe, T., Lucius, R. & Gottstein, B. (2006) *Allgemeine Parasitologie*. Parey Verlag, Stuttgart.
- Hill,C.A., Fox,A.N., Pitts,R.J., Kent,L.B., Tan,P.L., Chrystal,M.A., Cravchik,A., Collins,F.H., Robertson,H.M. & Zwiebel,L.J. (2002) G protein-coupled receptors in *Anopheles gambiae*. *Science* **298**, 176-178.
- Hiripi,L., Juhos,S. & Downer,R.G. (1994) Characterization of tyramine and octopamine receptors in the insect (*Locusta migratoria migratorioides*) brain. *Brain Res* **633**, 119-126.
- Hollingworth,R.M. & Lund,A.E. (1982) Biological and neurotoxic effect of amidine pesticides. *Insecticide Mode of Action* 189-227.
- Hopkins,A.L. & Groom,C.R. (2002) The druggable genome. *Nat Rev Drug Discov* **1**, 727-730.
- Humphries,M.A., Mustard,J.A., Hunter,S.J., Mercer,A., Ward,V. & Ebert,P.R. (2003) Invertebrate D2 type dopamine receptor exhibits age-based

- plasticity of expression in the mushroom bodies of the honeybee brain. *J Neurobiol.* **55**, 315-330.
- Hutvagner,G. & Zamore,P.D. (2002) RNAi: nature abhors a double-strand. *Curr Opin.Genet.Dev.* **12**, 225-232.
- Hyun,S., Lee,Y., Hong,S.T., Bang,S., Paik,D., Kang,J., Shin,J., Lee,J., Jeon,K., Hwang,S., Bae,E. & Kim,J. (2005) Drosophila GPCR Han is a receptor for the circadian clock neuropeptide PDF. *Neuron* **48**, 267-278.
- Inoue,H., Nojima,H. & Okayama,H. (1990) High efficiency transformation of Escherichia coli with plasmids. *Gene* **96**, 23-28.
- Iorio,L.C., Barnett,A., Leitz,F.H., Houser,V.P. & Korduba,C.A. (1983) SCH 23390, a potential benzazepine antipsychotic with unique interactions on dopaminergic systems. *J Pharmacol Exp Ther* **226**, 462-468.
- Kandel, E.R., Schwartz, J.H. & Jessell, T.M. (1996) *Neurowissenschaften - Eine Einführung*. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg.
- Kassack,M.U., Hofgen,B., Decker,M., Eckstein,N. & Lehmann,J. (2002) Pharmacological characterization of the benz[d]indolo[2,3-g]azecine LE300, a novel type of a nanomolar dopamine receptor antagonist. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* **366**, 543-550.
- Kebabian,J.W. & Calne,D.B. (1979) Multiple receptors for dopamine. *Nature* **277**, 93-96.
- Kelly,T.J., Jr. & Smith,H.O. (1970) A restriction enzyme from Hemophilus influenzae. II. *J Mol Biol* **51**, 393-409.
- Kennerdell,J.R. & Carthew,R.W. (2000) Heritable gene silencing in Drosophila using double-stranded RNA. *Nat Biotechnol.* **18**, 896-898.
- Kim,Y.C., Lee,H.G., Seong,C.S. & Han,K.A. (2003) Expression of a D1 dopamine receptor dDA1/DmDOP1 in the central nervous system of Drosophila melanogaster. *Gene Expr.Patterns* **3**, 237-245.
- Knippers, R. (2006) *Molekulare Genetik*. Thieme Verlag, Stuttgart.
- Knowles,C.O. & Roulston,W.J. (1973) Toxicity to Boophilus microplus of formamidine acaricides and related compounds, and modification of

- toxicity by certain insecticide synergists. *J Econ.Entomol.* **66**, 1245-1251.
- Koolman, J. & Röhm, K.-H. (2002) *Taschenatlas der Biochemie*. Thieme Verlag, Stuttgart.
- Krauss, G. (2001) *Biochemistry of Signal Transduction and Regulation*. Wiley-VCH Verlag, New York.
- Krieg,P.A. & Melton,D.A. (1984) Functional messenger RNAs are produced by SP6 in vitro transcription of cloned cDNAs. *Nucleic Acids Res* **12**, 7057-7070.
- Krogh,A., Larsson,B., von Heijne,G. & Sonnhammer,E.L. (2001) Predicting transmembrane protein topology with a hidden Markov model: application to complete genomes. *J Mol Biol* **305**, 567-580.
- Lee,Y.S. & Carthew,R.W. (2003) Making a better RNAi vector for Drosophila: use of intron spacers. *Methods* **30**, 322-329.
- Lehrach,H., Diamond,D., Wozney,J.M. & Boedtker,H. (1977) RNA molecular weight determinations by gel electrophoresis under denaturing conditions, a critical reexamination. *Biochemistry* **16**, 4743-4751.
- Lewis,R.E. (1972) Notes on the geographical distribution and host preferences in the order Siphonaptera. 1. Pulicidae. *J Med Entomol.* **9**, 511-520.
- Lindl, T. (2002) *Zell- und Gewebekultur*. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, Berlin.
- Mercenier,A. & Chassy,B.M. (1988) Strategies for the development of bacterial transformation systems. *Biochimie* **70**, 503-517.
- Missale,C., Nash,S.R., Robinson,S.W., Jaber,M. & Caron,M.G. (1998) Dopamine receptors: from structure to function. *Physiol Rev* **78**, 189-225.
- Monsma,F.J., Jr., Mahan,L.C., McVittie,L.D., Gerfen,C.R. & Sibley,D.R. (1990) Molecular cloning and expression of a D1 dopamine receptor linked to adenylyl cyclase activation. *Proc Natl Acad.Sci U.S A* **87**, 6723-6727.

- Mustard, J.A., Blenau, W., Hamilton, I.S., Ward, V.K., Ebert, P.R. & Mercer, A.R. (2003) Analysis of two D1-like dopamine receptors from the honey bee *Apis mellifera* reveals agonist-independent activity. *Brain Res Mol Brain Res* **113**, 67-77.
- Mustard, J.A., Beggs, K.T. & Mercer, A.R. (2005) Molecular biology of the invertebrate dopamine receptors. *Arch Insect Biochem Physiol* **59**, 103-117.
- Mühlhardt C. (2003) *Der Experimentator: Molekularbiologie/Genomics*. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg.
- Neckameyer, W.S. (1996) Multiple roles for dopamine in *Drosophila* development. *Dev. Biol* **176**, 209-219.
- Neckameyer, W.S. (1998) Dopamine and mushroom bodies in *Drosophila*: experience-dependent and -independent aspects of sexual behavior. *Learn. Mem.* **5**, 157-165.
- Neckameyer, W.S. (1998) Dopamine modulates female sexual receptivity in *Drosophila melanogaster*. *J Neurogenet.* **12**, 101-114.
- Nelson, D. L. & Cox, M. M. (2001) *Biochemie*. Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York.
- Oellien, F., Cramer, J., Beyer, C., Ihlenfeldt, W.-D. & Selzer, P.M. (2006) The Impact of Tautomer Forms on Pharmacophore-Based Virtual Screening. *J.Chem.Inf.Model.*
- Ohta, H., Utsumi, T. & Ozoe, Y. (2003) B96Bom encodes a *Bombyx mori* tyramine receptor negatively coupled to adenylate cyclase. *Insect Mol Biol* **12**, 217-223.
- Orchard, I. (1982) Octopamine in insects: neurotransmitter, neurohormone and neuromodulator. *Can.J.Zool.* 659-669.
- Palczewski, K., Kumasaka, T., Hori, T., Behnke, C.A., Motoshima, H., Fox, B.A., Le, T., I, Teller, D.C., Okada, T., Stenkamp, R.E., Yamamoto, M. & Miyano, M. (2000) Crystal structure of rhodopsin: A G protein-coupled receptor. *Science* **289**, 739-745.

- Parkinson, J. (2002) An essay on the shaking palsy. 1817. *J Neuropsychiatry Clin Neurosci.* **14**, 223-236.
- Pendleton, R.G., Robinson, N., Roychowdhury, R., Rasheed, A. & Hillman, R. (1996) Reproduction and development in *Drosophila* are dependent upon catecholamines. *Life Sci* **59**, 2083-2091.
- Radad, K., Gille, G. & Rausch, W.D. (2005) Short review on dopamine agonists: insight into clinical and research studies relevant to Parkinson's disease. *Pharmacol Rep.* **57**, 701-712.
- Reid, T.J. (1989) Acaricide resistance in Queensland. *Qld. Dept. Prim. Indust. Info. Series* 1-17.
- Robbins, F.C., Enders, J.F. & Weller, T.H. (1950) Cytopathogenic effect of poliomyelitis viruses in vitro on, human embryonic tissues. *Proc Soc Exp Biol Med* **75**, 370-374.
- Roberts, D.B. (1998) *Drosophila: A practical approach*. IRL Press, Oxford.
- Roeder, T. (1995) Pharmacology of the octopamine receptor from locust central nervous tissue (OAR3). *Br J Pharmacol* **114**, 210-216.
- Rosen, K.M., Lamperti, E.D. & Villa-Komaroff, L. (1990) Optimizing the northern blot procedure. *Biotechniques* **8**, 398-403.
- ROTE LISTE® (2006) ROTE LISTE® Service GmbH, Frankfurt/Main.
- Roulston, W.J., Wharton, R.H., Schnitzerling, H.J., Sutherst, R.W. & Sullivan, N.D. (1971) Mixtures of chlorphenamide with other acaricides for the control of organophosphorus-resistant strains of cattle tick *Boophilus microplus*. *Aust Vet J* **47**, 521-528.
- Rust, M.K. (2005) Advances in the control of *Ctenocephalides felis* (cat flea) on cats and dogs. *Trends Parasitol* **21**, 232-236.
- Saiki, R.K., Scharf, S., Faloona, F., Mullis, K.B., Horn, G.T., Erlich, H.A. & Arnheim, N. (1985) Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science* **230**, 1350-1354.
- Sambrook, J. & Russel, D.W. (2001) *Molecular Cloning A Laboratory Manual*. CSHL Press, New York.

- Sanger,F., Nicklen,S. & Coulson,A.R. (1977) DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad.Sci U.S A* **74**, 5463-5467.
- Schlegel, H.G. (1992) *Allgemeine Mikrobiologie*. Thieme Verlag, Stuttgart.
- Selzer,P.M., Brutsche,S., Wiesner,P., Schmid,P. & Mullner,H. (2000) Target-based drug discovery for the development of novel antiinfectives. *Int J Med Microbiol* **290**, 191-201.
- Selzer, P.M., Marhöfer, R. & Rohwer, A. (2004) *Angewandte Bioinformatik*. Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York.
- Shuman,S. (1991) Recombination mediated by vaccinia virus DNA topoisomerase I in Escherichia coli is sequence specific. *Proc Natl Acad.Sci U.S A* **88**, 10104-10108.
- Shuman,S. (1994) Novel approach to molecular cloning and polynucleotide synthesis using vaccinia DNA topoisomerase. *J Biol Chem* **269**, 32678-32684.
- Sidhu,A., van Oene,J.C., Dandridge,P., Kaiser,C. & Keabian,J.W. (1986) [125I]SCH 23982: the ligand of choice for identifying the D-1 dopamine receptor. *Eur J Pharmacol* **128**, 213-220.
- Smith,H.O. & Wilcox,K.W. (1970) A restriction enzyme from Hemophilus influenzae. I. Purification and general properties. *J Mol Biol* **51**, 379-391.
- Smith,L.D., Xu,W.L. & Varnold,R.L. (1991) Oogenesis and oocyte isolation. *Methods Cell Biol* **36**, 45-60.
- Sokoloff,P., Giros,B., Martres,M.P., Bouthenet,M.L. & Schwartz,J.C. (1990) Molecular cloning and characterization of a novel dopamine receptor (D3) as a target for neuroleptics. *Nature* **347**, 146-151.
- Strader,C.D., Fong,T.M., Graziano,M.P. & Tota,M.R. (1995) The family of G-protein-coupled receptors. *FASEB J* **9**, 745-754.
- Sugamori,K.S., Demchyshyn,L.L., McConkey,F., Forte,M.A. & Niznik,H.B. (1995) A primordial dopamine D1-like adenylyl cyclase-linked receptor from Drosophila melanogaster displaying poor affinity for benzazepines. *FEBS Lett* **362**, 131-138.

- Suggs,S.V., Wallace,R.B., Hirose,T., Kawashima,E.H. & Itakura,K. (1981) Use of synthetic oligonucleotides as hybridization probes: isolation of cloned cDNA sequences for human beta 2-microglobulin. *Proc Natl Acad.Sci U.S A* **78**, 6613-6617.
- Sullivan, W., Ashburner, M. & Hawley, R.S. (1996) *Drosophila protocols*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
- Sunahara,R.K., Guan,H.C., O'Dowd,B.F., Seeman,P., Laurier,L.G., Ng,G., George,S.R., Torchia,J., Van Tol,H.H. & Niznik,H.B. (1991) Cloning of the gene for a human dopamine D5 receptor with higher affinity for dopamine than D1. *Nature* **350**, 614-619.
- Tempel,B.L., Livingstone,M.S. & Quinn,W.G. (1984) Mutations in the dopa decarboxylase gene affect learning in *Drosophila*. *Proc Natl Acad.Sci U.S A* **81**, 3577-3581.
- Thein,S.L., Lynch,J.R., Weatherall,D.J. & Wallace,R.B. (1986) Direct detection of haemoglobin E with synthetic oligonucleotides. *Lancet* **1**, 93.
- Thompson,J.D., Higgins,D.G. & Gibson,T.J. (1994) CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res* **22**, 4673-4680.
- Tiberi,M., Jarvie,K.R., Silvia,C., Falardeau,P., Gingrich,J.A., Godinot,N., Bertrand,L., Yang-Feng,T.L., Fremeau,R.T., Jr. & Caron,M.G. (1991) Cloning, molecular characterization, and chromosomal assignment of a gene encoding a second D1 dopamine receptor subtype: differential expression pattern in rat brain compared with the D1A receptor. *Proc Natl Acad.Sci U.S A* **88**, 7491-7495.
- Trabanino,R.J., Hall,S.E., Vaidehi,N., Floriano,W.B., Kam,V.W. & Goddard,W.A., III (2004) First principles predictions of the structure and function of g-protein-coupled receptors: validation for bovine rhodopsin. *Biophys.J* **86**, 1904-1921.
- Van Tol,H.H., Bunzow,J.R., Guan,H.C., Sunahara,R.K., Seeman,P., Niznik,H.B. & Civelli,O. (1991) Cloning of the gene for a human dopamine D4 receptor with high affinity for the antipsychotic clozapine. *Nature* **350**, 610-614.

- Voet, D. & Voet, J.G. (1994) *Lehrbuch der Biochemie*. Wiley-VCH Verlag, New York.
- Wehner, R. & Gehring, W. (1995) *Zoologie*. Thieme Verlag, Stuttgart.
- Weiss, B., Jacquemin-Sablon, A., Live, T.R., Fareed, G.C. & Richardson, C.C. (1968) Enzymatic breakage and joining of deoxyribonucleic acid. VI. Further purification and properties of polynucleotide ligase from *Escherichia coli* infected with bacteriophage T4. *J Biol Chem* **243**, 4543-4555.
- Wess, J. (1997) G-protein-coupled receptors: molecular mechanisms involved in receptor activation and selectivity of G-protein recognition. *FASEB J* **11**, 346-354.
- Westheide, W. & Rieger, R. (1996) *Spezielle Zoologie Teil 1: Einzeller und Wirbellose Tiere*. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg.
- Wise, A., Gearing, K. & Rees, S. (2002) Target validation of G-protein coupled receptors. *Drug Discov Today* **7**, 235-246.
- Yellman, C., Tao, H., He, B. & Hirsh, J. (1997) Conserved and sexually dimorphic behavioral responses to biogenic amines in decapitated *Drosophila*. *Proc Natl Acad. Sci U.S A* **94**, 4131-4136.
- Zhou, Q.Y., Grandy, D.K., Thambi, L., Kushner, J.A., Van Tol, H.H., Cone, R., Pribnow, D., Salon, J., Bunzow, J.R. & Civelli, O. (1990) Cloning and expression of human and rat D1 dopamine receptors. *Nature* **347**, 76-80.

7. Anhang

7.1 Primer

Degenerierte *Primer* für die Klonierung des CfDopRI

Primer	Sequenz
deg_Primer1F	ATGACNTTYGCIGGNGTIAA
deg_Primer2R	TTNACRCARAARAAIGGNACCCA
deg_Primer3F	TGYTAYGCICARAARCAIGT
deg_Primer4R	TTRAAGCYTCNCKRAAYTC
deg_Primer5F	AARGAYCCIYTIMGNTAYGG
deg_Primer6R	CCAIGTNARDATYTTTRAAIGT
deg_Primer7F_Depict	GAYHTNYTIGGITAYTGG
deg_Primer8R_Depict	TTRAADATISWRTADATIA
deg_Primer9F	TGGGTIGCNTTYGAYGTIATG
deg_Primer10R	CCARCADATIARRAANACICCCAT

Degenerierte *Primer* für die Klonierung des CfDopRII

Primer	Sequenz
DopRII_1	ACIGAYTGGTGYGAYATHTGG
DopRII_2	CCARCADATDATRAAIACICCCAT
DopRII_3	TTYCCIGCIATHGTNTGGTGG
DopRII_4	TTYTTYTCYTTIGCRAAYTT
DopRII_5	TGGGCIATHACNGAYCCITT
DopRII_6	CCARCAIGCRTADATIACIGGRITCAT
DopRII_7	ATHWSIYTIGAYMGITAYTGG
DopRII_8	TTDATCCAICCIARCCANGT
DopRII_9	ACIAARCARGTIYTNATGGC
DopRII_10	ACIARRTANCCIARRTYTC
DopRII_11	CAYACIGCNACIAAYTAYTT
DopRII_12	ATGCCITTYWSIGCIYTNTA

Degenerierte *Primer* für die Klonierung des CfDopRIII

Primer	Sequenz
DopRIII_1	ATGGTITTYTITAYTGGAA
DopRIII_2	TTIGTIGCYTTICKYTCYTTYTT
DopRIII_3	ATIAARTAYGCIAARCAYAARAA
DopRIII_4	CAIGTRAARAANGGIARCCARCA
DopRIII_5	ATGGAYGTIATHTGYWSIAC
DopRIII_6	TTCATRTANCCIARCCAIGT
DopRIII_7	TTYTAYAAYACIGAYTTYAT
DopRIII_8	TTICKRAAYTCIGGRITTRAA
DopRIII_9	GTIATGCCNTTYGCNGTITA
DopRIII_10	TCICKYTTYTTYTTISWIGCYTT

Primer für die Klonierung des 5'- und 3'-Endes des CfDopRI

Primer	Sequenz
Primer43	CAGCGCGTGGTCTCGTCATCCTTCTGTTCG
Primer44	GCAGCCCATACCACGTTAGCGATCACAAGG
PrimerR42	GGACCTGTGCTGGTGGTTGC
PrimerF41	GCAACCACCAGCACAGGTCC

Primer für die Klonierung des 5'- und 3'-Endes des CfDopRII

Primer	Sequenz
3'DopRII_47	AACACGAAGAAATAGTATCGGCGGTAGTCA
3'DopRII_in_48	TCCTATCTGGGTTGTGCGTGAATTGTATCC
5'DopRII_in_49	AACAAGACATCCAGGGAGCGCCAAATGTCA
5'DopRII_50	CACCAGTCGGAGCCAAAGAACCAAGTGTTG

Primer für die Klonierung des 5'- und 3'-Endes des CfDopRIII

Primer	Sequenz
DopRIII5'Ende1Rv	CAATGGACCTAGAACAGTCTCTGCTAACTT
DopRIII5'Ende2Rv	ATCCCGAGGCAGTATTTGTTGGACGTTTCAT
DopRIII3'Ende3	AGCACTCAACACGTGGCCATACTAGCGGAG
DopRIII3'Ende4	CGGTTTAGAGAGGAAGTTATCCGCTAAATC

Primer für die Klonierung des CfDopRI über die gesamte Länge

Primer	Sequenz
DopRI_vL1	CGCGATCTAGAACTATCCGACCACTATGCC
DopRI_vL2	ACACAAGATTTATGGCAAGTTTTATTTCTTTGG
DopRI_vL3	TAACACGAGATCCATTTATATTGCACTGAT
DopRI_vL4	CCACTATGCCGAACACGAGTTGGGAGGAGG

Primer für die Klonierung des CfDopRII über die gesamte Länge

Primer	Sequenz
DopRII_CfRVvLBgIII	GAATTCAGATCTATGCTAAATGTAGGATTGTCCATAG
DopRII_CfFWvLBgIII	GAATTCAGATCTGCCATGAATATCAGTTTCAAC

Primer für die Klonierung des CfDopRIII über die gesamte Länge

Primer	Sequenz
RvCfDopRIII	GAATTCCTCGAGATTATTTAGTTAAACAGATTTACGT
FwCfDopRIII	GAATTCGGATCCGTAAAATCATTGCCAAAATGG

Primer für die Klonierung des CfDopRI in den pSP64T

Primer	Sequenz
PrimerDopRICfmitBgIIloverhangRv	GAATTCAGATCTTTATATTGCACTGATTTTCAT
PrimerDopRICfmitBgIIloverhangFw	GAATTCAGATCTACCATGCCGAACACGAGTTG GGA

Primer für die Klonierung des CfDopRI in den pcDNA3.1(+)

Primer	Sequenz
ZDopRIIDmRv	GGATCCGCGGCCGCTATATGTAGGTCTGCTCGC
ZDopRIIDmFW	GGATCCGAATTCATGGTGGACGACAATGGCTC

Primer für die Klonierung des DmDopRII in den pSP64T

Primer	Sequenz
DopRIIDmFWBclIneu	GAATTCTGATCAACAGCACTGAGTTGCCATGGTGGACG
DopRIIDmRvBclI	GAATTCTGATCACTAAACTATATGTAGGTCTGCTCGC

Primer für die Klonierung des DmDopRI *hairpin*-Konstrukts

Primer	Sequenz
CG 9652 5' XhoI	GAATTCCTCGAGGCTATACTGCTATGCCCAGA
CG 9652 5' Asp718	GAATTCGGTACCGCTATACTGCTATGCCCAGA
CG 9652 3' XbaI	GAATTCTCTAGACGGCCCGAGTTCATC
CG 9652 3' NotI	GAATTCGCGGCCGCGCCGCGCCCGAGTTCATC

Primer für die Klonierung des DmDopRII *hairpin*-Konstrukts

Primer	Sequenz
CG 18741 5' XhoI	GAATTCCTCGAGATGGTGGACGACAATGGCTC
CG 18741 5' Asp718	GAATTCGGTACCATGGTGGACGACAATGGCTC
CG 18741 3' XbaI	GAATTCTCTAGATAATGGCGCTGGAGCAGATC
CG 18741 3' NotI	GAATTCGCGGCCGCTAATGGCGCTGGAGCAGATC

Primer für die Klonierung des DmDopRIII *hairpin*-Konstrukts

Primer	Sequenz
CG 17004 5' XhoI	GAATTCCTCGAGGAACCGCACACAAACACAAG
CG 17004 5' Asp718	GAATTCGGTACCGAACCGCACACAAACACAAG
CG 17004 3' XbaI	GAATTCTCTAGACTACGCTCGTGATCTGTCCA
CG 17004 3' NotI	GAATTCGCGGCCGCTACGCTCGTGATCTGTCCA

Primer für die Klonierung des *white hairpin*-Konstrukts

Primer	Sequenz
CG 2759 5' mit Xho I-Überhang	GAATTCCTCGAGGTGTTACCTCAGAGCTGCC
CG 2759 5' mit Asp718-Überhang	GAATTCGGTACCGTGTTACCTCAGAGCTGCC
CG 2759 3' mit Xba I-Überhang	GAATTCTCTAGAATGTCGGCTACTCCTTGCGT
CG 2759 3' mit Not I-Überhang	GAATTCGCGGCCGCATGTCGGCTACTCCTTGCGT

Primer für die Klonierung des *pfk hairpin*-Konstrukts

Primer	Sequenz
CG 4001 mit NotI-Überhang	GAATTCGCGGCCGCCGAAGTTCGTCTCTGCAATG
CG 4001 mit XhoI-Überhang	GAATTCCTCGAGAACGCACACTGCCTGAGGGC
CG 4001 mit Asp718-Überhang	GAATTCGGTACCAACGCACACTGCCTGAGGGC
CG 4001 mit XbaI-Überhang	GAATTCTCTAGACGAAGTTCGTCTCTGCAATG

7.2 Vektoren

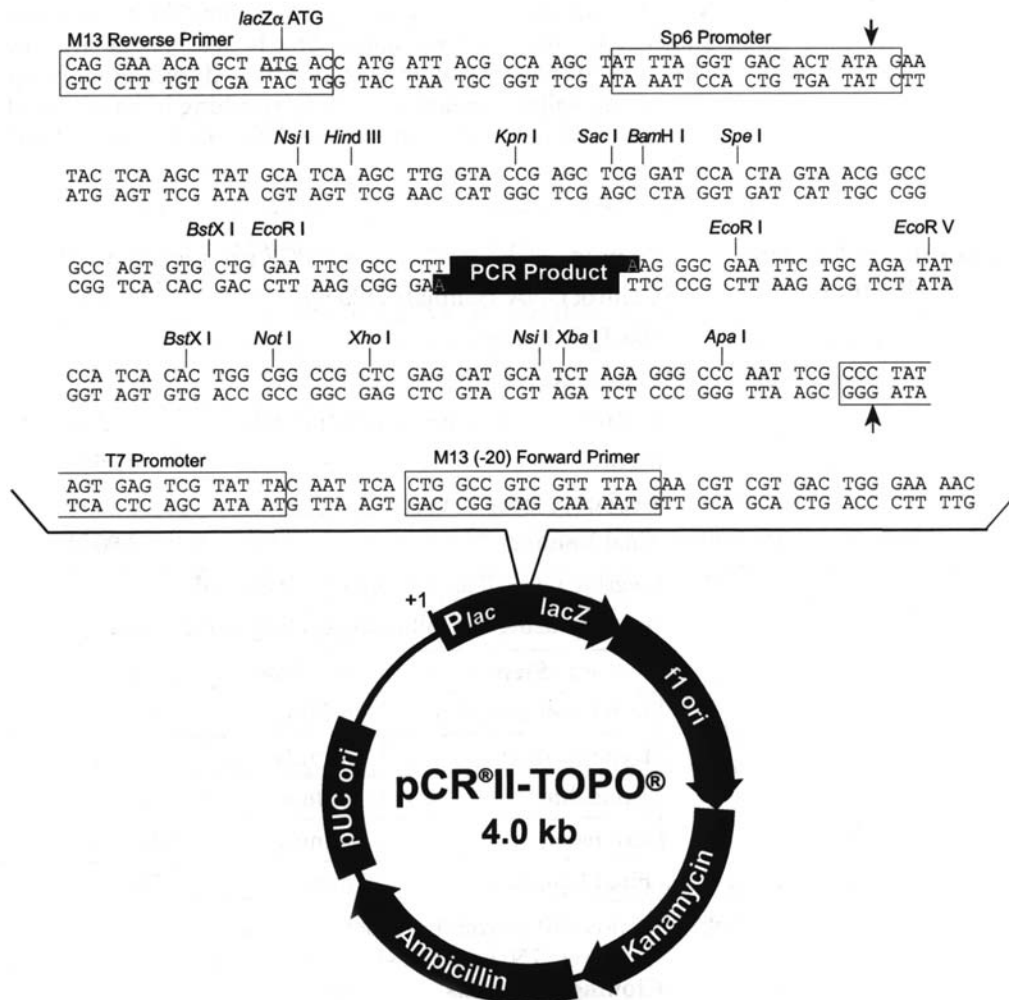


Abb. 7.1. Der Vektor pCRII-TOPO von Invitrogen. Dieser Vektor wurde z.B. zur Klonierung von Genfragmenten des CfDopRI, II bzw. III verwendet. Wurde eine Polymerase verwendet, welche Poly-Adenin-Anhänge an das Amplifikat anfügt, kann das PCR-Produkt direkt in einen pCRII-TOPO-Vektor von Invitrogen kloniert werden. Der pCRII-TOPO-Vektor liegt linearisiert mit 3'-Desoxythymidin-Überhängen vor. Das Enzym Topoisomerase aus dem *Vaccinia*-Virus ist an den 3'-Überhängen des Vektors kovalent gebunden. Die Topoisomerase katalysiert die Insertion eines PCR-Produktes und bewirkt gleichzeitig die eigene Entfernung. Der pCRII-TOPO-Vektor enthält Resistenzgene für Ampicillin und Kanamycin und diverse Schnittstellen für Restriktionsendonukleasen. Bei der Insertion des PCR-Produkts in den pCRII-TOPO-Vektor wird das vom Vektor codierte lacZ-Gen inaktiviert. Nach der Transformation in *E. coli*-Zellen kann über die Blau-Weiß-Selektion festgestellt werden, ob das PCR-Produkt in den pCRII-TOPO-Vektor enthalten ist.

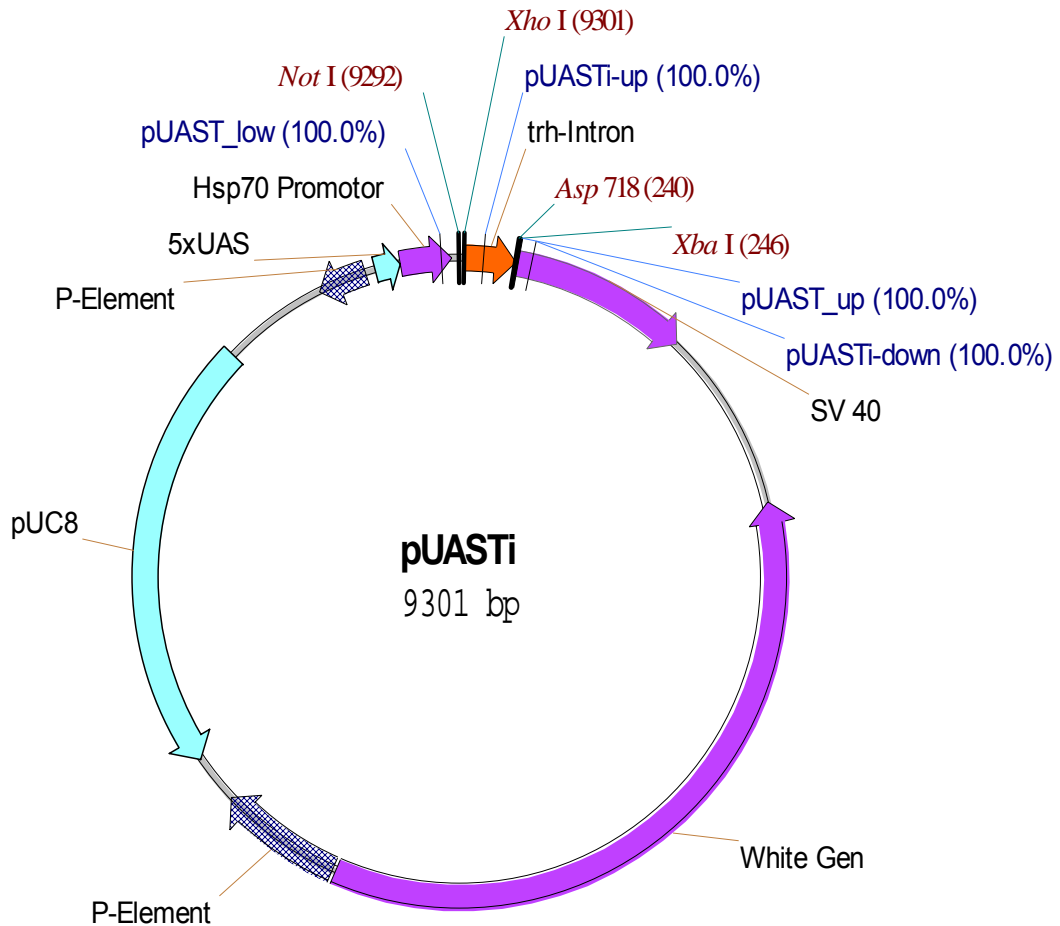


Abb. 7.2. pUASTi-Vektor. Der Vektor enthält innerhalb der P-Elementenden fünf hintereinander angeordnete UAS-Sequenzen. *Downstream* dieser UAS-Sequenzen befindet sich ein *hsp70*-Promotor, ein 244 bp langes Intron aus dem *tracheless*-Gen von *D. melanogaster* und schließlich eine SV40-Terminationssequenz. *Upstream* des Introns befinden sich im Vektor nur einmal vorkommende Restriktionsschnittstellen für die Restriktionsendonukleasen *NotI* und *XhoI*, downstream einmalige Restriktionsschnittstellen für *Asp718* und *XbaI*.

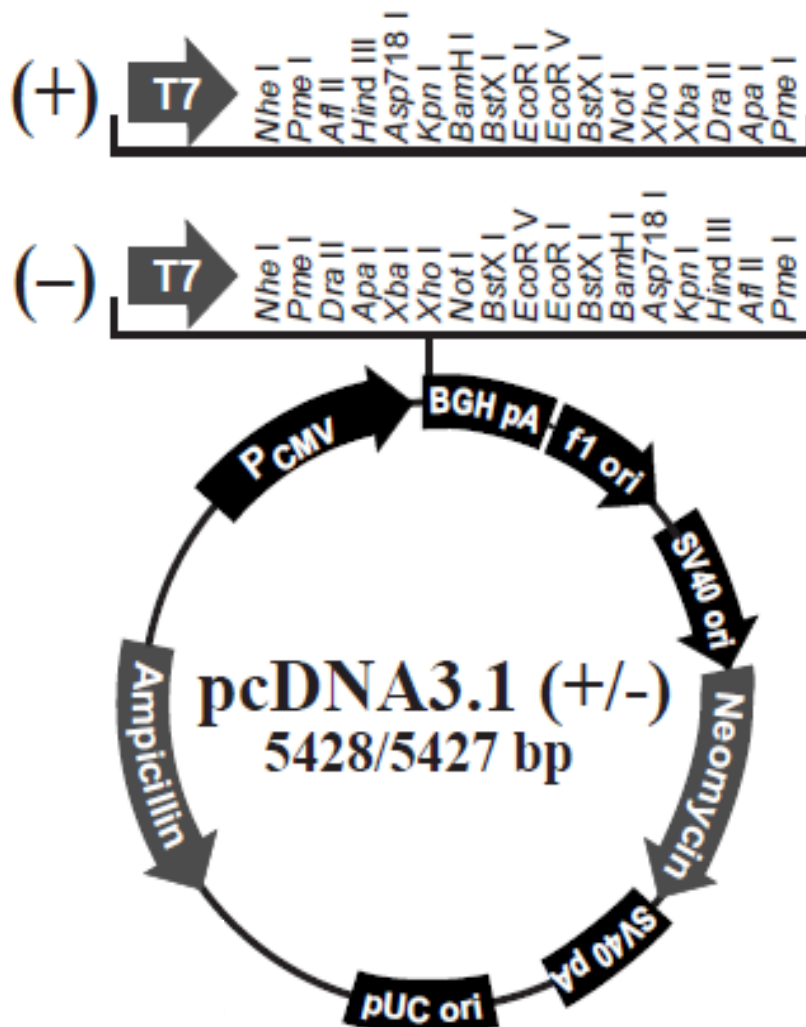


Abb. 7.3. Expressionsvektor pcDNA3.1 (+) von Invitrogen. Dieser Vektor wurde für die Expression von Dopamin-Rezeptoren in HEK293-Zellen verwendet. Über die *multiple cloning site* wurden die Gene in den Vektor einkloniert. Dieser besitzt einen T7 Promotor, an dem die Transkription beginnt, sowie eine Polyadenylierungssequenz. Weiterhin enthält der pcDNA3.1 (+) ein Neomycin- und ein Ampicillin-Resistenzgen.

7.3 Alignments bekannter Dopamin-Rezeptoren von *A. mellifera*, *D. melanogaster* und *A. gambiae*

```

AmDopRI : ----- : -
DmDopRI : MYTPHPFGFLIILVPMTNAMRAIAAIAAGVGSVAATVATSTTSSISSSTTIINTSSATTIG : 61
AgDopRI : ----- : -

AmDopRI : -----MILSQNNLTDGKE----- : 13
DmDopRI : GNHTSGSTGFSTNSTLLDADHLLPLQLTTAKVDLDIEIDIQLLTNGYDGTTLTSFYNESSWT : 122
AgDopRI : ----- : -

-----TMH1-----
AmDopRI : -----DQPENTFSLLSVLLVGFLLILIFLSVAGNILVCVAIYTDRLRRIGNLFLA : 65
DmDopRI : NASEMDTIVGEEPEPLSLVSIIVVVGIFLSVLIFLSVAGNILVCLAIYTERSLRRIGNLFLA : 183
AgDopRI : -----TFVSYAIAGVFLSIVIFLSVAGNILVCLAIYTERSLRRIGNLFLA : 45

--TMH2----- --TMH3-----
AmDopRI : SLAIADLDFVGCLVMTFAGVNDLLGYWVFGPRFCDTWIAFDVVCSTASILNLCALSLDRYIH : 126
DmDopRI : SLAIADLDFVASLVMTFAGVNDLLGYWIFGAQFCDTWVAFDVMCSTASILNLCALSMDRYIH : 244
AgDopRI : SLAIADLDFVASLVMTFAGVNDLLGYWIFGAQFCDTWVAFDVMCSTASILNLCALSLDRYIH : 106

-----TMH4-----
AmDopRI : IKDPLRYGRWVTRRIAIVAGIAVVWLLAGLISFVPI SLGLHRANEP---VVLDDSKKEEHP TC : 184
DmDopRI : IKDPLRYGRWVTRRVAVITIAAWLLAAFVVSFVPI SLGIHRPDQP---LIFEDNGKKYPTC : 302
AgDopRI : IKDPLRYGRWVTRRVAIGTIAVWLLAALVSVFVPI SLDLHRDKRDKTDTSLKINGIKYETC : 167

-----TMH5-----
AmDopRI : ALDLTPTYAVVSSSISFYVPCIVMLGIYCRLYCYAQKHVKSIRAVTKLPDTSMA---KSFV : 242
DmDopRI : ALDLTPTYAVVSSCISFYFPCVVMIGIYCRLYCYAQKHVKSIAVTRPGEVAEKQRYKSIR : 363
AgDopRI : ALDLTPTYAVVSSCISFYVPCIVMIGIYCRLYCYAQKHVKSIRAVTRPGEISEK-RYRSIR : 227

-----TMH6-----
AmDopRI : RKVHATKPPKPQTK-TKPTSPYHVS DHKAAITVGVIMGVFLICWVPPFCVNI VTSYCKT CI : 302
DmDopRI : RPKNQPKKFKVRNL-HTHSSPYHVS DHKAAVTVGVIMGVFLICWVPPFCVNI TAAFCKT CI : 423
AgDopRI : RPKSSKNKLKLRQLAHTASSPYHVS DHKAAITVGVIMGVFLICWVPPFCVNI IAAFCKT CI : 288

-----TMH7-----
AmDopRI : SGRAEQVLTWLGYSNSAFNP I IYSIFNTEFREAFKRILT KGARARGNQPSTSECGEFRSVV : 363
DmDopRI : GGQTFKILT WLGYSNSAFNP I IYSIFNKEFRDAFKRILTMRNPWCCAQDVGNIHPRNSDRF : 484
AgDopRI : GQQTFKVL SWLGYSNSAFNP I IYSIFNTEFREAFKRILTSRSSWCCGQEMGN IYPRSSDRY : 349

AmDopRI : VQKRNGSMIECNI SPRSSADSCQVGIMAQRHRDTIVSAI : 402
DmDopRI : ITDYAAKNVVMNSGRSSAELEQV-----SAI : 511
AgDopRI : VTDYAAKN-VVMNSGRSSADLEQV-----SAI : 375

```

Abb. 7.4. Alignment der Dopamin-Rezeptoren I von *A. mellifera* (Am), *D. melanogaster* (Dm) und *A. gambiae* (Ag). Über alle drei Sequenzen konservierte Aminosäuren sind rot, blaue Aminosäuren sind über zwei Sequenzen konserviert. Die Transmembran-Helices (TMH) sind eingezeichnet.

```

AmDopRII : ---MNESAVYLLGSEEEGN-----QLNR-----SFY----- : 23
DmDopRII : MVDDNGSSPEVEGAEGAGAPLLALLRVDGLNQTQTRSPSPSFFGSGYNI SEDVYFYFNGLP : 60
AgDopRII : ---MMSNASEVPWEFLQLT-----ALTN-----ISFYN----- : 25

-----TMH1
AmDopRII : -----SASYPPQNRSQ-----EDLWNLATDRAGLAILLFLFSV : 57
DmDopRII : TSTELVLNATTSATLSPAMVATGGGGTTTPEPDLSEFLEALPNDRVGLLAFLLFLFSF : 120
AgDopRII : -----VSHGSVEFSINCGSVVFN-----FSNYIVSLPNDKAGLLTFLLLFSF : 67

-----TMH2-----
AmDopRII : ATVFGNTLVILAVRERYLHTATNYFVTSLAFADCLVGLVVMPPFSAIYEVLNRWLFSTD : 117
DmDopRII : ATVFGNSLVILAVIRERYLHTATNYFITSLAVADCLVGLVVMPPFSALYEVLNTWFFGTD : 180
AgDopRII : TTVFGNSLVILAVIRERYLHTATNYFVTSLAVADCLVGLVVMPPFSALYEVLQNTWFFGTD : 127

-----TMH3-----TMH4--
AmDopRII : WCDVWRSLDVLVSTASILNLCVISLDRYWAITDPFTYPSKMSRRRAAVLIAIVWICSSAI : 177
DmDopRII : WCDIWRSLDVLVSTASILNLCVISLDRYWAITDPFSYPMRMTVKRAAGLIAAVWICSSAI : 240
AgDopRII : WCDIWRSLDVLVSTASILNLCVISLDRYWAITDSFSYPMKMRQKAVLVIAAVWICSSAI : 187

-----TMH5-----
AmDopRII : SFPPIVWRAVRTEVPEDKCPFTEHLGYLIFSSTISFYLPFLVMVFYTYKIYRAAVIQT : 237
DmDopRII : SFPPIVWRAARDGEMPAYKCTFTEHLGYLVFSSISFYLPPLVMVFYTYCRIYRAAVIQT : 300
AgDopRII : SFPAILWRAVRETDMLPFKCTFTEHLGYLVFSSIIISFYLPPIVMVFYTYCRIYRAAAVQT : 247

AmDopRII : KSLKLGTKQVLMASGELELTLRIHRGGTNTDAR-----HLFRTASST : 280
DmDopRII : RSLKIGTKQVLMASGELQLTLRIHRGGTRDQQNQVSGGGGGGGGGGGGSLSHSHS : 360
AgDopRII : RSLKLGTKQVLMASGELQLTLRIHRGGTRERLNHPRLAASDHYQQFQHLDQMOPNTQPS : 307

AmDopRII : PEDLQD-----LEEPLTTIQHNN---CLTRIPSTRINKQH--TRGNFSLSRKLAKFA : 328
DmDopRII : HHHHHN-----HGGGTTTSTPEEPDDEPLSALHNGLARHR--HMGKNFSLSRKLAKFA : 412
AgDopRII : LSTQHQPFLKKLHQLQTNTSTPDDPDEPLSALENNIGGRHRVHMGKHFSLSRKLTKFA : 367

-----TMH6-----TMH7--
AmDopRII : KEKKAAKTLGIVMGVFIIICWLPFFVNVNLSGFCSCQIWQEKIVFAAVTWLWGWINSGMNPV : 388
DmDopRII : KEKKAAKTLGIVMGVFIIICWLPFFVNVNLSGFCIECIEHEEIVSAIVTWLWGWINSGMNPV : 472
AgDopRII : KEKKAAKTLGIVMGVFIICWMPFFVNVNLSGFCMDCIAHEEIVSAVVTWLWGWINSGMNPV : 427

-----
AmDopRII : IYACWSRDFRRAFVRILCACCPGRVRRRYQPAFRCKPSQRFASGRYYSAYSLHVRSSRE : 448
DmDopRII : IYACWSRDFRRAFVRLLCMPCKPRKIRKYQPTMRSK-SQRFATRRCYSTCSLHGIQVHRH : 531
AgDopRII : IYACWSRDFRRAFRLILCVCCPRKRLKYQPTRRSIASIGFETMLLHLLTSDWDTTSAAKL : 487

AmDopRII : SSCEQTYI : 456
DmDopRII : NSCEQTYI : 539
AgDopRII : MRTDAY-- : 493

```

Abb. 7.5. Alignment der Dopamin-Rezeptoren II von *A. mellifera* (Am), *D. melanogaster* (Dm) und *A. gambiae* (Ag). Über alle drei Sequenzen konservierte Aminosäuren sind rot, blaue Aminosäuren sind über zwei Sequenzen konserviert. Die Transmembran-Helices (TMH) sind eingezeichnet.

```

AmDopRIII : MGTKTGDQSLLGSIARSLSLDRRARRGAADLSLGNATKVNTVHEEESLNDLFSGPE : 58
DmDopRIIIc : -----MLLLENFNDFYFPNYNGS-----TVSGTSTIAPGVAITGSRGSGLLLEQN : 44
DmDopRIIIId : -----MLLLENFNDFYFPNYNGS-----TVSGTSTIAPGVAITGSRGSGLLLEQN : 44
DmDopRIIIb : -----MLLLENFNDFYFPNYNGS-----TVSGTSTIAPGVAITGSRGSGLLLEQN : 44
DmDopRIIIa : -----MLLLENFNDFYFPNYNGS-----TVSGTSTIAPGVAITGSRGSGLLLEQN : 44
AgDopRIII : -----MLLLENFNDFYFPNYNGS-----TVSGTSTIAPGVAITGSRGSGLLLEQN : -

AmDopRIII : ESRGGVELGCAFVNLTAYDGGANLNLNGTVNCTSSIASSGVVSAGECGPAADVDEKT : 116
DmDopRIIIc : LTG-----LYLDGYRLNCTNETLNLTDSCGELRVVDH----- : 76
DmDopRIIIId : LTG-----LYLDGYRLNCTNETLNLTDSCGELRVVDH----- : 76
DmDopRIIIb : LTG-----LYLDGYRLNCTNETLNLTDSCGELRVVDH----- : 76
DmDopRIIIa : -----LYLDGYRLNCTNETLNLTDSCGELRVVDH----- : -
AgDopRIII : -----LYLDGYRLNCTNETLNLTDSCGELRVVDH----- : -

-----TMH1-----
AmDopRIII : DANSSWWALILVIVPCLTLFGNVLVILAVVRERALQTVTNYFIVSLAVADLLVAVLVMP : 174
DmDopRIIIc : ---NYWALILILFPILTLFGNVLVILSVCRERSLQTVTNYFIVSLAIADLLVAVVMP : 131
DmDopRIIIId : ---NYWALILILFPILTLFGNVLVILSVCRERSLQTVTNYFIVSLAIADLLVAVVMP : 131
DmDopRIIIb : ---NYWALILILFPILTLFGNVLVILSVCRERSLQTVTNYFIVSLAIADLLVAVVMP : 131
DmDopRIIIa : -----MSAPK----- : 5
AgDopRIII : -----MSAPK----- : -

-----TMH3-----
AmDopRIII : FAVYVLVNGSWSLPGFVCDFYIAMDVICTSSIFNLVAISIDRYIAVTQPIKYAKHKN : 232
DmDopRIIIc : FAVYFLVNGAWALPDVCDFYIAMDVICTSSIFNLVAISIDRYIAVTQPIKYAKHKN : 189
DmDopRIIIId : FAVYFLVNGAWALPDVCDFYIAMDVICTSSIFNLVAISIDRYIAVTQPIKYAKHKN : 189
DmDopRIIIb : FAVYFLVNGAWALPDVCDFYIAMDVICTSSIFNLVAISIDRYIAVTQPIKYAKHKN : 189
DmDopRIIIa : -----VNGAWALPDVCDFYIAMDVICTSSIFNLVAISIDRYIAVTQPIKYAKHKN : 57
AgDopRIII : -----MDVICCTSSIFNLVAISIDRYIAVTQPIKYAKHKN : 35

-----TMH4-----
AmDopRIII : NRRVWLTILLVWAISAAIGSPIVLGLNNTPDRTPDQCLFYNTDFIIYSSLSSFYIPCI : 290
DmDopRIIIc : SRRVCLTILLVWAISAAIGSPIVLGLNNTPNREPDVCAFYNADFILYSSLSSFYIPCI : 247
DmDopRIIIId : SRRVCLTILLVWAISAAIGSPIVLGLNNTPNREPDVCAFYNADFILYSSLSSFYIPCI : 247
DmDopRIIIb : SRRVCLTILLVWAISAAIGSPIVLGLNNTPNREPDVCAFYNADFILYSSLSSFYIPCI : 247
DmDopRIIIa : SRRVCLTILLVWAISAAIGSPIVLGLNNTPNREPDVCAFYNADFILYSSLSSFYIPCI : 115
AgDopRIII : SRRVCLTILLVWAISAAIGSPIVLGLNNTQDRSPDLQDFYNTDFIVYSSLTSFYIPCI : 93

-----
AmDopRIII : IMVFLYWNIFKALRSRARKQRAARKPHLSELTGG-SVIENIAQTRRLAETALD-SSRH : 343
DmDopRIIIc : IMVFLYWNIFKALRSRARKQRAARKPHLSELTGG-SVIENIAQTRRLAETALD-SSRH : 303
DmDopRIIIId : IMVFLYWNIFKALRSRARKQRAARKPHLSELTGG-SVIENIAQTRRLAETALD-SSRH : 303
DmDopRIIIb : IMVFLYWNIFKALRSRARKQRAARKPHLSELTGG-SVIENIAQTRRLAETALD-SSRH : 303
DmDopRIIIa : IMVFLYWNIFKALRSRARKQRAARKPHLSELTGG-SVIENIAQTRRLAETALD-SSRH : 171
AgDopRIII : IMVFLYWNIFKALRTRAKKQRAARKPHLSEITAGSIIENIAQTKRLAETQLDGSTRS : 151

AmDopRIII : AALVAPGMEEPNTASGSNEEDEDETPLDP---VVVISNDKSTEFFLATVVEEAACR- : 396
DmDopRIIIc : ASRILPD-EAANTASGSNEEEDENAI SPDIDDCHVIVNDKSTEFMLATVVEETGN-- : 358
DmDopRIIIId : ASRILPD-EAANTASGSNEEEDENAI SPDIDDCHVIVNDKSTEFMLATVVEETG--- : 357
DmDopRIIIb : ASRILPD-EAANTASGSNEEEDENAI SPDIDDCHVIVNDKSTEFMLATVVEETGNSV : 360
DmDopRIIIa : ASRILPD-EAANTASGSNEEEDENAI SPDIDDCHVIVNDKSTEFMLATVVEETGNSV : 228
AgDopRIII : GSKILPDEERPNTASGSNEEEDENAGSPDIDDCHVIVNDKSTEFMLATVVEEAGN-- : 207

```

Fortsetzung des *alignments* auf der folgenden Seite


```

AmDopRIII  : -FSAVAQAQLGGERQNGRKDSGYDGAASTAVIHEPVVETNSSPSNPRIASAPSSSTS : 453
DmDopRIIIc : ----- : -
DmDopRIIIId : ----- : -
DmDopRIIIb : VAQITTQPQLVVADPNGNHDSGYAASNVDVLAGVAPASASAATSAAAPRSSGSPDPS : 418
DmDopRIIIa : VAQITTQPQLVVADPNGNHDSGYAASNVDVLAGVAPASASAATSAAAPRSSGSPDPS : 286
AgDopRIII  : VVAQIATTQQVPSDPNGNHDSGYAPSSIADALAVNATPPESLNVATVIVNKSATIRS : 265

AmDopRIII  : SSPP-----AKGAAAAGQSSKRNGGETNKQELKRLKSTVSLPL : 492
DmDopRIIIc : -----VAMKPLSFVRYGVQEAMT : 376
DmDopRIIIId : ----- : -
DmDopRIIIb : LPSGATLQRSSVSSQRRPTGDESPKRGEALRSVGVNDSVAMKPLSFVRYGVQEAMT : 476
DmDopRIIIa : LPSG-----ATLQRSSVSSQRRPTGDDSPKRGEALRSVAMKPLSFVRYGVQEAMT : 336
AgDopRIII  : RNGS-----PRKEASVTLKPLSLVRCGVQQUALT : 293

---

AmDopRIII  : PLARTPSVMSASSTCKDKKNAGSGSRFTIYKANKASKKKREKSSAKKERKATKT LAI : 550
DmDopRIIIc : LARNDSLSTTSKTSSRKDKKNSQASRFTIYKVKASKKKREKSSAKKERKATKT LAI : 434
DmDopRIIIId : -----KFTIYKVKASKKKREKSSAKKERKATKT LAI : 389
DmDopRIIIb : LARNDSLSTTSKTSSRKDKKNSQASRFTIYKVKASKKKREKSSAKKERKATKT LAI : 534
DmDopRIIIa : LARNDSLSTTSKTSSRKDKKNSQASRFTIYKVKASKKKREKSSAKKERKATKT LAI : 394
AgDopRIII  : LNRNDSLSTNSRDSSRKDKKNTQASRFTIYKVKASKKKREKSSAKKERKATKT LAI : 351

-----TMH6-----
AmDopRIII  : VLGVFLICWLPFFTCNIMDAICTKLTADCQPGVTAFLVTSWLGYMNSFVNPIYTVFN : 608
DmDopRIIIc : VLGVFLFCWLPFFSCNIMDAMCAKFKKDCRPGLTAYMNTTWLGYINSFVNPIYTVFN : 492
DmDopRIIIId : VLGVFLFCWLPFFSCNIMDAMCAKFKKDCRPGLTAYMNTTWLGYINSFVNPIYTVFN : 447
DmDopRIIIb : VLGVFLFCWLPFFSCNIMDAMCAKFKKDCRPGLTAYMNTTWLGYINSFVNPIYTVFN : 592
DmDopRIIIa : VLGVFLFCWLPFFSCNIMDAMCAKFKKDCRPGLTAYMNTTWLGYINSFVNPIYTVFN : 452
AgDopRIII  : VLGVFLFCWVPFFTCNIMDAMCAKLDKDCRPGVTIFNLTTWLGYMNSFVNPIYTVFN : 409

-----TMH7-----

AmDopRIII  : PEFRKAFHKLVSF- : 621
DmDopRIIIc : PEFRKAFKKIMHMG : 506
DmDopRIIIId : PEFRKAFKKIMHMG : 461
DmDopRIIIb : PEFRKAFKKIMHMG : 606
DmDopRIIIa : PEFRKAFKKIMHMG : 466
AgDopRIII  : PEFRKAFKKIMHI- : 422

```

Abb. 7.6. Alignment der Dopamin-Rezeptoren III von *A. mellifera* (Am), *D. melanogaster* (Dm) und *A. gambiae* (Ag). Über alle Sequenzen konservierte Aminosäuren sind rot, blaue Aminosäuren sind über fünf, grüne Aminosäuren über vier Sequenzen konserviert. Die Transmembran-Helices (TMH) sind eingezeichnet. Von *D. melanogaster* wurden mehrere Varianten des DmDopRIII in das alignment einbezogen: DmDopRIIIa (CG17004), DmDopRIIIb (DD2R-606), DmDopRIIIc (DD2R-506), DmDopRIIIId (DD2R-461). Für den Dopamin-Rezeptor III von *D. melanogaster* sind acht verschiedene Isoformen beschrieben worden (Hearn *et al.*, 2002). Für das alignment wurden vier Isoformen ausgewählt, welche in drei Fällen die typischen sieben Transmembran-Helices und in einem Fall nur fünf Transmembran-Helices besaßen. Der Rezeptor AgDopRIII (Hill *et al.*, 2002) wies ebenfalls eine reduzierte Anzahl an Transmembran-Helices auf.

7.4 Marker

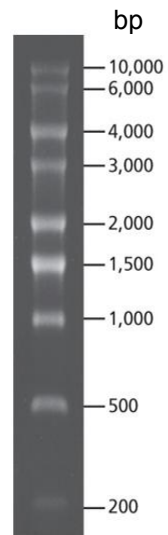


Abb. 7.7. Verwendeter RNA-Marker für Formaldehyd-Agarosegele. Das Bild zeigt die Elektrophorese des 0,2-10 kb RNA-Markers von Sigma. Die Größe der Fragmente ist neben den jeweiligen Banden in bp angegeben.

Meine akademischen Lehrer

Zoologie	A. Dorresteijn, G. Eisenbeis, A. Fischer, U. Höger, K. Honomichl, G. Kamp, R. J. Markl, C. Mora-Ferrer Ch. Neumeyer, Rupprecht, M. Veith, G. Wegener, U. Wolfrum
Mikrobiologie	C. Harald, H. König, G. Unden
Biochemie	F. Fahrenholz, K. Gehrig, R. Postina, H.-J. Schäfer
Botanik	M. Decker, W. Kadereit, H. Paulsen, G. Rothe, W. Wernicke
Genetik	T. Hankeln, W. Hennig, E. R. Schmidt, G. Technau
Chemie	M. Dräger, K. Rück-Braun, K. Unger, W. Vogt
Physik	H.-J. Arends, K. Jakobs

Lebenslauf

Name Sonja Gerber
Geburtstag 13. März 1978
Geburtsort Wiesbaden-Sonnenberg

PROMOTION

11/2003 – 01/2007 Dissertation mit dem Thema „**Identifikation und Charakterisierung neuer G-Protein gekoppelter Rezeptoren des Katzenflohs *Ctenocephalides felis***“ an der Eberhard-Karls-Universität, Tübingen unter der Anleitung von PD Dr. P. M. Selzer und Prof. Dr. M. Duszenko in Kooperation mit der Intervet Innovation GmbH.

STUDIUM

01/2003 – 10/2003 Diplomarbeit mit dem Thema „**Untersuchung zur RNAi-induzierten Genrepression in adulten Stadien der Taufliege *Drosophila melanogaster***“ an der Johannes-Gutenberg-Universität, Mainz unter der Anleitung von PD Dr. P. M. Selzer und Prof. Dr. G. Technau in Kooperation mit der Intervet Innovation GmbH.

10/1998 – 10/2003 Diplomstudium der Biologie an der Johannes-Gutenberg-Universität, Mainz.

11/2000 – 12/2002 Hauptstudium der Biologie
Schwerpunkte: Biochemie, Alzheimer-Forschung
Mikrobiologie und Zoologie.

10/1998 – 10/2000 Grundstudium der Biologie

SCHULBILDUNG

08/1989 – 06/1998 Main-Taunus-Gymnasium, Hofheim

06/1998 Abitur