



Identifizierung und Charakterisierung von GABA_A-Rezeptoren aus Zecken

Inaugural-Dissertation

zur

Erlangung des Doktorgrades
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von

Melania Akköse, geb. Joannou

aus Dormagen

Düsseldorf, Mai 2015

Aus dem Institut für Biochemische Pflanzenphysiologie
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Gedruckt mit der Genehmigung der
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der
Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Referent: Prof. Dr. Georg Groth

Korreferent: Prof. Dr. Dieter Willbold

Tag der mündlichen Prüfung: 8. Juli 2015

Der Beginn aller Wissenschaften ist das Erstaunen,
dass die Dinge so sind, wie sie sind.

Aristoteles (384 - 322 v.Chr.)

Meiner Familie

Inhaltsverzeichnis

| | | |
|-------------|--|-----------|
| I | Einleitung | 1 |
| I.1 | Die Zecke | 1 |
| I.1.1 | Systematik und Ökologie | 1 |
| I.1.2 | Einfluss von Zecken auf die Wirtschaft | 4 |
| I.1.3 | Human- und veterinärmedizinische Relevanz | 6 |
| I.2 | Zeckenbekämpfung | 8 |
| I.2.1 | Einsatz chemischer Parasitizide | 8 |
| I.2.2 | Frühe Therapieversuche | 8 |
| I.2.2.1 | Chlororganische Verbindungen | 9 |
| I.2.2.2 | Organophosphate und Carbamate | 10 |
| I.2.2.3 | Amidine und Makrozyklische Laktone | 10 |
| I.2.2.4 | Pyrethroide | 11 |
| I.2.2.5 | Phenylpyrazole | 13 |
| I.2.2.6 | Neue Insektizid- und Akarizidklassen mit GABAerger Wirkung | 13 |
| I.2.3 | Nicht chemische Alternativen | 14 |
| I.2.3.1 | Impfstoffe gegen Zecken | 14 |
| I.2.3.2 | Biologische Methoden der Zeckenbekämpfung | 14 |
| I.2.4 | Akarizidresistenz | 15 |
| I.3 | Der GABA-Rezeptor | 17 |
| I.3.1 | Aufbau und Funktion | 17 |
| I.3.2 | Lokalisation von GABA _A -Rezeptoren | 19 |
| I.3.3 | Pharmakologie von GABA _A -Rezeptoren in Säugern | 20 |
| I.3.4 | GABA _A -Rezeptoren in Insekten | 22 |
| I.3.5 | GABA _A -Rezeptoren in Zecken | 25 |
| I.4 | Zielsetzung | 26 |
| II | Material & Methoden | 27 |
| II.1 | Material | 27 |
| II.1.1 | Zecken | 27 |
| II.1.2 | Bakterienstamm | 27 |
| II.1.3 | Eukaryotische Zelllinie | 27 |
| II.1.4 | Chemikalien und Enzyme | 28 |
| II.1.5 | Puffer und Lösungen | 30 |
| II.1.6 | Kommerzielle Kits | 31 |

| | | |
|-------------|--|-----------|
| II.1.7 | Nährmedien | 31 |
| II.1.8 | Primer | 32 |
| II.2 | Geräte | 33 |
| II.3 | Molekularbiologische Methoden | 34 |
| II.3.1 | RNA-Extraktion | 34 |
| II.3.2 | Reverse Transkription (Erststrang-cDNA-Synthese) | 34 |
| II.3.3 | DNA-Amplifikation durch Polymerase-Kettenreaktion (PCR)..... | 35 |
| II.3.4 | Nukleinsäuretrennung mittels Agarose-Gelelektrophorese..... | 36 |
| II.3.5 | Extraktion von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen | 36 |
| II.3.6 | Bestimmung der RNA- und DNA-Konzentration | 36 |
| II.3.7 | DNA-Präzipitation | 37 |
| II.3.8 | Klonierung und Transformation | 37 |
| II.3.9 | Kolonie-PCR | 37 |
| II.3.10 | Plasmidpräparation | 38 |
| II.3.11 | Sequenzierung und Sequenzanalyse | 38 |
| II.3.12 | Subklonierung | 39 |
| II.3.13 | In-vitro Transkription..... | 40 |
| II.4 | Elektrophysiologische Methoden | 40 |
| II.4.1 | Zwei-Elektroden-Spannungsklemme..... | 40 |
| II.4.1.1 | Gewinnung der Oozyten und RNA-Injektion | 40 |
| II.4.1.2 | Ansatz der Testsubstanzen für elektrophysiologische Experimente. | 41 |
| II.4.1.3 | Elektrophysiologische Ableitungen | 41 |
| II.5 | Zellbiologische und biochemische Methoden | 42 |
| II.5.1 | Kultivierung von Säugetierzellen | 42 |
| II.5.1.1 | Passagieren der Zellen..... | 42 |
| II.5.1.2 | Zellzahlbestimmung..... | 42 |
| II.5.1.3 | Kryokonservierung und Auftauen der Zellen..... | 42 |
| II.5.2 | Generation der stabilen Zelllinie | 43 |
| II.5.2.1 | Transfektion..... | 43 |
| II.5.2.2 | Membranpotential-Assay | 43 |
| II.5.2.3 | Einzelzellklonierung | 47 |
| II.6 | Datenanalyse | 48 |

| | | |
|--------------|--|-----------|
| III | Ergebnisse | 49 |
| III.1 | Molekularbiologische Ergebnisse | 49 |
| III.1.1 | Datenbankanalyse | 49 |
| III.1.2 | Amplifikation der <i>rdl</i> -Sequenz verschiedener Zeckenspezies | 51 |
| III.1.3 | Analyse der identifizierten <i>rdl</i> -Sequenzen | 52 |
| III.2 | Elektrophysiologische Charakterisierung von RDL-Rezeptoren aus Zecken | 57 |
| III.2.1 | Expressionsstudie | 58 |
| III.2.2 | Messung von GABA _A -Rezeptor-Agonisten an IRRDL und RMRDL1 | 60 |
| III.2.3 | Messung von GABA _A -Rezeptor-Antagonisten an IRRDL und RMRDL1 | 62 |
| III.3 | Stabile Expression des RDL-Rezeptors der Rinderzecke in CHO-Zellen | 65 |
| III.3.1 | Kontrollmessungen der CHO Zellen | 65 |
| III.3.2 | Generation der stabilen Zelllinie | 67 |
| III.3.2.1 | Selektion der Klonpopulation | 68 |
| III.3.2.2 | Einzelzellklonierung | 69 |
| III.3.3 | Assay-Optimierung | 70 |
| III.3.3.1 | Beladungszeit | 71 |
| III.3.3.2 | Einfluss der Tyrode auf den Membranpotential-Assay | 72 |
| III.3.3.3 | Bestimmung der optimalen Zellzahl | 74 |
| III.3.3.4 | DMSO-Toleranz des Assays | 76 |
| III.3.4 | Pharmakologie bekannter Substanzen am stabil exprimierten RDL-Rezeptor der Rinderzecke | 77 |
| IV | Diskussion | 80 |
| IV.1 | Identifizierung der RDL-Untereinheit aus Zecken | 80 |
| IV.1.1 | Das Signalpeptid | 81 |
| IV.1.2 | Charakteristische Motive und bekannte resistenzverursachende Mutationen des GABA _A -Rezeptors | 82 |
| IV.1.3 | Spleiß-Varianten | 83 |
| IV.1.4 | RNA-Editing | 85 |
| IV.1.5 | Molekulare Phylogenie | 86 |
| IV.2 | Funktionelle Expression der Zecken-RDL-Rezeptoren in <i>Xenopus laevis</i>-Oozyten | 88 |
| IV.2.1 | Pharmakologie bekannter GABAerger Verbindungen an den RDL-Rezeptoren aus <i>Ixodes ricinus</i> und <i>Rhipicephalus microplus</i> bei transienter Expression in <i>Xenopus laevis</i> -Oozyten | 90 |
| IV.3 | Entwicklung und Charakterisierung der stabilen Zelllinie | 92 |
| IV.3.1 | Pharmakologie bekannter GABAerger Verbindungen an RMRDL1 bei stabiler Expression in CHO-Zellen | 92 |

| | |
|---|------------|
| V Zusammenfassung..... | 97 |
| VI Abstract..... | 98 |
| VII Literaturverzeichnis | 99 |
| VIII Anhang | 122 |
| VIII.1 Ergänzende Daten | 122 |
| VIII.1.1 Plasmidkarten der Zecken- <i>rdll</i> pcDNA3.1(+)-Konstrukte | 122 |
| VIII.1.2 Vollständige cDNA-Sequenzen und abgeleitete Aminosäuresequenzen | 128 |
| VIII.2 Abkürzungsverzeichnis | 134 |
| VIII.3 Abbildungsverzeichnis | 135 |
| VIII.4 Tabellenverzeichnis | 137 |
| VIII.5 Selbstständigkeitserklärung | 138 |
| VIII.6 Veröffentlichungen und Tagungsbeiträge..... | 139 |
| VIII.7 Danksagung..... | 140 |

I Einleitung

I.1 Die Zecke

I.1.1 Systematik und Ökologie

Zecken sind blutsaugende Arthropoden, die an einer Reihe von Wirbeltieren, z.B. Vögel, Amphibien, Reptilien oder Säugetiere parasitieren (ANDERSON & MAGNARELLI, 2008). Innerhalb des Stamms Arthropoda unterscheidet man den Unterstamm der Mandibulata, dem Insekten (Insecta) und Krebstiere (Crustacea) zugeordnet werden, von dem Unterstamm der Chelicerata, zu dem Spinnentiere (Arachnida) gehören (GIRIBET & EDGECOMBE, 2013). Zecken und Milben werden unter den Spinnentieren zur Subklasse der Acari zusammengefasst. Weltweit gibt es 878 Zeckenspezies, die in drei große Familien eingeteilt werden: die Schildzecken (Ixodidae), die Lederzecken (Argasidae) und die aus nur einer südafrikanischen Spezies bestehende Nuttalliellidae, die Merkmale der beiden anderen Familien vereinen. Bereits 1948 gab es die ersten Hypothesen über evolutionäre Beziehungen von Zecken. Die erste Publikation über die Verwandtschaftsverhältnisse dieser Familien in Form eines phylogenetischen Baums wurde jedoch erst 1982 veröffentlicht (HOOGSTRAAL & AESCHLIMANN, 1982) (vgl. Abb. I.1). Dieser Baum basierte auf der Morphologie der Zecken, den Charakteristika ihres Lebenszyklus und der Art und Lebensweise ihres Wirtes. Hierbei wurden die Schildzecken aufgrund ihrer unterschiedlichen Morphologie weiter in zwei Gruppen unterteilt. Zum einen die Prostriata, die allein aus der Gattung Ixodes besteht und sich nach HOOGSTRAAL & AESCHLIMANN (1982) als erste Gruppe von einem gemeinsamen Vorfahren differenziert haben. Zum anderen die Metastrata, die die vier Subfamilien Amblyomminae, Haemaphysalinae, Hyalomminae und Rhipicephalinae vereint (BLACK & PIESMAN, 1994; BARKER & MURRELL, 2004).

Mit fortschreitender Entwicklung der Molekularbiologie entstand das Fachgebiet der molekularen Phylogenie. Mit deren Methoden wurde in den 1990er Jahren auch die Systematik von Zecken unter molekularbiologischen Gesichtspunkten untersucht (BARKER & MURRELL, 2004). Diese Analysen werden mit Hilfe von molekularen Markern durchgeführt, bevorzugt in bestimmten Regionen der ribosomalen Gene

(NAVA *et al.*, 2009). Eine bedeutende systematische Veränderung, die aus diesen Untersuchungen hervorging, war die Einbeziehung der ursprünglichen Gattung *Boophilus* in die Gattung *Rhipicephalus*. Die Rinderzecke wird daher fortan als *Rhipicephalus microplus* bezeichnet. Der Name *Boophilus* wird jedoch weiterhin als Untergattung verwendet (MURREL & BARKER, 2003).

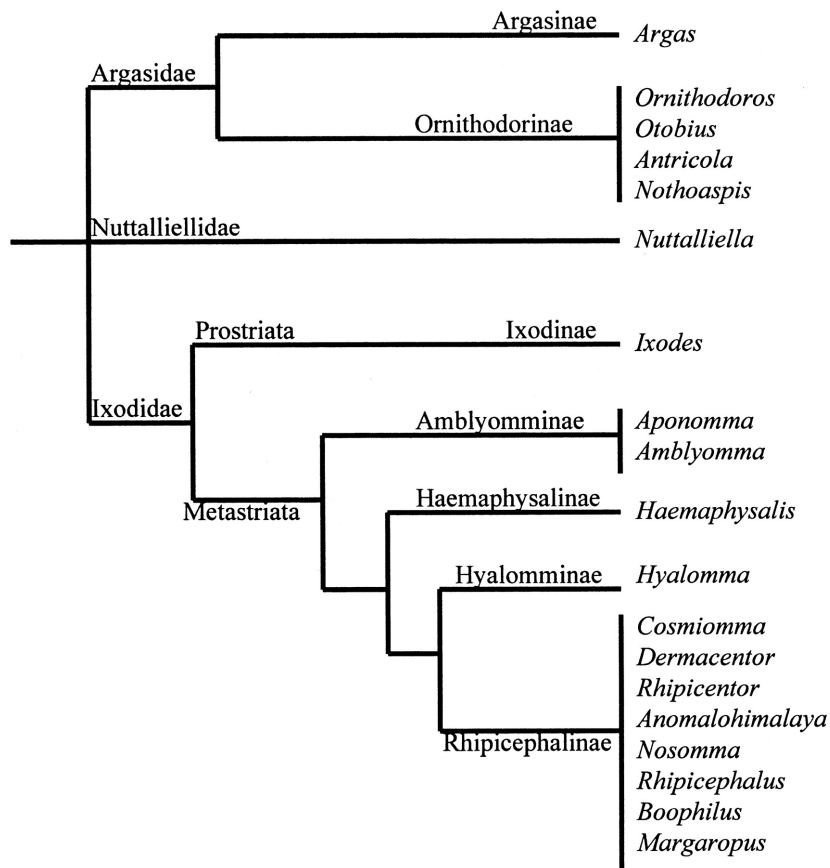


Abb. I.1 Klassische Systematik der Zecken nach Hoogstraal (PAROLA, 2001)

Der Körper der Zecke ist, wie bei allen Spinnentieren, in zwei Teile segmentiert. Kopf und Thorax sind zum Gnathosoma oder Capitulum verschmolzen und das Abdomen wird als Idiosoma bezeichnet (OLIVER, 1989). Die komplexen Mundwerkzeuge, die sich bei Schildzecken anterior am Gnathosoma befinden, sind an die blutsaugende Lebensweise der Zecke hochgradig angepasst. Sie bestehen aus dem Hypostom, zwei Cheliceren und zwei Palpen. Während der Blutmahlzeit verankert das Hypostom die Zecke mit zahlreichen Zähnchen in der Haut des Wirtes. Die zwei

sklerotisierten Cheliceren liegen zwischen den zwei segmentierten Palpen und dienen dem Anritzen der Haut des Wirtes. Der dorso-ventral abgeflachte Körper der Zecke ist durch ein aus Chitin bestehendes Exoskelett geschützt. Schildzecken besitzen zusätzlich ein Skutum, eine sklerotisierte Platte, die das gesamte Dorsum des Idiosomas des Männchens bedeckt, jedoch nur den anterioren Teil der Rückenpartie des Idiosomas beim Weibchen (vgl. Abb. I.2). Der Rest des Idiosomas der weiblichen Zecken besteht aus dem nicht sklerotisierten Alloskutum, welches bei einer Blutmahlzeit das Ausdehnen des Körpers um ein Vielfaches ermöglicht (OLIVER, 1989). Eine sehr wichtige Struktur an den Tarsen des ersten Beinpaars ist das Haller'sche Organ. Es enthält Rezeptoren, die der Wahrnehmung von Temperatur-, Kohlendioxid- und Feuchtigkeitsänderungen dienen, und daher notwendig zur Auffindung eines Wirtes sind (OLIVER, 1989).

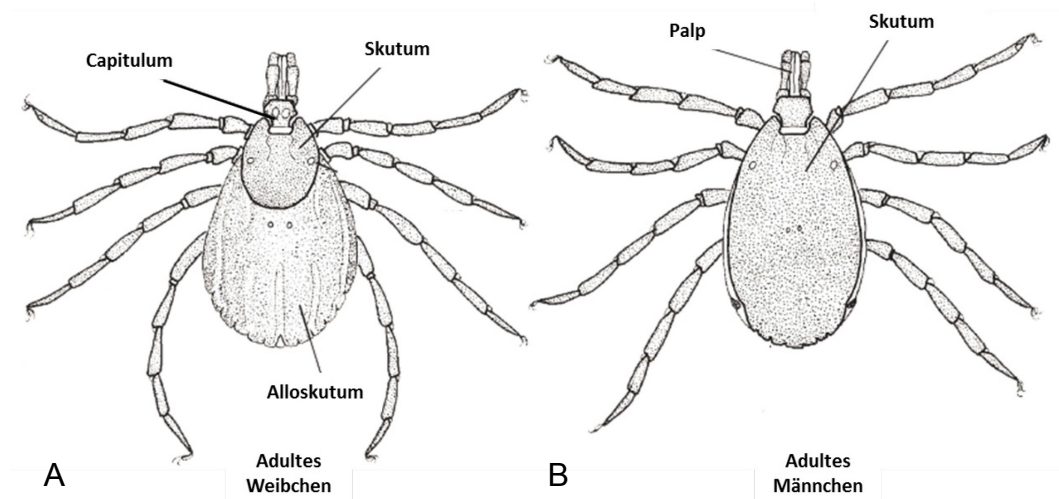


Abb. I.2 Morphologie einer Schildzecke am Beispiel von *Hyalomma*. (A) Adulte weibliche Zecke mit kleinem Skutum und (B) adulte männliche Zecke mit großem Skutum. Die bei der Gattung *Hyalomma* deutlich ausgeprägten Mundwerkzeuge mit Hypostom und Palpen sind gut zu erkennen. Grafik adaptiert aus WALKER *et al.*, 2003.

In ihrem Lebenszyklus durchlaufen Zecken vier Entwicklungsstadien (vgl. Abb. I.4). Dabei wird zwischen einwirtigen und mehrwirtigen Spezies unterschieden. Bei mehrwirtigen Zecken verlassen vollgesogene Weibchen den Wirt und legen nach einer Präovipositionsphase mehrere tausend Eier ab. Aus diesen Eiern schlüpfen sechsbeinige Larven, die nach einem neuen Wirt suchen. Nach Beendigung der

Blutmahlzeit, fallen die vollgesogenen Larven ab und entwickeln sich am Boden zum nächsten Stadium. Sie häuten sich zu achtbeinigen Nymphen, die wiederum eine Blutmahlzeit an

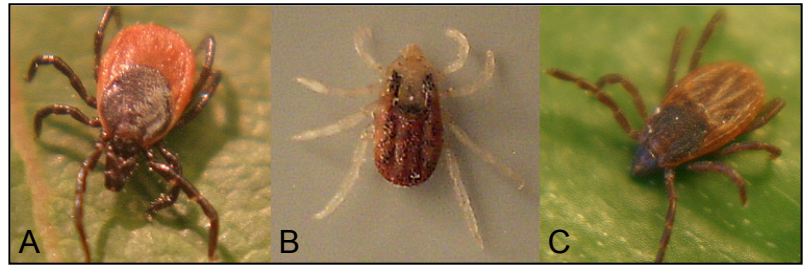


Abb. I.3 Adulte weibliche Schildzecken. (A) *Ixodes ricinus*, (B) *Rhipicephalus microplus* und (C) *Rhipicephalus sanguineus*

einem weiteren Wirt benötigen, bevor sie sich zu den männlichen und weiblichen Adultstadien entwickeln können. Je nach Spezies gehören die Wirte derselben Spezies an, wie z.B. bei der Hundezecke *Rhipicephalus sanguineus*, oder umfassen verschiedene Spezies (Mäuse, Füchse oder Wild) wie z.B. beim Holzbock *Ixodes ricinus* (APANASKEVICH & OLIVER, 2014). Die ungesogenen Stadien können unter den aktuellen klimatischen Bedingungen Mitteleuropas Jahre überdauern (GRAY *et al.*, 2008). Der gesamte Lebenszyklus kann - abhängig von der jeweiligen Spezies - in einigen Monaten oder in bis zu vier Jahren vollendet werden (ANDERSON & MAGNARELLI, 2008). Der Lebenszyklus von einwirtigen Zecken, wie z.B. der Rinderzecke *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*, der auf demselben Wirt stattfindet, ist unter optimalen Bedingungen in drei Wochen abgeschlossen (APANASKEVICH & OLIVER, 2014).

I.1.2 Einfluss von Zecken auf die Wirtschaft

Zecken sind ökonomisch wichtige Parasiten, die vor allem die Viehwirtschaft in tropischen und subtropischen Regionen der Welt beeinflussen. Etwa 80 % des weltweiten Viehbestands sind dem Risiko eines Zeckenbefalls und einer Infektion durch von Zecken übertragene Krankheiten ausgesetzt (DE CASTRO, 1997). Bei einem Befall entstehen Produktionsverluste, z. B. aufgrund von eingeschränkter Gewichtszunahme und damit verbundenem reduziertem Fleischertrag. Die Schwächung des Immunsystems durch Zeckenbefall erhöht zudem die Anfälligkeit für Sekundärinfektionen (ERVIN *et al.*, 1987). Mit ihren Mundwerkzeugen verursachen Zecken auch Narben in der Haut der Tiere und mindern so die Qualität der Lederproduktion (VON ROTZ *et al.*, 1983). Neben Vertretern der Gattungen *Amblyomma*, *Hyalomma*, *Haemaphysalis* und *Rhipicephalus*, ist hauptsächlich die Rinderzecke *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* für wirtschaftlich bedeutsame

Schäden verantwortlich (ESTRADA-PENÁ *et al.*, 2006). Sie ist in großen Teilen Australiens, Lateinamerikas und Afrikas verbreitet (JONGEJAN & UILENBERG, 2004) und befällt dort fast ausschließlich Rinder. Im Gegensatz zu vielen anderen Spezies ist die Rinderzecke sehr wirtsspezifisch und ist zudem eine der wenigen einwirtigen Arten, d. h. sie verbleibt für ihre gesamte Entwicklung auf dem gleichen Wirt, wo auch die Häutungen stattfinden. Erst das vollgesogene adulte Weibchen verlässt den Wirt (APANASKEVICH & OLIVER, 2014).

Neben den bereits erwähnten direkten Schäden, die ein Zeckenbefall mit sich bringt, ist es vor allem die Übertragung von Protozoen, sowie von pathogenen Bakterien



Abb. I.4 Lebensstadien von *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. L: Larven, N: Nympe, W: nüchternes adultes Weibchen, M: nüchternes adultes Männchen, gW: vollgesogenes adultes Weibchen

und Viren und die damit verbundenen Erkrankungen, die die Viehwirtschaft beeinträchtigen (BOCK *et al.*, 2004). Beispielsweise wurde Ende des 19. Jh. erstmals die mit *R. microplus* verwandte Zeckenspezies *Boophilus annulatus* als der Vektor des Protozoons *Babesia bigemina*, des Erregers des Texasfiebers bei Rindern, identifiziert (SMITH & KILBOURNE, 1893).

Anfang des neuen Jahrtausends wurden die wirtschaftlichen Verluste durch Zecken in Brasilien auf etwa zwei Milliarden Dollar jährlich geschätzt (KLAFKE, 2006). In Australien betrug der Schaden älteren Berichten zufolge jährlich 62 Mio Dollar (SPRINGELL, 1983). Und in Teilen Afrikas wird über Ausfälle von 168 Mio Dollar durch das Ostküstenfieber berichtet, das von Zecken übertragen und durch das Protozoon *Theileria parva* verursacht wird. Ein Verlust von weiteren 40 Mio Dollar entsteht in Afrika durch Babesiose und Anaplasmosen, deren Überträger ebenfalls Zeckenspezies sind (MUKHEBI *et al.*, 1992; LEW & JORGENSEN, 2005). Weltweit muss jedoch zusätzlich mit erheblich höheren Schadenssummen gerechnet werden (JONGEJAN & UILENBERG, 2004).

I.1.3 Human- und veterinärmedizinische Relevanz

Im europäischen Raum ist in den letzten Jahren vor allem durch erhöhte Aufmerksamkeit der Medien das Bewusstsein der Bevölkerung für die Zecke als krankheitsübertragenden Parasiten gestiegen. Die für den Menschen bedrohlichste Spezies in Europa ist der Gemeine Holzbock *Ixodes ricinus*. Er ist der Vektor der am häufigsten von Zecken auf den Menschen übertragenen Krankheit: der Borreliose. Diese auch als Lyme-Borreliose bezeichnete Krankheit, wurde 1975 in Lyme (Connecticut, USA) als besondere klinische Ausprägung bei einer Gruppe von Arthritis-Patienten entdeckt (MALAWISTA *et al.*, 1984). In Europa sind fast 14 % der Zecken Träger und damit potenzielle Überträger des Bakteriums *Borrelia burgdorferi*, dem Erreger der Borreliose (RAUTER & HARTUNG, 2005). Allein in Deutschland gibt es jährlich etwa 60.000 – 100.000 Neuerkrankungen nach einem Zeckenbiss (FISCHER & SIGMUND, 2007). Zu den anfänglichen Symptomen gehört oft die Erythema migrans, ein roter, sich um den Zeckenbiss ausdehnender Kreis, der jedoch nur in 50 - 70 % aller Fälle vorkommt (SIGAL, 1992). Bei dieser mehrstufigen Krankheit zeigen sich zunächst grippeähnliche Symptome mit Kopf- und Gliederschmerzen. Eine antibiotische Therapie ist vor allem in dieser Frühphase mit der Aussicht auf vollständige Heilung wirksam (ASCH *et al.*, 1994). Erfolgt keine sofortige Behandlung, können sich im Verlauf neurologische Beschwerden wie asymmetrische Lähmungserscheinungen der Gesichtsmuskeln oder Entzündungen der Hirnhäute bzw. des Herzens entwickeln. Schließlich geht die Krankheit in die chronische Spätphase über, die häufig mit Gelenkentzündungen, der sogenannten Lyme-Arthritis einhergeht. Die Krankheit ist in dieser Phase nicht mehr heilbar. Es ist jedoch möglich die Symptome zu behandeln (NATHWANI *et al.*, 1990; SIGAL, 1992).

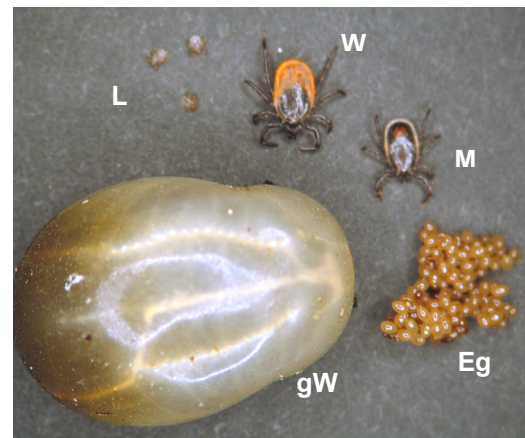


Abb. I.5 Lebensstadien von *Ixodes ricinus*. L: Larven, W: nüchternes adultes Weibchen, M: nüchternes adultes Männchen, gW: vollgesogenes adultes Weibchen, Eg: Eigelege

Zu den von *Ixodes ricinus* übertragenen Pathogenen gehören neben *B. burgdorferi* weitere Bakterienarten wie Rickettsien oder Anaplasmen, die u.a. Fleckfieber bzw. humane Granulozytäre Anaplasrose auslösen (VON LOEWENICH *et al.*, 2003; DOBLER & WÖLFEL, 2009). Der Gemeine Holzbock ist aber auch der Vektor für das Frühsommer-Meningoencephalitis (FSME)-Virus, das vor allem im Süden Zentral- und Osteuropas vorkommt. Seit einigen Jahren gibt es jedoch auch Berichte über die Ausbreitung von FSME in Skandinavien (LUNDKVIST *et al.*, 2011). Oft verläuft eine Infektion symptomlos oder es kommt zu milden, grippeähnlichen Symptomen mit Fieber. Lediglich ein Drittel der betroffenen Patienten entwickelt eine Meningitis, wobei 0,5 - 2 % der Fälle tödlich enden (DUMPIS *et al.*, 1999). Aufgrund der Meldepflicht von FSME-Erkrankungen in Deutschland sind genaue Zahlen bekannt. Im Jahr 2012 gab es in Deutschland 195 Fälle, 54 % weniger als im Jahr zuvor (ROBERT-KOCH-INSTITUT, 2013) und deutlich weniger als Borreliose-Neuerkrankungen. Das liegt vor allem an der Aufklärungsarbeit in Risikogebieten und dem verfügbaren Impfstoff gegen das Virus. Oft wird diese Impfung im Volksmund irrtümlich als „Zeckenimpfung“ bezeichnet, obwohl sie lediglich vor dem Virus, nicht aber vor einem Zeckenbiss und anderen von der Zecke übertragbaren Pathogenen schützt.

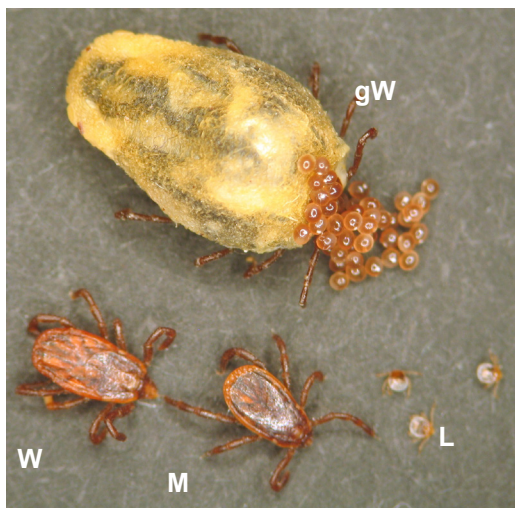


Abb. 1.6 Lebensstadien von *Rhipicephalus sanguineus*. L: Larven, W: nüchternes adultes Weibchen, M: nüchternes adultes Männchen, gW: vollgesogenes adultes Weibchen bei der Eiablage

Rhipicephalus sanguineus, die braune Hundezecke, ist die am weitesten verbreitete Zecke der Welt. Ursprünglich aus Afrika stammend, kommt sie heute weltweit in einem Gürtel zwischen 35° Süd und 50° Nord vor. Im Gegensatz zu vielen anderen Zeckenarten ist sie nicht auf eine hohe Luftfeuchtigkeit angewiesen und kommt daher in trockenerem Klima gut zurecht. Im Süden Europas befällt sie hauptsächlich Hunde, akzeptiert jedoch auch andere Wirte, darunter auch den Menschen (DANTAS-TORRES, 2008). Die Hundezecke wird immer häufiger auch in nördlicheren Gebieten angetroffen.

Ein Faktor könnte die Zunahme der Durchschnittstemperaturen in den gemäßigten Regionen sein. Hauptsächlich scheint aber das Verhalten der Menschen, die durch Reisen mit ihrem Hund bzw. der Aufnahme von verwaisten, aus dem Süden stammenden Tieren, diese Zecke einschleppen, die Ausbreitung zu befördern (DANTAS-TORRES, 2010). Von einem veterinärmedizinischen Standpunkt aus ist *R. sanguineus*, neben *Dermacentor variabilis* und *Dermacentor reticulatus*, eine der wichtigsten Zeckenspezies bei Hunden. Sie ist der Vektor für verschiedene Protozoen, wie z.B. *Babesia canis* und *Hepatozoon canis*, die Auslöser der Babesiose bzw. der Hepatozoonose, die ein potenzielles Gesundheitsrisiko für mitreisende Hunde darstellen (DANTAS-TORRES & OTRANDO, 2011). Obwohl der Mensch nur ein Fehlwirt der Hundezecke ist, gibt es Berichte über das Rocky-Mountain- und das Mittelmeer-Fleckfieber beim Menschen, die durch *Rickettsia rickettsii* bzw. *Rickettsia conorii* ausgelöst werden, die ebenfalls von *R. sanguineus* übertragen werden (DANTAS-TORRES, 2008).

I.2 Zeckenbekämpfung

I.2.1 Einsatz chemischer Parasitizide

Die Bezeichnung chemischer Bekämpfungsmittel richtet sich nach der Gruppe des zu bekämpfenden Organismus. So wirken beispielsweise Parasitizide gegen Parasiten, Pestizide gegen Pflanzenschädlinge, Arthropodizide gegen Gliederfüßer, Insektizide gegen Insekten und Akarizide gegen Milben, Zecken und andere Spinnentiere. Dabei kann ein Pestizid gleichzeitig ein Insektizid sein, da Pflanzenschädlinge häufig Insekten sind. Das Wort Insektizid wird häufig als Überbegriff anstelle von Arthropodizid verwendet. Dies gilt jedoch nicht in allen Fällen, z.B. wirkt das Neonikotinoid Imidacloprid gegen Insekten, jedoch nicht gegen Zecken (ERDMANIS *et al.*, 2012).

I.2.2 Frühe Therapieversuche

Bereits bevor *Boophilus annulatus* als Vektor für *Babesia bigemina* identifiziert wurde, erkannten Farmer die Verbindung von Zeckenbefall mit anderen Krankheiten, die ihr Vieh töteten. Um 1893 waren in Australien, Afrika und den USA einfache Tauchbecken mit verschiedenen Wirkstoffen, durch die von Zecken befallene Rinder

geleitet wurden, ein fester Bestandteil der Bemühungen zur Kontrolle von Zecken und den von ihnen übertragenen Krankheiten. Nach Experimenten mit Fischöl, Kerosin oder Tabakextrakten, wurden schließlich Arsen und seine Verbindungen zur Zeckenbekämpfung eingesetzt. Nach 50 Jahren extensiven Einsatzes, traten erste Resistenzen gegen Arsen auf (MATTHEWSON & BAKER, 1975; GEORGE, 2000). Mitte der 1930er Jahre nahmen, nunmehr ohne eine verfügbare Alternative zu Arsen, die Zeckeninfestationen enorme Ausmaße an (SHAW, 1970).

1.2.2.1 Chlororganische Verbindungen

Chlororganische Verbindungen waren die ersten synthetischen Pestizide, deren Vertreter speziell für die Bekämpfung von Zecken formuliert wurden (GEORGE *et al.*, 2004). Nachdem die arthropodizide Wirkung von Dichlordiphenyl-Trichloroethan (DDT) erkannt wurde, löste es Arsen ab und wurde als frei erhältliches Arthropodizid vermarktet (DURHAM, 1987; GEORGE *et al.*, 2004; DAVIES *et al.*, 2007). Aufgrund der endokrinen Wirkung auf verschiedene Tierklassen wurde der Wirkstoff zu Beginn der 1970er Jahre in Europa und den Vereinigten Staaten verboten (TURUSOV *et al.*, 2002). Seit Inkrafttreten der Stockholmer Konvention im Jahr 2004 ist der Einsatz von DDT und einiger anderer chlorierter Kohlenwasserstoffe ausschließlich für die Bekämpfung krankheitsübertragender Insekten zulässig (RICHTER *et al.*, 2001). DDT wirkt wie viele chlororganischen Verbindungen auf das periphere Nervensystem von Insekten und Zecken (LEGG, 1947; DAVIES *et al.*, 2007). Es verhindert den Verschluss und die Inaktivierung bereits geöffneter spannungsabhängiger Na⁺-Kanäle. Dadurch ausgelöste unterschwellige Stimuli führen zu Krämpfen und schließlich zum Tod der Arthropoden (DAVIES *et al.*, 2007; DEKANT & VARNVAKAS, 2009). Obwohl die arthropodizid wirkenden Cyclodiene Dieldrin, Endrin, Endosulfan und Heptachlor (vgl. Abb. 1.7) als Cyclodiene, das Cycloalkan Lindan und das Cycloalkan Toxaphen auch zu den chlororganischen Verbindungen gehören, haben sie einen anderen Wirkmechanismus als DDT. Sie blockieren die im zentralen Nervensystem (ZNS) vorkommenden GABA_A-Rezeptoren und unterdrücken als Antagonisten die Funktion dieser wichtigen Chlorid-Kanäle. Dadurch kommt es zu einer Übererregung vieler neuraler Prozesse im Organismus und schließlich zum Tod des Insekts bzw. der Zecke (ELDEFRAWI *et al.*, 1985; OSBORNE, 1996).

I.2.2.2 Organophosphate und Carbamate

Organophosphate (OPs) und Carbamate sind Ester der Phosphorsäure bzw. der Carbaminsäure und stellen nach den chlorierten Kohlenwasserstoffen die zweite Generation der synthetischen Pestizide dar. Beide Klassen sind im Gegensatz zu den chlorierten Kohlenwasserstoffen weniger stabil in der Umwelt (MENZER, 1991; KUNZ & KEMP, 1994).

Sie inhibieren die Acetylcholinesterase (AChE) von Insekten und Spinnentieren (COSTA, 2006), welche den wichtigen Neurotransmitter Acetylcholin hydrolysiert, um dessen Bindestelle OPs und Carbamate konkurrieren. Durch die Akkumulation von Acetylcholin an cholinergen Synapsen kommt es zu einer Überstimulation muskarinischer und nikotinischer Rezeptoren (MARSELLA, 1999; JOANNOU, 2010). OPs wurden zur Bekämpfung von Rinderzecken entwickelt, die resistent gegenüber chlororganischen Verbindungen waren. Zu den meist genutzten OPs zählen Chlorpyrifos und Coumaphos (vgl. Abb. I.7). Der Nutzen der Carbamate, wie z.B. Carbaryl (vgl. Abb. I.7), war jedoch aufgrund der Kreuzresistenz zu OPs begrenzt (GEORGE *et al.*, 2004).

I.2.2.3 Amidine und Makrozyklische Laktone

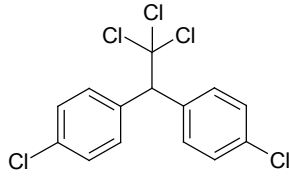
Die akarizide Wirkung von Amidinen wurde Anfang der 1960er Jahre entdeckt. Der bekannteste Vertreter aus dieser chemischen Klasse ist Amitraz. Es wird bis heute zur Bekämpfung von *R. microplus* bei Rindern in Form von Sprays oder Dips angewendet (TAYLOR, 2001). Amitraz ist ein Antagonist des Octopamin-Rezeptors und ist daher eine Alternative zur Bekämpfung von OP- oder Pyrethroid-resistenten Zecken. Allerdings gibt es bereits Berichte über Resistenzen gegenüber Amitraz in Australien und anderen Ländern (GEORGE, 2000). Es kann zudem bei systemischer Gabe zu sedativen Effekten bei behandelten Tieren kommen, was den Einsatz als „Pour-on“ ausschließt (HUGNET *et al.*, 1996).

Ende der 1970er Jahre wurden die makrozyklischen Laktone in den Markt eingeführt. Diese Verbindungen sind Fermentationsprodukte von Pilzen der Gattung *Streptomyces* oder chemische Derivate davon, die in zwei Gruppen unterteilt werden: die Avermectine und die Milbemycine (MEHLHORN, 2007). Zur ersten Gruppe gehört u.a. Ivermectin, ein Gemisch zweier durch Hydrierung modifizierter Avermectine mit

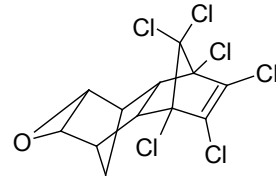
Wirkung gegen Nematoden und Arthropoden. Der bekannteste Vertreter der ektoparasitiziden Milbemycine, die sich von den Avermectinen durch das Fehlen einer Disaccharidseitenkette unterscheiden, ist Moxidectin (vgl. Abb. I.7) (PRICHARD *et al.*, 2012). Makrozyklische Laktone erhöhen als Agonisten die Permeabilität Glutamat- und GABA-gesteuerter Ionenkanäle, was einen schnellen Influx von Chlorid-Ionen und eine Hyperpolarisation von Nervenzellen bewirkt. Dadurch wird die Reizweiterleitung erschwert oder sogar blockiert, was zum Tod des Parasiten führt (GEARY & MORENO, 2012).

I.2.2.4 Pyrethroide

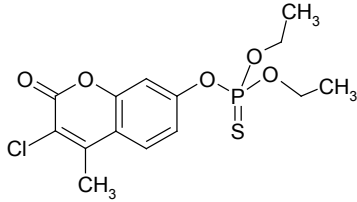
Die aus der Pflanze *Chrysanthemum cinerariaefolium* stammenden Pyrethrine bildeten in der Mitte des 20. Jh. die Grundlage für die Entwicklung der synthetischen Pyrethroide. Diese Wirkstoffklasse zeichnet sich durch schnelle Wirksamkeit bei geringen Konzentrationen aus und besitzt eine geringe Säuger-Toxizität, aber hohe Umwelt- und Photostabilität (ELLIOTT *et al.*, 1973; ECOBICHON, 1991; JOANNOU, 2010). Pyrethroide besitzen eine ähnliche neurotoxische Wirkung wie DDT: sie verhindern den Verschluss und die Inaktivierung bereits geöffneter spannungsabhängiger Na⁺-Kanäle, was zu Krämpfen und Lähmungen führt und als ‚Knock-down-Effekt‘ bezeichnet wird (NARAHASHI, 1971; SODERLUND & BLOOMQUIST, 1989; DAVIES *et al.*, 2007). Eines der ersten entwickelten Pyrethroide war das zu den Typ I-Pyrethroiden gehörende Permethrin (Vgl. Abb. I.7). Es ist ein Insektizid und Akarizid mit einer leicht repellierenden Wirkung. Deltamethrin, wie auch Flumethrin (Vgl. Abb. I.7), gehört aufgrund seiner α -Cyano-Gruppe zu den Typ II-Pyrethroiden, die eine höhere Effektivität besitzen, da die von ihnen ausgelöste Depolarisation irreversibel ist. (ELLIOTT *et al.*, 1973; DAVIES *et al.*, 2007). Obwohl bei der Bekämpfung der Rinderzecke mit Pyrethroiden schnell Kreuzresistenzen gegenüber DDT auftraten (GRAF *et al.*, 2004), ist deren Wirksamkeit bei anderen Zeckenspezies durchaus noch gegeben, weshalb sie gegenwärtig bei Haustieren angewendet werden (DANTAS-TORRES *et al.*, 2013).



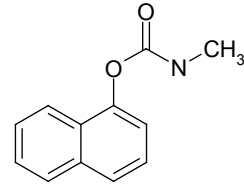
DDT (Chlorkohlenwasserstoff)



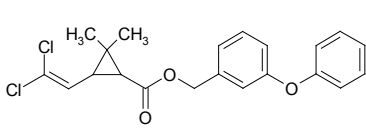
Dieldrin (Chlorkohlenwasserstoff)



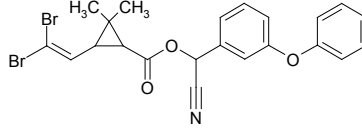
Coumaphos (Organophosphat)



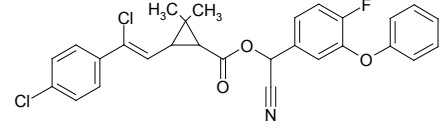
Carbaryl (Carbamat)



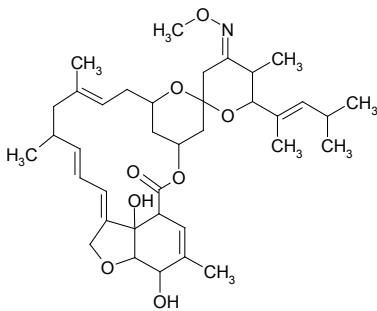
Permethrin (Pyrethroid I)



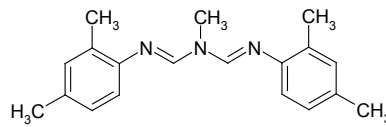
Deltamethrin (Pyrethroid II)



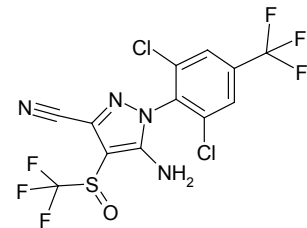
Flumethrin (Pyrethroid II)



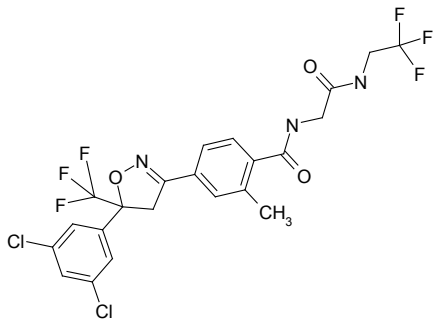
Moxidectin
(Makrozyklisches Lakton)



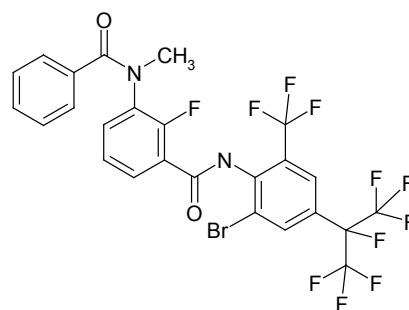
Amitraz (Amidin)



Fipronil (Phenylpyrazol)



Fluralaner (Isoxazolin)



Broflanilide (Metadiamid)

Abb. I.7 Strukturformeln bekannter Vertreter von Arthropodiziden aus verschiedenen chemischen Klassen

I.2.2.5 Phenylpyrazole

Fipronil (vgl. Abb. I.7) wurde 1993 zunächst in den Pflanzenschutzmarkt eingeführt und zählt heute zu den am häufigsten verwendeten Parasitiziden im Haustiermarkt (LIU *et al.*, 2011; SCHNATTERER, 2012). Es stammt aus der Klasse der Phenylpyrazole und ist ein Kontaktwirkstoff mit insektizider und akarizider Wirkung (MEHLHORN, 2001). Phenylpyrazole wirken primär, wie Cyclo-diene, als nicht-kompetitive Antagonisten des GABA_A-Rezeptors (COLE *et al.*, 1993; GANT *et al.*, 1998). Die geringe Toxizität gegenüber Säugetieren basiert zum einen auf der hohen Selektivität gegenüber GABA_A-Rezeptoren in Arthropoden, zum anderen auf dem vermutlich nur in protostomen Invertebraten, wie Arthropoden oder Nematoden, vorkommenden sekundären Zielprotein, dem Glutamat-gesteuerten Chlorid-Kanal (NARAHASHI *et al.*, 2010).

I.2.2.6 Neue Insektizid- und Akarizidklassen mit GABAerger Wirkung

Aufgrund der zunehmenden Resistenzentwicklung gegen Arthropodizide ist die Suche nach neuen Wirkmechanismen von hoher Dringlichkeit. Ein Weg, der begangen wurde, ist die Entwicklung neuer nicht-kompetitiver Antagonisten des GABA_A-Rezeptors. Eine der neuesten Klassen mit Wirkung an diesem Rezeptor, die gegen Katzenflöhe und Zecken wirkt, sind die Arylisoxazoline. Dazu gehört Fluralaner (vgl. Abb. I.7), das eine von den bekannten Antagonisten distinkte, jedoch überlappende Bindestelle des GABA_A-Rezeptors adressiert (OZOE *et al.*, 2010; ZHAO & CASIDA, 2014). Bindungstests haben gezeigt, dass Fluralaner GABA- und Glutamat-gesteuerte Chlorid-Kanäle in Arthropoden inhibiert, am GABA_A-Rezeptor in Säugern jedoch nicht wirkt. Zudem ist Fluralaner resistenzbrechend im Hinblick auf die Rdl-Resistenz gegenüber Dieldrin (GARCÍA-REYNAGA *et al.*, 2013; GASSEL *et al.*, 2014). Auch die neue Klasse der Metadiamid-Insektizide ist wirksam gegen Insekten mit ausgeprägter Dieldrin-Resistenz. Mit Hilfe von Homologie-Modelling wurde die Bindestelle dieser Verbindungen im Zwischenraum zweier Untereinheiten lokalisiert, ähnlich der von Ivermectin, das den geöffneten Zustand Glutamat-gesteuerter Chlorid-Kanäle stabilisiert. Metadiamide begünstigen jedoch den geschlossenen Zustand von GABA_A-Rezeptoren ohne die für nicht-kompetitive Antagonisten typische Interaktion mit Transmembrandomäne 2 (NAKAO *et al.*, 2013).

I.2.3 Nicht chemische Alternativen

I.2.3.1 Impfstoffe gegen Zecken

Aufgrund der sich verbreitenden Resistenz der Rinderzecke gegen chemische Akarizide Ende der 1980er Jahre, begann ein Team australischer Wissenschaftler an einem Impfstoff gegen *R. microplus* zu arbeiten (WILLADSEN, 1997). In einem ersten experimentellen Ansatz wurden Extrakte und Antigene aus der Speicheldrüse der Rinderzecke isoliert und zur Immunisierung verwendet. Aufgrund der immunevasiven Mechanismen der Bestandteile des Speichels war dieser Ansatz jedoch wenig erfolgreich (KEMP *et al.*, 1989). Die Entdeckung von Bm86, einem internen Antigen aus der Darmwand der Rinderzecke, war schließlich der Durchbruch in der Forschung nach Anti-Zecken-Vakzinen (GEORGE, 2000). Dieses Antigen wird bei einer normalen Blutmahlzeit nicht sekretiert und würde somit nicht in Kontakt mit dem Immunsystem des Wirts kommen. Folglich ist es der Zecke kaum möglich, Strategien zu entwickeln, sich der Immunantwort des Wirts zu entziehen (KEMP *et al.*, 1989). Das rekombinante Bm86 wird seit Anfang der 1990er Jahre unter den Namen TickGARD™ (Hoechst Animal Health; Australia), später als TickGARD^{PLUS} (Intervet Australia; Australia) und Gavac™ (Heber Biotec; Cuba) vermarktet (FREEMAN *et al.*, 2010). Der Impfstoff ist zwar in der Lage die Anzahl vollgesogener weiblicher Zecken und deren Reproduktionsfähigkeit um bis zu 90 % zu reduzieren, der Effekt der Immunisierung zeigt sich jedoch erst in der nächsten Generation Zecken. Aus diesem Grund wird die Immunisierung häufig in Kombination mit niedrig dosierten Akariziden appliziert (WILLARDSEN, 2006). Die Immunisierung gegen Zecken ist noch immer Teil gegenwärtiger Forschung. So wird z.B. an Bm86-Orthologen anderer Zeckenspezies und an der Identifizierung weiterer Antigene gearbeitet, um die Wirksamkeit der Impfstoffe zu verbessern (DE LA FUENTE & KOCAN, 2006; CANALES *et al.*, 2009; GALAI *et al.*, 2012).

I.2.3.2 Biologische Methoden der Zeckenbekämpfung

Biologische Schädlingsbekämpfung ist von zunehmender Bedeutung. Die Attraktivität dieser Strategie liegt in steigenden Kosten für den Einsatz von chemischen Parasitiziden, an den immer häufiger werdenden Resistenzen der Parasiten gegenüber diesen Mitteln oder auch an Bedenken in Bezug auf Umweltsicherheit

und menschliche Gesundheit begründet. So führt der zunehmende Einsatz von chemischen Insektiziden in der konventionellen Landwirtschaft mancher Ländern zu erhöhter Nachfrage nach biologischen Produkten, da aufgrund der vorgeschriebenen Bewirtschaftungsmethoden im Allgemeinen keine humanpathogenen, toxischen oder umweltschädlichen Rückstände nach Applikation verbleiben (SAMISH *et al.*, 2004). Wiederholt auftretende Diskussionen über die Toxizität von Pestiziden gegenüber nützlichen Insekten wie Honigbienen verstärken ebenfalls den Bedarf an biologischen Schädlingsbekämpfungsmitteln (JOHNSON *et al.*, 2010, CARVALHO *et al.*, 2013). In Gebieten mit geringer Zeckenaktivität können bereits einfache Managementstrategien in der Landwirtschaft, wie eine kontrollierte Weidewirtschaft helfen, einen wirtschaftlich schädlichen Zeckenbefall zu vermeiden. Dazu gehört z.B. das Errichten von Zäunen, um das Einbringen von Zecken durch Wild zu verhindern oder auch Zeckenfallen mit Pheromonen (BROSSARD, 1998). Die Entwicklung von Mitteln zur biologischen Bekämpfung von Zecken, obwohl höchst erstrebenswert, stellt eine große wissenschaftliche Herausforderung dar. Eine Möglichkeit der Intervention ist der Einsatz entomopathogener Pilze. Aufgrund ihrer hohen Selektivität liegen die Gattungen *Beauveria* und *Metarhizium* hierbei im besonderen Fokus (WILLADSEN, 2006). Die Abhängigkeit der Wirkung dieser Pilze von Umweltbedingungen, Kutikula-Beschaffenheit und der Immunreaktion der Zielorganismen macht eine verlässliche Wirksamkeit unmöglich. Eine Verbesserung der Wirksamkeit durch Koapplikation von gering dosierten chemischen Akariziden, um das Immunsystem der Zecke zu schwächen und die Pathogenität des Pilzes zu erhöhen, ist denkbar, jedoch muss hierbei auch eine mögliche Toxizität des Akarizids gegenüber dem Pilz berücksichtigt werden (SCHUMACHER, 2013).

1.2.4 Akarizidresistenz

Als Akarizidresistenz bezeichnet man die Entwicklung der Fähigkeit mancher Zecken oder Milben einer Population, die Dosis eines Wirkstoffes zu überleben, die für die Mehrheit der Individuen einer normalen Population derselben Spezies tödlich wäre (WHO, 1957). Hierbei unterscheidet man grundsätzlich zwischen drei Mechanismen: der Resistenz durch Mutation des Angriffsorts eines Wirkstoffes, so dass dieser nicht mehr binden kann, der metabolischen Resistenz durch Hochregulierung bestimmter Enzyme, die für einen schnelleren Abbau des Wirkstoffes sorgen und der Penetrationsresistenz durch Entwicklung von Barrieren in der Kutikula, die die

Absorption von Chemikalien verlangsamen (GUERRERO *et al.*, 2012). Die Entstehung von Mutationen und deren Manifestierung in einer Population ist bei den meisten Zeckenarten ein langwieriger Prozess. Grund dafür ist die Lebensweise vieler Spezies und deren oft langer Lebenszyklus mit multiplen Wirten, wie z.B. bei *Ixodes ricinus*. Zudem verringert das Vorhandensein großer Wildtierreservoirs die Exposition gegenüber Akariziden. Es gibt aktuell nur einen wissenschaftlichen Bericht über metabolische Resistenz bei *Ixodes ricinus* (SMIRNOV, 2009), aber keinen, der eine auf einer Mutation basierende Resistenz beschreibt. Ganz andere Ausmaße nimmt die Resistenzentwicklung bei der Rinderzecke an. Durch den deutlich kürzeren Lebenszyklus, die Einwirtigkeit und die oft und wiederholt behandelten, dicht zusammen stehenden Wirtstiere, wird die Entwicklung von Resistenzen um ein Vielfaches beschleunigt. Vor allem in Südamerika, Afrika und Australien, wo die Rinderzecke große wirtschaftliche Schäden anrichtet, kommt es durch übermäßigen Einsatz von Akariziden immer wieder zur Entwicklung von Resistenzen und zu dem sich daraus ergebenden Bedarf an neuen Substanzklassen mit neuem Wirkmechanismus (STONE, 1957; GEORGE *et al.*, 2004). Für Resistenzen gegen chlorierte Kohlenwasserstoffe wie DDT und Kreuzresistenzen gegen Pyrethroide sind Punktmutationen im Gen, das für den spannungsgesteuerten Natriumkanal kodiert, verantwortlich. Zuerst entdeckt wurde diese als knockdown-Resistenz (kdr) bezeichnete Mutation in Domäne II des Na⁺-Kanals aus der Stubenfliege *Musca domestica* (WILLIAMSON *et al.*, 1993). Bis heute sind mehr als zehn Punktmutationen in verschiedenen Domänen dieses Proteins bekannt, einige davon wurden auch für die Rinderzecke berichtet (HE *et al.*, 1999; DONG, 2007; MORGAN *et al.*, 2009). Auch in der Acetylcholinesterase, die den Angriffsort für insektizide und akarizide OPs und Carbamate bildet, wurden bereits in verschiedenen Insekten, wie auch in der Rinderzecke, eine Reihe von Punktmutationen im aktiven Zentrum nachgewiesen (TEMEYER *et al.*, 2009). Auch gegen Arthropodizide, die am GABA_A-Rezeptor wirken, wie den Cyclodienen, wurden Resistenzen für *R. microplus* bekannt (STONE & WEBBER, 1960). Dennoch ist der GABA_A-Rezeptor als validiertes Target in den letzten Jahren wieder in den Fokus der Wirkstoff-Entwickler gerückt, da er verschiedene Bindestellen für eine Vielzahl von Liganden besitzt, die Resistenzbrechung versprechen. Tatsächlich wurden in den letzten Jahren derartige neue Insektizide entwickelt, wie z.B. die Arylisoxazoline (OZOE *et al.*, 2010; LAHM *et al.*, 2013).

I.3 Der GABA-Rezeptor

I.3.1 Aufbau und Funktion

γ -Aminobuttersäure (GABA) ist der wichtigste inhibitorische Neurotransmitter im Nervensystem von Vertebraten und Invertebraten. Dieser Transmitter wirkt an GABA-Rezeptoren, welche eine Zielstruktur für neuroaktive Substanzen und Arthropodizide darstellen (SMITH & OLSEN, 1995; HOSIE *et al.*, 1997). Man unterscheidet zwischen zwei Formen von GABA-Rezeptoren, den GABA_A- und den GABA_B-Rezeptoren.

GABA_B-Rezeptoren sind sogenannte metabotrope G-Protein-gekoppelte Rezeptoren, die sowohl prä- als auch postsynaptisch vorkommen. Bei Bindung von GABA aktivieren sie GTP-bindende Proteine, die ihrerseits eine Signalkaskade auslösen. Dabei wird die Leitfähigkeit der Zelle für K⁺ erhöht und für Ca²⁺ reduziert, wodurch die Membran hyperpolarisiert und damit die Weiterleitung eines Signals verhindert wird (BETTLER *et al.*, 2004). GABA_B-Rezeptoren bilden Heteromere aus den beiden Untereinheiten GABA_{B1} und GABA_{B2}, die jeweils sieben Transmembranhelices enthalten und über ihre C-Termini gekoppelt sind. Essentiell für ihre Funktion sind „K⁺-Channel Tetramerization Domain“ (KCTD)-Hilfsproteine, die als Homotetramere mit dem Rezeptor assoziiert sind. Diese Hilfsproteine steigern u.a. die Wirksamkeit des Agonisten, beschleunigen die Desensibilisierung und bestimmen damit maßgeblich die Pharmakologie und Kinetik des GABA_B-Rezeptors (SCHWENK *et al.*, 2010; SEDDIK *et al.*, 2012).

GABA_A-Rezeptoren hingegen sind ligandengesteuerte Ionenkanäle. Die Bindung von GABA am postsynaptisch lokalisierten Rezeptor öffnet den Kanal und lässt Chlorid-Ionen in das Neuron strömen. Die Signalweiterleitung wird schnell und kurzfristig inhibiert, indem das negative Membranpotential weiter gesenkt (Hyperpolarisierung) und damit der Schwellenwert zur Entstehung eines Aktionspotentials erhöht wird (OLSEN & SIEGHART, 2008). Eine besondere Form unter den GABA_A-Rezeptoren sind die GABA_A- ρ -Rezeptoren, auch GABA_C-Rezeptoren genannt. Sie gehören funktionell zu den ionotropen Rezeptoren und kommen hauptsächlich als Homopentamere, bestehend aus der Untereinheit ρ , in der Netzhaut vor (SCHMIDT, 2008). Im ZNS bilden sie jedoch auch Heteropentamere mit GABA_A-Rezeptor-Untereinheiten (MILLIGAN *et al.*, 2004).

GABA_A-Rezeptoren gehören zur Superfamilie der Cys-Loop-Rezeptoren, zu der auch die nikotinischen Acetylcholin-Rezeptoren (nAChR), bestimmte Serotonin-Rezeptoren (5-HT₃) oder auch Glycin- und Glutamat-gesteuerte Rezeptoren gehören. Diese Rezeptoren sind sich strukturell und funktionell ähnlich und besitzen Sequenz-Homologien von etwa 30 %, mit einer deutlich größeren Ähnlichkeit auf Sekundär- und Tertiärstruktur-Niveau (OLSEN & SIEGHART, 2008). Sie sind durch einen im N-terminalen Bereich liegenden, extrazellulären Loop charakterisiert, der durch eine Disulfidbrücke zweier Cystein-Reste entsteht, deren Abstand genau 13 Aminosäuren beträgt. GABA_A-Rezeptoren kommen *in vivo* als heteropentamere Membranproteine vor (vgl. Abb. 1.8). Jede ihrer Untereinheiten besteht aus einer großen N-terminalen und einer kleineren C-terminalen extrazellulären Domäne, vier Transmembranhelices (TM1-TM4) und einem intrazellulärem Loop zwischen TM3 und TM4. Die zweite Transmembranhelix jeder Untereinheit bildet im Pentamer die Pore des Ionenkanals und bestimmt die Chlorid-Selektivität (SCHOFIELD *et al.*, 1987). Die Bindestelle für GABA am Rezeptor ist extrazellulär zwischen einer α -Untereinheit und einer weiteren α - oder nicht- α -Untereinheit. Die extrazelluläre Domäne jeder Untereinheit wird aus je zehn, orthogonal zueinander angeordneten β -Faltblättern gebildet, die alphabetisch numeriert sind. Die Loops A, B und C der α -Untereinheit und die Loops D, E und F der zweiten Untereinheit bilden mit aromatischen Aminosäuren die Bindetasche (SMITH & OLSEN, 1995; BREJC *et al.*, 2001).

Diese strukturellen Informationen über Cys-Loop-Rezeptoren beruhen hauptsächlich auf Röntgenkristallstrukturen homologer Proteine. Die Struktur des löslichen Acetylcholin-Bindeproteins der Schnecke *Lymnea stagnalis*, das eine 24 %ige Homologie zur extrazellulären Domäne der $\alpha 7$ -Untereinheit des nAChRs aufweist, wurde mit einer Auflösung von 2,7 Å bestimmt (SMIT *et al.*, 2001, BREJC *et al.*, 2001). Postsynaptische Membranen des elektrischen Organs des Zitterrochens *Torpedo marmorata* sind hoch angereichert mit Acetylcholin-Rezeptoren, deren Struktur durch elektronenmikroskopische Methoden mit einer Auflösung von 4 Å bestimmt wurde (MIYAZAWA *et al.*, 2003; UNWIN, 2005). Zusätzlich gibt es röntgenstrukturelle Informationen durch die Kristallisation eines bakteriellen pentameren Liganden-gesteuerten Ionenkanals (HILF & DUTZLER, 2008; CHARON *et al.*, 2011). Mit Hilfe dieser Strukturen, die als Proteinmodellierungs-Templates dienen, konnten aus GABA_A-Rezeptor-Sequenzen mittels Homologie-basierter Methoden Proteinstruktur-Modelle berechnet werden (AKABAS, 2004; CHARON *et al.*, 2011).

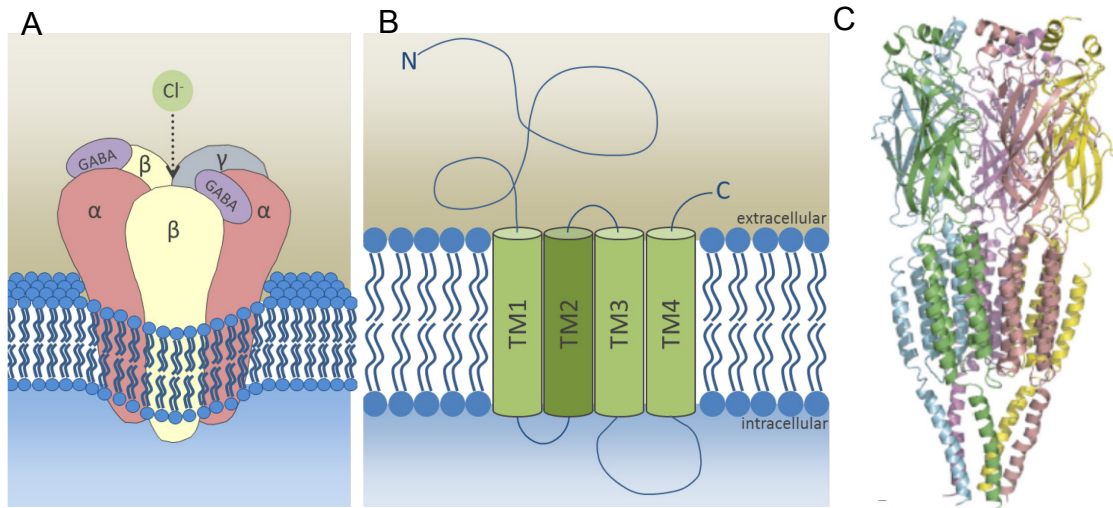


Abb. I.8 Struktur des GABA-gesteuerten Chlorid-Kanals. (A) Beispiel für einen heteropentameren Kanal aus zwei α , zwei β und einer γ Untereinheit, der zwei Bindestellen für den Liganden GABA besitzt und für Chlorid-Ionen leitfähig ist. (B) Aufbau einer Untereinheit aus einem extrazellulären N-terminus, der den charakteristischen Cys-Loop aufweist, vier Transmembrandomänen und einem größeren intrazellulären Loop zwischen TM3 und TM4. Diese Strukturierung wird ebenfalls im (C) Strukturmodell eines homopentameren Cys-Loop-Rezeptors am Beispiel des nAChRs deutlich (Grafiken A und B adaptiert von VITHLANI *et al.*, 2011 und MOSS & SMART, 2001; Grafik C aus MOKRAB *et al.*, 2007).

I.3.2 Lokalisation von GABA_A-Rezeptoren

GABA_A-Rezeptoren kommen in allen Organismen vor, die auch ein Nervensystem besitzen (OLSEN & SIEGHART, 2008). In Säugern sind sie hauptsächlich in den Neuronen des zentralen Nervensystems lokalisiert, wo sie postsynaptisch ein inhibitorisches postsynaptisches Potential (IPSP), also eine schnelle, phasische Inhibition der Reizweiterleitung auslösen, während extrasynaptisch eine langsamere, tonische Inhibition ausgelöst wird (MODY & PEARCE, 2004). Jedoch kommen GABAerge Systeme auch im peripheren Nervensystem und in nichtneuronalen Zellen vor. Die Aufgaben der GABA_A-Rezeptoren in nichtneuroalem Gewebe sind unterschiedlich. Im endokrinen System wie im Nebennierenmark (CASTRO *et al.*, 1989) oder den Zellen der Langerhans-Inseln (RORSMAN *et al.*, 1989) kontrollieren sie die Ausschüttung von Hormonen, in den glatten Muskelzellen des Uterus beeinflussen sie die Steuerung der Kontraktion (HEDBLOOM & KIRKNESS, 1997) und in Lymphozyten fungieren sie als Modulatoren der Proliferation (DIONISIO *et al.*, 2011).

In der Lunge sind GABA_A-Rezeptoren z.B. für die Steuerung des Flüssigkeitstransports (JIN *et al.*, 2006) oder einer erhöhten Schleimproduktion bei Asthma verantwortlich (XIANG *et al.*, 2007). Zudem wurden sie ebenfalls im Herzen, der Leber und anderen wichtigen Organen gefunden (HEDBLOOM & KIRKNESS, 1997).

I.3.3 Pharmakologie von GABA_A-Rezeptoren in Säugern

Die Richtlinien zur Klassifizierung und Nomenklatur von Ionenkanälen und Rezeptoren werden vom NC-IUPHAR (Nomenclature Committee of the International Union of Pharmacology) festgelegt. Demnach werden Ionenkanal-Untereinheiten definiert durch einen griechischen Buchstaben gefolgt von einer arabischen Ziffer (BARNARD *et al.*, 1998; COLLINGRIDGE *et al.*, 2009). Nach der Veröffentlichung der vollständigen Genomsequenz des Menschen und anderen Säugern wurden die Gene von 19 GABA_A-Rezeptor-Untereinheiten identifiziert: $\alpha(1-6)$, $\beta(1-3)$, $\gamma(1-3)$, δ , ϵ , θ , π und $\rho(1-3)$ (SIMON *et al.*, 2004). Das Vorhandensein von Spleiß-Varianten wurde hauptsächlich für γ -Untereinheiten berichtet. Die Varianten unterscheiden sich durch Anwesenheit oder Fehlen eines acht Aminosäuren langen Abschnitts im intrazellulären Loop zwischen TM3 und TM4, der ein Serin enthält, das ein potentiell Substrat für eine Protein Kinase C-Phosphorylierung darstellt. Weitere Spleiß-Varianten anderer Untereinheiten wurden zwar identifiziert, jedoch nie als Bestandteil funktioneller Rezeptoren nachgewiesen (OLSEN & SIEGHART, 2008). Aus dieser Reihe von Untereinheiten und Spleiß-Varianten ergeben sich nach heutigem Wissen etwa 800 pentamere Kombinationsmöglichkeiten, wobei die Anzahl der tatsächlich gebildeten Kombinationen wahrscheinlich deutlich darunter liegt. Die Zusammensetzung der einzelnen Untereinheiten und deren Vorkommen in bestimmten Zellen legen die elektrophysiologischen Eigenschaften des jeweiligen Rezeptors fest. Aus diesem Grund kann die Pharmakologie heterolog exprimierter Rezeptoren Informationen über Untereinheiten-Zusammensetzung nativer Rezeptoren liefern (BARNARD *et al.*, 1998).

GABA_A-Rezeptoren sind Angriffspunkte zahlreicher pharmakologisch und klinisch wichtiger Medikamente. Verbindungen, die agonistisch an der Ligandenbindestelle des GABA_A-Rezeptors wirken, sind hauptsächlich GABA-Analoga, wie Isoguvacin oder Muscimol, Diese kompetitiven GABA-Agonisten binden an der Liganden-Bindestelle und öffnen den Chlorid-Kanal (KERR & ONG, 1992).

Versuche, das synthetische GABA-Analogon THIP als Schlafmittel zu entwickeln, sind an den breiten Nebenwirkungen gescheitert (RUDOLPH & KNOFLACH, 2011). Grundsätzlich werden alle GABA_A-Rezeptoren von Bicucullin, einem kompetitiven Antagonisten, und Picrotoxinin, einem nicht-kompetitiven Antagonisten, blockiert, sind aber unempfindlich gegenüber Baclofen (MACDONALD & OLSEN, 1994). Im Gegensatz dazu stehen GABA_B-Rezeptoren, die Bicucullin- und Picrotoxin-insensitiv sind, jedoch durch Baclofen inhibiert werden (BOWERY *et al.*, 2002).

GABA_A-Rezeptoren haben jedoch auch eine Vielzahl weiterer allosterischer Bindestellen für verschiedene Klassen pharmakologisch aktiver Substanzen. Eine dieser Substanzklassen sind die Barbiturate, die zu Beginn des 20. Jh. als Schlafmittel auf den Markt kamen (LÖSCHER & ROGAWSKI, 2012). Barbiturate, wie z.B. Pentobarbital, sind allosterische Agonisten. Sie induzieren in Abwesenheit von GABA einen Chlorid-Strom, können aber auch einen GABA-induzierten Strom verstärken, indem sie die durchschnittliche Öffnungsdauer des Chlorid-Kanals erhöhen, jedoch nicht die Leitfähigkeit verändern (MACDONALD & OLSEN, 1994). Die nebenwirkungsreichen Barbiturate sind seit 1992 in Deutschland nur noch als Narkosemittel zugelassen (GRAEFE *et al.*, 2011). Bereits in den 1960er Jahren wurden die Benzodiazepine in den Markt eingeführt, die die Barbiturate weitgehend verdrängten (LÖSCHER & ROGAWSKI, 2012). Als positiv allosterische Modulatoren erhöhen Benzodiazepine, wie z.B. Diazepam, bei geringen GABA-Konzentrationen die Affinität der meisten GABA_A-Rezeptoren für ihren natürlichen Liganden. Dabei wird die Maximalantwort, die durch hohe GABA-Konzentrationen allein ausgelöst werden kann, nie überschritten (RUDOLPH & KNOFLACH, 2011). Die Benzodiazepin-Bindestelle ist extrazellulär zwischen einer α - und einer γ -Untereinheit lokalisiert und unterscheidet sich trotz ihrer funktionalen Ähnlichkeit von der der Barbiturate (KERR & ONG, 1992; SIGEL, 2002). An dieser Bindestelle sind auch negative Modulatoren wirksam, wie Methyl-6,7-dimethoxy-4-ethyl-beta-carboline-3-carboxylate (DMCM), das den GABA-induzierten Strom inhibiert, oder Antagonisten wie Flumazenil, das keinen direkten Einfluss auf den Chlorid-Strom hat, jedoch die Benzodiazepin-Wirkung inhibiert (HANSON & CZAJKOWSKI, 2008). Benzodiazepine wirken als angstlösende, muskelrelaxierende und schlaffördernde Beruhigungsmittel und werden z.B. zur Therapie von Epilepsie eingesetzt (Riss *et al.*, 2008). Aufgrund der hohen Abhängigkeitsgefahr fallen sie jedoch unter das Betäubungsmittelgesetz (§1 Abs. 1 BtMG, Anlage III).

Andere positiv allosterische Modulatoren des GABA_A-Rezeptors mit distinkten Bindestellen sind bestimmte Neurosteroiden und Ethanol. Beide haben anästhetische Wirkung und folgen dem gleichen Wirkprinzip wie Barbiturate (LAMBERT *et al.*, 2003).

I.3.4 GABA_A-Rezeptoren in Insekten

Invertebraten besitzen ebenso wie Vertebraten ein Nervensystem und weisen auch GABA-Rezeptoren auf. In Arthropoden werden sie jedoch nicht nur im ZNS exprimiert, sondern auch an neuromuskulären Synapsen (LUMMIS, 1990). Ionotrope GABA-Rezeptoren in Arthropoden haben eine Sequenzidentität von 30 - 38 % zu GABA_A-Rezeptoren aus Säugern und sind ihnen strukturell und funktional ähnlich. Wie GABA_A-Rezeptoren in Säugern werden sie von Picrotoxinin geblockt, die allosterische Modulation durch Benzodiazepine und Barbituraten hingegen ist schwach. Gleichzeitig sind sie, ähnlich der GABA_A-p-Rezeptoren, Bicucullin-insensitiv. Aufgrund der einzigartigen Pharmakologie dieser Arthropoden-GABA-Rezeptoren lassen sie sich keinem der Rezeptor-Typen in Säugern zuordnen (HOSIE *et al.*, 2001).

Das erste GABA-Rezeptor-Gen eines Arthropoden wurde aus einem Feldisolat von *Drosophila melanogaster* isoliert, das resistent gegenüber dem Cyclodien Dieldrin war. Daher erhielt dieses Gen den Namen *rdl* (*resistance to dieldrin*) (FFRENCH-CONSTANT *et al.* 1991). Die Dieldrin-Resistenz in *D. melanogaster* ist mit dem Austausch einer einzigen Aminosäure an Position 2' der TM2 an der Chlorid-Kanal-Pore, Alanin (A) 302 zu Serin (S) oder Glycin (G), verbunden (FFRENCH-CONSTANT *et al.* 1993). Nach dieser Entdeckung wurden zahlreiche molekularbiologische und elektrophysiologische Studien zum GABA-Rezeptor in *D. melanogaster* veröffentlicht, die Einsichten in Gemeinsamkeiten und Unterschiede von GABA-Rezeptoren in Insekten und Säugern ermöglicht haben. Orthologe des *rdl*-Gens aus *D. melanogaster* wurden aus einer Reihe von Insekten isoliert. Sie zeigen eine hohe Aminosäurenübereinstimmung (85 - 99 % Identität) mit dem *rdl*-Produkt aus *D. melanogaster* (HOSIE *et al.*, 2001). Zudem wurde die *rdl*-Mutation in Verbindung mit Dieldrin- oder Fipronil-Resistenz in Feldisolaten verschiedenster Insekten auf der ganzen Welt gefunden. Die Aminosäuren an Position 2' und 6' von TM2 sind entscheidend für die Potenz von nicht-kompetitiven Antagonisten, wobei Threonin (T) an 6'-Position in Säugern und Arthropoden konserviert ist, die

Aminosäuren an 2'-Position sich jedoch unterscheiden (OZOE, 2013). Mit fortschreitender Forschung nach den Ursachen für Resistenzen gegen die nicht-kompetitiven Antagonisten, wurden weitere Mutationen im *rdl*-Gen entdeckt. Ein Aminosäureaustausch von T6' zu Leucin (L) in der Rinderzecke führte ebenfalls zu einer Dieldrin-Resistenz (HOPE *et al.*, 2010). In der Fipronil-resistenten Zikade *Sogatella furcifera* wurden gleich zwei miteinander assoziierte Mutationen identifiziert, der bereits bekannte A2'S-Austausch und die Mutation von Arginin (R) 340 zu Glutamin (Q) im cytoplasmatischen Loop zwischen TM3 und TM4 des *Sogatella furcifera rdl*-Gens (NAKAO *et al.*, 2012). In resistenten *Anopheles funestus* Moskitos wurde ein Austausch von Valin (V) 327 zu Isoleucin (I) in der TM2-TM3 Linker Region gefunden und in einem mit Fipronil selektierten, resistenten Stamm von *Drosophila simulans* wurde zusätzlich zur A2'S-Mutation eine weiterer Austausch von T350 zu Methionin (M) in TM3 identifiziert (LE GOFF *et al.*, 2005; WONDJI *et al.*, 2011). Die ausgeprägten Resistenzen dieser Substitutionen im *rdl*-Gen deuten darauf hin, dass die RDL-Untereinheit mit großer Wahrscheinlichkeit Bestandteil vieler nativer GABA-Rezeptoren ist (HOSIE *et al.*, 1997). Einen weiteren Hinweis darauf gaben immunocytochemische Studien in *D. melanogaster*, die eine weitreichende Verteilung des *rdl*-Produktes im ZNS, jedoch nicht in der Muskulatur zeigten (ARONSTEIN & FFRENCH-CONSTANT, 1995).

Die funktionelle Diversität der GABA-Rezeptoren in Insekten wird nicht wie bei Säugern bevorzugt durch die Kombination diverser Untereinheiten erreicht, sondern vor allem durch alternatives Spleißen, RNA-Editing und Genduplikation von *rdl* (OZOE, 2013). Das aus insgesamt neun Exons bestehende *rdl*-Gen durchläuft bei der RNA-Reifung alternatives Spleißen der Exons 3 und 6, die in der extrazellulären N-terminalen Domäne liegen. Dieser Vorgang resultiert in vier partiell unterschiedlichen Isoformen des *rdl*-Genprodukts. Diese GABA-Rezeptor-Region ist für Spleiß-Vorgänge ungewöhnlich, da sich die Mehrheit der Spleiß-Varianten bei GABA-Rezeptoren in Säugern im intrazellulären Loop unterscheiden (HOSIE *et al.*, 2001). In der extrazellulären Domäne des RDL-Proteins beeinflusst das Spleißen die Ligandenbindestelle und verändert dadurch die Wirksamkeit des Agonisten (HOSIE *et al.*, 2001). Wie viele der Resistenz-verursachenden Punktmutationen sind auch die Spleiß-Regionen der Exons 3 und 6 zwischen vielen Insekten konserviert (BUCKINGHAM *et al.*, 2005). Das *rdl*-Gen durchläuft auch eine Form des RNA-Editings, die auch „A-zu-I-Editing“ genannt wird. An einigen Stellen der mRNA wird Adenosin

enzymatisch zu Inosin umgesetzt. Dies führt im Translationsvorgang zu veränderten Aminosäuren, die bei *Drosophila*-RDL an vier Stellen nachgewiesen wurden: R122G in der N-terminalen Domäne, I283V in TM1, N294D in der TM1-TM2 Linkerregion und M360V in der TM3-TM4 Linker-Region. Die Kombination von alternativem Spleißen und RNA-Editing von *rdl* scheint für eine genaue Regulation schneller synaptischer Inhibition notwendig zu sein (OZOE, 2013).

Die RDL-Untereinheit bildet nach rekombinanter Expression in *Xenopus laevis*-Oozyten homooligomere Chlorid-Kanäle, deren Pharmakologie mit der Pharmakologie der Mehrheit nativer GABA_A-Rezeptoren in Insekten übereinstimmt. Da die Expression der RDL-Untereinheit dennoch nicht in allen Geweben nachgewiesen werden konnte, in denen auch GABA-gesteuerter Chlorid-Ströme messbar sind, lag die Vermutung nahe, dass es weitere Untereinheiten in Insekten gibt, die an der Bildung von GABA_A-Rezeptoren beteiligt sind (BUCKINGHAM *et al.*, 2005). In *D. melanogaster* wurden mit GRD (glycine-like receptor of *Drosophila*) und LCCH3 (ligand-gated chloride channel homologue 3) zwei weitere Insekten-GABA_A-Rezeptor Untereinheiten identifiziert (MCGONIGLE & LUMMIS, 2009). In der GRD-Untereinheit fehlt das typische PAR-Motiv, das die Selektivität für Chlorid-Ionen bestimmt, dafür enthält sie eine Insertion von 73 Aminosäuren in der extrazellulären Domäne, die in keiner anderen Sequenz dieser Gen-Familie vorkommt (KNIPPLE & SODERLUND, 2010). LCCH3 besitzt eine hohe Homologie zur β -Untereinheit der GABA_A-Rezeptoren in Säugern (HENDERSON *et al.*, 1993). Obwohl GRD und LCCH3 aufgrund von Sequenz-Vergleichen eine mögliche Anionen-Kanal Aktivität vermuten ließen, ergab die Koexpression der beiden Untereinheiten in *Xenopus laevis*-Oozyten einen Kationen-Kanal. Zudem sind sie unempfindlich gegenüber Dieldrin (GISSELMANN *et al.*, 2004). RDL und LCCH3 bilden bei Koexpression einen Picrotoxinin-insensitiven, Bicucullin-sensitiven Kanal, dessen Pharmakologie gar nicht der nativer GABA-Rezeptoren in Insekten gleicht (ZHANG *et al.*, 1995). Auch eine Kolokalisation dieser beiden Untereinheiten konnte nicht nachgewiesen werden (AARONSTEIN *et al.*, 1996).

I.3.5 GABA_A-Rezeptoren in Zecken

GABA_A-Rezeptoren in Zecken wurden erstmals von ZHENG *et al.* (2003) beschrieben. Die identifizierte Sequenz aus der amerikanischen Hundezecke *Dermacentor variabilis* ist zu 64 % identisch mit der RDL-Untereinheit aus *D. melanogaster* und lässt sich in *Xenopus laevis*-Oozyten als Homopentamer exprimieren. Der Rezeptor ist durch GABA aktivierbar und kann durch Fipronil und PicROTOXININ blockiert werden, reagiert jedoch nicht auf Glutamat oder Glycin. Aufgrund dieser strukturellen und pharmakologischen Ähnlichkeiten zum *D. melanogaster* RDL-Rezeptor, stellte der RDL_{Dv} Rezeptor ein potentiell Target für ein Akarizid-Screening dar.

Die starke Resistenzentwicklung bei der Rinderzecke konnte lange Zeit nur durch den zeitaufwändigen Larval-Packet-Test nachgewiesen werden. Eine schnelle Alternative, die auch ohne lebende Zecken auskommt, war der Nachweis genetischer Mutationen, die mit Resistenzen verbunden sind. So wurde in neuerer Zeit auch die homologe RDL-Untereinheit aus *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* beschrieben, deren Aminosäuresequenz zu 98 % identisch zu RDL_{Dv} ist. In der Studie von HOPE *et al.* (2010) wurde erstmals auch eine Dieldrin-Resistenz-*verursachende* Mutation identifiziert, die an anderer Position liegt, als die bisher bei Insekten beschriebenen. Die Threonin zu Leucin Mutation an Position 306 ist ebenfalls in TM2 lokalisiert und liegt vier Aminosäuren von der A2'S Mutation entfernt. Die klassische A2'S Mutation wurde bisher noch in keiner Zeckenspezies beschrieben.

I.4 Zielsetzung

GABA_A-Rezeptoren spielen eine wichtige Rolle in der synaptischen Transmission im Zentralnervensystem von Vertebraten und Invertebraten. Sie stellen die primäre Zielstruktur für verschiedene Insektizidklassen wie zyklische chlorierte Kohlenwasserstoffe, Phenylpyrazole, Isoxazoline oder Metadiamide dar. Diese chemischen Klassen sind von Interesse für die Entwicklung neuer Akarizide. Biologische *in-vitro* Studien und Registrierungen von Wirksamkeiten gegen Zecken für existierende Produkte gaben bereits Hinweise auf Gemeinsamkeiten und Unterschiede zwischen verschiedenen Zeckenspezies in der Empfindlichkeit gegenüber diesen Verbindungen. Für eine rationale Strategie der Wirkstofffindung im Akarizid-Bereich ist die detaillierte Kenntnis der Bindungsstellen und -eigenschaften essentiell. Im Zuge dieser Studie wurde ein tieferes molekulares Verständnis des Zecken-GABA_A-Rezeptors angestrebt.

Zu Beginn der Arbeit lag wenig Information aus Sequenzstudien zu GABA_A-Rezeptoren aus Zecken vor, die Aufschluss über Gemeinsamkeiten oder Unterschiede zwischen verschiedenen Zeckenspezies gab. Ein Ziel dieser Arbeit war zunächst die Identifikation und Analyse der GABA_A-Rezeptor-kodierenden Sequenzen aus den drei veterinär- und humanmedizinisch wichtigen Zeckenspezies *Ixodes ricinus*, *Rhipicephalus sanguineus* und *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. Anschließend sollten die Rezeptoren im heterologen Expressionssystem in *Xenopus laevis*-Oozyten elektrophysiologisch mit bekannten GABA_A-Rezeptor-Agonisten und -Antagonisten charakterisiert werden.

Da das Oozyten-Expressionssystem für die Verwendung im Screening bezüglich Aufwand und Durchsatz nicht ideal ist, sollte zusätzlich ein alternatives Testsystem entwickelt werden. Hierzu war geplant, Säugerzellen mit dem Rezeptor einer Zeckenspezies zu transfizieren und eine stabile, klonale Zelllinie zu selektieren. Diese Zelllinie sollte dann als Grundlage zur Entwicklung fluorimetrischen GABA_A-Rezeptor-Assays mit dem angestrebten höheren Durchsatz dienen, zu dessen Validierung bekannte Agonisten und Antagonisten pharmakologisch charakterisiert werden sollten.

II Material & Methoden

II.1 Material

II.1.1 Zecken

Folgende Zeckenspezies wurden von der Bayer Animal Health GmbH (Monheim) zur Verfügung gestellt. Die Zecken wurden im Brutschrank bei folgenden Bedingungen gelagert (nach persönlicher Kommunikation, Dr. Sabrina Foit, Bayer Animal Health GmbH):

| | |
|--|--------------------------------------|
| <i>Rhipicephalus sanguineus</i> : | 27°C, 80 % relative Luftfeuchtigkeit |
| <i>Rhipicephalus (Boophilus) microplus</i> : | 27°C, 80 % relative Luftfeuchtigkeit |
| <i>Ixodes ricinus</i> : | 20°C, 95 % relative Luftfeuchtigkeit |

II.1.2 Bakterienstamm

Der Stamm *Escherichia coli* XL1-Blue, bezogen von Stratagene, wurde zur Amplifikation der Plasmidkonstrukte benötigt, die zur Klonierung und Sequenzierung verwendet wurden.

Genotyp: recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac [F' proAB lacI^qZΔM15 Tn10 (Tet^r)]

II.1.3 Eukaryotische Zelllinie

CHO-Zellen (Zelllinie aus Ovarien des chinesischen Hamsters *Cricetulus griseus*) des Stamms CHO-Dukx wurden von der Abteilung Cell Biology der Bayer Pharma AG (Wuppertal) zur Verfügung gestellt. Im Folgenden werden diese Zellen nur noch als „CHO-Zellen“ bezeichnet. Diese Zellen wurden zur Erzeugung einer Zelllinie verwendet, die stabil GABA_A-Rezeptoren aus Zecken exprimiert, da sie nur eine geringe Anzahl endogener Ionenkanäle besitzen.

II.1.4 Chemikalien und Enzyme

Analysenreine Chemikalien wurden im Allgemeinen von Sigma-Aldrich oder Fisher Scientific bezogen. Soweit nicht anders angegeben, wurde zur Herstellung von Puffern und einigen Lösungen entionisiertes, gereinigtes und sterilfiltriertes Wasser verwendet (Millipore Milli-Q Academic Gradient A10, mit Millipack 40 Sterilfilter 0,22 µm). Nuklease-freies Wasser wurde von der Firma Qiagen (Deutschland) erworben.

| | |
|-----------------------------|--|
| 3-APS | Sigma Aldrich Chemie GmbH (Deutschland) |
| Agar | Sigma Aldrich Chemie GmbH (Deutschland) |
| Agarose | Sigma Aldrich Chemie GmbH (Deutschland) |
| Baclofen | Sigma Aldrich Chemie GmbH (Deutschland) |
| (+)-Bicuculline | Sigma Aldrich Chemie GmbH (Deutschland) |
| Brilliant Black BN | Sigma Aldrich Chemie GmbH (Deutschland) |
| DMSO | Merck KGaA (Deutschland) |
| 6x DNA Loading Dye | Thermo Fisher Scientific (USA) |
| α-Endosulfan | Sigma Aldrich Chemie GmbH (Deutschland) |
| Ethanol absolut | Sigma Aldrich Chemie GmbH (Deutschland) |
| FBS | Gibco®, Life Technologies GmbH (USA) |
| Fipronil | Sigma Aldrich Chemie GmbH (Deutschland) |
| GelRed™ (10.000X in Wasser) | Biotium (USA) |
| GeneRuler 1 kb DNA ladder | Thermo Fisher Scientific (USA) |
| Geneticin (50 mg/ ml) | Gibco®, Life Technologies GmbH (USA) |
| GlutaMAX™ Supplement | Gibco®, Life Technologies GmbH (USA) |
| Hefeextrakt | Sigma Aldrich Chemie GmbH (Deutschland) |
| Isoguvacin | Sigma Aldrich Chemie GmbH (Deutschland) |
| Ivermectin | Sigma Aldrich Chemie GmbH (Deutschland) |
| KAPA HiFi™ Polymerase | PEQLAB Biotechnologie GmbH (Deutschland) |

| | |
|--|---|
| Lipofectamine® 2000 Reagent | Invitrogen™, Life Technologies GmbH (USA) |
| MEM Alpha Medium (1X) | Gibco®, Life Technologies GmbH (USA) |
| Muscimol | Sigma Aldrich Chemie GmbH (Deutschland) |
| Natriumchlorid (NaCl) | Sigma Aldrich Chemie GmbH (Deutschland) |
| Penicillin-Streptomycin (5000 u/ ml) | Gibco®, Life Technologies GmbH (USA) |
| Picrotoxinin | Sigma Aldrich Chemie GmbH (Deutschland) |
| ssRNA Ladder | New England Biolabs (USA) |
| ssRNA Loading Buffer (2X) | New England Biolabs (USA) |
| UltraPure™ DNA Typing Grade® TAE Puffer (50X) | Invitrogen™, Life Technologies GmbH (USA) |
| SOC Medium | Sigma Aldrich Chemie GmbH (Deutschland) |
| Tango Puffer (10X) | Thermo Fisher Scientific (USA) |
| THIP | Tocris Bioscience (United Kingdom) |
| Toxaphene | Sigma Aldrich Chemie GmbH (Deutschland) |
| TrypLE Express (1X) | Gibco®, Life Technologies GmbH (USA) |
| Trypton | Sigma Aldrich Chemie GmbH (Deutschland) |

II.1.5 Puffer und Lösungen

Barth's Lösung

| | |
|---------|-----------------------------------|
| 88 mM | NaCl |
| 1 mM | KCl |
| 0,4 mM | CaCl ₂ |
| 0,33 mM | Ca(NO ₃) ₂ |
| 0,8 mM | MgSO ₄ |
| 5 mM | Tris-HCl |
| 2,4 mM | NaHCO ₃ |
| | pH 7,2 |

Normal-Frosch-Ringer-Lösung (NFR)

| | |
|-------|-------------------|
| 90 mM | NaCl |
| 2 mM | KCl |
| 2 mM | CaCl ₂ |
| 1 mM | MgCl ₂ |
| 5 mM | HEPES |
| | pH 7,2 |

Barth's und NFR-Lösungen nach Angaben der Firma Ecocyte Bioscience.

Cafty-Tyrode

| | |
|--------|--|
| 20 mM | HEPES |
| 130 mM | NaCl |
| 5 mM | NaHCO ₃ |
| 2 mM | MgCl ₂ x 6 H ₂ O |
| 2 mM | KCl |
| 2 mM | CaCl ₂ |
| | pH 7,4 |

Natriumgluconat-Tyrode

| | |
|--------|--|
| 20 mM | HEPES |
| 130 mM | Natriumgluconat |
| 5 mM | NaHCO ₃ |
| 2 mM | MgCl ₂ x 6 H ₂ O |
| 2 mM | KCl |
| 2 mM | CaCl ₂ |
| | pH 7,4 |

"Membrane Potential Assay" (MPA) Lösung

Cafty-Tyrode bzw. Natriumgluconat-Tyrode

125 mg/ l Membrane Potential Blue Dye (vgl. II.1.6)

1 % Brilliant Black BN (Stammlösung: 30 mg/ ml in H₂O)

Cafty-, Natriumgluconat-Tyrodien und MPA-Lösung nach Magdalena Platzk, Bayer Pharma, persönliche Kommunikation.

II.1.6 Kommerzielle Kits

| | |
|--|---------------------------------|
| illustra RNAspin Mini RNA Isolation Kit | GE Healthcare (Deutschland) |
| DNA-free™ Kit | Ambion (USA) |
| RevertAid™ First Strand cDNA Synthesis Kit | Thermo Scientific (Deutschland) |
| QIAquick Gel Extraction Kit | Qiagen (Deutschland) |
| CloneJET™ PCR Cloning Kit | Thermo Scientific (Deutschland) |
| GeneJET Plasmid Miniprep Kit | Thermo Scientific (Deutschland) |
| mMESSAGE mMACHINE® Kit | Ambion (USA) |
| FLIPR® Membrane Potential Assay Blue Kit | Molecular Devices (USA) |

II.1.7 Nährmedien

Flüssigkulturen von *E. coli* wurden in LB-Medium auf Grundlage von BERTANI (1951) vermehrt. Zur Selektion einzelner Klone wurden die Bakterien auf Agarplatten ausgestrichen, die aus LB-Medium und 1,5 % Agar (w/v) bestanden. Alle Medien wurden für 20 min bei 120°C autoklaviert. Entsprechende Antibiotika wurden vor Gebrauch frisch zugesetzt.

| | |
|------------------|-------------------|
| <u>LB-Medium</u> | 10 g/l Trypton |
| | 5 g/l Hefeextrakt |
| | 10 g/l NaCl |
| | pH 7,0 |

CHO-Zellen wurden in dukx-Medium (modifiziert nach SIMONSEN & LEVINSON, 1983) kultiviert. Zur Selektion positiv transfizierter Klone wurde dem Medium 1 mg/ml Geneticin zugesetzt.

| | |
|--------------------|---|
| <u>dukx-Medium</u> | MEM Alpha |
| | 10 % FBS |
| | 5 % GlutaMAX™ |
| | 1 % Penicillin-Streptomycin (5000 u/ml) |

II.1.8 Primer

Alle Primer wurden von der Firma Sigma Aldrich synthetisiert und zu einer Endkonzentration von 100 ng/ µl in Nuklease-freiem Wasser gelöst. Um die Wahrscheinlichkeit einer Selbst-Komplementarität auszuschließen, wurden alle Primer mit dem Programm OligoCalc (KIBBE, 2007) überprüft.

Tab. II.1 Bezeichnungen, Sequenzen und Verwendungszweck der eingesetzten Primer

| Primer | Sequenz (5'-3') | Funktion |
|--|--|---|
| RmrdlF | ACC ATA GGC AGG CGA TGG CTT CAG TTG C | Amplifikation des Zecken- <i>rdl</i> -Gen-ORFs |
| RmrdlR | GAT CAG CAG CGG TTG CAG CAG GCC GTC | Amplifikation des Zecken- <i>rdl</i> -Gen-ORFs |
| Ex_RmrdlF | AGC GAA TTC AAC CAT GAG GCA GGC GAT GGC G | Addition einer 5' <i>EcoRI</i> -Restriktionsschnittstelle an die Zecken- <i>rdl</i> -Gene |
| Ex_RmrdlR | AGC TCT AGA CTA GTC GCC AAC GTC GTC C | Addition einer 3' <i>XbaI</i> -Restriktionsschnittstelle an die Zecken- <i>rdl</i> -Gene |
| pJET1.2_fwd | CGA CTC ACT ATA GGG AGA GCG GC | Primer zur Sequenzierung von pJET1.2-Konstrukten |
| pJET1.2_rev | AAG AAC ATC GAT TTT CCA TGG CAG | Primer zur Sequenzierung von pJET1.2-Konstrukten |
| T7_fwd (Eurofins MWG Operon) | TAA TAC GAC TCA CTA TAG GG | Primer zur Sequenzierung von pcDNA3.1(+)-Konstrukten |
| pCR3.1-BGHrev (Eurofins MWG Operon) | TAG AAG GCA CAG TCG AGG | Primer zur Sequenzierung von pcDNA3.1(+)-Konstrukten |

II.2 Geräte

| | |
|---|--|
| S1000 Thermal Cycler | Bio-Rad Laboratories (Deutschland) |
| 2K15 Kühlischzentrifuge | Sigma Laborzentrifugen (Deutschland) |
| 5810 R Kühlischzentrifuge | Eppendorf (Deutschland) |
| E.A.S.Y.® Win32 Dokumentationssystem | Herolab (Deutschland) |
| Certomat® BS-1 Inkubationsschüttler | Sartorius (Deutschland) |
| BioPhotometer plus | Eppendorf (Deutschland) |
| Roboocyte2 | Multi Channel Systems MCS GmbH (Deutschland) |
| CyBi®-Well Liquid Handling Robot | CyBio (Deutschland) |
| Megafuge 1.0 | Heraeus (Deutschland) |
| Embla 384 Microplate Washer | Skatron/ Molecular Devices (USA) |
| Multidrop Combi Reagent Dispenser | Thermo Fisher Scientific (USA) |
| Fluobox | Mikrotiterplatten-Fluorometer mit Möglichkeit der Substanzzugabe; Eigenproduktion der Bayer Technology Services |
| FLIPR® Tetra High Throughput Cellular Screening System | Molecular Devices (USA) |

II.3 Molekularbiologische Methoden

II.3.1 RNA-Extraktion

Alle in dieser Studie verwendeten Organismen wurden vor der RNA-Extraktion lebend in Flüssigstickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert. Gefrorene adulte Zecken wurden unter ständiger Kühlung mit Flüssigstickstoff in Eppendorf-Gefäßen mit Mikropistillen zu einem Pulver zermahlen. Aus diesem Homogenat wurde Gesamt-RNA mittels illustra RNAspin Mini RNA Isolation Kit gemäß Angaben des Herstellers (GE Healthcare) extrahiert. Diese Methode basiert auf dem Prinzip der Adsorptionschromatographie (BOOM *et al.*, 1990; PARIDA *et al.*, 2006). In einem ersten Schritt wurden RNasen inaktiviert und Nucleinsäuren an eine Silica-Membran gebunden. Durch Behandlung der Membran mit RNase-freier DNase wurde verbliebene DNA entfernt und durch die Zugabe von Ethanol die RNA gewaschen. Schließlich wurde die aufgereinigte, adsorbierte RNA durch schwach ionische Bedingungen mit RNase-freiem Wasser eluiert. Zur Entfernung verbliebener genomischer DNA, wurden die Proben erneut mit RNase-freier DNase gemäß Angaben des Herstellers (Ambion) behandelt. Die RNA wurde anschließend zur cDNA-Synthese verwendet bzw. bis zur weiteren Verwendung bei -80°C gelagert.

II.3.2 Reverse Transkription (Erststrang-cDNA-Synthese)

Komplementäre DNA (cDNA) wird von RNA-abhängigen DNA-Polymerasen, die auch Reverse Transkriptasen genannt werden, synthetisiert. cDNA enthält wie mRNA die ununterbrochene Proteinsequenz-Information anders als genomische Gene, deren kodierende DNA von Introns unterbrochen werden. Für die Erststrang-cDNA-Synthese aus Gesamt-RNA wurde das RevertAid™ First Strand cDNA Synthesis Kit benutzt. Hierfür wurde nach dem Protokoll des Herstellers 1 µg extrahierte Gesamt-RNA mit Nuklease-freiem Wasser und 1 µl des mitgelieferten Oligo(dT)₁₈ Primers (0,5 µg/ µl) gemischt, der sich bevorzugt an den Poly(A)-Schwanz eukaryotischer mRNA anlagert. Das Gemisch wurde zunächst bei 65°C für 5 min denaturiert und dann auf Eis gekühlt. Durch die Zugabe von 1 µl RiboLock™ RNase Inhibitor (20 U/ µl) wurde ein Abbau der Template-RNA durch eine mögliche RNase-Kontamination verhindert. Die Erststrang-cDNA wurde mit Hilfe von 1 µl

RevertAid™ M-MuLV Reversen Transkriptase (200 U/ µl) synthetisiert. Diese Reaktion fand in Anwesenheit von 1 mM dNTP Mix und des Reaktionspuffers (1X) für 60 min bei 42°C statt. Durch Erhitzen des Reaktionsansatzes auf 70°C für 5 min wurde die Reaktion gestoppt. Die synthetisierte cDNA wurde im Anschluss als Template für die PCR eingesetzt bzw. bei -20°C bis zum weiteren Gebrauch gelagert.

II.3.3 DNA-Amplifikation durch Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die KAPA HiFi DNA-Polymerase wurden aufgrund ihrer geringen Fehlerrate („Proof-reading“, 3'-5' Exonuklease-Aktivität) zur Klonierung verwendet (je 1 Fehler pro $3,6 \times 10^6$). Für analytische Kolonie-PCR wurde die DreamTaq DNA-Polymerase ohne „Proof-reading“-Funktion benutzt.

Tab. II.2 Zusammensetzung und Reaktionsbedingungen der durchgeführten Polymerase-Kettenreaktionen

| Klonierung | | |
|------------------------------------|---------|-----------------------------|
| KAPA HiFi Fidelity Puffer (5X) | 5 µl | 1. Zyklus 95°C für 2 min |
| 5' Primer (10 ng/µl) | 0,75 µl | 2.-30. Zyklus 98°C für 20 s |
| 3' Primer (10 ng/µl) | 0,75 µl | 65°C für 30 s |
| dNTPs (0,3 mM jedes dNTP) | 0,75 µl | 72°C für 50 s |
| Template DNA | 1 µl | 31. Zyklus 98°C für 20 s |
| KAPA HiFi™ DNA-Polymerase (1 U/µl) | 0,5 µl | 65°C für 30 s |
| Nuklease-freies Wasser ad | 25 µl | 72°C für 2 min |
| Kolonie-PCR | | |
| DreamTaq Green PCR Master Mix (2X) | 12,5 µl | 1. Zyklus 95°C für 5 min |
| 5' Primer (10 ng/µl) | 0,5 µl | 2.-30. Zyklus 95°C für 30 s |
| 3' Primer (10 ng/µl) | 0,5 µl | 50°C für 40 s |
| Template DNA | 2 µl | 72°C für 1 min |
| Nuklease-freies Wasser ad | 25 µl | |

II.3.4 Nukleinsäuretrennung mittels Agarose-Gelelektrophorese

Im Allgemeinen hatten die für diese Arbeit benutzen Agarosegele eine Konzentration von 1 - 1,2 % (w/v). Die Agarose wurde in 1X TAE-Puffer (vgl. II.1.4; 2 M Tris-Acetate, 50 mM EDTA) mit einem pH von 7,6 erhitzt und gelöst. Sobald die Lösung auf etwa 50°C abgekühlt war, wurde 1X Geldred™ zugesetzt. Für die elektrophoretische Auftrennung wurden DNA-Proben mit DNA „Loading dye“ (vgl. II.1.4) und RNA-Proben mit „ssRNA Loading Buffer“ (vgl. II.1.4) versetzt.

RNA-Proben wurden zusätzlich bei 65°C für 5 min denaturiert bevor sie auf ein Gel aufgetragen wurden. Die Proben und ein geeigneter Größenstandard, wie etwa der „GeneRuler 1 kb Ladder“ (vgl. II.1.4) oder der „ssRNA Ladder“ (vgl. II.1.4), wurden bei 100 V für 60 - 90 min aufgetrennt. Die Gele wurden mit Hilfe des Herolab E.A.S.Y.® Win32 Dokumentationssystems analysiert.

II.3.5 Extraktion von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

PCR-amplifizierte Fragmente der korrekten Größe wurden mittels Skalpell aus dem Gel ausgeschnitten. Dabei wurde versucht die UV-Exposition so kurz wie möglich zu halten, um das Einführen von UV-induzierten Mutationen zu vermeiden. Die Extraktion aus der Agarosematrix erfolgte mit Hilfe des QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen). Das jeweilige Gelstück wurde im entsprechenden mitgelieferten Puffer bei 50°C gelöst und die DNA wurde nach Angaben des Herstellers mit Hilfe einer chaotropen Silica-Säule aufgereinigt.

II.3.6 Bestimmung der RNA- und DNA-Konzentration

Die Konzentration und Integrität von RNA und DNA wurde mittels Absorptionsspektroskopie bestimmt. Die Messungen wurden in Verdünnungen (z.B. 1:25) mit Hilfe des Eppendorf BioPhotometer plus durchgeführt. Nukleotide haben eine maximale Absorption bei 260 nm, wohingegen die Absorptionsmaxima von Proteinen und Zuckern bei 280 nm bzw. 230 nm liegen. Ein A260/A280-Verhältnis von etwa 1,8 für DNA und 2,0 für RNA zeigt reine, proteinfreie Proben an. Das A260/A230-Verhältnis ist ein zusätzlicher Parameter zur Überprüfung auf andere Kontaminationen und sollte für reine Proben bei 2,0 – 2,2 liegen (SAMBROOK & RUSSELL, 2001).

II.3.7 DNA-Präzipitation

Zunächst wurde das Probenvolumen gemessen und die DNA durch Zusatz von $\frac{1}{10}$ Volumen 3 M Natriumacetat und 2,5 Volumen reinem Ethanol für 15 min bei Raumtemperatur gefällt. Nach einer 20-minütigen Zentrifugation bei 16.000 x g wurde der Überstand verworfen und das Pellet mit 200 μ l Ethanol (70 %) gewaschen. Die Probe wurde nochmals für 20 min bei 16.000 x g zentrifugiert und der Überstand abgenommen. Das Pellet wurde luftgetrocknet und schließlich in der entsprechenden Menge Nuklease-freiem Wasser resuspendiert um die gewünschte Konzentration zu erzielen (modifiziert nach SAMBROOK & RUSSEL, 2001).

II.3.8 Klonierung und Transformation

Amplifizierte und gereinigte DNA-Fragmente aus PCR-Reaktionen wurden in den linearisierten pJET1.2-Vektor kloniert. Die Ligation erfolgte in einem molaren Verhältnis von 3:1 durch eine T4 DNA-Ligase nach dem „Blunt-end“-Protokoll des CloneJET™ PCR Cloning Kit.

Die Transformation wurde anhand des Protokolls des Herstellers Stratagene durchgeführt. Dafür wurden 200 μ l XL1-Blue superkompetente *E. coli*-Zellen auf Eis aufgetaut und vor der Transformation mit 3,4 μ l β -Mercaptoethanol versetzt. Aliquots von 20 - 30 μ l Zellen wurden mit 2 μ l des Ligationsgemisches versetzt. Nach 30-minütiger Inkubation auf Eis, erfolgte ein Hitzeschock für exakt 45 s bei 42°C im Wasserbad. Anschließend wurde der Transformationsansatz sofort wieder für 2 min auf Eis gekühlt. Dann wurden 400 μ l vorgewärmtes SOC-Medium zugefügt und die Zellen für eine Stunde bei 37°C unter Schütteln (250 rpm) inkubiert. Schließlich wurden Aliquots der transformierten Zellen auf LB-Agar ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert. Zur Selektion transformierter Klone enthielten die Agarplatten 100 μ g/ml Ampicillin.

II.3.9 Kolonie-PCR

Die Methode der Kolonie-PCR wurde zur Überprüfung einer erfolgreichen Insertion der Zecken-*rdl*-Gene in die gewünschten Plasmide verwendet (Dr. Martin Williamson, persönliche Kommunikation). Nach der Transformation (vgl. II.3.8) wurden

vereinzelte Kolonien zufällig mit einer sterilen Pipettenspitze von der Agarplatte gepickt und eine neue nummerierte LB-Agarplatte mit Ampicillin (100 µg/ml) leicht mit der Spitze berührt. Mit der gleichen Spitze wurde dann 4 ml LB-Medium (100 µg/ml Ampicillin) für die spätere Plasmidpräparation angeimpft. Schließlich wurde die Spitze für etwa 5 min in 20 µl Nuklease-freies Wasser überführt, welches dann als Template in der PCR-Reaktion diente (vgl. II.3.3). Agarplatten und Minikulturen wurden über Nacht bei 37°C inkubiert, die Minikulturen zusätzlich bei 250 rpm geschüttelt. Die PCR-Reaktionen wurden auf einem Agarosegel aufgetrennt (vgl. II.3.4), um zu überprüfen, ob die richtigen DNA-Fragmente amplifiziert wurden. Plasmide aus Kolonien mit einem amplifizierten DNA-Fragment der richtigen Größe wurden isoliert (vgl. II.3.5) und in beide Orientierungen der DNA sequenziert (vgl. II.3.11). Falls höhere Plasmid DNA-Konzentrationen erforderlich waren, wurde 100 ml LB-Medium mit 100 µl einer Übernachtskultur angeimpft, und über Nacht bei 37°C und konstantem Schütteln bei 250 rpm inkubiert.

II.3.10 Plasmidpräparation

Zur Isolierung von Plasmiden aus bakteriellen Minikulturen (vgl. II.4.8) wurde das Plasmid Mini Kit der Firma Qiagen nach Angaben des Herstellers verwendet. Das Prinzip dieser Methode ist die alkalische Lyse. Dabei lysieren Natriumhydroxid und SDS die Zellen und denaturieren chromosomale und Plasmid-DNA. Nach der Neutralisierung durch Kaliumacetat ist die renaturierte Plasmid-DNA löslich und bindet an die Silica-Membran der Säule, während genomische DNA aufgrund ihrer Größe nur unvollständig und irregulär renaturiert, zusammen mit Proteinen ausfällt und vor der Membranbindung durch Zentrifugation abgetrennt wird. Plasmid-DNA wird dann unter schwach ionischen Bedingungen mit Nuklease-freiem Wasser von der Membran eluiert (BIRNBOIM & DOLY, 1979; BIRNBOIM, 1983; AUSUBEL *et al.*, 1997).

II.3.11 Sequenzierung und Sequenzanalyse

Die Sequenzierung der DNA-Proben erfolgte durch die Firma Eurofins MWG Operon (www.eurofinsdna.com), wobei für das jeweilige Plasmid geeignete Primer verwendet wurden (vgl. Tab. II.1). Analysiert und bearbeitet wurden die Ergebnisse mit der Software Geneious Pro 5.4.4 (GENEIOUS) (Biomatters; DRUMMOND *et al.*, 2010). Die Vorhersage der Transmembranhelices und deren Topologie wurde mit Hilfe von

TMHMM 2.0 durchgeführt (öffentlich verfügbar auf <http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM-2.0/>). Die Identifikation von Importsequenzen für den Transport des Proteins in das endoplasmatische Retikulum erfolgte über SignalP 4.1 (PETERSEN *et al.*, 2011) (öffentlich verfügbar auf <http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>). Und für die Vorhersage von Phosphorylierungsstellen im TM3-TM4-Linker wurde der NetPhos 2.0 Server verwendet (BLOM *et al.*, 1999) (öffentlich verfügbar auf <http://www.cbs.dtu.dk/services/NetPhos/>).

II.3.12 Subklonierung

Zum Einsatz in die in-vitro Transkription bzw. für die Expression in Säugerzellen wurden die Zecken-*rdl*-Gene in ein geeignetes Plasmid subkloniert. Hierzu wurde der Vektor pcDNA3.1(+) gewählt. Zunächst wurden mittels PCR 5'- und 3'-Restriktionsschnittstellen in das jeweilige *rdl*-Fragment eingefügt. Es wurden die Restriktionsschnittstellen *EcoRI* und *XbaI* gewählt und die Primer Ex_BmrdIF und Ex_BmrdIR (vgl. II.1.8, Tab. II.1) konstruiert, die die Anfangs- bzw. Endsequenz der Gene, die Sequenz der jeweiligen Restriktionsschnittstelle und Überhangbasen enthielten. Im Anschluss wurden alle PCR-Reaktionen mittels Agarose-Gelelektrophorese getrennt, die DNA-Fragmente der richtigen Größe extrahiert und deren Konzentration bestimmt. Die amplifizierten DNA-Fragmente und der Vektor pcDNA3.1(+) wurden dann mit den Restriktionsenzymen *EcoRI* und *XbaI* gespalten. Die Zusammensetzung des Reaktionsansatzes für den Doppelspaltung wurde mit Hilfe des Onlinetools <http://www.thermoscientificbio.com/webtools/doubledigest/> ermittelt. Für den Reaktionsansatz wurden 0,6 µg DNA, 1 µl *EcoRI* (10 U/ µl), 3 µl *XbaI* (10 U/ µl) und 6 µl Tango-Puffer (10X, 330 mM Tris-Acetat (pH 7,9), 100 mM Magnesiumacetat, 660 mM Kaliumacetat, 1 mg/ mL BSA) gemischt und auf ein Gesamtvolumen von 30 µl mit Nuklease-freiem Wasser aufgefüllt. Die Reaktion wurde für 15 Std bei 37°C inkubiert und anschließend für 20 min bei 65°C durch Hitzeinaktivierung terminiert. Schließlich wurden die aus dieser Reaktion stammenden Konstrukte mit dem ebenfalls mit *EcoRI/ XbaI* vorbereiteten Vektor pcDNA3.1(+) ligiert. Dafür wurden 2 µl des gespaltenen Vektors mit 10 µl des jeweiligen Konstrukts, 2 µl des T4 DNA-Ligase Puffers und 5 µl Nuklease-freiem Wasser gemischt und die Reaktion durch Zugabe von 1 µl T4 DNA-Ligase (U/ µl) gestartet. Der Reaktionsansatz wurde für eine Stunde bei 22°C inkubiert und direkt im Anschluss in *E. coli* transformiert (vgl. II.3.8).

II.3.13 In-vitro Transkription

Die Zecken-*rdll* pcDNA3.1(+)-Konstrukte wurden zunächst mit dem Restriktionsenzym *PvuI* linearisiert. In einem Gesamtvolumen von 80 µl wurden 4 µg jedes Konstrukts mit 4 µl *PvuI* (10 U/ µl) und 8 µl Puffer R bei 37°C für 90 min inkubiert und die Reaktion wurde durch eine zehninütige Inkubation bei 70°C terminiert.

Die cRNA Transkription wurde durch eine T7-RNA-Polymerase katalysiert. Dafür wurde das mMMESSAGE mMACHINE T7 Kit (Applied Biosystems) gemäß des Protokolls des Herstellers verwendet. Die Integrität der cRNA wurde mittels Agarose-Gelelektrophorese (vgl. II.3.4) und Absorptionsspektroskopie (vgl. II.3.6) überprüft. Die cRNA wurde bis zur weiteren Verwendung bei -80°C gelagert.

II.4 Elektrophysiologische Methoden

II.4.1 Zwei-Elektroden-Spannungsklemme

Der Entwurf, die Bereitstellung der Reagenzien und die Auswertung der elektrophysiologischen Experimente erfolgten durch die Autorin. Die eigentlichen Messungen an *Xenopus laevis*-Oozyten mit der Zwei-Elektroden-Spannungsklemme (TEVC) wurden im Auftrag von der Firma EcoCyte Bioscience (Castrop-Rauxel, Deutschland) durchgeführt (vgl. II.4.1.1).

II.4.1.1 Gewinnung der Oozyten und RNA-Injektion

Zur Gewinnung der Oozyten wurden adulte Krallenfrösche (*Xenopus laevis*) aus der Kolonie der Firma EcoCyte mit 0,15 % MS-222 in Wasser für 15 min anästhesiert. Dann wurden die Tiere für 15 min auf Eis gelegt, bevor die Ovaryektomie durchgeführt wurde. Zur Defollikulation der entnommenen Ovarien wurden diese in einer Kollagenase-Lösung (10 mg/ ml) in Ca²⁺-freier Barth's Lösung inkubiert. Im Anschluss wurden die Oozyten mit Ca²⁺-freier Barth's Lösung gespült und in Mikrotiterplatten überführt. Etwa 10 - 20 ng cRNA (vgl. II.3.13), welche für die verschiedenen Zecken-RDL-Rezeptor-Varianten kodieren, wurden mit Hilfe des automatischen Injektions- und Ableitungssystems des Roboocyte® (Multi Channel Systems MCS GmbH) in jede Oozyte injiziert.

II.4.1.2 Ansatz der Testsubstanzen für elektrophysiologische Experimente

Die getesteten Substanzen wurden als 1 M oder 0,5 M Stammlösungen in DMSO angesetzt und vor Gebrauch in Natrium-Frosch-Ringer-Lösung (NFR) auf die gewünschten Konzentrationen verdünnt. Aufgrund ihrer geringen Wasserlöslichkeit wurde der Wirkstoff Fipronil in einer 10 mM Stammlösung angesetzt und zunächst in DMSO verdünnt, bevor jede einzelne Konzentration nochmals mit NFR-Lösung verdünnt wurde. Die Endkonzentration an DMSO betrug für die Applikation an Oozyten maximal 1 % (v/v).

II.4.1.3 Elektrophysiologische Ableitungen

Nach Injektion der cRNA wurden die Oozyten in Barth's-Lösung mit Gentamycin (50 µg/ ml) bei 19°C für ein bis vier Tage inkubiert. Die TEVC-Messungen wurden mit dem Roboocyte2 durchgeführt. Die verwendete Elektrode war mit 3 M Kaliumacetat gefüllt und hatte einen Widerstand von 0,2 – 0,6 MΩ. Die Oozyten wurden kontinuierlich mit NFR-Lösung (3 ml/ min) perfundiert. Alle getesteten Substanzen wurden mit Hilfe des integrierten Superfusion Systems appliziert, das einen Lösungswechsel in weniger als 20 s zulässt. Zur Messung der Ströme bei Raumtemperatur mit Messraten zwischen 200 Hz und 1000 Hz wurde ein Haltepotential von -70 mV angelegt. Standardmäßig wurde zunächst für 20 s GABA appliziert und im Anschluss für 2 min mit NFR-Lösung gespült. Dann erfolgte zunächst für 20 s die Applikation des Antagonisten alleine, gefolgt von einer Co-Applikation von GABA und Antagonist für weitere 20 s. Um die teilweise irreversiblen Effekte mancher Antagonisten zu vernachlässigen, wurde jede Antagonisten-Konzentration und jedes Replikat an einer separaten Oozyte gemessen.

II.5 Zellbiologische und biochemische Methoden

II.5.1 Kultivierung von Säugetierzellen

II.5.1.1 Passagieren der Zellen

Die adhärennten CHO-Zellen wurden in Zellkulturflaschen (175 cm²) bei 37°C und 5 % CO₂ kultiviert und nach Erreichen einer Subkonfluenz alle 3 - 4 Tage passagiert. Dafür wurde das Medium abgenommen, die Zellen mit 3 ml Trypsin (TrypLE Express) gewaschen und nach erneuter Trypsin-Zugabe etwa 5 - 10 min bei im Brutschrank inkubiert. Die Zellsuspension wurde dann mit einem Verdünnungsfaktor von 1:10 in dukx-Medium überführt und ausgezählt (vgl. II.5.1.2). Es wurden 5x10⁵ Zellen pro Zellkulturflasche ausgesät.

II.5.1.2 Zellzahlbestimmung

Zur Bestimmung der Zellzahl wurde unter sterilen Bedingungen 20 µl einer Zellsuspension entnommen und in eine Neubauerzählkammer überführt. Es wurden 4 Großquadrate ausgezählt und die Zellzahl mit folgender Formel berechnet:

Zellen/ ml = durchschnittliche Zellzahl/ Quadrat * 10⁴ (Kammerfaktor)

II.5.1.3 Kryokonservierung und Auftauen der Zellen

Zur Kryokonservierung wurde eine durch Trypsinisierung gewonnene Zellsuspension für 5 min bei 1500 x g zentrifugiert und das Zellpellet in Einfriermedium (dukx-Medium mit 10 % DMSO (v/v)) resuspendiert. Aliquots der Zellen (1 ml) wurden mit einer Dichte von 10⁶ Zellen/ ml in Kryoröhrchen bei -80°C eingefroren. Zur dauerhaften Lagerung wurden die Zellen danach in Flüssigstickstoff überführt.

Vor dem Auftauen der Zellen wurden in zwei Zellkulturflaschen je 50 ml dukx-Medium vorgelegt und die Kryoröhren mit Bacillo® AF desinfiziert. Dann wurden die Zellen schnell in der Handfläche aufgetaut und je 1/3 bzw. 2/3 der Zellen in die vorbereiteten Zellkulturflaschen ausgesät.

II.5.2 Generation der stabilen Zelllinie

II.5.2.1 Transfektion

Zum Einbringen der Zecken-*rdl*-Gene in CHO-Zellen wurde die Methode der kationischen Lipid-vermittelten Transfektion gewählt und nach Angaben des Herstellers des Lipofectamine® 2000-Reagenz durchgeführt. 24 Std vor der Transfektion wurden die Zellen mit einer Dichte von 5×10^5 Zellen/ml in 6-Lochplatten ausgesät und bei 37°C und 5 % CO₂ inkubiert. 2 µg des jeweiligen Zecken *rdl* pcDNA3.1(+)-Konstrukts, 4 µl Lipofectamine® 2000-Reagenz und 1 ml OptiMEM-Medium wurden gemischt und für 30 min bei Raumtemperatur inkubiert bevor der Ansatz zu den Zellen gegeben wurde. Nach einer vierstündigen Inkubation im Brutschrank wurde das Transfektionsgemisch durch dukx-Medium ersetzt. 24 Std nach der Transfektion wurden die Zellen mit frischem dukx-Medium verdünnt und durch den Zusatz von 1 mg/ml Geneticin im Medium auf positive Klone selektiert. Die Zellen wurden mit einer Dichte von 25 Zellen pro Loch mit dem Multidrop Combi Reagent Dispenser auf 384-Loch-Zellkulturplatten ausgesät. Der Ansatz wurde 14 - 20 Tage im Brutschrank inkubiert.

II.5.2.2 Membranpotential-Assay

Der Membranpotential-Assay ist eine Methode Ionenströme fluorimetrisch zu messen und daher ideal für Hochdurchsatz-Messungen. Die wichtigste Komponente ist der spannungssensitive Fluoreszenzfarbstoff. Dieser lipophile und anionische Farbstoff dringt durch die Plasmamembran und verteilt sich abhängig vom Membranpotential der Zelle. Bei einer Depolarisation der Zelle, dringen mehr Farbstoffmoleküle in die Zelle ein. Bindet der Farbstoff dort an zytosolische Proteine, so steigt die Fluoreszenzintensität an. Im Gegensatz dazu fällt bei einer Hyperpolarisation der Zelle die Fluoreszenzintensität ab, da die Farbstoffmoleküle mit der positiven Ladung aus der Zelle wandern und dort von mit der MPA-Lösung zugesetzten impermeablen Quencher-Molekülen abgeschirmt werden (Angaben des Herstellers Molecular Devices auf <http://www.moleculardevices.com/reagents-supplies/assay-kits/ion-channels/flipr-membrane-potential-assay-kits>).

II.5.2.2.1 Messungen mit der Fluobox

Die Assayentwicklung wurde mit Hilfe der Fluobox durchgeführt. Dieses Gerät ist ein von der Bayer Technical Services konstruiertes Fluoreszenzspektrometer mit einem 2-Kanal-Dispergiersystem, das in der Lage ist 384-Lochplatten zu messen.

Die Messungen wurden durchgeführt, sobald die transfizierten CHO-Zellen Konfluenz aufwiesen. Etwa 24 Std vor der Messung wurden die Zellen in Duplikaten auf schwarze 384-Lochplatten mit transparentem Boden übertragen. Dafür wurde das Medium mit Hilfe des Embla 384 Microplate Washer abgesaugt, die Zellen einmal mit Trypsin (10 µl/ Loch) gespült und dann nochmals mit Trypsin (10 µl/ Loch) für etwa 5 min inkubiert. Nach dem Ablösen der Zellen wurden die Platten mit dukx-Medium (70 µl) aufgefüllt. Die Zellsuspension wurden mit Hilfe des CyBi®-Well Liquid Handling Robots auf jeweils zwei schwarze Messplatten (20 µl/ Loch) übertragen. Zu den, in den klaren 384-Loch-Zellkulturplatten verbliebenen Zellen, wurde für die spätere Klonauswahl 30 µl frisches dukx-Medium gegeben.

Für die Messung wurde das Medium von den Zellen entfernt, indem die Platten über einem Waschbecken ausgeschlagen und auf Papiertüchern abgetupft wurden. Sobald die MPA-Lösung angesetzt war, wurde aufgrund der Lichtempfindlichkeit des Farbstoffes unter Gelblicht gearbeitet. Die Zellen wurden dann mit MPA-Lösung (25 µl/ Loch) beladen und für 6 min bei Raumtemperatur inkubiert, so dass sich der Farbstoff entlang des Membranpotentials in den Zellen verteilen konnte. Nach der Inkubationszeit wurde die jeweilige Platte in die Fluobox überführt und zunächst für 3 s bei einer Anregung von 520 nm und einer Emission von 575 nm gemessen. Anschließend erfolgte in der Fluobox bei der Hälfte der Plattenduplikate die Zugabe von 20 µl MPA-Lösung (Kontrolle), bei der anderen Hälfte die Zugabe von 20 µl Dye B-Lösung mit dem darin gelösten Agonisten GABA (Messwert). Die Fluoreszenzintensität wurde in einer Kinetik über 120 s aufgezeichnet.

II.5.2.2.2 Auswertung der Messungen an der Fluobox und Klonauswahl

Für die Datenanalyse von Messungen an der Fluobox wurde der erste Messwert vor Substanzzugabe (Hintergrund) auf 100 % gesetzt. Die Maximalantwort nach 120 s wurde auf den Hintergrund normiert und ist im Folgenden als % Hintergrund angegeben. Zur graphischen Darstellung wurde der normierte Wert gegen den

Hintergrund aufgetragen. Klone, mit den größten Maximalantworten und einem möglichst kleinen Hintergrund wurden zur weiteren Analyse ausgewählt. Dafür wurde das Medium der entsprechenden Klone in den originalen 384-Loch-Zellkulturplatten abgesaugt, die Zellen mit 50 µl Trypsin gespült und nach erneuter Applikation von 50 µl Trypsin für 5 min inkubiert. Die abgelösten Zellen wurden dann in 5 ml dukx-Medium auf 6-Loch-Zellkulturplatten gegeben und für 3 – 4 Tage im Brutschrank inkubiert.

II.5.2.2.3 Messungen mit dem FLIPR^{TETRA}

Messungen von Substanz-Dosis-Wirkungs-Kurven wurden mit dem FLIPR^{TETRA} (Fluorometric Imaging Plate Reader, Molecular Devices) durchgeführt. Der wesentliche Unterschied zur Fluobox besteht in der Applikation der Substanzen. Während die Fluobox Lösungen über einen Kamm aus einem Reservoir appliziert, kann der FLIPR^{TETRA} unter Verwendung von Pipettenspitzen Substanzen von einer auf eine andere Platte transferieren und somit Konzentrationsreihen messen.

Zur Messung von bereits stabil transfizierten Klonen wurden 4×10^3 Zellen pro Loch direkt in schwarze 384-Lochplatten ausgesät und für 24 Std im Brutschrank inkubiert. Zur Testung von Rezeptor-Antagonisten wurde die entsprechende Substanz 400fach konzentriert in DMSO gelöst und eine Verdünnungsreihe in DMSO hergestellt. Jede Konzentration dieser Verdünnungsreihe wurde dann auf einer 96-Lochplatte 1:100 in MPA-Lösung verdünnt. Dieser Substanzansatz (4x) wurde mit Hilfe des CyBi®-Well Liquid Handling Robots auf eine 384-Lochplatte übertragen, so dass jede Konzentration in Vierfachbestimmung gemessen werden konnte. Die DMSO-Konzentration betrug nie mehr als 0,25 %. Bei Antagonisten-Messungen betrug die Endkonzentration an GABA standardisiert 3 µM. Für die Messung wurde das Medium von den Zellen entfernt, indem die Platten über einem Waschbecken ausgeschlagen und auf Papiertüchern abgetupft wurden. Die Zellen wurden dann mit MPA-Lösung (30 µl/ Loch) beladen und für 6 min bei Raumtemperatur inkubiert. Nach der Inkubationszeit wurde die jeweilige Platte in den FLIPR^{TETRA} überführt und zunächst für 1 s bei einer Anregung von 510 – 545 nm, einer Emission von 565 – 625 nm und Verstärkung von 2000 gemessen. Anschließend erfolgte im FLIPR^{TETRA} die Zugabe der zu testenden Substanz nach jeweils 1 s und 150 s aus der 384-Loch-Substanzplatte und die Fluoreszenzintensität wurde in einer Kinetik über insgesamt 350 s aufgezeichnet (vgl. Abb. II.1).

Sukzessive Zugabe zu CHO-Zellen im FLIPR^{TETRA} bei Messung von Antagonisten:

30 µl/ Loch MPA-Lösung (6 min Inkubation bei RT)

10 µl/ Loch Antagonist (6X konzentriert in MPA-Lösung)

20 µl/ Loch GABA (3X konzentriert in MPA-Lösung)

Sukzessive Zugabe zu CHO-Zellen im FLIPR^{TETRA} bei Messung von Agonisten:

30 µl/ Loch MPA-Lösung (6 min Inkubation bei RT)

10 µl/ Loch Agonist (4X konzentriert in MPA-Lösung)

II.5.2.2.4 Auswertung der Messungen am FLIPR^{TETRA}

Für die Datenanalyse von Messungen am FLIPR^{TETRA} wurde die Aktivität eines Agonisten wie folgt berechnet (vgl. Abb. II.1):

$$\text{Aktivität}(\%) = \frac{A - B}{C - B} * 100\%$$

A: durchschnittliche Fluoreszenz nach 149 s (nach Substanz-Zugabe)

B: durchschnittliche Hintergrundfluoreszenz nach 1 s (vor Substanz-Zugabe)

C: durchschnittliche Fluoreszenz nach 149 s (DMSO-Kontrolle nach Substanz-Zugabe)

Die Inhibition durch einen Antagonisten wurde in % Inhibition angegeben und folgenderweise berechnet:

$$\text{Inhibition}(\%) = 100\% - \text{Aktivität}(\%)$$

Wobei die Aktivität (%) in diesem Fall wie folgt berechnet wurde (vgl. Abb. II.1):

$$\text{Aktivität}(\%) = \frac{A - B}{C - B} * 100\%$$

A: durchschnittliche Fluoreszenz nach 350 s (nach GABA-Zugabe)

B: durchschnittliche Hintergrundfluoreszenz nach 149 s (vor GABA-Zugabe)

C: durchschnittliche Fluoreszenz nach 350 s (DMSO-Kontrolle nach GABA-Zugabe)

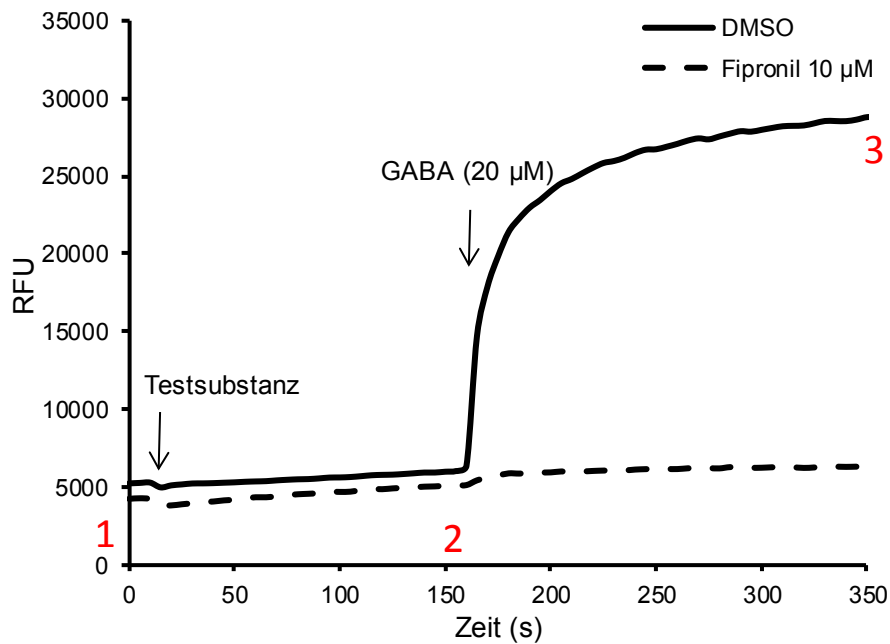


Abb. II.1 Schematischer Ablauf des Membranpotential-Assays am Beispiel einer Messung von DMSO und Fipronil mit 20 µM GABA. Zunächst wurde die Fluoreszenz der beladenen Zellen für 1 s bei einer Anregung von 510 – 545 nm, einer Emission von 565 – 625 nm und Verstärkung von 2000 gemessen (1). Im FLIPR^{TETRA} erfolgte dann die Zugabe der zu testenden Substanz. Der Messwert nach 149 s wurde zur Identifikation eines Agonisten herangezogen (2). Nach 150 s wurde 20 µM GABA zugegeben und dessen Kinetik über weitere 200 s gemessen. Der Messwert nach 350 s diente zur Identifikation eines Antagonisten (3).

II.5.2.3 Einzelzellklonierung

Stabil transfizierte Zellen wurden mittels limitierender Verdünnungen unter Zugabe von 1 mg/mL Geneticin auf Neomycin-Resistenz selektiert. Dafür wurden die kultivierten Zellen zunächst gezählt und mit einer theoretischen Häufigkeit von 0,5 Zellen pro Loch auf 384-Loch-Zellkulturplatten ausgesät und für etwa 7 Tage im Brutschrank inkubiert. Subklone wurden erneut mittels Membranpotential-Assay getestet und Klone mit den stärksten Signalen und den besten Signal-Rausch-Verhältnissen ausgewählt und weiterkultiviert.

II.6 Datenanalyse

Zur Darstellung aller Grafiken und der statischen Analyse von Daten wurde GraphPad Prism Version 6.00 für Windows, (GraphPad Software, La Jolla California USA, www.graphpad.com) verwendet. Alle dargestellten Daten zeigen Mittelwerte \pm Standardabweichungen. Die Daten aus Bestimmungen von Dosis-Wirkungs-Kurven wurden mit Hilfe von GraphPad Prism und der Methode der kleinsten Quadrate analysiert. Die Dosis-Wirkungs-Kurven sind mittels nichtlinearer Regression mit vier Parametern durch folgende Formel berechnet:

$$f_1 = \frac{\min + (\max - \min)}{1 + \left(\frac{EC_{50}}{x} \right)^{Hillslope}}$$

Für die Berechnung der Dosis-Wirkungs-Kurven aus den elektrophysiologischen Messungen an *Xenopus laevis*-Oozyten und aus den biochemischen Messungen an der stabilen Zelllinie wurden die Parameter Min und Max als 0 und 100 definiert.

III Ergebnisse

III.1 Molekularbiologische Ergebnisse

III.1.1 Datenbankanalyse

Zu Beginn des Projektes wurden die Datenbanken NCBI GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>) und EBI (<http://www.ebi.ac.uk/services>) nach bereits veröffentlichten GABA-Rezeptor Sequenzen aus Zecken durchsucht. Dafür wurde zum einen die Stichwortsuche, zum anderen die BLAST-Suche mit Hilfe des hochkonservierten TM2 Motivs des RDL-Rezeptors von *Drosophila melanogaster* (GenBank AAA28556.1) als Template verwendet. Die Suche ergab zwei Hits, die Vollängen-Sequenzen der *rdl*-Gene aus den zwei Zeckenspezies *R. microplus* (GenBank GQ398111.1) und *D. variabilis* (ZHENG *et al.*, 2003). Diese Gene und deren Produkte haben eine Größe von jeweils 1614 bp bzw. 537 Aminosäuren. Zu Beginn des Projektes war VectorBase (<http://www.vectorbase.org/>), eine Datenbank für Humanpathogenen-Vektoren, die beste Quelle für nicht annotierte genomische und EST-Sequenzen von *Ixodes scapularis*. ESTs (expressed sequence tags) sind exprimierte Genfragmente, die durch Sequenzierung von cDNA-Klonen gewonnen werden (NAGARAJ *et al.*, 2006). Mit Hilfe der Sequenz von *R. microplus* wurde deshalb mittels BLAST Suche auch in der VectorBase Datenbank nach homologen Sequenzen gesucht. Die Suche ergab drei als putative GABA-Rezeptoren annotierte EST Hits: ISCW021468, ISCW021469 und ISCW021474 mit Größen von jeweils 1515 bp, 1218 bp und 1518 bp bzw. 505, 406 und 506 Aminosäuren. Eine BLAST-Suche der Sequenzen ergab eine Übereinstimmung der Aminosäuren von 41,3 % zwischen ISCW021468 und der *R. microplus* RDL-Sequenz. ISCW021469 stimmte zu 70 % mit einem Propeptid der LCCH3-Untereinheit aus der Biene *Apis mellifera* (GenBank NP_001071280.1) überein und ISCW021474 zeigte mit 58 % die größte Homologie zu einem Propeptid der GRD-Untereinheit aus der parasitischen Wespe *Nasonia vitripennis* (GenBank NP_001234887.1). Parallel zu dieser Arbeit wurde das Transkriptom von *I. ricinus* sequenziert (Daten nicht veröffentlicht). Aus Analysen des Transkriptoms resultierte jedoch nur eine partielle Sequenz des GABA-Rezeptors mit 81 % Homologie zur RDL-Untereinheit aus *R. microplus*.

| | | | | | | | | |
|--------------------|--|---|--|---|--|---|--|--|
| D. melanogaster | MSDSKMDKLA | RMAPLPRTPL | LTIWLAINMA | LIAQETGHKR | IHTVQAATGG | GSMLGDVNI | A ILDS F SVS Y | |
| M. domestica | | | | | | | | |
| A. aegypti | MSLEI | EVPVRCPSL | G VLILTLNLA | LFLPQTINRT | PPYVLAGTGG | GSMLGDVNI | A ILDS F SVG Y | |
| R. microplus | | MRQAMA | F SCWSEVLFV | AVAVTSAGR | NGPA-PLRPG | Q TQRGQNTQ | I LNA F ETRG Y | |
| D. variabilis | | MRQAMA | F SCWSEVLFV | AVAVTSAGR | NGPA-PLRPG | Q TQRGQNTQ | I LNA F ETRG Y | |
| I. ricinus partial | | MA | F SCWSEVLFV | AIAIAFGPR | SSTA--LQPG | Q TQRGQNTQ | I LNA F ETRG Y | |
| ISCW021468 | | | | | | | | |
| D. melanogaster | DKRVRPNYGG | P PVEVGVTMY | V LSISSVSEV | L MDFTLDFYE | R QFWTDPRLA | Y RKRPGVETL | S VGSEFIK N I | |
| M. domestica | | | | Y F | R QFWTDPRLA | Y GKRPGVETL | S VGSEFIK N I | |
| A. aegypti | DKRVRPNYGG | P PVEVGVTMY | V LSISSVSEV | L MDFTLDFYE | R QFWSDPRLA | Y RKRPGVETL | S VGSEFIK N I | |
| R. microplus | DKRVRPNYGG | P PVEVGVTMQ | V LSISSVSEV | L MDFTLDFYE | R QSWRDERLS | F QKSPDLESM | T VGAEVAER I | |
| D. variabilis | DKRVRPNYGG | P PVEVGVTMQ | V LSISSVSEV | L MDFTLDFYE | R QSWRDERLS | F QKSPDLESM | T VGAEVAER I | |
| I. ricinus partial | DKRVRPNYGG | L PVEVGVTMQ | V LSISSVPEV | Q MDFTSDFYE | R QSWRDERLS | F QKSPGLESM | T VGAEVAER I | |
| ISCW021468 | | | | | | | | |
| D. melanogaster | WVPDTFFVNE | K QSYFHIATT | S NEFIRVHHS | G SITRSIRLT | I TASCPMNLQ | Y FPMDRQLCH | I EIESFGYT M | |
| M. domestica | WVPDT----- | -----SIATT | G NEFIRVHHS | G SITRSIRLT | I TASCPMNLQ | Y FPMDRQLCH | I EIESFGYT M | |
| A. aegypti | WVPDTFFVNE | K QSYFHIATT | S NEFIRVHHS | G SITRSIRLT | I TASCPMNLQ | Y FPMDRQLCH | I EIESFGYT M | |
| R. microplus | WVPDTFFVNE | K SAYFHAATT | P NTFLRIGSG | G EVFRSIRLT | V TASCPMDLR | Y FPMDRQACT | I EIESFGYT M | |
| D. variabilis | WVPDTFFVNE | K SAYFHAATT | P NTFLRIGSG | G EVFRSIRLT | V TASCPMDLR | Y FPMDRQACT | I EIESFGYT M | |
| I. ricinus partial | WVPDTFFVNE | K SAYFHMATT | P NTFLRIGSG | G EVFRSIRLT | V TAGCPMDLR | Y FPMDRQACT | I EIESFGYT M | |
| ISCW021468 | | | | | | | | |
| TM1 | | | | | | | | |
| D. melanogaster | R DIRY F WRDG | L SSVG- M SSSE | V ELPQFVLG | H RQRATEINL | T TGNYSRLAC | E IQFVRSMGY | Y LTIQIY I PSG | |
| M. domestica | R DIRYK W NEG | P NSVG- V SSSE | V SLPQFKVLG | H RQRAVEISL | T TGNYSRLAC | E IQFVRSMGY | Y LTIQIY I PSG | |
| A. aegypti | R DIRY F WKDG | L SSVG- M SSSE | V ELPQFVLG | H RQRATEINL | T TGNYSRLAC | E IQFVRSMGY | Y LTIQIY I PSG | |
| R. microplus | K DIRY R WSDG | D TSVR- I AKE | V ELPQFKVLG | H VQKAKEVAL | T TGNYSRLVC | E IRFARSMGY | Y LTIQIY I PAG | |
| D. variabilis | K DIRY R WSDG | D TSVR- I AKE | V ELPQFKVLG | H VQKAKEVAL | T TGNYSRLVC | E IRFARSMGY | Y LTIQIY I PAG | |
| I. ricinus partial | K DIRY R WSDG | D TSVR- I AKE | V ELPQFKVLG | H VQKAKEVAL | T TGNYSRLVC | E IRFARSMGY | Y LTIQIY I PAS | |
| ISCW021468 | | | | | N YSRLVC | E IRFARSMGY | Y LTIQIY I PAG | |
| | | | | TM2 | TM3 | | | |
| D. melanogaster | L IVVISWVSE | W LNRNATPAR | V ALGVTTVLT | M TTLMSSTNA | A LPKISYVKS | I DVYLGTCFV | M VFASLL E YA | |
| M. domestica | L IVVISWVSE | W LNRNATPAR | V ALGVTTVLT | M TTLMSSTNA | A LPKISYVKS | I DVYLGTCFV | M VFASLL E YA | |
| A. aegypti | L IVVISWVSE | W LNRNATPAR | V ALGVTTVLT | M TTLMSSTNA | A LPKISYVKS | I DVYLGTCFV | M VFASLL E YA | |
| R. microplus | L IVVISWVSE | W LHRNASPAR | V ALGVTTVLT | M TTLMSSTNA | A LPKISYVKS | I DVYLGTCFV | M VF T ALLEYA | |
| D. variabilis | L IVVISWVSE | W LHRNASPAR | V ALGVTTVLT | M TTLMSSTNA | A LPKISYVKS | I DVYLGTCFV | M VF T ALLEYA | |
| I. ricinus partial | L IVVISWVSE | W LHRNATPAR | V ALGVTTVLT | M TTLMSSTNA | A LPKISYVKS | I DYLGTCFV | M VFASLL E YA | |
| ISCW021468 | L IVVISWVSE | W LHRNASPAR | V ALGVTTVLT | M TTLMSSTNA | A LPKISYVKS | I DVYLGTCFV | M VF T ALLEYA | |
| D. melanogaster | T VG Y MAKRIQ | M RKQR F MAIQ | K IAEQ K KQQL | D GAN Q QANP | N PNAN V GGPG | G VGV G PGGP | G PG G GV N VG V | |
| M. domestica | T VG Y MAKRIQ | M RKQR F MAIQ | K MAEQ K KQQL | L DG V Q P PPNP | N PNT V VDH-- | -- | ----- G | |
| A. aegypti | T VG Y MAKRIQ | M RKQR F MAIQ | K IAEQ K KQQA | A DAN H PPP-- | - PP V SDH-- | -- | ----- S | |
| R. microplus | A V G Y L GKRIT | M RK T RCQQLA | K LAEQ H RQRC | A AAS S NEPSS | E PL L ASPEVS | I V K TVG S CQV | C PA A ---- V | |
| D. variabilis | A V G Y L GKRIT | M RK T RCQQLA | K LAEQ H RQRC | A AAS S NEPSS | E PL L ASPEVS | I V K TVG S CQV | C PA A ---- V | |
| I. ricinus partial | A V G Y L GKRIT | M RK A RCQQLA | K LAE H HRQKR | I AAS T GE P GS | E PL L ASPEI H | S QD G R F L S SL | S CC G GI P RST | |
| ISCW021468 | T V G Y L GKRIT | M RK T RCQQLA | K LAEQ H RQRC | V PV K F V LLRW | H PK V N---- | -- | ----- | |
| D. melanogaster | G M G M G PEHGH | G H G H H AHS H G | H P H A P K Q T V S | N R P I G F S T N I | -- - Q N V G T R G | C S I V G P -- L F | Q E V R F K V H D P | |
| M. domestica | ----- - G H | G H G H G H S H G | H P H V P K Q T V C | N R P I G F Q T M Q | -- - Q Q N I G G R G | C S I V G P -- L F | Q E V R F K V H D P | |
| A. aegypti | ----- - H | G H G H G - H S H G | H Q H T P K Q --- | ----- - Q M | G S R S G P -- L F | Q E V R F K V H D P | | |
| R. microplus | ----- - AS Q | G Q P R E A P P T G | F T M G R R G A D Q | C C P G L Q G S C Q | V C P A A V A S Q T | Q Q Q A P P P G I P | M E V R L K M V D P | |
| D. variabilis | ----- - AS Q | G Q P R E A P P T G | F T M G R R G A D Q | C C P G L Q G S C Q | V C P A A V A S Q T | Q Q Q A P P P G I P | M E V R L K M V D P | |
| I. ricinus partial | E G S T T N R I Y D | G S P R R R P M L P | W S T G R F M P S L | C C R C L T S S A A | G P S P W N T Y G S | T S Q N G | | |
| ISCW021468 | ----- - R | G K H H Q P D L R W | F A E A R T N V-- | ----- - AL V Y R A | H A K S V L L P L P | H K L S S R L P L P | | |
| D. melanogaster | K A H S K G G T L E | N T V N G G R G G P | Q S H G P G P Q G | G G P P G G G - G G | G G G G G G P P E G | G G D P E A A V P A | H L L H P G K V K K | |
| M. domestica | K A H S K G G T L E | N T V N G G R G G P | P V G P H G P Q G | G P P P G G P P A G G | G G G G G G A P P E | G G D A E A A V P A | H L L H P G K V K K | |
| A. aegypti | K A H S K G G T L E | N T I N G G R G G -- | ----- G ----- | ----- G P P P G | G G G P P G G G G | G P D E E S G A P Q | H L I H P G --- K | |
| R. microplus | K G F S K S T L E | N T V N G ----- | ----- | ----- | ----- | A P D I E A A F C | --- ----- K | |
| D. variabilis | K G F S K S T L E | N T V N G ----- | ----- | ----- | ----- | A P D I E A A F C | --- ----- K | |
| I. ricinus partial | | | | | | | | |
| ISCW021468 | E Y L C K S S T L E | N T V N G ----- | ----- | ----- | ----- | A P D I E A S A F C- | --- ----- K | |
| TM4 | | | | | | | | |
| D. melanogaster | D I N K L L G I T P | S D I D K Y S R I V | F P V C F V C F N L | M Y W I I Y L H V S | D V V A D D L V L L | G E E | | |
| M. domestica | D I N K L L G I T P | S D I D K Y S R I V | F P V C F V C F N L | M Y W I I Y | | | | |
| A. aegypti | D I N K L L G I T P | S D I D K Y S R I V | F P V C F V C F N L | M Y W I I Y L H V S | D V V A D D L V L L | G E E K | | |
| R. microplus | N P N K L F G V S P | S D I D K Y S R V V | F P V C F V C F N L | M Y W I I Y L H I S | D V L P D D V G D D | | | |
| D. variabilis | N P N K L F G V G P | S D I D K Y S R V V | F P V C F V C F D L | M Y W I I Y L H I S | D V L P D D V G D D | | | |
| I. ricinus partial | | | | | | | | |
| ISCW021468 | N P N K L F G V S P | S D I D K Y S R V V | F P V C F V C F N L | M Y W I I Y L H I S | D V L P D D V N D E | * | | |

Abb. III.1 Sequenz-Alignment der publizierten GABA-Rezeptor RDL-Sequenzen aus Zecken mit verschiedenen orthologen Sequenzen aus den Insekten *Drosophila melanogaster*, *Musca domestica* und *Aedes aegypti*. Identische Aminosäuren sind farbig unterlegt.

Ein Alignment aller bekannten RDL-Sequenzen aus Zecken und einigen Insekten (vgl. Abb. III.1), das mit Hilfe von GENEIOUS erstellt wurde, bildete die Grundlage für das Design von Primern zur Amplifikation von RDL-Untereinheiten der drei Zeckenspezies *R. microplus*, *R. sanguineus* und *I. ricinus*.

III.1.2 Amplifikation der *rdl*-Sequenz verschiedener Zeckenspezies

Um die Sequenz des RDL-Rezeptors aus *Ixodes ricinus*, *Rhipicephalus sanguineus* und *Rhipicephalus microplus* zu identifizieren, wurde zunächst Gesamt-RNA aus diesen Zeckenspezies extrahiert und daraus mit Hilfe von oligodT-Primern Erststrang-cDNA zur Selektion von mRNA synthetisiert. Verschiedene degenerierte und spezifische Primer wurden entworfen und in PCR-Reaktionen mit cDNA als Template eingesetzt.

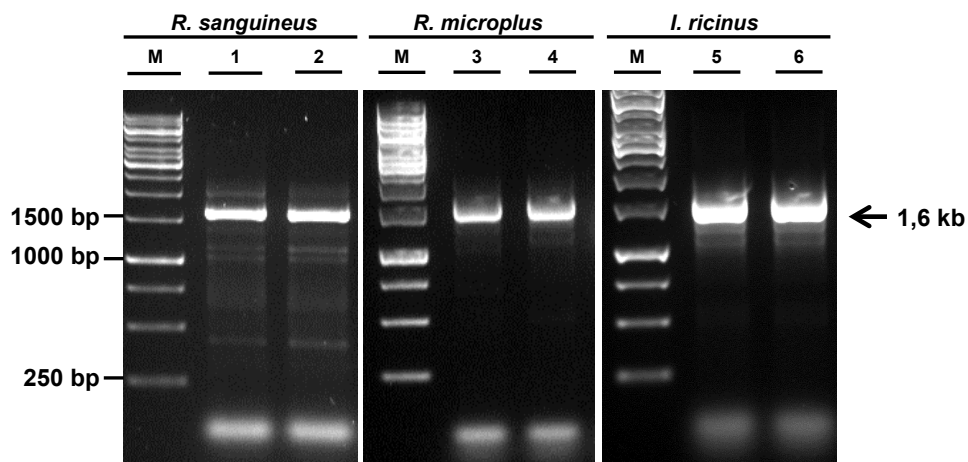


Abb. III.2 Amplifikation der *rdl*-Gene aus verschiedenen Zeckenspezies unter Verwendung des für die Sequenz aus *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* spezifischen Primerpaares RmRdIF und RmRdIR. Die PCR Produkte wurden zunächst mit DNA-Ladepuffer versetzt und auf ein 1 %iges, mit Geldred angefärbtes Agarosegel aufgetragen. Als Größenstandard diente ein 1 kb DNA-Marker. Die elektrophoretisch aufgetrennten Fragmente wurden in folgender Reihenfolge aufgetragen: 1 kb Marker (M), *Rhipicephalus sanguineus* ♀(1) und ♂(2), 1 kb Marker (M), *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* ♀(3) und ♂(4), 1 kb Marker (M), *Ixodes ricinus* ♀(5) und ♂(6).

Mit den Primern RmRdIF und RmRdIR (vgl. Tab. II.1), die spezifisch für das *rdl*-Gen aus *Rhipicephalus microplus* (GenBank GQ398111.1) entworfen wurden, wurden aufgrund der hohen Homologie erfolgreich 1614 - 1695 bp große Fragmente von jeder der drei Spezies amplifiziert. Es wurden jeweils sechs Klone sequenziert und in einem Nukleotidsequenz-Alignment verglichen. Unterschiede in nur einer Sequenz wurden als Fehler bewertet, während Sequenzen mit zwei oder mehr Unterschieden als Isoform betrachtet wurden. Im Vergleich der Sequenzen auf Nukleinsäureebene mittels BLAST® blastn gegen die NCBI GenBank Datenbank zeigten alle Fragmente die höchste Identität mit dem *rdl*-Gen aus *R. microplus*, gefolgt von einer GABA_A-Rezeptor Untereinheit aus der Wanze *Cyrtorhinus lividipennis* (GenBank AHW29555.1).

III.1.3 Analyse der identifizierten *rdl*-Sequenzen

Aus der Analyse der identifizierten Fragmente resultierten eine *rdl*-Sequenz von *Ixodes ricinus*, zwei aus *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* und drei Sequenzen aus *Rhipicephalus sanguineus*. Unterschiede zwischen männlichen und weiblichen Zecken jeder Spezies wurden nicht identifiziert. Die Kurzbezeichnungen der entsprechenden cDNAs, die im Folgenden genutzt werden, sind *irrdl*, *rmdl1*, *rmdl2*, *rsrdl1*, *rsrdl2* und *rsrdl3*. Die Eigenschaften aller Sequenzen sind in Tab. III.1 zusammengefasst. Die 1614 - 1695 bp langen Sequenzen kodieren offene Leserahmen über 537 - 564 AS. Alle identifizierten Nukleotidsequenzen der Zecken-*rdl* sind zu 79 - 99 % identisch zueinander, während die Aminosäuresequenzen der translatierten Proteine 81 - 100 %ige Identität haben. Auf Aminosäureebene teilen Zecken- und Insekten-RDL (z.B. *D. melanogaster*) 50 - 52 % Identität. Die vollständigen cDNA-Sequenzen und abgeleiteten Aminosäuresequenzen der *rdl*-Gene von *I. ricinus*, *R. microplus* und *R. sanguineus* finden sich im Anhang (vgl. VI.1.2).

Tab. III.1 Sequenz-Eigenschaften der *rdl*-Sequenzen von *I. ricinus*, *R. microplus* und *R. sanguineus* aus dieser Studie. Die kodierenden Sequenzen beginnen mit dem Start- und enden mit dem Stoppkodon.

| Sequenz | Spezies | kodierende Sequenz | offener Leserahmen | Identität zu | | Identität zu <i>D. melanogaster</i> RDL* (AS) |
|---------------|----------------------|--------------------|--------------------|--------------------------------|--------|---|
| | | | | <i>R. microplus rdl</i> / RDL* | RDL* | |
| | | | | Nukleotid | AS | |
| <i>irrdl</i> | <i>I. ricinus</i> | 1614 bp | 537 AS | 89,2 % | 92,9 % | 51,1 % |
| <i>rmdl1</i> | <i>R. microplus</i> | 1617 bp | 538 AS | 99,9 % | 99,9 % | 51,9 % |
| <i>rmdl2</i> | | 1614 bp | 537 AS | 85,9 % | 85,6 % | 51,0 % |
| <i>rsrdl1</i> | | 1617 bp | 538 AS | 99,1 % | 99,6 % | 51,7 % |
| <i>rsrdl2</i> | <i>R. sanguineus</i> | 1695 bp | 564 AS | 85,9 % | 91,8 % | 49,7 % |
| <i>rsrdl3</i> | | 1617 bp | 538 AS | 87,9 % | 86,7 % | 51,8 % |

* *R. microplus* RDL: GenBank GQ398111.1, *D. melanogaster* RDL: GenBank AAA28556.1

Alle identifizierten Sequenzen enthalten zwei Cysteinreste in der extrazellulären Domäne, die durch 13 Aminosäuren voneinander getrennt sind und den für diese Ionenkanal Superfamilie typischen Cys-Loop formt (vgl. Abb. III.5). Eine Analyse der Aminosäuresequenz mittels TMHMM 2.0 (KROGH *et al.*, 2001) sagt für alle Proteinsequenzen die vier konservierten Transmembranhelices an den entsprechenden Stellen vorher, wie in Abb. III.3 exemplarisch für IRRDL dargestellt ist. Zusätzlich dazu wurde eine weitere, 18 Aminosäuren lange Helix am N-terminalen Ende der Untereinheit zwischen Position 7 und 24 prognostiziert.

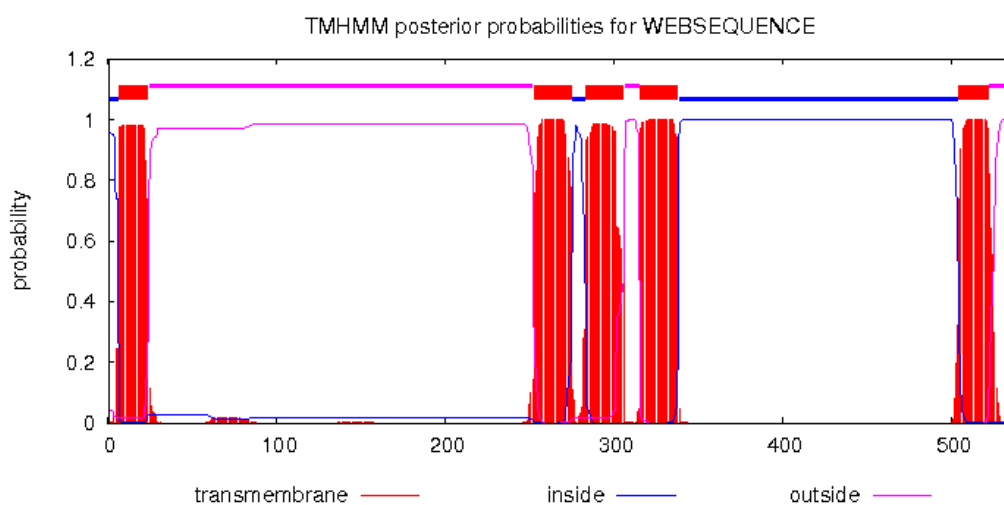


Abb. III.3 Vorhersage der Sekundärstruktur von IRRDL. Die Analyse wurde mit Hilfe von TMHMM 2.0 (KROGH *et al.*, 2001) durchgeführt. Die Grafik sagt mit hoher Wahrscheinlichkeit die konservierten Transmembranhelices 1-4 voraus, auch der große intrazelluläre Loop zwischen Position 340 und 500 ist erkennbar. Zusätzlich zu den bekannten Sekundärstrukturen in GABA_A-Rezeptor-Untereinheiten wurde eine weitere helikale Struktur am N-terminalen Ende des Proteins prognostiziert.

Die identifizierten Sequenzen wurden daraufhin mit Hilfe von SignalP 4.1 (PETERSEN *et al.*, 2011) auf die Anwesenheit eines Signalpeptids zum Transport in das endoplasmatische Retikulum untersucht. Für die Sequenzen RMRDL1, RMRDL2, RSRDL1, RSRDL2 und RSRSL3 wurden die N-terminalen α -Helices mit hohen Wahrscheinlichkeiten („S-score“: 0,936) als Signalpeptid vorhergesagt, welches mit einer potenziellen Spaltstelle zwischen den Aminosäuren 23 und 24 abschließt. Exemplarisch ist in Abb. III.4 die Analyse von RMRDL1 dargestellt.

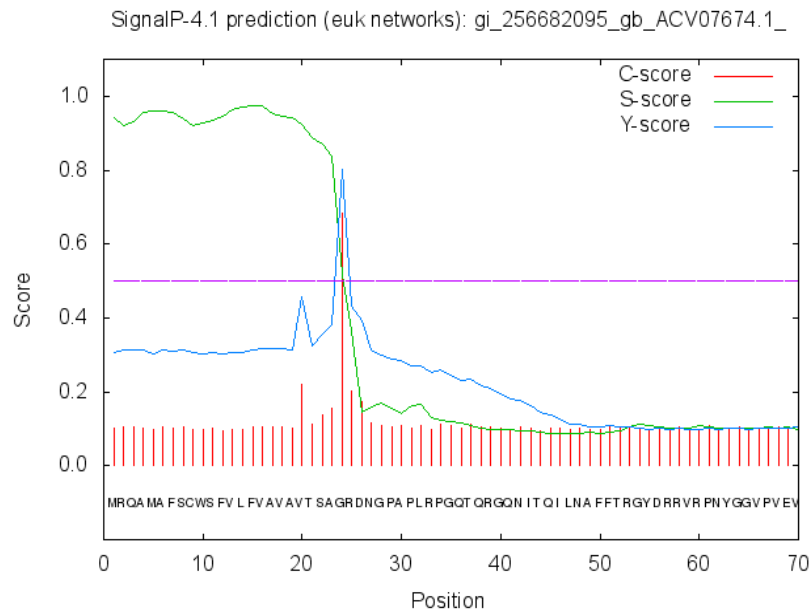


Abb. III.4 Signalpeptid-Vorhersage in RMRDL1. Die Analyse wurde mit Hilfe von SignalP 4.1 (PETERSEN ET AL., 2011) durchgeführt. Die Grafik sagt mit einer Wahrscheinlichkeit von 0,936 das Signalpeptid zwischen Position 1 und 23 („S-score“) und eine potenzielle Spaltstelle zwischen Position 23 und 24 voraus („C-score“).

Im Gegensatz zu den RDL-Sequenzen aus *R. sanguineus* und *R. microplus* zeigte die SignalP-Analyse von IRRDL, dass trotz des Vorhandenseins der N-terminalen Helix kein Signalpeptid und keine Spaltstelle identifiziert werden konnten.

Ein Vergleich aller identifizierten Zecken-RDL-Sequenzen mit Hilfe der GENEIOUS Software zeigt, dass die Unterschiede zwischen den Klonen einer Spezies in einzelnen SNPs und Spleißvarianten in der variablen intrazellulären Region zwischen TM3 und TM4 bestehen. Diese Spleißfragmente sind auch zwischen den Spezies konserviert. So fehlt RMRDL2 und RSRDL3 im Gegensatz zu IRRDL, RMRDL1 und RSRDL1 ein konserviertes, 26 AS langes Fragment an Position 391, beide besitzen dafür jedoch ein ebenfalls konserviertes, 25 AS langes Fragment an Position 430 (vgl. Abb. II.5). RSRDL2 ist die einzige Sequenz, die beide Spleißfragmente enthält. Der TM3-TM4-Linker aller identifizierten Sequenzen wurde mit Hilfe des NetPhos 2.0 Servers (BLOM *et al.*, 1999) auf Phosphorylierungsstellen hin untersucht. Unabhängig von den Spleißvarianten ergab die Analyse jeweils fünf Serin- und eine Threonin-Phosphorylierungsstelle für IRRDL und RMRDL2, jeweils acht Serin- und zwei Threonin-Phosphorylierungsstellen für RMRDL1 und RSRDL1 und jeweils sechs Serin-Phosphorylierungsstellen für RSRDL2 und RSRDL3.

| | Signalpeptid | | | | | | | | | | |
|--------|--------------|------------|------------|------------|-------------|------------|------------|------------|--|--|--|
| IRRDL | MRQAMAFSCW | SFVLFVAIAI | AFGPRDSSTA | -LRPGQTQRG | QNTIQILNAF | FTRGYDRRVR | PNYGGLPVEV | | | | |
| RMRDL1 | MRQAMAFSCW | SFVLFVAVAV | TSAGRDNGPA | PLRPGQTQRG | QNTIQILNAF | FTRGYDRRVR | PNYGGVPVEV | | | | |
| RMRDL2 | MRQAMAFSCW | SFVLFVAVAV | TSAGRDNGPA | PLQPGQTQRG | QNTIQILNAF | FTRGYDRRVR | PNYGGVPVEV | | | | |
| RSRDL1 | MRQAMAFSCW | SFVLFVAVAV | TSAGRDNGPA | PLRPGQTQRG | QNTIQILNAF | FTRGYDRRVR | PNYGGVPVEV | | | | |
| RSRDL2 | MRQAMAFSCW | SFVLFVAVAV | TSAGRDNGPA | PLRPGQTQRG | QNTIQILNAF | FTRGYDRRVR | PNYGGVPVEV | | | | |
| RSRDL3 | MRQAMAFSCW | SFVLFVAVAV | TSAGRDNGPA | PLRPGQTQRG | QNTIQILNAF | FTRGYDRRVR | PNYGGVPVEV | | | | |
| IRRDL | GVTMQIISIS | TVSEVQMDFT | SDFYFRQSWR | DERLSFQKSP | GLSMTVGAE | VAERIWVPDT | FFANEKSAYF | | | | |
| RMRDL1 | GVTMQIISIS | TVSEVQMDFT | SDFYFRQSWR | DERLSFQKSP | DLESMTVGAE | VAERIWVPDT | FFANEKSAYF | | | | |
| RMRDL2 | GVTMQIISIS | TVSEVQMDFT | SDFYFRQSWR | DERLSFQKSP | DLESMTVGAE | VAERIWVPDT | FFANEKSAYF | | | | |
| RSRDL1 | GVTMQIISIS | TVSEVQMDFT | SDFYFRQSWR | DERLSFQKSP | DLESMTVGAE | VAERIWVPDT | FFANEKSAYF | | | | |
| RSRDL2 | GVTMQIISIS | TVSEVQMDFT | SDFYFRQSWR | DERLSFQKSP | DLESMTVGAE | VAERIWVPDT | FFANEKSAYF | | | | |
| RSRDL3 | GVTMQIISIS | TVSEVQMDFT | SDFYFRQSWR | DERLSFQKSP | DLESMTVGAE | VAEKIWVPDT | FFANEKSAYF | | | | |
| IRRDL | HMATTPNTFL | RIGSGGEVFR | SIRLTVTAGC | PMDLRYFPMD | RQACTIEIES | FGYTMKDIRY | RWSGDGTSVR | | | | |
| RMRDL1 | HAATTPNTFL | RIGSGGEVFR | SIRLTVTASC | PMDLRYFPMD | RQACTIEIES | FGYTMKDIRY | RWSGDGTSVR | | | | |
| RMRDL2 | HAATTPNTFL | RIGSGGEVFR | SIRLTVTASC | PMDLRYFPMD | RQACTIEIES | FGYTMKDIRY | RWSGDGTSVR | | | | |
| RSRDL1 | HAATTPNTFL | RIGSGGEVFR | SIRLTVTASC | PMDLRYFPMD | RQACTIEIES | FGYTMKDIRY | RWSGDGTSVR | | | | |
| RSRDL2 | HAATTPNTFL | RIGSGGEVFR | SIRLTVTASC | PMDLRYFPMD | RQACTIEIES | FGYTMKDIRY | RWSGDGTSVR | | | | |
| RSRDL3 | HAATTPNTFL | RIGSGGEVFR | SIRLTVTASC | PMDLRYFPMD | RQACTIEIES | FGYTMKDIRY | RWSGDGTSVR | | | | |
| IRRDL | IAKEVELPQF | KVLGHVQKAK | EVALTTGNYS | RLVCEIRFVR | SMGYLLIQIY | IPASLIVVIS | WVSFWLHRNA | | | | |
| RMRDL1 | IAKEVELPQF | KVLGHVQKAK | EVALTTGNYS | RLVCEIRFAR | SMGYLLIQIY | IPAGLIVVIS | WVSFWLHRNA | | | | |
| RMRDL2 | IAKEVELPQF | KVLGHVQKAK | EVALTTGNYS | RLVCEIRFVR | SMGYLLIQMY | IPAGLIVVIS | WVSFWLHRNA | | | | |
| RSRDL1 | IAKEVELPQF | KVLGHVQKAK | EVALTTGNYS | RLVCEIRFAR | SMGYLLIQIY | IPAGLIVVIS | WVSFWLHRNA | | | | |
| RSRDL2 | IAKEVELPQF | KVLGHVQKAK | EVALTTGNYS | RLVCEIRFVR | SMGYLLIQIY | IPASLIVVIS | WVSFWLHRNA | | | | |
| RSRDL3 | IAKEVELPQF | KVLGHVQKAK | EVALTTGNYS | RLVCEIRFVR | SMGYLLIQIY | IPASLIVVIS | WVSFWLHRNA | | | | |
| | | | | | TM1 | | | | | | |
| IRRDL | TPARVSLGVT | TVLFTMTLMS | STNAALPKIS | YVKSIDIYLG | TCFVMVFASL | LEYAAVGYLG | KRIAMRKARC | | | | |
| RMRDL1 | SPARVALGVT | TVLFTMTLMS | STNAALPKIS | YVKSIDVYLG | TCFVMVFATAL | LEYAAVGYLG | KRITMRKTRC | | | | |
| RMRDL2 | SPARVALGVT | TVLFTMTLMS | STNAALPKIS | YVKSIDVYLG | TCFVMVFAAL | LEYATVGYLG | KRITMKRTAK | | | | |
| RSRDL1 | SPARVALGVT | TVLFTMTLMS | STNAALPKIS | YVKSIDVYLG | TCFVMVFATAL | LEYAAVGYLG | KRITMRKTRC | | | | |
| RSRDL2 | TPARVSLGVT | TVLFTMTLMS | STNAALPKIS | YVKSIDIYLG | TCFVMVFASL | LEYAAVGYLG | KRIAMRKARC | | | | |
| RSRDL3 | TPARVSLGVT | TVLFTMTLMS | STNAALPKIS | YVKSIDIYLG | TCFVMVFASL | LEYATVGYLG | KRIAMRKARC | | | | |
| | | | | | | | | | | | |
| IRRDL | QQLAKLAEQH | RQ-KRIAAST | GEPGSEPLLA | SPEMPVVKTV | GSCQVCPAAV | ASQGQPREAP | PTGFTMGRRG | | | | |
| RMRDL1 | QQLAKLAEQH | RQ-RCAAASS | NEPSSEPLLA | SPEVSIKTV | GSCQVCPAAV | ASQGQPREAP | PTGFTMGRRG | | | | |
| RMRDL2 | QQLAKLAQEH | AS-RNALPPT | SEPEPEPMV | SPELPIPKMA | ----- | ----- | -----GRRG | | | | |
| RSRDL1 | QQLAKLAEQH | RQ-RCAAASS | NEPSSEPLLA | SPEVSIKTV | GSCQVCPAAV | ASQGQPREAP | PTGFTMGRRG | | | | |
| RSRDL2 | QQLAKLAEQH | RQKRNAASA | GEAGSEPLLA | SPEVPVVKTV | GSCQVCPAAV | ASQGQPREAP | PTGFTMGRRG | | | | |
| RSRDL3 | QQLAKLAEEH | RQKRNAASA | GEAGSEPLLA | SPEVPVVKTV | ----- | ----- | -----GRRG | | | | |
| | | | | | | | | | | | |
| IRRDL | ADQCCPGLQG | SCQVCPAAVA | SQAQQQAPP | GIPM----- | ----- | ----- | -----E | VRLKMVDPKG | | | |
| RMRDL1 | ADQCCPGLQG | SCQVCPAAVA | SQTQQQAPP | GIPM----- | ----- | ----- | -----E | VRLKMVDPKG | | | |
| RMRDL2 | ADQCCPGLQG | SCQVCPAAVA | SQTQQQAPP | GIPMNHKVR | PYRTMVMPS | RNCHITGCH | -----E | VRLKMVDPKG | | | |
| RSRDL1 | ADQCCPGLQG | SCQVCPAAVA | SQTQQQAPP | GIPM----- | ----- | ----- | -----E | VRLKMVDPKG | | | |
| RSRDL2 | ADQCCPGLQG | SCQVCPAAVA | SQTQQQAPP | GIPMNHKVR | PYRTMVMPS | RNCHITGCH | -----E | VRLKMVDPKG | | | |
| RSRDL3 | ADQCCPGLQG | SCQVCPAAVA | SQTQQQAPP | GIPMNHKVR | PYRTMVMPS | RNCHITGCH | -----E | VRLKMVDPKG | | | |
| | | | | | | | | | | | |
| | | | | | | | | | | | |
| IRRDL | FSKSSLENT | VNGAPDIEAA | FCKNPNKLF | VGPSDIDKYS | RVVFPVCFVC | FGLMYWIIYL | HISDVLPPDV | | | | |
| RMRDL1 | FSKSSLENT | VNGAPDIEAA | FCKNPNKLF | VGPSDIDKYS | RVVFPVCFVC | FGLMYWIIYL | HISDVLPPDV | | | | |
| RMRDL2 | FSKSSLENT | VNGAPDIEAA | FCKNPNKLF | VSPSIDKYS | RVVFPVCFVC | FGLMYWIIYL | HISDVLPPDV | | | | |
| RSRDL1 | FSKSSLENT | VNGAPDIEAA | FCKNPNKLF | VGPSDIDKYS | RVVFPVCFVC | FGLMYWIIYL | HISDVLPPDV | | | | |
| RSRDL2 | FSKSSLENT | VNGAPDIEAA | FCKNPNKLF | VSPSIDKYS | RVVFPVCFVC | FGLMYWIIYL | HISDVLPPDV | | | | |
| RSRDL3 | FSKSSLENT | VGGAPDIEAA | FCKNPNKLF | VSPSIDKYS | RVVFPVCFVC | FGLMYWIIYL | HISDVLPPDV | | | | |
| | | | | | | | | | | | |
| | | | | | | | | | | | |
| IRRDL | GDD* | | | | | | | | | | |
| RMRDL1 | GDD* | | | | | | | | | | |
| RMRDL2 | GDD* | | | | | | | | | | |
| RSRDL1 | GDD* | | | | | | | | | | |
| RSRDL2 | GDD* | | | | | | | | | | |
| RSRDL3 | GDD* | | | | | | | | | | |

Abb. III.5 Sequenz-Alignment der identifizierten GABA-Rezeptor RDL-Sequenzen aus den untersuchten Zeckenspezies. Aus *Ixodes ricinus* wurde nur eine Sequenz identifiziert, aus *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* zwei und aus *Rhipicephalus sanguineus* drei Sequenzen. RMRDL2, RSRDL2 und RSRDL3 weisen in der intrazellulären Region zwischen TM3 und TM4 konservierte Spleißregionen auf. Identische Aminosäuren sind farbig unterlegt, Spleißregionen sind rot umrandet, für Bindung nicht-kompetitiver Antagonisten relevante Aminosäuren sind blau umrandet und Resistenzmutationen sind durch einen blauen Punkt gekennzeichnet. Die zwei Cysteinreste, die den typischen Cys-Loop bilden, sind durch grüne Pfeile angezeigt, potenzielle Stellen für eine N-Glykosylierung durch eine Klammer. Die mittels TMHMM 2.0 (KROGH *et al.*, 2001) und SignalP 4.1 (PETERSEN ET AL., 2011) vorhergesagten Transmembranhelices (TM) und Signalpeptide sind als solche gekennzeichnet.

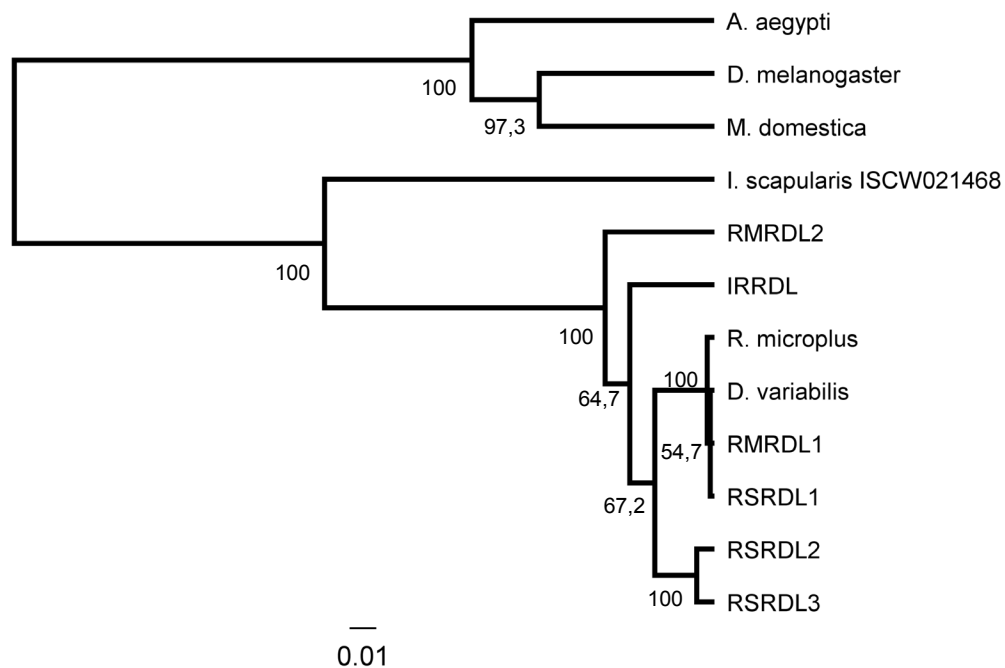


Abb. III.6 Phylogenetischer Stammbaum von RDL-Untereinheiten verschiedener Zecken- und Insekten-Spezies basierend auf einem Aminosäurevergleich und mittels UPGMA (Unweighted Pair Group Method)-Verfahren generiert. Die Bootstrap-Werte (in Prozent; 1000 Replikate) sind an den Knotenpunkten angegeben. Die Astlänge des Stammbaumes zeigt die Anzahl der Substitutionen pro Aminosäureposition.

NCBI GenBank Accession Nummern: *A. aegypti*: XP_001653205.1, *D. melanogaster*: AAA28556.1, *M. domestica*: AAC23602.1, *R. microplus*: GQ398111.1, *D. variabilis*: ABT07487.1

Basierend auf einem GENEIOUS-Alignment wurde die phylogenetische Verwandtschaft zwischen den identifizierten RDL-Sequenzen der verschiedenen Zeckenspezies und den orthologen Untereinheiten einiger Vertreter aus der Gruppe der Insekten ermittelt. Der darauf basierende Stammbaum wurde mit Hilfe des UPGMA-Verfahrens generiert und in Abb. III.6 dargestellt. Die Gruppe der Insekten hebt sich deutlich von den Zecken ab.

III.2 Elektrophysiologische Charakterisierung von RDL-Rezeptoren aus Zecken

In der Literatur waren bereits Expressionsstudien mit der orthologen RDL-Untereinheit aus *D. variabilis* beschrieben (ZHENG *et al.*, 2003). Jedoch gab es zu Beginn der Studie keine detaillierten Untersuchungen zur Pharmakologie dieses Rezeptors aus Zecken. Zur elektrophysiologischen Charakterisierung der identifizierten RDL-Untereinheiten aus den drei Zeckenspezies wurden *Xenopus laevis*-Oozyten als heterologes Expressionssystem verwendet. Zunächst wurden alle Sequenzen, wie in II.3.12 beschrieben, in den für Expression in Säugerzellen geeigneten Vektor pcDNA3.1(+) subkloniert. Die vollständigen Plasmidkarten der Zecken-*rdl*-Gene finden sich im Anhang (vgl. VI.1.1). Für die *in-vitro* Transkription wurden die Plasmide mit Hilfe des Restriktionsenzym *PvuI* linearisiert und die Vollständigkeit der Linearisierung mittels Agarose-Gelelektrophorese (vgl. II.3.4) bestätigt (Gelbild nicht gezeigt). Anschließend wurde mittels *in-vitro* Transkription (vgl. II.3.13) cRNA synthetisiert, deren Integrität durch Agarose-Gelelektrophorese (vgl. II.3.4) und Absorptionsspektroskopie (vgl. II.3.6) überprüft wurde.

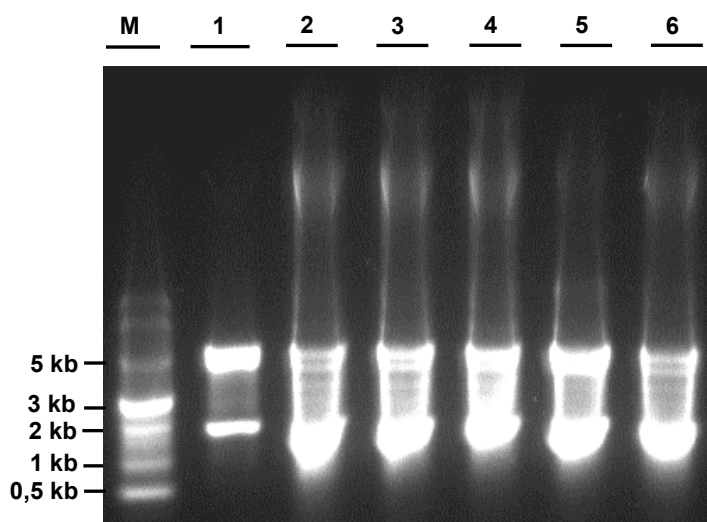


Abb. III.7 Integritätsanalyse durch native Agarose-Gelelektrophorese der denaturierten synthetisierten cRNA. Die *in-vitro* transkribierte cRNA wurde mit ssRNA Ladepuffer versetzt, bei 65°C 5 min denaturiert und auf ein 1 %iges, mit GeldRed™ angefärbtes Agarosegel aufgetragen. Als Größenstandard diente ein ssRNA-Marker. Die Proben wurden in folgender Reihenfolge aufgetragen: ssRNA-Marker (M), *irrd1* (1), *rmr1* (2), *rmr2* (3), *rsrd1* (4), *rsrd2* (5) und *rsrd3* (6).

Die synthetisierte cRNA wurde vor Beladung des nativen Agarosegels durch Erhitzen im RNA-Ladepuffer denaturiert. Das Gel zeigt für jedes Konstrukt cRNA-Banden in einer erwarteten Länge von etwa 1,6 kb und mehrere größere Banden bis etwa 5 kb (vgl. Abb. III.7).

III.2.1 Expressionsstudie

Zur Bestimmung der optimalen Inkubationszeit wurden alle Konstrukte mit jeweils 10 - 20 ng cRNA pro Oozyte injiziert und nach jeweils 24 Std, 48 Std und 72 Std mit 100 μ M GABA gemessen. Dafür wurde ein Haltepotential von -70 mV angelegt und 5 s gemessen, bevor für 20 s 100 μ M GABA appliziert wurde. Im Anschluss wurde für 35 s mit NFR-Lösung gespült. Die Homooligomere von RMRDL1 und IRRDL waren bereits nach 24 Std mit sehr guter Expressionsrate messbar. Die Konstrukte RSRDL2 und RSRDL3 waren erst am dritten Tag nach Injektion messbar, zeigten jedoch eine weniger effiziente Expression. In Zellen, die mit den Konstrukten RMRDL2 und RSRDL1 injiziert wurden, war auch nach 72 Std kein Signal detektierbar (vgl. Tab. III.2).

Tab. III.2 Übersicht der Expressionseigenschaften der RDL-Homooligomere der identifizierten Sequenzen aus drei Zeckenspezies

| Untereinheit | Optimale Inkubationszeit | Expressionsrate (n=40) |
|--------------|-------------------------------|------------------------|
| IRRDL | 24 Std nach Injektion messbar | 98 % |
| RMRDL1 | 24 Std nach Injektion messbar | 100 % |
| RMRDL2 | nicht exprimierbar | |
| RSRDL1 | nicht exprimierbar | |
| RSRDL2 | 72 Std nach Injektion messbar | 83 % |
| RSRDL3 | 72 Std nach Injektion messbar | 53 % |

Um die Expressionsrate genauer zu bestimmen wurden die Konstrukte *irrdl*, *rmdl1*, *rsrdl2* und *rsrdl3* in jeweils 40 Oozyten injiziert. Die höchsten Expressionsraten erreichten mit jeweils 100 % und 98 % positiver Oozyten die Untereinheiten RMRDL1 und IRRDL, während RSRDL2 in 83 % der Oozyten auch noch gut exprimiert wurde, war die Expression von RSRDL3 mit 53 % eher schwierig (vgl. Tab. III.2).

Des Weiteren wurde bei dieser Expressionsstudie die durchschnittliche Größe der jeweiligen Antworten der exprimierten RDL-Rezeptoren bestimmt. Das Ergebnis der Auswertung ist in Abb. III.8 dargestellt.

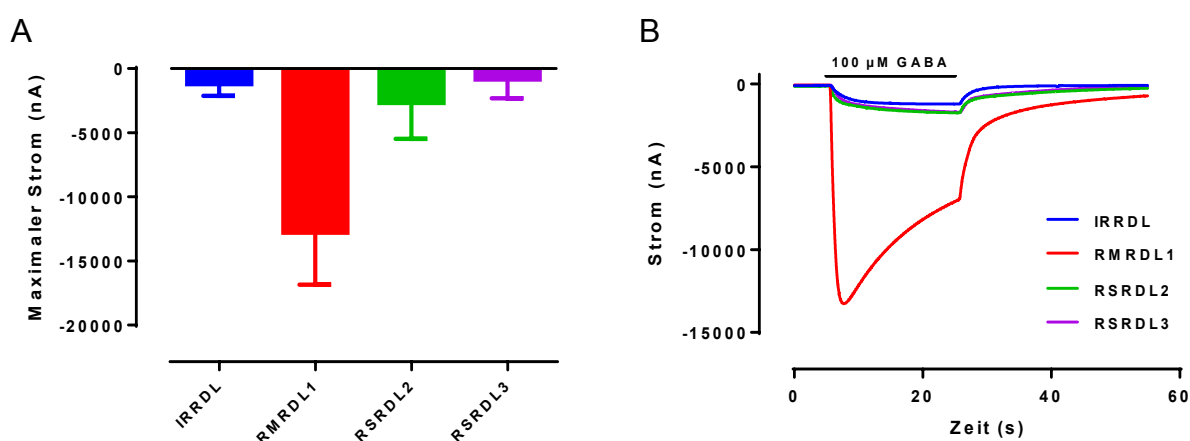


Abb. III.8 Expressionstest der identifizierten homopentameren RDL-Rezeptor-Untereinheiten der drei Zeckenspezies. (A) Durchschnittliche maximale Amplitudengröße des Stroms nach Applikation von 100 μ M GABA ($n = 10-40$). (B) Repräsentative Kinetiken der GABA-induzierten Ströme der Zecken RDL-Rezeptoren über 60 s, wobei 20 s lang 100 μ M GABA appliziert wurde. Applikationszeitpunkt und -dauer sind durch horizontalen Balken dargestellt.

Alle Messungen wurden bei einem Haltepotential von -70 mV durchgeführt. Die GABA-induzierten Ströme waren schnell und stets komplett reversibel. Der durchschnittliche GABA-aktivierte Strom bei IRRDL-Rezeptor-Expression betrug $1,20 \mu\text{A} \pm 0,89 \mu\text{A}$ ($n=39$). Von 40 injizierten Oozyten exprimierten 22 den RSRDL2-Rezeptor mit einem durchschnittlichen Strom von $2,68 \mu\text{A} \pm 2,96 \mu\text{A}$, während der durchschnittliche Strom bei der Messung des RSRDL3-Rezeptor

0,85 $\mu\text{A} \pm 1,90 \mu\text{A}$ (n=10) betrug. Der einzige Zecken-RDL-Rezeptor, bei dem in jeder injizierten Zelle ein Strom zu messen war, ist RMRDL1. Bei diesem Rezeptor wurde mit 100 μM GABA ein Maximalstrom von 22,33 μA und ein durchschnittlicher Strom von 12,79 $\mu\text{A} \pm 4,56 \mu\text{A}$ (n=40) ermittelt (vgl. Abb. III.8A).

III.2.2 Messung von GABA_A-Rezeptor-Agonisten an IRRDL und RMRDL1

Zur weiteren pharmakologischen Charakterisierung wurden die beiden Rezeptoren mit den höchsten Expressionsraten gewählt. Die Konstrukte pcDNA3.1(+)/ *irrdl* und pcDNA3.1(+)/ *rmdl1* wurden mit jeweils 10 - 20 ng cRNA pro Oozyte injiziert und die Dosis-abhängige Antwort auf GABA bzw. Muscimol nach 24 Std bei einem Haltepotential von -70 mV gemessen. Die Messung begann 5 s vor Substanzapplikation während der Perfusion mit NFR-Lösung, bevor dann für 20 s GABA bzw. Muscimol in verschiedenen Konzentrationen appliziert wurde. Im Anschluss wurde für 35 s mit NFR-Lösung gespült.

Abb. III.9E zeigt die nichtlinearen Regressionskurven mit vier Parametern, die durch die normalisierten Messwerte der Dosis-Wirkungs-Kurven von GABA gelegt wurden. Der Hill-Koeffizient gibt die Steigung der Kurve an. Für IRRDL wurde ein EC₅₀-Wert von 132,6 μM ermittelt, wobei der Hill-Koeffizient 1,99 betrug. Für RMRDL1 hingegen wurde EC₅₀-Wert von 53,7 μM mit einem Hill-Koeffizient von 1,43 ermittelt. Die Pharmakologie von Muscimol, eines weiteren bekannten GABA-Rezeptor Agonisten, wurden ebenfalls an den beiden RDL-Rezeptoren untersucht (vgl. Abb. III.9F). Daraus ergab sich für IRRDL ein EC₅₀-Wert von 128,3 μM , wobei der Hill-Koeffizient 1,53 betrug. Für RMRDL1 hingegen wurde ein EC₅₀-Wert von 73,9 μM mit einem Hill-Koeffizient von 1,6 ermittelt.

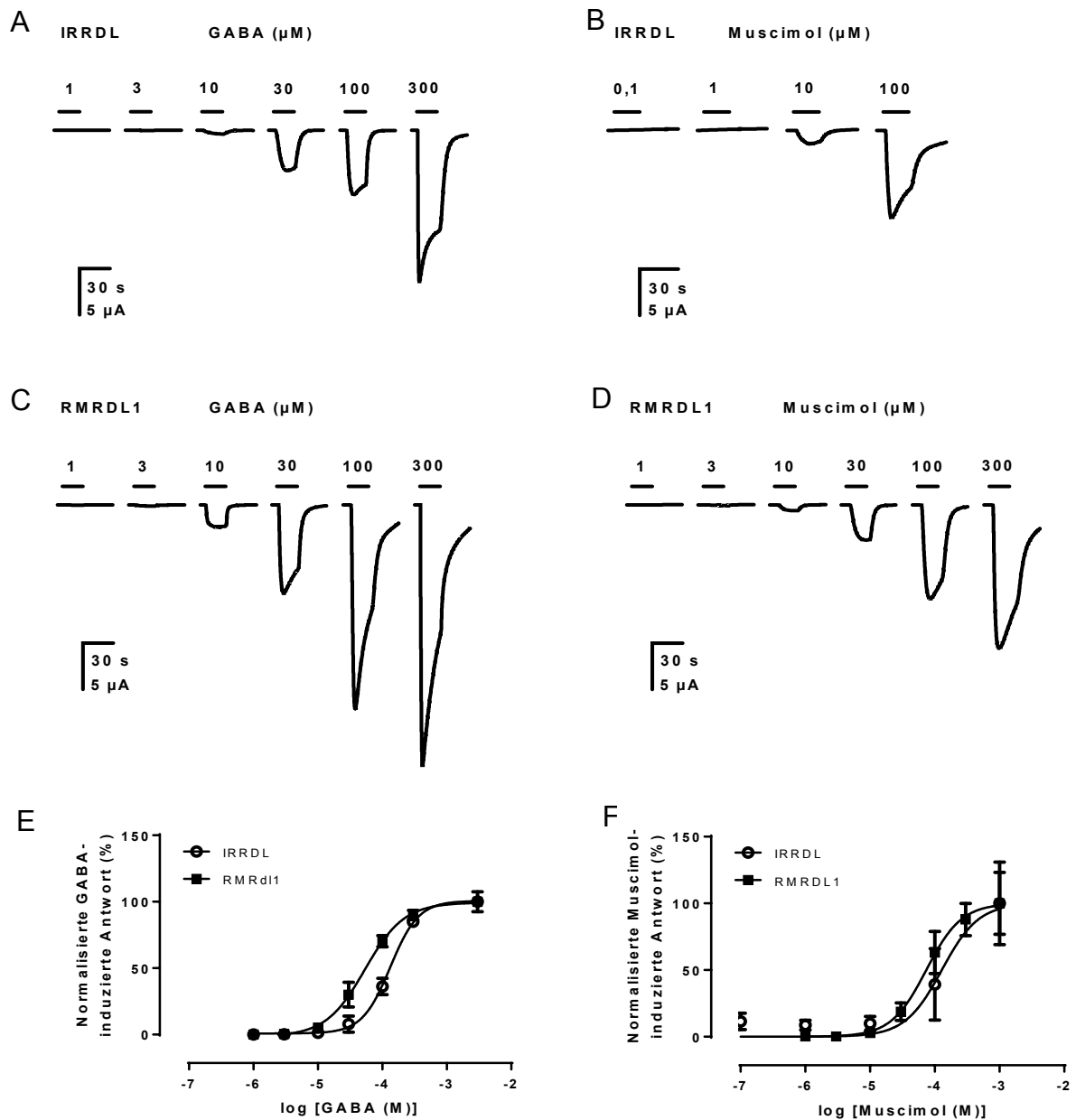


Abb. III.9 Dosis-abhängige Aktivierung der IRRDL- und RMRDL1-Homooligomere exprimiert in *Xenopus laevis*-Oozyten durch die Agonisten GABA und Muscimol. Dargestellt sind repräsentative Stromspuren, induziert durch verschiedene Konzentrationen von GABA bzw. Muscimol für IRRDL (A, C) und RMRDL1 (B, D). Applikationszeitpunkt und -dauer sind durch horizontale Balken dargestellt. Die maximale GABA- bzw. Muscimol-induzierte Amplitude wurde auf 100 % gesetzt, die Antworten der jeweiligen Applikationen wurden normalisiert und als Dosis-Wirkungs-Kurven abgebildet (E, F). Dargestellt sind jeweils Mittelwerte \pm SD ($n=3-5$).

Die EC₅₀-Werte für die getesteten Agonisten GABA und Muscimol unterschieden sich an dem jeweiligen Rezeptor kaum und lagen im zwei- bis dreistelligen mikromolaren Bereich, wobei RMRDL1 für beide Agonisten fast dreifach sensitiver war. Der Hill-Koeffizient lag für beide Agonisten an beiden Rezeptoren zwischen 1,4 und 2.

Tab. III.3 Zusammenfassung der pharmakologischen Eigenschaften von IRRDL und RMRDL gegenüber bekannten Agonisten des GABA_A-Rezeptors

| Agonist | | EC ₅₀ (CI 95%) | Hill-Koeffizient (±SD) | R ² |
|----------|--------|---------------------------|------------------------|----------------|
| GABA | IRRDL | 132,6 µM (117,7 – 149,3) | 1,988 ± 0,13 | 0,9994 |
| | RMRDL1 | 53,7 µM (45,31 – 63,59) | 1,427 ± 0,09 | 0,9993 |
| Muscimol | IRRDL | 128,3 µM (50,64 - 325,1) | 1,526 ± 0,97 | 0,9525 |
| | RMRDL1 | 73,9 µM (67,98 – 80,34) | 1,596 ± 0,07 | 0,9990 |

Die Werte sind das Ergebnis der in Abb. III.9 E und F dargestellten Regressionskurven.

III.2.3 Messung von GABA_A-Rezeptor-Antagonisten an IRRDL und RMRDL1

Neben den bekannten Agonisten wurde auch die Pharmakologie bekannter Antagonisten an den beiden Rezeptoren untersucht. Die Konstrukte pcDNA3.1(+)/ *irrdl* und pcDNA3.1(+)/ *rmrld1* wurden mit jeweils 10 - 20 ng cRNA pro Oozyte injiziert und die Dosis-abhängige Inhibition der Antagonisten auf GABA-Antwort wurde nach 24 Std bei einem Haltepotential von -70 mV gemessen. Für die Messungen wurde zunächst nach 5 s einmal für 20 s 30 µM GABA appliziert. Im Anschluss wurde für 2 min mit NFR-Lösung gespült, dann erfolgte zunächst für 20 s die Applikation des Antagonisten alleine und danach für weitere 20 s die Applikation eines Gemischs aus Antagonist und 30 µM GABA (vgl. Abb. III.10A). Für die Auswertung wurde die jeweils vorangegangene, durch 30 µM GABA ausgelöste Antwort auf 100 % gesetzt, die Antwort unter Einfluss der jeweiligen Inhibitor-Applikation normiert und als Dosis-Wirkungs-Kurven abgebildet.

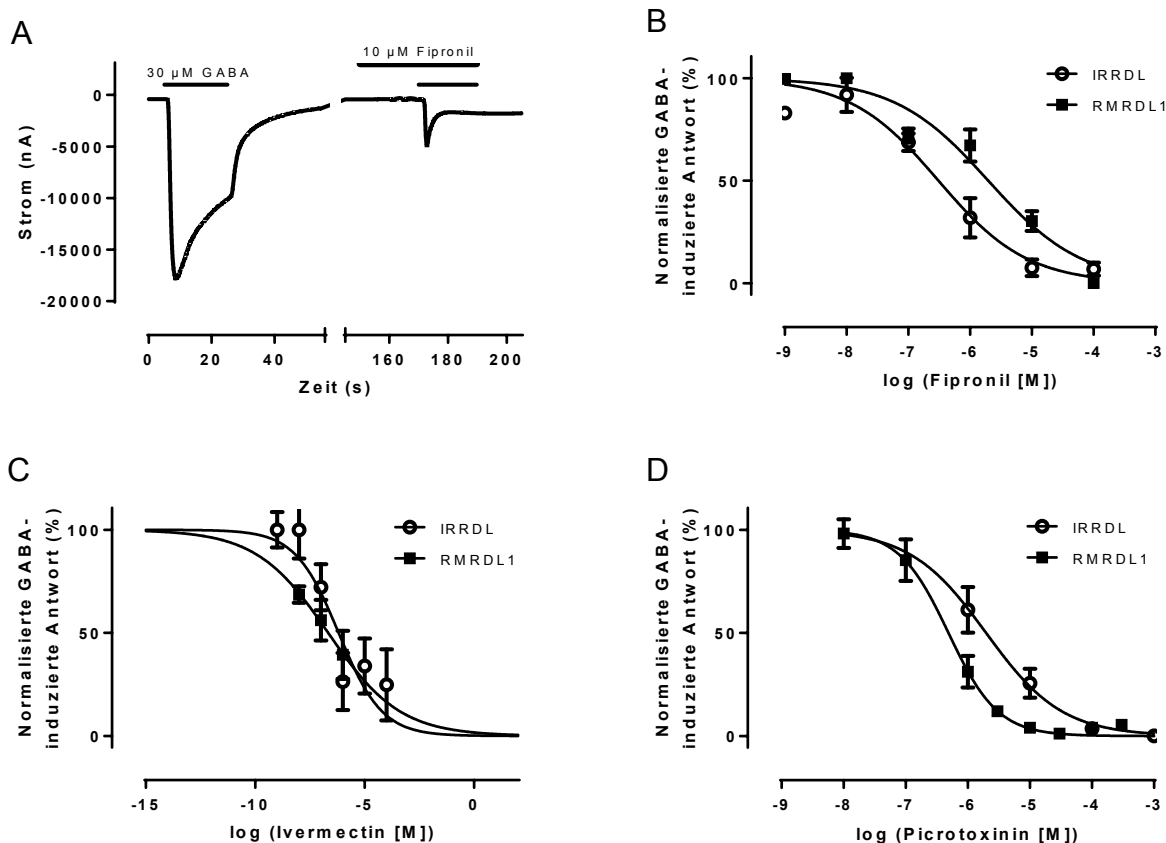


Abb. III.10 Dosis-abhängige Inhibition der IRRDL- und RMRDL1-Homooligomere exprimiert in *Xenopus laevis*-Oozyten durch verschiedene Antagonisten. (A) Das Protokoll der Antagonisten-Messungen ist am Beispiel der Messung von RMRDL1 mit 10 μ M Fipronil dargestellt und zeigt gleichzeitig die Inhibition des GABA-induzierten Stroms am Rezeptor durch Fipronil. 5 s nach Beginn der Messung wurde für 20 s 30 μ M GABA appliziert, dann für 2 min mit NFR-Lösung gespült. Im Anschluss erfolgte für 20 s die Applikation des Antagonisten alleine, danach für weitere 20 s die gleichzeitige Applikation von Antagonist und 30 μ M GABA. (B, C, D) Dosis-Wirkbeziehung von Fipronil, Ivermectin und PicROTOXIN an IRRDL- und RMRDL1-Homooligomeren. Die jeweils vorangegangene, durch 30 μ M GABA induzierte Amplitude wurde auf 100 % gesetzt, die Antworten der jeweiligen Applikationen wurden normalisiert und als Dosis-Wirkungs-Kurven abgebildet. Dargestellt sind jeweils Mittelwerte \pm SD (n=4-5).

In Abb. III.10 sind diese Dosis-Wirkungs-Kurven dargestellt. Für Fipronil wurde mit IRRDL ein IC_{50} -Wert von 310 nM ermittelt, mit RMRDL1 ein IC_{50} -Wert von 1,97 μ M (vgl. Tab. III.4). IRRDL ist demnach fast siebenfach sensitiver in Bezug auf Fipronil als RMRDL1. Das Gegenteil ist der Fall für Picrotoxinin. Hier wurde für IRRDL ein IC_{50} -Wert von 1,97 μ M ermittelt, während für RMRDL ein IC_{50} -Wert von 490 nM bestimmt wurde (vgl. Tab. III.4). Hier ist RMRDL etwa fünffach sensitiver. Das gleiche gilt für Ivermectin. Der bekannte Agonist des Glutamat-Rezeptors inhibiert beide RDL-Rezeptoren. Für IRRDL wurde ein IC_{50} -Wert von 770 nM ermittelt, für RMRDL1 hingegen ein IC_{50} -Wert von 220 nM (vgl. Tab. III.4).

Tab. III.4 Zusammenfassung der pharmakologischen Eigenschaften von IRRDL und RMRDL gegenüber bekannter Antagonisten des $GABA_A$ -Rezeptors

| Antagonist | | IC_{50} (CI 95%) | Hill-Koeffizient (\pm SD) | R^2 |
|--------------|--------|----------------------------|------------------------------|--------|
| Fipronil | IRRDL | 0,31 μ M (0,11 – 0,86) | 0,60 \pm 0,13 | 0,9666 |
| | RMRDL1 | 1,97 μ M (0,56 – 6,85) | 0,57 \pm 0,09 | 0,9576 |
| Picrotoxinin | IRRDL | 1,97 μ M (1,27 – 3,05) | 0,71 \pm 0,05 | 0,9962 |
| | RMRDL1 | 0,49 μ M (0,39 – 0,62) | 1,09 \pm 0,08 | 0,9960 |
| Ivermectin | IRRDL | 0,77 μ M (0,07 – 86,1) | 0,42 \pm 0,15 | 0,8569 |
| | RMRDL1 | 0,22 μ M (0,04 – 13,1) | 0,26 \pm 0,02 | 0,9951 |

Die Werte sind das Ergebnis der in Abb. III.10 B-D dargestellten Regressionskurven.

Zusätzlich zu Fipronil, Picrotoxinin und Ivermectin wurde auch der selektive, kompetitive $GABA_A$ -Rezeptor-Antagonist Bicucullin gemessen, der jedoch, wie für RDL-Rezeptoren charakteristisch, keine Wirkung an IRRDL und RMRDL1 zeigte.

III.3 Stabile Expression des RDL-Rezeptors der Rinderzecke in CHO-Zellen

Elektrophysiologische Untersuchungen dienen dazu die Funktionalität von Ionenkanälen und die Pharmakologie bestimmter Substanzen daran zu untersuchen. Häufig werden dafür *Xenopus laevis*-Oozyten als heterologes Expressionssystem verwendet. Für ein Screening neuer unbekannter Substanzen ist die Herstellung einer stabil transfizierten Zelllinie, die das Zielprotein permanent exprimiert, hilfreich. Sie kann jederzeit in beliebig großen Mengen kultiviert werden und eignet sich für Membranpotential-Assays mit Fluoreszenzfarbstoffen, die einen hohen Durchsatz erlauben. In der vorliegenden Studie wurde als Vektor für die stabile Transfektion pcDNA3.1(+) verwendet, der die Transgene über einen CMV-Promotor zur Expression bringt und mit Geneticin selektiert ist.

III.3.1 Kontrollmessungen der CHO Zellen

Vor Beginn der Transfektion wurde die CHO-dukx Zelllinie auf endogene Faktoren überprüft, die den Membranpotential-Assay beeinflussen könnten. Dazu wurden nicht transfizierte und mit dem leeren Vektor pcDNA3.1(+) transfizierte CHO-Zellen im Membranpotential-Assay gemessen.

In Abb. III.11A ist die Änderung des Membranpotentials der nicht transfizierten CHO-Zellen in Abhängigkeit steigender GABA-Konzentrationen dargestellt. Unabhängig von der applizierten GABA-Konzentration liegen alle Messwerte im Bereich des Hintergrundsignals. Es konnte also keine Membranpotentialänderung durch die Zugabe von GABA bewirkt werden. Die mit dem nicht klonierten Vektor pcDNA3.1(+) transfizierten Zellen wurden nur mit einer definierten GABA-Konzentration von 10 mM gemessen. Die Messwerte der einzelnen Kavitäten einer 384-Loch-Platte sind in Abb. III.11B dargestellt. Sie zeigt ein proportionales Verhältnis zwischen der Hintergrundfluoreszenz und dem Fluoreszenzsignal nach GABA-Applikation. Auch dieses Ergebnis schließt die Anwesenheit eines intrinsischen GABA_A-Rezeptors, genauso wie den Einfluss des Vektors auf das Membranpotential, aus.

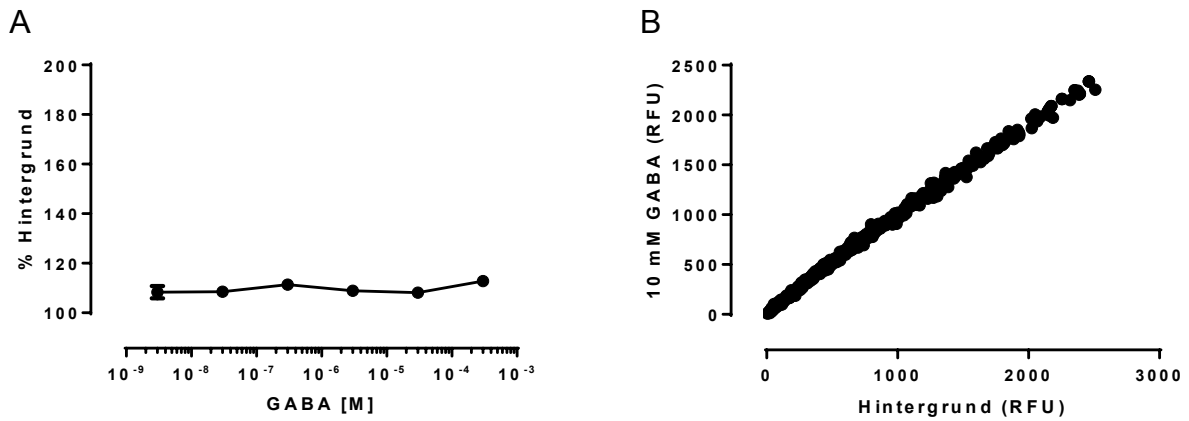


Abb. III.11 Membranpotential-Assay mit nicht transfizierten und mit dem nicht klonierten Vektor pcDNA3.1(+) transfizierten CHO- Zellen. (A) Dosis-Wirkbeziehung zwischen ansteigender GABA-Konzentration und Membranpotential-Änderung der nicht transfizierten CHO-Zelle. Die dargestellten Daten sind Mittelwerte \pm SD (n=4). (B) Darstellung von Einzelwerten der MPA-Messung einer 384-Lochplatte zeigt den proportionalen Anstieg des Fluoreszenzsignals nach Gabe von 10 mM GABA in Abhängigkeit der Hintergrundfluoreszenz bei der Messung der mit pcDNA3.1(+) transfizierten CHO-Zelle.

III.3.2 Generation der stabilen Zelllinie

Die für die Generation der stabilen Zelllinie angewandten Selektionsmethoden sind im Folgenden zum besseren Verständnis zusammenfassend skizziert.

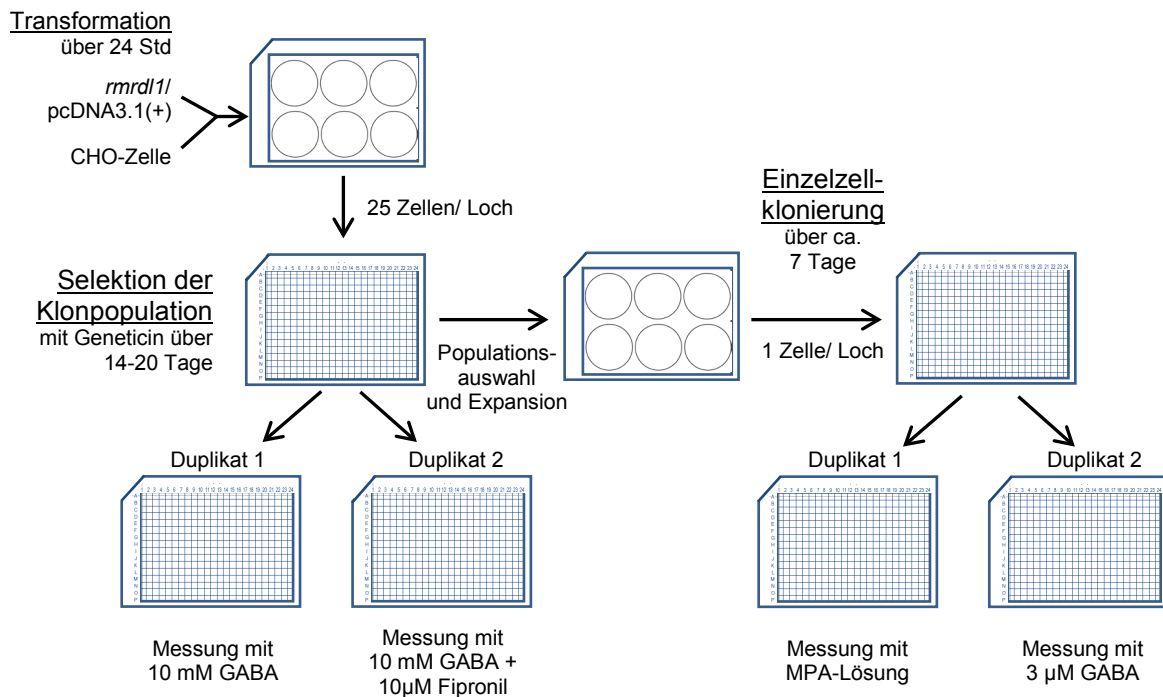


Abb. III.12 Zusammenfassung der Selektionsmethoden zur Generation der stabilen Zelllinie.

In einem ersten Schritt wurden CHO-Zellen mit den Zecken-*rd1/ pcDNA3.1(+)*-Konstrukten über 24 Std transformiert. Im Anschluss wurden die transformierten Zellen mit 25 Zellen/ Loch in 384-Lochplatten ausplattiert und mit Geneticin über 14 - 20 Tage selektiert. Von diesen Platten wurden schließlich zwei Duplikate auf Messplatten übertragen und jeweils mit 10 mM GABA und einer Kombination aus 10 mM GABA und 10 µM Fipronil gemessen. Klonpopulationen mit hohem GABA-Signal und möglichst geringem Signal bei Hemmung mit Fipronil wurden expandiert. Für eine Einzelzellklonierung wurden die expandierten Klone anschließend mit einer statistischen Häufigkeit von 0,5 Zellen/ Loch in 384-Lochplatten ausplattiert, so dass die Wahrscheinlichkeit des Plattierens mehrerer Zellen pro Loch möglichst gering ist. Nach ca. 7 Tagen wurden die Klone auf zwei Messplatten dupliziert. Diese Duplikate wurden jeweils mit 3 µM GABA und MPA-Lösung gemessen. Der Klon mit dem besten Signal-Rausch-Verhältnis wurde zur weiteren Assay-Optimierung ausgewählt und expandiert.

III.3.2.1 Selektion der Klonpopulation

Zur der Etablierung einer Zelllinie, welche den RDL-Rezeptor aus *Rhipicephalus microplus* stabil exprimieren, wurden Zellpopulationen generiert, die die RDL-Untereinheit konstitutiv unter der Kontrolle des viralen CMV-Promotors exprimierten. Nach erfolgter Transfektion der CHO-Zellen mit dem *rmdl1/* pcDNA3.1(+) Konstrukt, wurden die ausplattierten Klone etwa 14 - 20 Tage lang mit Hilfe von Geneticin selektiert. Anschließend wurden sie als Duplikate auf Messplatten übertragen.

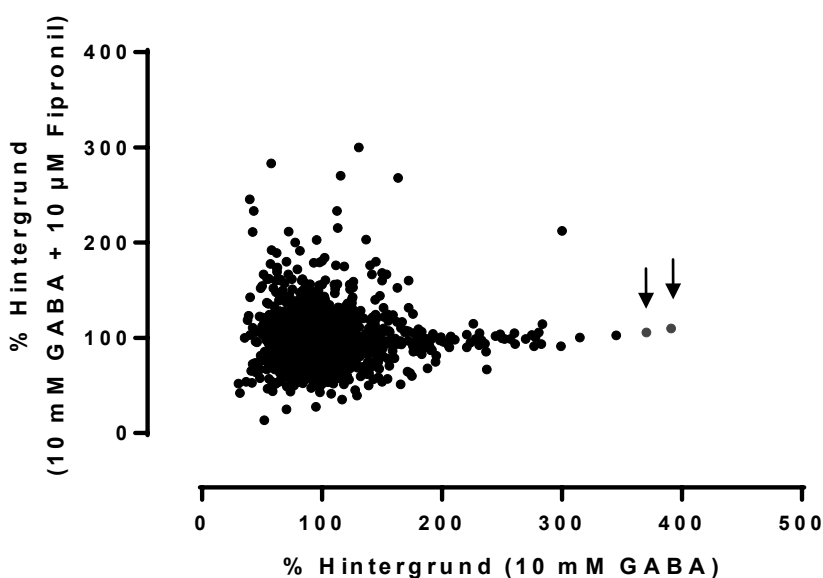


Abb. III.13 Klonselktion nach Transfektion mit *rmdl1/* pcDNA3.1(+). Duplizierte Platten der selektierten Klone wurden jeweils mit 10 mM GABA und einer Kombination von 10 mM GABA und 10 µM Fipronil mittels Membranpotential-Assay in der Fluobox gemessen und die Datensätze gegeneinander aufgetragen. Ausgewählte Klone wurden durch Pfeile markiert: 4P20 (rechts) und 2F4 (links).

Die Ursprungsplatte wurde nochmals mit frischem Medium aufgefüllt. Die Messung der Klone erfolgte mit Hilfe der Fluobox. Dabei wurde je ein Duplikat mit 10 mM GABA, das andere mit einem Gemisch von 10 mM GABA und 10 μ M Fipronil gemessen. Die beiden gemessenen und gegeneinander aufgetragenen Datensätze sind in Abb. III.13 dargestellt. Es wurden Klone, die ein möglichst hohes Signal nach GABA-Applikation und eine gute Hemmung bei Koapplikation mit Fipronil aufwiesen, ausgewählt. Die beiden Klone mit den besten Signalen waren 4P20 mit einem GABA-Signal, das 391 % über der Hintergrundfluoreszenz lag und 110 % bei Hemmung mit Fipronil und 2F4 mit 370 % GABA-Signal und 106 % bei Hemmung durch Fipronil (vgl. Abb II.13). Beide Zellpopulationen wurden von der Ursprungsplatte abgelöst und expandiert. An diesen expandierten, noch heterogenen Zellpopulationen wurden Dosis-Wirkungs-Kurven von GABA gemessen, aus denen EC_{50} -Werte von ca. 2 μ M berechnet wurden.

III.3.2.2 Einzelzellklonierung

Um eine reine klonale Zellpopulation zu erhalten wurden die selektierten Zellen kloniert (vgl. II.5.3). Die expandierten Zellpopulationen wurden mit einer Häufigkeit von 0,5 Zellen/Loch in 384-Lochplatten ausplattiert und nach einer Wachstumsphase von etwa einer Woche in Duplikaten auf Messplatten übertragen. Die Ursprungsplatte wurde nochmals mit frischem Medium aufgefüllt. Die Messung der Klone erfolgte in der Fluobox. Dabei wurde je ein Duplikat mit einer GABA-Konzentration nahe dem EC_{50} -Wert (3 μ M GABA) gemessen, das andere Duplikat diente als Kontrolle ohne GABA. Die mit Klon 4P20 gemessenen Datensätze sind im Folgenden nicht dargestellt, da sie aufgrund der schlechteren Messwerte im Vergleich zu Klon 2F4 nicht für die Auswahl eines finalen Klons in Frage kamen. Die mit Klon 2F4 gemessenen Datensätze sind in Abb. III.14 dargestellt. Ausgewählt wurden Klone mit einem möglichst hohen Signal nach GABA-Applikation, die eine geringe Hintergrund-Fluoreszenz aufwiesen. Die beiden Klone mit den besten Signalen waren 5C3 mit einem GABA-Signal, das 308 % über der Hintergrundfluoreszenz lag und einem Hintergrundsignal von 7337 RFU und 5F4 mit einem GABA-Signal von 316 % über dem Hintergrund und 5911 RFU. Klon 2F4-5F4 wurde von der Ursprungsplatte abgelöst und expandiert.

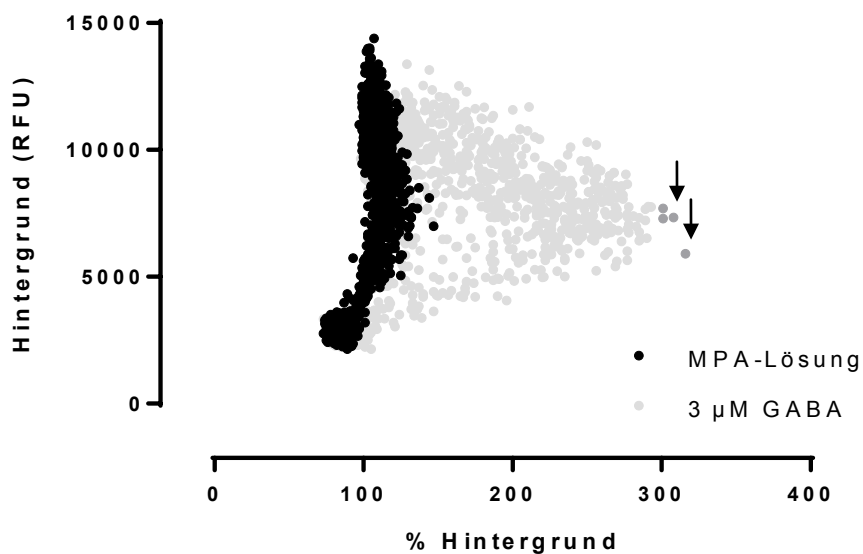


Abb. III.14 Subklonierung des expandierten Klon 2F4. Duplizierte Platten des expandierten Klon wurden jeweils nur mit MPA-Lösung bzw. mit 3 μ M GABA in MPA-Lösung mittels Membranpotential-Assay in der Fluobox gemessen. Die Grafik zeigt die Auftragung der jeweiligen Hintergrund-Fluoreszenz gegen das maximale Signal über dem Hintergrund bei Applikation von 3 μ M GABA aufgetragen. Ausgewählte Klone wurden durch Pfeile markiert: 5C3 (links) und 5F4 (rechts).

III.3.3 Assay-Optimierung

Zur Optimierung der Assay-Bedingungen wurde eine klonale Zelllinie ausgewählt (2F4-5F4) und im Folgenden ausschließlich verwendet. Ziel der Optimierung war es, ein möglichst hohes Signal-Rausch-Verhältnis zu erhalten, die optimale Zellzahl festzulegen und die DMSO-Toleranz des Assays zu untersuchen.

III.3.3.1 Beladungszeit

Bei den in III.3.2.1 und III.3.2.2 beschriebenen Messungen wurde eine Beladungszeit mit der MPA-Lösung von 6 min gewählt. Diese Zeit beruhte auf Erfahrungen aus anderen Assays mit der CHO-Zelle (Dr. Thomas Müller, Bayer Healthcare, persönliche Mitteilung). Um die Beladungszeit der klonalen Zelllinie 2F4-5F4 zu bestätigen, wurde der zeitliche Verlauf der Fluoreszenz während der Beladung dem in der MPA-Lösung enthaltenen Farbstoff über einen Zeitraum von 20 min gemessen. Die Kinetik ist in Abb. III.15 dargestellt. Das Fluoreszenzsignal steigt bei Zugabe über 5 min steil an, flacht dann ab und erreicht bei etwa 6,5 min ein Plateau. Bei weiterer Inkubation nimmt das Signal langsam wieder ab. Der optimale Beladungszeitraum wurde somit bestätigt und bei allen folgenden Versuchen die Zellen zu Beginn 6 min mit MPA-Lösung beladen wurden.

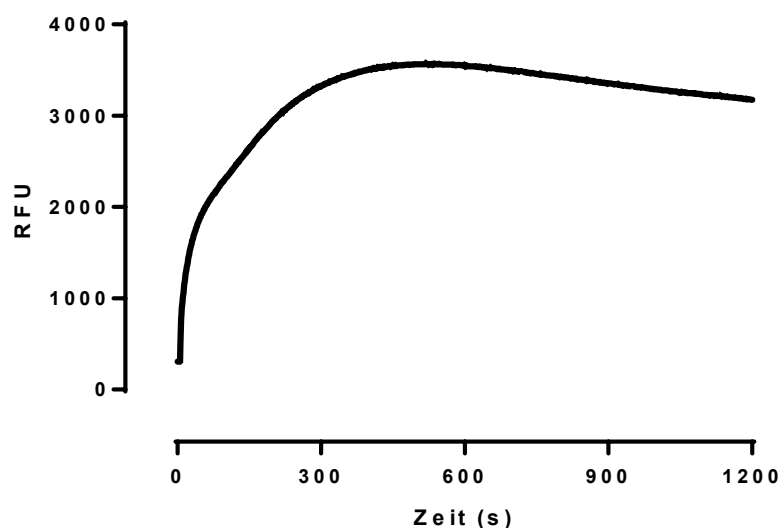


Abb. III.15 Zeitabhängige Verteilung des blauen Fluoreszenzfarbstoffes der MPA-Lösung bei 2F4-5F4. 4000 Zellen pro Loch wurden ausplattiert und nach 24 Std Inkubation bei 37°C und 5 % CO₂ gemessen. Dazu wurde im FLIPR^{TETRA} 30 µl MPA-Lösung zugegeben und der Verlauf der Fluoreszenz über 20 min aufgezeichnet. Dargestellt ist die mittlere Fluoreszenz über eine 384-Lochplatte.

III.3.3.2 Einfluss der Tyrode auf den Membranpotential-Assay

Um das größtmögliche Signal-Rausch-Verhältnis zu erreichen, wurden Messungen mit verschiedenen Tyroden miteinander verglichen. Es wurden Tyroden mit unterschiedlichem Chlorid-Gehalt getestet, da die Membranpotential-Änderung durch einen Chlorid-Strom erzeugt wird. Dafür wurde die Cafty-Tyrode (20 mM HEPES, 130 mM NaCl, 5 mM NaHCO₃, 2 mM MgCl₂ * 6 H₂O, 2 mM KCl und 2 mM CaCl₂) mit zwei Natriumgluconat-Tyroden verglichen. Beide Natriumgluconat-Tyroden enthielten 20 mM HEPES, 130 mM Natriumgluconat, 5 mM NaHCO₃ und 2 mM MgCl₂*H₂O, wobei eine, im Folgenden als Natriumgluconat⁺-Tyrode bezeichnet, zusätzlich 2 mM KCl und 2 mM CaCl₂ enthielt.

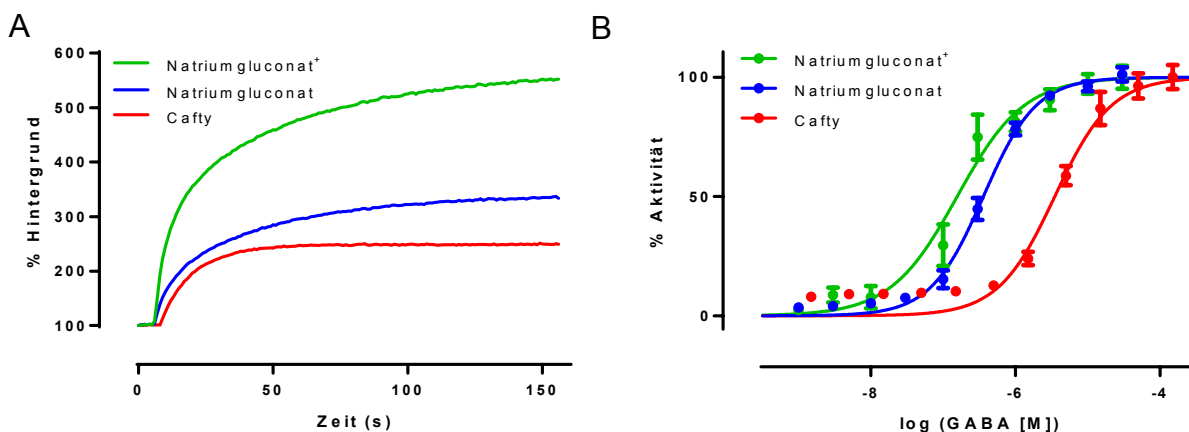


Abb. III.16 Einfluss verschiedener Tyroden auf den Membranpotential-Assay. (A) Kinetiken der Membranpotential-Änderung über 155 s nach Zugabe von 3 μ M GABA in Cafty-, Natriumgluconat- und Natriumgluconat⁺-Tyrode. Die Beladung erfolgte mit MPA-Lösung, die ebenfalls in der jeweiligen Test-Tyrode angesetzt wurde. (B) Dosis-Wirkungs-Kurven von GABA in Cafty-, Natriumgluconat- und Natriumgluconat⁺-Tyrode. Die Daten zeigen jeweils Mittelwerte \pm SD (n=7-8). Zur Berechnung der Aktivität (%) wurden alle Messwerte auf den mit der höchsten GABA-Konzentration erreichten Messwert normiert.

Für den Vergleich der Tyroden wurden jeweils Dosis-Wirkungs-Kurven von GABA gemessen. Die Kinetiken des Fluoreszenzsignals nach Applikation von 3 μ M GABA sind in Abb. III.15A dargestellt. Während das Signal mit der Cafty-Tyrode nach 155 s das Plateau bei etwa $252 \pm 10,46$ % (n=8) erreicht hat, steigt die Kinetik der Natriumgluconat-Tyrode nach anfänglich identischem Verlauf auf etwa $334 \pm 9,94$ % (n=7).

Mit $552 \pm 14,16\%$ ($n=8$) wurde das größte Signal-Rausch-Verhältnis mit der Natriumgluconat⁺-Tyrode erreicht, die zusätzlich je 2 mM KCl und CaCl₂ enthielt. Abb. III.15B zeigt die Vier-Parameter-Logistischen Kurven, die jeweils mit Hilfe von GraphPad Prism durch die Messdaten der Dosis-Wirkungs-Kurven von GABA gelegt wurden. Es ist erkennbar, dass sich die EC₅₀-Werte voneinander unterscheiden. Mit der Cafty-Tyrode wurde ein EC₅₀-Wert von 3,49 μM ermittelt, während mit der Natriumgluconat-Tyrode der EC₅₀-Wert mit 0,36 μM zehnfach sensitiver ist. Unter Verwendung der Natriumgluconat⁺-Tyrode liegt der EC₅₀-Wert mit 0,16 μM nochmals geringfügig sensitiver. Durch den hohen extrazellulären Chlorid-Gehalt der Cafty-Tyrode ist das Membranpotential bereits vor der Öffnung des Kanals erhöht, wodurch das durch GABA ausgelöste maximale Signal nicht viel weiter ansteigen kann. Die Natriumgluconat-Tyrode besitzt hingegen lediglich das in MgCl₂·H₂O enthaltene Chlorid. Der mit dieser Tyrode gemessene EC₅₀-Wert ist zehnfach sensitiver, jedoch liegt trotz des weitaus geringeren Chlorid-Gehalts der Maximalwert ebenfalls nur Faktor 3 über der Hintergrund-Fluoreszenz. Die fehlenden Kationen Calcium und Kalium verhindern zusätzlich den Aufbau eines Membranpotentials über der Zellmembran. Die Natriumgluconat⁺-Tyrode enthält diese Kationen und besitzt gleichzeitig einen niedrigen Chlorid-Gehalt. Sie liefert somit optimale Bedingungen für ein möglichst großes Signal-Rausch-Verhältnis. Für den weiteren Verlauf der Versuche die Natriumgluconat⁺-Tyrode für den Membranpotential-Assay verwendet.

III.3.3.3 Bestimmung der optimalen Zellzahl

Nachdem mit dem Natriumgluconat⁺-Puffer die optimale Tyrode für ein möglichst hohes Signal-Rausch-Verhältnis festgelegt war, wurde im Anschluss die optimale Zellzahl für den Assay bestimmt. Dazu wurden verschiedene Zellzahlen pro Kavität auf Messplatten ausplattiert und Dosis-Wirkungs-Kurven von GABA gemessen. Eine Vier-Parameter-Logistischen Kurve wurde jeweils durch die Messdaten gelegt (vgl. Abb. III.17).

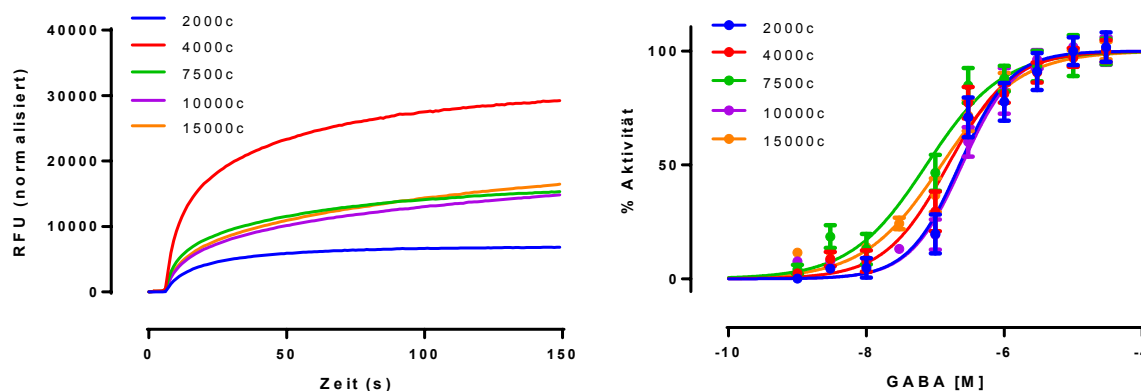


Abb. III.17 Membranpotential-Assay mit verschiedenen Zellzahlen. (A) Kinetik des MPA nach Applikation von 3 μ M GABA mit verschiedenen Zellzahlen. Dargestellt ist die auf den Hintergrund normalisierte Fluoreszenz über 150 s. (B) Dosis-Wirkungs-Kurven von GABA mit verschiedenen Zellzahlen. Die Daten zeigen jeweils Mittelwerte \pm SD ($n=6-8$). Zur Berechnung der Aktivität (%) wurden alle Messwerte auf den mit der höchsten GABA-Konzentration erreichten Messwert normiert.

Mit 2000 Zellen pro Kavität wurde 24 Std nach Ausplattieren der Zellen eine Konfluenz von etwa 60 % festgestellt und ein Maximalsignal von 477 % erreicht. Die doppelte Anzahl von Zellen erreichte maximal 557 % über dem Hintergrundsignal, wobei die Zellen 100 % konfluent waren. Bei 7500 Zellen pro Kavität waren die Zellen nach 24 Std so dicht, dass sie sich nach oben hin ablösten. Das maximale Fluoreszenzsignal betrug 541 %. Bis zu dieser Dichte lag der Hill-Koeffizient zwischen 1,1 und 1,7 (vgl. Tab. III.5). Oberhalb von 10000 Zellen pro Kavität vermindert sich das maximale Signal auf 321 %, wobei der Hill-Koeffizient zwischen 0,81 und 1,1 lag.

Mit zunehmender Zellzahl verringert sich demnach das Maximalsignal und das Signal-Rausch-Verhältnis wird schlechter (vgl. Abb. III.17). Im weiteren Verlauf dieser Arbeit wurden deshalb in jedem Versuch 4000 Zellen pro Kavität ausgesät.

Tab. III.5 Zusammenfassung der Parameter aus Dosis-Wirkungs-Kurven von GABA zur Bestimmung der optimalen Zellzahl (n=4).

| Zellen/ Kavität | Hintergrund- Fluoreszenz (RFU) | Maximalsignal (% Hintergrund) | EC ₅₀ (CI 95 %) | Hill-Koeffizient | R ² |
|--------------------|--------------------------------------|----------------------------------|----------------------------|------------------|----------------|
| 2000 | 1748 | 477 | 165 nM (142 – 191 nM) | 1,513 | 0,9674 |
| 4000 | 6410 | 557 | 138 nM (120 – 158 nM) | 1,655 | 0,9677 |
| 7500 | 6915 | 541 | 285 nM (235 – 344 nM) | 1,070 | 0,9594 |
| 10000 | 4708 | 328 | 65 nM (50,7 – 83,4 nM) | 0,817 | 0,9621 |
| 15000 | 10111 | 321 | 109 nM (81,5 – 145 nM) | 0,842 | 0,9285 |
| 20000 | 10097 | 334 | 156 nM (129 – 189 nM) | 1,114 | 0,9546 |

III.3.3.4 DMSO-Toleranz des Assays

Ein wesentlicher Faktor für die Messung von, vor allem lipophilen Substanzen, ist die Toleranz des Assays gegenüber dem Lösungsmittel DMSO. Nach der Bestimmung optimaler Assay-Bedingungen (Beladungszeit, Tyrode, optimale Zellzahl) wurde daher der Einfluss des Lösungsmittel DMSO bestimmt. Dazu wurden Dosis-Wirkungs-Kurven von GABA unter dem Einfluss verschiedener Konzentrationen von DMSO bis zu 1 % gemessen. Vier-Parameter-Logistische Kurven wurden jeweils durch die Messdaten gelegt (vgl. Abb. III.18).

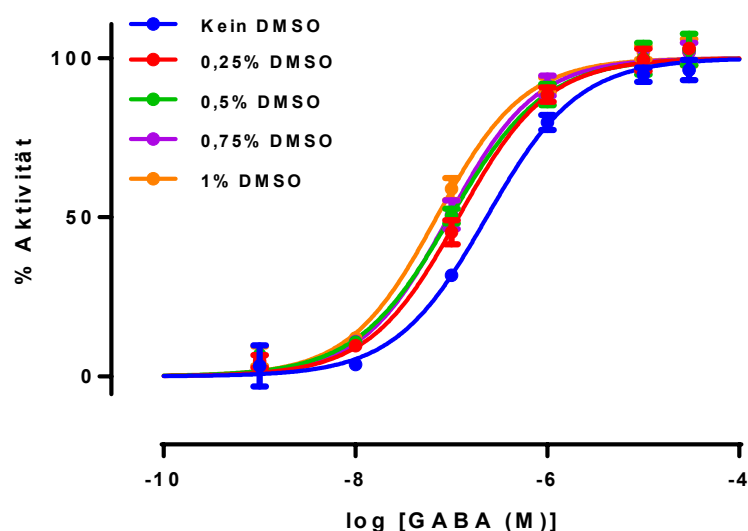


Abb. III.18 DMSO-Toleranz des Membranpotential-Assays. Gemessen wurden Dosis-Wirkungs-Kurven von GABA unter dem Einfluss verschiedener DMSO-Konzentrationen (0 %, 0,25 %, 0,5 %, 0,75 %, 1 %). Die dargestellten Daten sind Mittelwerte \pm SD ($n=4$). Zur Berechnung der Aktivität (%) wurden alle Messwerte auf den mit der höchsten GABA-Konzentration erreichten Messwert normiert.

Dosis-Wirkungs-Kurven von GABA in Abhängigkeit verschiedener Konzentrationen von DMSO sind in Abb. III.18 dargestellt. Dabei wurde eine Linksverschiebung der Dosis-Wirkungskurve mit steigender DMSO-Konzentration deutlich. Ohne den Zusatz von DMSO wurde ein EC_{50} von 201,1 nM ermittelt, mit 0,25 % DMSO 130,5 nM, mit 0,5 % DMSO 106,6 nM, mit 0,75 % DMSO 98,6 nM und mit 1 % DMSO betrug der EC_{50} 76,2 nM. Für den weiteren Verlauf der vorliegenden Arbeit wurde eine maximale DMSO-Konzentration von 0,25 % festgelegt.

III.3.4 Pharmakologie bekannter Substanzen am stabil exprimierten RDL-Rezeptor der Rinderzecke

Zur Charakterisierung des Rezeptors und Validierung des Assays wurde die Pharmakologie bekannter Akarizide und GABA_A-Rezeptor-Modulatoren untersucht.

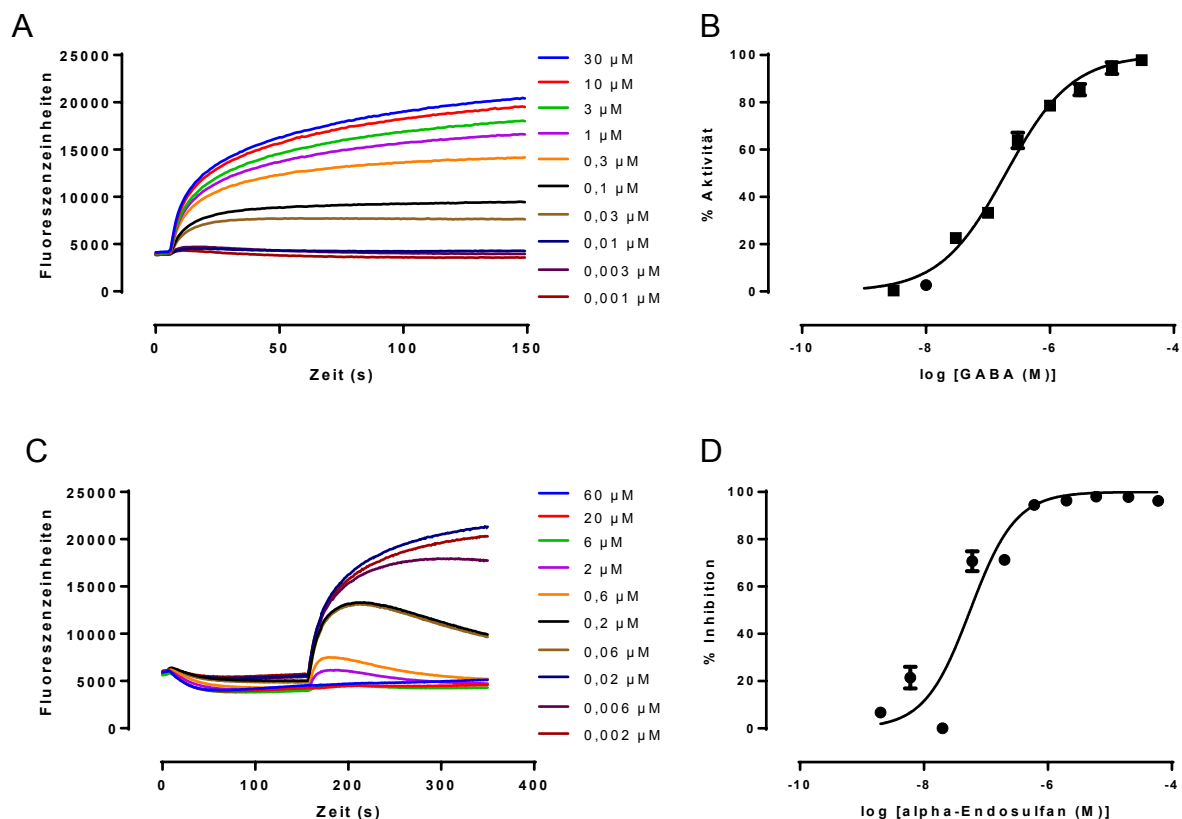


Abb. III.19 Dosis-abhängige Stimulation und Inhibition des stabil in CHO-Zellen exprimierten RMRDL1-Homooligomers durch GABA und α -Endosulfan. (A) Kinetik des MPA nach Applikation aufsteigender GABA-Konzentrationen und die daraus abgeleitete (B) Dosis-Wirkungs-Kurve von GABA. (C) Kinetik des MPA nach Inkubation mit aufsteigenden Konzentrationen von α -Endosulfan und anschließender Applikation von 3 μ M GABA und die daraus abgeleitete (D) Dosis-Wirkungs-Kurve von α -Endosulfan. In den Kinetiken dargestellt ist jeweils die auf den Hintergrund normalisierte Fluoreszenz über 150 s. Die Daten der Dosis-Wirkungs-Kurven zeigen jeweils Mittelwerte \pm SD (n=4).

Zunächst wurden, wie in II.5.2.2.3 beschrieben, 4000 Zellen/ Loch auf Messplatten ausplattiert und für 6 min mit dem Membranpotential-abhängigen Farbstoff beladen. Anschließend wurden die zu testenden Substanzen im FLIPR^{TETRA} appliziert und deren Kinetik 149 s gemessen, bevor eine finale Konzentration von 3 μM GABA zugegeben und die Kinetik über weitere 200 s aufgezeichnet wurde. Die Berechnung der Dosis-Wirkungs-Kurven der untersuchten Agonisten und Antagonisten erfolgte wie in II.5.2.2.4 und II.6 beschrieben.

In Abb. III.19 sind exemplarisch die Kinetiken verschiedener Substanz-Konzentrationen von α -Endosulfan und GABA, sowie die dazugehörigen nichtlinearen Regressionskurven mit vier Parametern, die durch die gemittelten Messwerte der Dosis-Wirkungs-Kurven gelegt wurden. Der Hill-Koeffizient gibt die Steigung der Kurve an. Die Parameter der Dosis-Wirkungs-Kurven aller untersuchten Agonisten und Antagonisten sind in Tab. III.6 zusammengefasst. Für GABA, den natürlichen Agonisten des RMRDL1-Rezeptors, konnte ein EC_{50} -Wert von 0,2 μM ermittelt werden. Darüber hinaus wurden drei weitere Agonisten des GABA_A -Rezeptors an RMRDL1 getestet. Bei allen handelt es sich um GABA-Analoga. Während Muscimol mit einem EC_{50} von 0,14 μM nur geringfügig potenter ist als GABA selber, lag der EC_{50} für Isoguvacin mit 0,68 μM fast vierfach höher. Am wenigsten sensitiv ist RMRDL1 mit einem EC_{50} -Wert von 2,52 μM für THIP, auch unter der Bezeichnung Gaboxadol bekannt.

Das Phenylpyrazol Fipronil war mit einem IC_{50} von 24 nM der potenteste aller getesteten Antagonisten an RMRDL1 im Membranpotential-Assay. Nur geringfügig weniger potent waren die zyklischen Chlorkohlenwasserstoffe α -Endosulfan und Dieldrin. Demnach inhibierte α -Endosulfan RMRDL1 mit einem IC_{50} von 36 nM (vgl. Abb. III.19) und Dieldrin mit einem IC_{50} von 51,9 nM. Das makrozyklische Laktone Ivermectin war mit einem IC_{50} von 0,27 μM zehnfach weniger wirksam im Membranpotential-Assay. Der Chlorkohlenwasserstoff Toxaphen hingegen war mit einem IC_{50} von 2,2 μM lediglich im einstellig mikromolaren Bereich wirksam und somit von allen getesteten Antagonisten der mit der geringsten Potenz an RMRDL1 (vgl. Tab. III.6).

Ebenfalls getestet wurden der GABA_A -Rezeptor-Inhibitor Bicucullin, Baclofen, ein bekannter Agonist des GABA_B -Rezeptors, und das synthetische GABA-Analogon 3-APS, auch unter Homotaurin bekannt. Keine dieser Substanzen zeigte eine Wirksamkeit am stabil in CHO-Zellen exprimierten RMRDL1.

Tab. III.6 Zusammenfassung der pharmakologischen Eigenschaften des stabil in CHO-Zellen exprimierten RMRDL1 gegenüber bekannten Agonisten und Antagonisten des GABA_A-Rezeptors gemessen im Membranpotential-Assay (n=4)

| Wirkstoff | EC50 (95 % CI) | IC50 (95 % CI) | Hill-Koeffizient | R ² |
|---------------------|-----------------------|--------------------------|------------------|----------------|
| <i>Agonisten</i> | | | | |
| Isoguvacin | 0,68 µM (0,59 – 0,78) | - | 1,00 | 0,9843 |
| Muscimol | 0,14 µM (0,12 – 0,16) | - | 1,13 | 0,9844 |
| THIP | 2,52 µM (2,31 – 2,74) | - | 1,38 | 0,9954 |
| GABA | 0,20 µM (0,17 – 0,22) | - | 0,82 | 0,9891 |
| <i>Antagonisten</i> | | | | |
| α-Endosulfan | - | 36,01 nM (27,35 – 47,42) | 1,20 | 0,9168 |
| Dieldrin | - | 51,87 nM (37,49 – 71,77) | 1,36 | 0,9104 |
| Toxaphen | - | 2,19 µM (1,66 – 2,89) | 0,64 | 0,9264 |
| Fipronil | - | 23,92 nM (21,19 – 27,01) | 1,78 | 0,9771 |
| Ivermectin | - | 0,27 µM (0,21 – 0,34) | 0,99 | 0,9425 |

IV Diskussion

Vor etwa 30 Jahren wurden GABA-gesteuerte Chlorid-Kanäle als molekulare Targets der insektiziden Cyclodiene identifiziert (GHASUDDIN & MATSUMURA, 1982). Seitdem gab es zahlreiche Studien zur Struktur des GABA_A-Rezeptors und zu den Bindestellen der verschiedenen GABAergen Verbindungen (SATELLE, 1990; CHENG *et al.*, 2009).

In der synaptischen Transmission im Zentralnervensystem spielt GABA eine zentrale Rolle, wobei die GABA_A-Rezeptoren von Vertebraten und Invertebraten pharmakologisch zum Teil verschieden sind (NARAHASHI *et al.*, 2007). Deshalb stellen sie die primäre Zielstruktur für eine Reihe von insektiziden Verbindungen, wie z.B. zyklische Kohlenwasserstoffe, Phenylpyrazole, Isoxazoline oder Metadiamide dar (COLE *et al.*, 1993; OZOE *et al.*, 2010; NAKAO *et al.*, 2013). Eine abweichende Pharmakologie an der Zielstruktur kann Rückschlüsse auf Unterschiede in der Empfindlichkeit verschiedener Zeckenspezies gegenüber diesen Verbindungen geben und eine Idee für die Richtung der chemischen Optimierung liefern.

Es gab zu Beginn der Studie nur wenige Sequenzinformationen über GABA_A-Rezeptoren aus Zecken. Aus diesem Grund sollte im Rahmen dieser Arbeit zunächst die GABA-Rezeptor-kodierenden Sequenzen aus den drei wichtigen Zeckenspezies *Ixodes ricinus*, *Rhipicephalus sanguineus* und *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* identifiziert und analysiert und die durch sie kodierten Rezeptoren nachfolgend auf ihre Funktionalität überprüft werden. Im Anschluss sollte eine stabile Zelllinie generiert und ein biochemischer Assay etabliert werden, der sich für das Screening von Substanzen in hohem Durchsatz eignet.

IV.1 Identifizierung der RDL-Untereinheit aus Zecken

Eine PCR mit spezifischen Primern abgeleitet aus der *rdl*-DNA-Sequenz der Rinderzecke führte zur Identifizierung von 1614 bp - 1695 bp langen Sequenzen aus cDNA der drei untersuchten Zeckenspezies. Der Sequenzidentitätsvergleich zeigte 85,9 - 99,9%ige Identität der gefundenen DNA-Sequenzen zur bereits bekannten *rdl*-Sequenz der Rinderzecke (GQ398111.1). Aufgrund der hohen Homologie ist mit großer Wahrscheinlichkeit davon auszugehen, dass es sich bei den identifizierten Sequenzen um Orthologe der *rdl*-Untereinheit handelt.

IV.1.1 Das Signalpeptid

Neben den vier konservierten Transmembrandomänen wurde mit Hilfe der Analyse der Aminosäuresequenzen auf Sekundärstrukturen durch das Online-Tool TMHMM Server 2.0 eine weitere N-terminale, 18 Aminosäuren lange α -Helix am N-terminalen Ende der Untereinheit zwischen Position 7 und 24 prognostiziert (vgl. III.1.3). Da RDL-Rezeptoren Membran-gebundene Proteine sind, wurden alle identifizierten Aminosäuresequenzen ebenfalls auf die Anwesenheit eines Signalpeptids, welches dem Transport in das endoplasmatische Retikulum dient, mit Hilfe des Online-Tools SignalP 4.1 analysiert. Die N-terminalen α -Helices der Sequenzen RMRDL1, RMRDL2, RSRDL1, RSRDL2 und RSRSL3 sind identisch und wurden mit hohen Wahrscheinlichkeiten („S-score“: 0,936) als Signalpeptid vorhergesagt (vgl. III.1.3). Zudem wurden für dieselben Sequenzen potenzielle Spaltstellen zwischen den Aminosäuren 23 und 24 prognostiziert. Verfügbare strukturelle Informationen über eukaryote und prokaryote Liganden-gesteuerte Ionenkanäle zeigen eine extrazelluläre Domäne, die die Agonisten-Bindestelle formt und aus einem β -Sandwich besteht, welches aus zehn, orthogonal zueinander angeordneten β -Faltblättern gebildet wird (BREJC *et al.*, 2001). Die davor liegende N-terminale α -Helix ist typisch für alle bekannten eukaryoten Liganden-gesteuerten Ionenkanäle, bei den kristallisierten prokaryoten GLIC-Rezeptoren fehlt sie jedoch (HILF & DUTZLER, 2008).

Lediglich die RDL-Sequenz aus *I. ricinus* unterschied sich im N-terminalen Bereich von den Sequenzen der anderen Spezies. So sind die beiden Valine an den Positionen 18 und 20 durch Isoleucine ersetzt und Threonin und Serin an Position 21 und 22, die letzten beiden Aminosäuren der prognostizierten α -Helix, gegen Alanin und Phenylalanin ausgetauscht. Obwohl durch den TMHMM Server 2.0 auch für IRRDL eine α -Helix zwischen Aminosäuren 7 und 24 vorhergesagt wurde, konnten mittels SignalP 4.0 kein Signalpeptid und keine Spaltstelle für IRRDL identifiziert werden. In nikotinischen Acetylcholin-Rezeptoren wurde gezeigt, dass die N-terminale α -Helix essentiell für die Funktionalität der Liganden-gesteuerten Ionenkanäle ist. Fehlt sie, würde der Rezeptor zwar in die Membran integriert, könnte aber nicht durch Agonisten aktiviert werden (BAR-LEV *et al.*, 2011). Folglich kann diese Strukturveränderung der N-terminalen α -Helix von IRRDL die Ursache einer möglicherweise eingeschränkten Funktionalität sein.

IV.1.2 Charakteristische Motive und bekannte resistenzverursachende Mutationen des GABA_A-Rezeptors

Als GABA_A-Rezeptor gehört der RDL-Rezeptor der Zecke ebenfalls zur Cys-Loop-Superfamilie. So enthalten auch alle identifizierten Sequenzen die beiden Cysteine in der extrazellulären Domäne, die den Cys-Loop bilden. Cystein 169 und Cystein 183 sind typischerweise 13 Aminosäuren voneinander entfernt. Die dazwischen liegenden Aminosäuren sind zum Teil hoch konserviert (SCHOFIELD *et al.*, 1987). Im Falle der identifizierten RDL-Rezeptoren sind diese Aminosäuren identisch.

Das PAR-Motiv im TM1-TM2-Linker ist ebenfalls in den identifizierten RDL-Sequenzen der Zecken enthalten. Es definiert die Anionen-Selektivität von GABA_A-Rezeptoren. Dabei sind die Positionen -2' (Prolin), -1' (Alanin) und 13' (Threonin) in TM2 von ganz besonderer Bedeutung. Mutagenese-Experimente an diesen Stellen führten zu veränderter Leitfähigkeit der Ionenkanäle (JENSEN *et al.*, 2005). Das PAR-Motiv liegt unmittelbar vor TM2, deren Aminosäuren hochkonserviert für alle Säuger- und Insekten- bzw. Arachniden-GABA_A-Rezeptoren sind, da sie die Pore des Ionenkanals bilden. Diese Transmembrandomäne enthält die für die Bindung der meisten nicht-kompetitiven Antagonisten wichtigen Aminosäuren Alanin an Position 2', Threonin an Position 6' und Leucin an Position 9'. Eine Punktmutation von Alanin zu Serin oder Glycin an Position 2' führt zur Resistenz gegenüber Dieldrin und wird deswegen auch *rdl*-Mutation genannt (FRENCH-CONSTANT *et al.* 1993). Die in der vorliegenden Arbeit identifizierten Sequenzen enthielten zum Teil diese Mutation. Alle analysierten Klone des RDL-Rezeptors von *Ixodes ricinus* enthielten ein Serin an Position 2' und somit die Resistenz-verursachende Mutation. Im Gegenteil dazu besaßen alle Sequenzen aus *Rhipicephalus microplus* das wildtypische Alanin an dieser Position. Im Fall von *Rhipicephalus sanguineus* war etwa die Hälfte aller analysierten Klone des RDL-Rezeptors wildtypisch, die andere Hälfte enthielt die Mutation zu Serin an Position 2'. Dies lässt vermuten, dass *R. microplus* mit hoher Wahrscheinlichkeit homozygot das wildtypische Alanin trägt, *I. ricinus* homozygot für die Resistenzmutation ist und *R. sanguineus* heterozygot beide Allele trägt. Um diese Vermutung zu bestätigen, müsste jedoch eine Anzahl von Individuen des jeweiligen Stammes mittels Real-time PCR typisiert werden, durch die die Häufigkeit der einzelnen Allele bestimmt werden kann. Die Möglichkeit einer Duplikation von *rdl* in

R. sanguineus ist wie bei der grünen Pfirsichblattlaus *Myzus persicae* ebenfalls möglich (ANTHONY *et al.*, 1998). Da jedoch keine Individuen analysiert wurden, sondern Zecken-Pools, kann hier keine sichere Aussage getroffen werden. Das natürliche Vorkommen der *rdl*-Mutation in den drei Zeckenspezies wurde in dieser Studie zum ersten Mal beschrieben.

In der RDL-Sequenz eines mit Dieldrin auf Resistenz selektierten Stammes von *R. microplus* wurde eine weitere Mutation an Position 6' in TM2 entdeckt (HOPE *et al.*, 2010). Diese konnte jedoch, ebenso wie eine Mutation von Arginin 340 zu Glutamin, die in einem resistenten Stamm von *Sogatella furcifera* gefunden wurde (NAKAO *et al.*, 2012), in keiner der in dieser Arbeit untersuchten Spezies nachgewiesen werden. Hingegen zeigte sich in den Zecken-RDL-Sequenzen eine Mutation von Valin 327 zu Leucin in TM3, die für *Anopheles funestus* beschrieben wurde (WONDJI *et al.*, 2011). Wie postuliert, ist diese Mutation mit der *rdl*-Mutation assoziiert. Es gibt jedoch keine Studien, die den Einfluss dieser Mutation auf die Funktionalität des RDL-Rezeptors beschreiben. Eine weitere Mutation eines mit Fipronil selektierten Stammes von *Drosophila simulans* ist die Substitution von Threonin 350 zu Methionin in TM3 (LE GOFF *et al.*, 2005). In Zecken-RDL-Sequenzen ist diese Aminosäure im Gegensatz zu den Insekten in den meisten Fällen ein Alanin. Nur RMRDL2 und RSRDL3 enthalten ein Threonin an dieser Position, wobei kein Zusammenhang mit der *rdl*-Mutation besteht. Ein Methionin konnte in keiner der Zecken-RDL-Sequenzen identifiziert werden. Den Einfluss dieser Mutationen auf die Expression und Funktionalität der RDL-Rezeptoren und deren Empfindlichkeit gegen bestimmte Wirkstoffe müsste in weiteren Untersuchungen mit gezielter Mutagenese und Expression gezeigt werden.

IV.1.3 Spleiß-Varianten

Alternatives Spleißen ist ein besonderer Vorgang der genetischen Regulation, bei der aus einem einzelnen Gen durch alternative Kombinationen von Introns und Exons unterschiedliche mRNAs generiert werden, die für verschiedene Varianten eines Proteins kodieren (LEFF *et al.*, 1986; STAMM *et al.*, 2005). Durch alternatives Spleißen wird u.a. die funktionelle Diversität der GABA_A-Rezeptoren in Insekten erreicht (OZOE, 2013). Der Vorgang des alternativen Spleißens beim *rdl*-Gen und die damit verbundenen Konsequenzen in der Funktionalität der Rezeptoren ist bei

D. melanogaster am besten beschrieben. Bei der RNA-Reifung durchläuft das aus neun Exons bestehende *rdl*-Gen ein alternatives Spleißen des Exons 3 (Varianten a und b) und des Exons 6 (Varianten c und d), die in der extrazellulären N-terminalen Domäne liegen. Das Resultat sind vier partiell unterschiedliche Isoformen des *rdl*-Genprodukts (FRENCH-CONSTANT & ROCHELEAU, 1993). In der extrazellulären Domäne des RDL-Proteins beeinflusst das Spleißen die Ligandenbindestelle und verändert dadurch die Wirksamkeit des Agonisten (HOSIE *et al.*, 2001). Die Exons 3 und 6 der RDL-Untereinheit aus der Honigbiene *Apis mellifera* und dem Reismehlkäfer *Tribolium castaneum* unterliegen ebenfalls dem alternativen Spleißen, wobei *T. castaneum* eine weitere Spleiß-Variante von Exon 3 enthält (JONES & SATTELLE, 2006; JONES & SATTELLE, 2007). Über diese oder weitere Spleiß-Varianten bei Zecken gab es jedoch bislang keine Berichte. Im Vergleich der Zecken-RDL-Sequenzen aus dieser Studie mit den Spleiß-Varianten aus *D. melanogaster* wurde deutlich, dass die entsprechenden Exons 3 und 6 zwischen den Spezies nicht konserviert sind, innerhalb der Zecken-Sequenzen hingegen schon. In dieser Arbeit wurden folglich keine Spleiß-Varianten in Exon 3 und 6 identifiziert, was das Vorkommen dieser Spleiß-Varianten in Zecken jedoch nicht ausschließt.

Aus der Sequenzanalyse ergaben sich dagegen Spleiß-Varianten im intrazellulären TM3-TM4-Linker. In RMRDL2 und RSRDL3 fehlt im Gegensatz zu IRRDL, RMRDL1 und RSRDL1 ein konserviertes, 26 AS langes Fragment an Position 391 (GSCQVCPAAVASQGQPAPPTGFTM). Diese beiden Proteine besitzen dafür jedoch ein ebenfalls konserviertes, 25 AS langes Fragment an Position 430 (NHKVREPYGTMVVMPSRNCHITGCH) (vgl. Abb. III.5). RSRDL2 enthält beide durch RNA-Spleißen eingefügte Aminosäuresequenzen. Es ist sehr wahrscheinlich, dass es sich um konservierte Spleiß-Varianten des RDL-Rezeptors aus Zecken handelt, da beide identifizierten Spleiß-Fragmente in zwei verschiedenen Zeckenspezies vorkommen und identisch sind. Während das erste Fragment homolog zu den bereits bekannten Sequenzen von *D. variabilis*, *R. microplus* und *I. scapularis* ist, ist die Sequenz des zweiten Fragments nicht bekannt für Zecken- oder Insekten-RDL-Rezeptoren. Für γ -Untereinheiten in Säuger-GABA_A-Rezeptoren sind Spleiß-Varianten im intrazellulären TM3-TM4-Linker beschrieben. Sie unterscheiden sich durch Anwesenheit oder Fehlen eines acht Aminosäuren langen Abschnitts, der ein Serin enthält, das ein potentielles Substrat für eine Protein Kinase C-Phosphorylierung darstellt (WHITING *et al.*, 1990). Es ist bekannt, dass die

Phosphorylierung der intrazellulären Domäne in Liganden-gesteuerten Ionenkanälen wichtig für die kurz- und langfristige Modulation der Ionenkanal-Aktivität ist (SMART, 1997). Die Analyse des TM3-TM4-Linkers aller identifizierten Sequenzen mit Hilfe des NetPhos 2.0 Servers ergab, unabhängig von den Spleiß-Varianten, jeweils fünf Serin- und eine Threonin-Phosphorylierungsstelle für IRRDL und RMRDL2, jeweils acht Serin- und zwei Threonin-Phosphorylierungsstellen für RMRDL1 und RSRDL1 und jeweils sechs Serin-Phosphorylierungsstellen für RSRDL2 und RSRDL3. Keine der identifizierten Sequenzen enthält eine Tyrosin-Phosphorylierungsstelle im TM3-TM4-Linker. Es wäre also durchaus möglich, dass die Funktionalität dieser Rezeptoren durch unterschiedliche Modulation beeinflusst wird. Eine Möglichkeit diese Hypothese zu bestätigen, wäre über Deletionsmutagenese der einzelnen Phosphorylierungsstellen der Varianten und anschließender funktioneller Expression, z.B. in *Xenopus laevis*-Oozyten, den Einfluss der Phosphorylierung und auch der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration zu untersuchen. Denn Versuche an Neuronen aus Schaben und Honigbienen haben gezeigt, dass RDL-Rezeptoren aus diesen Insekten wahrscheinlich durch Ca^{2+} -abhängige Phosphorylierungsprozesse positiv reguliert werden (DUPUIS *et al.*, 2010).

IV.1.4 RNA-Editing

Beim RNA „A-zu-I-Editing“ wird an einigen Stellen der mRNA Adenosin enzymatisch zu Inosin umgesetzt, was im Translationsvorgang zu veränderten Aminosäuren in funktionell signifikanten Bereichen führt (HOOPENGARDNER *et al.*, 2003). Im Fall des Glutamat-Rezeptors kann es auch das alternative Spleißen regulieren, das verschiedene Varianten des Rezeptors generiert (SCHOFT *et al.*, 2007). Die Kombination aus diesen beiden Varianten der posttranskriptionalen Modifikation sind in Insekten entwicklungsreguliert und führt zu veränderter Wirksamkeit des natürlichen Liganden GABA (JONES *et al.*, 2009). Wie das alternative Spleißen ist auch das RNA „A-zu-I-Editing“ für den RDL-Rezeptor am besten in *D. melanogaster* untersucht, wobei vier Positionen identifiziert wurden (BUCKINGHAM *et al.*, 2005). Es ist nicht bekannt, ob RNA „A-zu-I-Editing“ auch in RDL-Rezeptoren anderer Insekten oder in Zecken vorkommt. Vergleicht man jedoch die entsprechenden Aminosäurepositionen aus *D. melanogaster* mit den Zecken-RDL-Sequenzen, so sind die entsprechenden Aminosäuren nur zum Teil konserviert. Arginin 122 ist in

Zecken ein Glutamin, das von dem Triplet CAG kodiert wird. Die hierbei verwendete Nummerierung entspricht der RDL-Sequenz aus *D. melanogaster*. Ein mögliches „A-zu-I-Editing“ würde zu einem CGG führen, das für Arginin kodiert, während dieser Austausch in *D. melanogaster* zu einem Glycin führt. Asparagin 294 ist in Zecken ein Histidin, das von dem Triplet CAC kodiert wird. Ein mögliches „A-zu-I-Editing“ würde zum Kodon CGC führen, das für Arginin kodiert im Gegensatz zur Asparaginsäure in der Fruchtfliege. Während sich diese beiden Positionen in der Zecken-RDL-Sequenz bereits im Wildtyp von *D. melanogaster* unterscheiden, sind die anderen beiden RNA-Editing-Positionen konserviert. Isoleucin 283, das durch ein ATC kodiert wird, und Methionin 360, welches von ATG kodiert wird. Durch „A-zu-I-Editing“ würden beide Aminosäuren, ebenso wie in *D. melanogaster*, durch Valin ersetzt werden. Nach Analyse und Vergleich der Sequenzen aus Zecken mit der der Fruchtfliege, besteht durchaus die Möglichkeit, dass die gleichen Positionen in den Zecken-RDL-Sequenzen relevant für ein RNA-Editing sind. Für den Nachweis wären jedoch die Sequenzierung und Analyse der genomischen Versionen der Zecken-*rdl*-Gene und die Darstellung von Unterschieden notwendig.

IV.1.5 Molekulare Phylogenie

Die phylogenetischen Verwandtschaftsverhältnisse von Zecken wurden erstmals anhand ihrer morphologischen Merkmale, der Art ihres Lebenszyklus und der Art und Lebensweise ihres Wirtes rekonstruiert (HOOGSTRAAL & AESCHLIMANN, 1982) (vgl. Abb. I.1). Schildzecken wurden aufgrund ihrer unterschiedlichen Morphologie zwischen den Gruppen Prostriata, die von der Gattung *Ixodes* repräsentiert wird, und Metastriata, die die vier Subfamilien Amblyomminae, Haemaphysalinae, Hyalomminae und Rhipicephalinae vereint, unterschieden (BLACK & PIESMANN, 1994; BARKER & MURRELL, 2004). Das Bild der Pro- und Metastriata spiegelt sich ebenfalls teilweise bei der phylogenetischen Analyse der aus Zecken isolierten RDL-Sequenzen wieder (vgl. Abb. III.6). Die RDL-Sequenz aus *I. scapularis* erscheint als monophyletische Gruppe, wobei diese Sequenz aus der Analyse eines Transkriptoms stammt, in der Contigs aus überlappenden RNA-Fragmenten gebildet werden. Die Transmembrandomänen und der intrazelluläre Teil dieser Sequenz teilen eine hohe Homologie mit den anderen Zecken-RDL-Sequenzen. Jedoch beginnt der N-terminale, extrazelluläre Bereich mit einer homologen

Aminosäurenabfolge zu TM2. Es ist davon auszugehen, dass nicht zusammengehörige Fragmente zu einem Contig assembliert wurden. IRRDL bildet ebenfalls eine monophyletische Gruppe im Vergleich zu den metastriaten Spezies. Während die bekannten Sequenzen aus *R. microplus* und *D. variabilis* mit RMRDL1 und RSRDL1 clustern, grenzen sich die Spleiß-Varianten RMRDL2 und RSRDL3 von den anderen metastriaten Zecken ab. Eine Ausnahme bildet hier RSRDL2, da diese Sequenz als einzige beide Spleiß-Fragmente enthält, grenzt sie sich von allen anderen Zecken-RDL-Sequenzen ab. Erkennbar an der Länge der Äste des phylogenetischen Baumes sind die RDL-Sequenzen der verschiedenen Zeckenspezies dennoch hoch konserviert im Vergleich zu den entsprechenden RDL-Sequenzen der Insekten (vgl. Abb. III.6). Diese heben sich deutlich als polyphyletische Gruppe von den Zecken-RDL-Untereinheiten ab, wobei auch die Unterscheidung der Dipteren in Mücken (Nematocera) und Fliegen (Brachycera) erkennbar ist, da *D. melanogaster* und *M. domestica* eine eigene Gruppe bilden.

IV.2 Funktionelle Expression der Zecken-RDL-Rezeptoren in *Xenopus laevis*-Oozyten

Vor Beginn der Entwicklung einer stabilen Zelllinie für ein Hochdurchsatz-Screening sollte zunächst die Funktionalität der identifizierten potentiellen RDL-Rezeptoren nachgewiesen werden. Neben pharmakologischen Studien am RDL-Rezeptor aus *D. melanogaster*, gab es bereits Expressionsstudien mit der orthologen RDL-Untereinheit aus *D. variabilis* (HOSIE *et al.*, 1995; ZHENG *et al.*, 2003). Nach Abschluss der vorliegenden experimentellen Arbeiten wurde kürzlich nun auch über die Funktionalität des RDL-Rezeptors eines *R. microplus*-Isolates berichtet (GASSEL *et al.*, 2014). Die daraus stammende cDNA wurde aus Larven isoliert und das vorhergesagte Protein unterscheidet sich lediglich in drei Aminosäuren von der, in der vorliegenden Arbeit identifizierten Sequenz RMRDL1, Arginin 57 und Arginin 124 in der extrazellulären Domäne und Glycin 496 im intrazellulären TM3-TM4-Linker. Die funktionelle Expression und die Messungen mit Hilfe der Zwei-Elektroden-Spannungsklemme an *Xenopus laevis*-Oozyten, die mit den Zecken-*rdl* cRNA-Konstrukten dieser Studien injiziert wurden, hat gezeigt, dass die meisten Genprodukte funktionelle, homomere RDL-Rezeptoren bilden. Nach 24- bis 72-stündiger Inkubation konnten bei einer Applikation von 100 μ M GABA Ströme von bis zu 22,3 μ A gemessen werden. Die durchschnittliche Größe der Ströme der exprimierbaren Zecken-RDL-Rezeptoren lag mit 1,2 μ A im Bereich dessen, was auch für andere RDL-Rezeptoren aus Insekten bzw. Zecken publiziert wurde (HOSIE *et al.*, 1995; ZHENG *et al.*, 2003; EGUCHI *et al.*, 2006; GASSEL *et al.*, 2014). Im Vergleich zu den beschriebenen Expressionsbedingungen des RDL-Rezeptors aus *Musca domestica*, der eine Inkubationszeit von mindestens vier Tagen benötigt (EGUCHI *et al.*, 2006), ist die Expression der RDL-Rezeptoren aus Zecken, wie auch bei der Fruchtfliege *D. melanogaster* in *Xenopus laevis*-Oozyten recht schnell und bereits nach maximal drei Tagen messbar (HOSIE *et al.*, 1995; ZHENG *et al.*, 2003).

Alle exprimierbaren Zecken-RDL-Rezeptoren zeigten eine Kinetik, die typisch für GABA_A-Rezeptoren ist (vgl. Abb. III.8). Die Kinetik des durch eine sättigende GABA-Konzentration induzierten Chlorid-Einstroms von RMRDL1 ist sehr schnell und erreicht unmittelbar nach Applikationsbeginn ihr Maximum, um schließlich bei anhaltender GABA-Applikation langsam zu desensibilisieren (vgl. Abb. III.8B). IRRDL, RSRDL2 und RSRDL3 besitzen eine sich ähnelnde, langsamere Kinetik der GABA-

Antwort. Die Kanäle öffnen zunächst langsam und der induzierte Strom erreicht gegen Ende der GABA-Applikation sein Maximum. Wahrscheinlich war die applizierte GABA-Konzentration für diese Kanäle nicht sättigend, so dass sie nicht desensibilisieren, da in diesem Fall vermutlich nicht alle GABA-Bindestellen besetzt werden (KERAMIDAS & LYNCH, 2013).

Zwei der sechs Konstrukte, RMRDL2 und RSRDL1, ließen sich nicht exprimieren. Bei RMRDL2 handelt es sich um die Spleiß-Variante, die in der intrazellulären Domäne ein 25 Aminosäuren langes zusätzliches Fragment enthält. Zudem unterscheidet sich diese Sequenz über einen Bereich von 50 Aminosäuren nach TM3 von allen anderen Zecken-RDL-Sequenzen. Im Gegensatz dazu ist RSRDL1 nahezu identisch mit RMRDL1, dem Konstrukt mit der höchsten Expressionsrate in den elektrophysiologischen Assays. Glycin 516 in TM4 von RSRDL1 ist in RMRDL1 lediglich durch ein Asparagin ersetzt. Die Ursache der mangelnden Exprimierbarkeit dieser Konstrukte in *Xenopus laevis*-Oozyten kann nicht eindeutig definiert werden. Bei allen Konstrukten handelt es sich um die originalen Sequenzen aus den untersuchten Zecken, die nicht für das Expressionssystem der *Xenopus laevis*-Oozyten Kodon-optimiert wurden. Da auch die Unterschiede auf Nukleotidebene zwischen den Konstrukten größer waren als die auf Proteinebene, könnte das eine mögliche Erklärung für fehlende oder eingeschränkte Exprimierbarkeit sein. Des Weiteren könnte, wie in VI.1.3 beschrieben, die Modulation der Rezeptoren durch unterschiedliche Phosphorylierung eine Rolle bei der Expression spielen. Das fehlende Signalpeptid in IRRDL hat jedoch keinen Einfluss auf die Exprimierbarkeit des in *Xenopus laevis*-Oozyten exprimierten Rezeptors, da die in III.2.1 gemessene Expressionsrate von 98 % sehr hoch ist.

IV.2.1 Pharmakologie bekannter GABAerger Verbindungen an den RDL-Rezeptoren aus *Ixodes ricinus* und *Rhipicephalus microplus* bei transienter Expression in *Xenopus laevis*-Oozyten

Zur pharmakologischen Charakterisierung wurden IRRDL und RMRDL1 ausgewählt, die beiden Rezeptoren mit den besten funktionellen Expressionen in *Xenopus laevis*-Oozyten. An beiden Rezeptoren wurden Dosis-Wirkungs-Kurven der Agonisten GABA und Muscimol gemessen (vgl. Abb. III.9). Für IRRDL wurde mit GABA ein mittlerer EC₅₀-Wert von 132,6 µM ermittelt, während für RMRDL1 ein mittlerer EC₅₀-Wert von 53,7 µM gemessen wurde. Der RDL-Rezeptor aus *R. microplus* ist folglich fast dreifach sensitiver gegenüber GABA als der aus *I. ricinus*. Ein ähnliches Verhältnis ergibt sich auch bei der Messung des Agonisten Muscimol, wobei für IRRDL ein mittlerer EC₅₀-Wert von 128,3 µM ermittelt wurde und für RMRDL1 ein mittlerer EC₅₀-Wert von 73,9 µM. Die Sensitivität dieser Zecken-RDL-Rezeptoren gegenüber GABA liegt im Bereich derer von in *Xenopus laevis*-Oozyten exprimierten RDL-Rezeptoren aus Insekten. So wurde für den RDL-Rezeptor aus *M. domestica* ein EC₅₀-Wert von 30 µM berichtet, für *D. melanogaster* ein EC₅₀ von 54 µM und für die Spinnmilbe *Tetranychus urticae* ein EC₅₀-Wert von 24,5 µM (EGUCHI *et al.*, 2006; JONES *et al.*, 2009; HIRAGAKI *et al.*, 2012). Im Gegensatz dazu sind viele Insekten-RDL-Rezeptoren anders als bei Zecken sensitiver für Muscimol als für GABA. So liegt z.B. bei *Heliothis virescens* der EC₅₀-Wert bei 14,9 µM und bei *D. melanogaster* sogar bei 9,04 µM (WOLFF & WINGATE, 1998; MCGONIGLE & LUMMIS, 2010). Im Vergleich zu RMRDL zeigt IRRDL eine geringere Sensitivität gegenüber beiden untersuchten Agonisten, da dieser Rezeptor die *rdl*-Mutation trägt, welche nicht nur die Bindung der Kanal-Blocker verringert, sondern auch die Agonisten-Bindestelle beeinflusst (HOSIE *et al.*, 1995).

Zur vollständigen Abbildung der Pharmakologie der Zecken-RDL-Rezeptoren wurden auch einige Wirkstoffvertreter getestet, die als Antagonisten des GABA_A-Rezeptors beschrieben sind. Darunter ist auch der nicht-kompetitive GABA_A-Rezeptor-Antagonist Picrotoxinin. Aus den Dosis-Wirkungs-Kurven mit Picrotoxinin wurde für IRRDL ein mittlerer IC₅₀-Wert von 1,97 µM ermittelt. RMRDL1 hingegen ist mit einem mittleren IC₅₀-Wert von 0,49 µM 4-fach sensitiver gegenüber Picrotoxinin. Des Weiteren wurden Dosis-Wirkungs-Kurven mit dem arthropodiziden Phenylpyrazol

Fipronil gemessen, wobei IRRDL mit einem mittleren IC_{50} -Wert von $0,31 \mu\text{M}$ fast 7-fach sensitiver war als RMRDL1, für den ein mittlerer IC_{50} -Wert von $1,97 \mu\text{M}$ gemessen wurde. Ein Einfluss der *rdl*-Mutation auf die Wirksamkeit wurde für beide Substanzen berichtet (HOSIE *et al.*, 1995). Im Fall von Picrotoxinin ist RMRDL1 wie zu erwarten sensitiver als IRRDL, wobei der ermittelte IC_{50} -Wert des wildtypischen RMRDL1 vergleichbar mit Werten für wildtypische RDL-Rezeptoren aus *H. virescens* ($0,38 \mu\text{M}$) und *D. melanogaster* ($0,48 \mu\text{M}$) ist (WOLFF & WINGATE, 1998). Das Gegenteil ist jedoch der Fall für Fipronil. IRRDL, der Rezeptor mit der *rdl*-Mutation in TM2, ist sehr viel sensitiver gegenüber Fipronil als der wildtypische RMRDL. Obwohl Kreuzresistenzen der *rdl*-Mutation zu Fipronil bereits für den RDL-Rezeptor von *D. melanogaster* beschrieben waren (HOSIE *et al.*, 1995), gab es weitere Berichte, die sie widerlegten und über identische IC_{50} -Werte berichten. So berichten GASSEL *et al.* (2014) zwar einen Einfluss der Mutation auf die Wirksamkeit von Fipronil am RDL-Rezeptor aus *D. melanogaster*, gleichzeitig konnte beim RDL-Rezeptor aus dem Katzenfloh *C. felis* kein Unterschied in der Wirksamkeit gezeigt werden (WOLFF & WINGATE, 1998).

Ebenfalls wurde das makrozyklische Laktone Ivermectin an den Zecken-RDL-Rezeptoren getestet. Es ist bekannt für seine agonistische Wirkung an Glutamat-gesteuerten Chlorid-Kanälen von Insekten und Helminthen (WOLSTENHOLME & ROGERS, 2005). Gleichzeitig wurde die Wirkung von Ivermectin als Antagonist am RDL-Rezeptor von *D. melanogaster* gezeigt (LEES *et al.*, 2014). Auch in der vorliegenden Studie an Zecken-RDL-Rezeptoren war Ivermectin mit mittleren IC_{50} -Werten von $0,77 \mu\text{M}$ bei IRRDL und $0,22 \mu\text{M}$ bei RMRDL1 antagonistisch wirksam. Die Werte sind vergleichbar mit dem für *D. melanogaster* ermittelten IC_{50} -Wert von $0,52 \mu\text{M}$ (LEES *et al.*, 2014).

In Messungen der beiden Konstrukte mit Bicucullin konnte der GABA-induzierte Strom an beiden Rezeptoren nicht inhibiert werden. Diese Unempfindlichkeit gegenüber diesem kompetitiven GABA_A-Rezeptor-Antagonisten ist charakteristisch für RDL-Rezeptoren (RAUH *et al.*, 1990).

IV.3 Entwicklung und Charakterisierung der stabilen Zelllinie

Nach der Identifikation der putativen *rdl*-Gene aus drei verschiedenen Zecken-Spezies und deren bioinformatischer Analyse konnte mit Hilfe der elektrophysiologischen Untersuchungen die Funktionalität dieser Genprodukte gezeigt werden, die sich auch pharmakologisch wie RDL-Rezeptoren verhielten.

In einem weiteren Schritt sollten schließlich stabile Zelllinien mit den beiden funktionellen Konstrukten *irrdl* und *rmrld1* generiert werden. Mehrere Transfektionsansätze mit dem *irrdl*-Konstrukt blieben jedoch erfolglos, da kein funktionaler Klon identifiziert werden konnte. Eine mögliche Ursache hierfür könnte die Abwesenheit des Signalpeptids sein, das möglicherweise im Gegensatz zu *Xenopus laevis*-Oozyten für das Expressionssystem der CHO-Zellen essentiell ist. Die Generation einer Zelllinie mit *rmrld1* war hingegen erfolgreich. Nach der Transfektion und Selektion mit Geneticin wurde die erste Klonpopulation mit Hilfe des Signals nach Applikation von 10 mM GABA im Membranpotential-Assay ausgewählt (vgl. III.3.2.1). Darauf folgte eine Einzelzellklonierung um eine reine Zellpopulation zu erhalten, in der alle Zellen den Rezeptor exprimieren (vgl. III.3.2.2). Diese wurde mit einer GABA-Konzentration von 3 μ M, die nahe am EC_{50} -Wert lag, selektiert. Mit der finalen klonalen Zelllinie wurden schließlich die Bedingungen des Membranpotential-Assays evaluiert und die optimale Zellzahl, der geeignetste Tyrode und die DMSO-Toleranz des Assays festgelegt (vgl. III.3.3).

IV.3.1 Pharmakologie bekannter GABAerger Verbindungen an RMRDL1 bei stabiler Expression in CHO-Zellen

Zur vollständigen pharmakologischen Charakterisierung des stabil in CHO-Zellen exprimierten RMRDL1-Rezeptors und zur Validierung des Membranpotential-Assays wurden Dosis-Wirk-Beziehungen bekannter Akarizide und GABA_A-Rezeptor-Modulatoren untersucht (vgl. III.3.4). Der Einfluss agonistischer Effekte wurde mit Hilfe des natürlichen Agonisten GABA und drei GABA-Analoga analysiert (vgl. Abb. IV.1). Für GABA konnte im Membranpotential-Assay an RMRDL1 ein EC_{50} -Wert von 0,2 μ M ermittelt werden. Die Sensitivität dieses Rezeptors gegenüber GABA liegt im Bereich des in *Drosophila* Mel-2-Zellen exprimierten RDL-Rezeptors aus dem Reisblattkäfer *Oulema oryzae*, für den ebenfalls mittels Membranpotential-

Assay ein EC_{50} von $0,3 \mu\text{M}$ ermittelt wurde (NAKAO *et al.*, 2012). Nach Abschluss der vorliegenden experimentellen Arbeiten wurde die Funktionalität des RDL-Rezeptors eines *R. microplus*-Isolates berichtet (GASSEL *et al.*, 2014). Diese Sequenz unterscheidet sich lediglich in drei Aminosäuren von RMRDL1 (Arginin 57, Arginin 124 und Glycin 496) und wurde stabil in HEK293-Zellen exprimiert. Der von GASSEL *et al.* (2014) mit Hilfe des Membranpotential-Assays ermittelte EC_{50} -Wert liegt jedoch mit $9,8 \mu\text{M}$ 50-fach höher als der für RMRDL1. Es ist denkbar, dass die drei Aminosäuren, welche die beiden Sequenzen voneinander unterscheiden, die abweichende GABA-Sensitivität verursachen. Zwar liegt keine der drei Aminosäuren im Bereich der bekannten GABA-Bindestelle (MCGONIGLE & LUMMIS, 2009), jedoch ist es möglich, dass sie eine Konformationsänderung bewirken, die Einfluss auf diese Bindestelle hat. Andererseits kann trotz der Ähnlichkeit beider Sequenzen der Unterschied in der Sensitivität für GABA durch die unterschiedlichen Expressionssysteme bedingt sein. CHO-Zellen zeigen selbst eine schwache Expression endogener Ionenkanäle und damit eine geringe Hintergrundleitfähigkeit, weshalb sie sich gut für die Expression von Ionenkanälen eignen (GAMPER *et al.*, 2005). Gleichwohl besitzen sie eine endogene Ca^{2+} -aktivierte Leitfähigkeit für Kationen, die Experimente erschwert, welche die Erhöhung intrazellulären Calciums erfordern (GAMPER *et al.*, 2005). In HEK-Zellen konnten endogene spannungsaktivierte Kalium-Ströme nachgewiesen werden, die besonders die Expression von exogenen Kaliumkanälen schwierig macht (GAMPER *et al.*, 2002). Zudem enthalten sie endogene mRNA der $\beta 3$ -Untereinheit des humanen GABA_A -Rezeptors (DAVIES *et al.*, 2000), die möglicherweise mit der RDL-Untereinheit Heteropentamere bilden könnte. So ist es möglich, dass beide Expressionssysteme einen unterschiedlichen Einfluss auf die durch GABA ausgelöste Chlorid-Leitfähigkeit des RDL-Rezeptors haben, was zu unterschiedlichen EC_{50} -Werten führt.

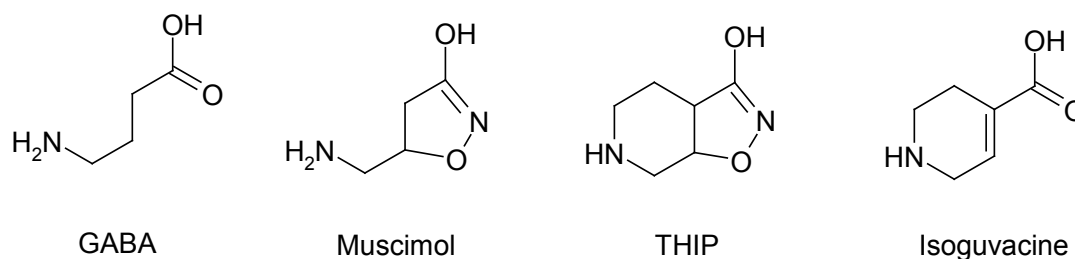


Abb. IV.1 Strukturformeln der getesteten Agonisten. GABA und dessen Analoga Muscimol, THIP und Isoguvacin

Des Weiteren wurde der GABA_A-Rezeptor Agonist Muscimol im Membranpotential-Assay an RMRDL1 getestet. Mit einem EC₅₀ von 0,14 µM war Muscimol nur geringfügig potenter als GABA selber. Aktuell gibt es keine vergleichbaren Daten von RDL-Rezeptoren aus anderen Arthropoden, die ebenfalls im Membranpotential-Assay gemessen wurden. Jedoch wurde Muscimol am in *Xenopus laevis*-Oozyten exprimierten RDL-Rezeptor aus *D. melanogaster* gemessen. An beiden Spleiß-Varianten war Muscimol mit EC₅₀-Werten von 26 µM bzw. 48 µM geringfügig potenter als bzw. äquipotent zu GABA (HOSIE *et al.*, 2001). Somit ist das Verhältnis der Potenz von Muscimol und GABA vergleichbar zu dem an RMRDL1 gemessenen. Der eingeschränkte Zugang von Substanzen zu den Oozyten von *Xenopus laevis* aufgrund von Einstülpungen der Membran erfordert höhere Substanzkonzentrationen um die gleiche Wirksamkeit an exprimierten Rezeptoren wie bei Säugerzellen zu erzielen (MASSEVER, 1973; GOLDIN, 2006). Folglich liegen EC₅₀-Werte, die mit Hilfe von *Xenopus laevis*-Oozyten als Expressionssystem erzeugt wurden höher als jene aus Säugerzellen (GOLDIN, 2006).

Das GABA-Analogon Isoguvacin war an RMRDL1 mit einem EC₅₀ von 0,68 µM weniger potent als GABA und Muscimol. Wie auch für Muscimol ist die Wirksamkeit von Isoguvacin am RDL-Rezeptor nur für *D. melanogaster* beschrieben, wobei es mit einem EC₅₀ von 159 µM ein geringfügig schwächerer Agonist war als GABA (HOSIE *et al.*, 2001). Obwohl Isoguvacin an RMRDL1 nur vierfach weniger potent als GABA war, ist die generell geringere Sensitivität der RDL-Rezeptoren gegenüber diesem GABA-Analogon vergleichbar.

THIP, auch unter dem Namen Gaboxadol bekannt, ist ein Muscimol-Derivat, das als voller Agonist am humanen GABA_A-Rezeptor wirksam ist und als Schlafmittel entwickelt werden sollte. Zu starke Nebenwirkungen führten jedoch zum Abbruch der Entwicklung (KROGSGAARD-LARSEN *et al.*, 2004). Von allen getesteten agonistischen Substanzen ist THIP der einzige partielle und mit einem EC₅₀-Wert von 2,52 µM der schwächste Agonist an RMRDL1. Auch am in *Xenopus laevis*-Oozyten exprimierten RDL-Rezeptor aus *D. melanogaster* wirkte THIP mit einem EC₅₀ von 226 µM als schwacher partieller Agonist (MCGONIGLE & LUMMIS, 2010). Das gleiche Profil der getesteten Agonisten wurde auch für Neuronen aus Schaben berichtet (SCHNEE *et al.*, 1997).

In dieser Studie wurden ebenfalls Bicucullin und 3-APS, auch als Homotaurin bekannt, untersucht. Beide Substanzen zeigten keine Wirksamkeit an RMRDL1. Ein ähnliches Ergebnis wurde für den RDL-Rezeptor aus *D. melanogaster* beschrieben (HOSIE *et al.*, 2001). Die Insensitivität des RDL-Rezeptors gegenüber diesen beiden Substanzen spiegelt gleichzeitig die Pharmakologie des nativen GABA_A-Rezeptors in Insekten wieder (SCHNEE *et al.*, 1997).

Der Einfluss antagonistischer Effekte wurde mit Hilfe GABA_A-Rezeptor-Blockern untersucht. Dafür wurde u.a. das Phenylpyrazol Fipronil ausgewählt. Dieser Wirkstoff war unter allen getesteten Antagonisten mit einem IC₅₀ von 24 nM der potenteste Blocker von RMRDL1, was im Bereich des RDL-Rezeptors aus *D. melanogaster* lag, für den ein IC₅₀ von 36 nM gemessen wurde (GASSEL *et al.*, 2014). Der in HEK-Zellen exprimierte RDL-Rezeptor aus *R. microplus* war mit einem IC₅₀ von 8,5 nM etwas sensitiver gegenüber Fipronil als RMRDL1, lag jedoch ebenfalls im nanomolaren Bereich.

Die ebenfalls untersuchten zyklischen Chlorkohlenwasserstoffe gehören zu den ältesten chemisch synthetisierten Insektiziden, deren Zielstruktur der GABA_A-Rezeptor ist. Einer ihrer Vertreter, das α -Endosulfan, war mit einem IC₅₀ von 36 nM ebenfalls ein potenter Blocker von RMRDL1. Der in *Drosophila* Mel-2-Zellen exprimierte RDL-Rezeptor aus dem Reisblattkäfer *Oulema oryzae* war hingegen mit einem IC₅₀ von 430 nM mehr als 10-fach weniger sensitiv für α -Endosulfan (NAKAO *et al.*, 2012). Vergleichsdaten für α -Endosulfan an den RDL-Rezeptoren aus *D. melanogaster* oder *R. microplus* sind nicht bekannt.

Der zweite zyklische Chlorkohlenwasserstoff Dieldrin inhibierte RMRDL1 mit einem IC₅₀ von 51,9 nM ebenfalls im zweistellig nanomolaren Bereich. Der von GASSEL *et al.* (2014) exprimierte RDL-Rezeptor aus *R. microplus* war mit einem IC₅₀ von <9 nM, ähnlich wie für Fipronil, deutlich sensitiver gegenüber Dieldrin als RMRDL1, ebenso verhielt sich der in *Drosophila* Mel-2-Zellen exprimierte RDL-Rezeptor aus dem Reisblattkäfer *Oulema oryzae*, bei dem der IC₅₀ bei 1,55 μ M lag (NAKAO *et al.*, 2012). Im Vergleich dazu wurde für den in HEK293-Zellen exprimierten, wildtypischen RDL-Rezeptor aus *D. melanogaster* mit Hilfe des Membranpotential-Assays ein IC₅₀ von 3,3 μ M ermittelt (GASSEL *et al.*, 2014).

Der parasitizide zyklische Chlorkohlenwasserstoff Toxaphen hingegen war mit einem IC₅₀ von 2,2 μ M lediglich im einstellig mikromolaren Bereich wirksam und somit von

allen getesteten Antagonisten, der mit der geringsten Potenz an RMRDL1. Es gibt keine vergleichbaren Daten aus Inhibitionsstudien mit rekombinant exprimierten RDL-Rezeptoren aus anderen Organismen. Aus Bindungsstudien an isolierten Membranen aus Stubenfliegen-Köpfen konnte allerdings gezeigt werden, dass Toxaphen mit einem IC_{50} von 87 nM [3H]EBOB (4'-Ethyanyl-4-*n*-[2,3- 3H_2]propylbicycloorthobenzoate) sehr effektiv verdrängt (COLE & CASIDA, 1992). [3H]EBOB ist ein Radioligand, der die Bindestelle der nicht-kompetitiven GABA_A-Rezeptor-Blocker adressiert. Demnach besitzt Toxaphen die gleiche Bindestelle wie alle anderen RDL-Rezeptor-Blocker (COLE & CASIDA, 1992).

Um den Einfluss einer weiteren chemischen Klasse auf den RMRDL1-Rezeptor zu untersuchen wurde das makrozyklische Lakton Ivermectin gewählt. Die Wirksamkeit von Ivermectin an GABA_A-Rezeptoren war lange bekannt (WRIGHT, 1986) und immunologische Studien ließen vermuten, dass Glutamat- und RDL-Untereinheiten in Insekten Ivermectin-sensitive Heteropentamere bilden (LUDMERER *et al.*, 2002). Jedoch zeigte die als Agonist des Glutamat-gesteuerten Chlorid-Kanals in Arthropoden und Nematoden bekannte Verbindung mit einem IC_{50} von 0,27 μ M im Membranpotential-Assay antagonistische Wirkung an RMRDL1. Dies wurde kürzlich auch erstmals für verschiedene Spleiß-Varianten des in *Xenopus laevis*-Oozyten exprimierten RDL-Rezeptors aus *D. melanogaster* berichtet, deren IC_{50} -Werte für Ivermectin mit 0,47 μ M und 0,52 μ M liegen im Bereich von RMRDL1 liegen (LEES *et al.*, 2014).

V Zusammenfassung

GABA-Rezeptoren spielen eine wichtige Rolle in der synaptischen Transmission im Zentralnervensystem von Vertebraten und Invertebraten. Sie sind die primäre Zielstruktur für Marktprodukte verschiedener Arthropodizidklassen wie zyklische chlorierte Kohlenwasserstoffe, Phenylpyrazole oder Isoxazoline, die ihren Einsatz im Pflanzenschutz, als Veterinärektoparasitizide, sowie in der Humanmedizin finden. Sie stellen somit z.B. auch eine validierte molekulare Zielstruktur dar, die von Interesse für die Entwicklung weiterer, neuer Akarizide ist.

Im Zuge der vorliegenden Studie wurde ein tieferes molekulares Verständnis des Zecken-GABA-Rezeptors erlangt. Zum einen wurden zunächst GABA-Rezeptor-kodierende Sequenzen aus den drei wichtigen Zeckenspezies *Ixodes ricinus*, *Rhipicephalus sanguineus* und *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* isoliert und auf bekannte, einflussreiche Mutationen und Motive hin untersucht. Dabei wurden bisher unbekannte Spleiß-Varianten in der intrazellulären Domäne entdeckt. Zudem wurde erstmals ein Serin an Stelle des Arginins an Position 2' der zweiten Transmembrandomäne der Rdl-Untereinheit in *Ixodes ricinus* nachgewiesen und damit die Rdl-Mutation identifiziert.

Zum anderen wurde mit der anschließenden heterologen Expression der identifizierten Untereinheiten in *Xenopus laevis*-Oozyten die elektrophysiologische Funktionalität von vier der sechs identifizierten Untereinheiten gezeigt. Zwei Untereinheiten aus *R. microplus* und *I. ricinus* mit den höchsten Expressionsraten wurden schließlich elektrophysiologisch mit bekannten GABA_A-Rezeptor-Agonisten und -Antagonisten charakterisiert.

Schließlich wurde ein alternatives Testsystem entwickelt mit der Zielsetzung der Verwendung im Hochdurchsatz-Screening. Hierzu wurden CHO-Zellen mit dem RDL-Rezeptor aus *R. microplus* transfiziert und erstmals eine stabile, klonale CHO-Zelllinie selektiert. Mit Hilfe dieser Zelllinie wurde ein fluorimetrischer GABA-Rezeptor-Assay entwickelt, der dem angestrebten höheren Durchsatz dient und mit Hilfe von bekannten Agonisten und Antagonisten validiert wurde. Ihre Pharmakologie deutet darauf hin, dass die Generation eines HTS-fähigen GABA-Rezeptor-Screening-Systems zur Entdeckung neuer Akarizide erfolgreich war.

VI Abstract

GABA-gated chloride channels play an important role in synaptic transmission in the central nervous system of vertebrates and invertebrates. They are the primary targets of historic and current market products with different chemical classes of arthropodicides comprising pesticides and veterinary and human parasiticides, like organochlorines, phenylpyrazoles or isoxazolines. Therefore, they represent a validated molecular target, still of interest for the development of new acaricides.

The goal of the present study was to gain a deeper molecular understanding of the tick GABA receptor. For that purpose, GABA receptor gene coding sequences from three important tick species, *Ixodes ricinus*, *Rhipicephalus sanguineus* und *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* were isolated and analyzed for known mutations and motifs. Previously unknown splice variants in the intracellular domain were identified and for the first time the *rdl* mutation, with a serine at position 2' of transmembrane domain two of the RDL subunit causing resistance to dieldrin, was found in *Ixodes ricinus*.

Heterologous expression of these newly identified subunits in *Xenopus laevis* oocytes led to the demonstration of ion channel functionality of four of the six identified subunits. Finally two subunits from *R. microplus* and *I. ricinus* with the highest expression rates were electrophysiologically characterized with known GABA_A receptor agonists and antagonists.

To allow for high throughput screening (HTS) an additional GABA-gated chloride channel test system was developed. Therefore CHO cells were transfected with the *rdl* subunit from *R. microplus* and a stable, clonal cell line was selected. With this cell line a fluorimetric GABA receptor assay, with adaptation potential for the higher throughput needed in a drug discovery project, was developed. The assay was validated by known agonists and antagonists. Their pharmacology suggests that the task of generating an HTS-compatible GABA receptor screening system for the discovery of new acaricides was successful.

VII Literaturverzeichnis

Aaronstein K. and ffrench-Constant R.H., 1995. Immunocytochemistry of a Novel GABA Receptor Subunit Rdl in *Drosophila melanogaster*. *Invertebrate Neuroscience* 1: 25-31.

Aaronstein K., Auld V. and ffrench-Constant R., 1996. Distribution of Two GABA Receptor-like Subunits in the *Drosophila* CNS. *Invertebrate Neuroscience* 2(2): 115-120.

Akabas M.H., 2004. GABA_A Receptor Structure–Function Studies: A Reexamination in Light of New Acetylcholine Receptor Structures. *International Review of Neurobiology* 62: 1-43.

Anderson J.F. and Magnarelli L.A., 2008. Biology of Ticks. *Infectious Disease Clinics of North America* 22(2): 195-215.

Anthony N., Unruh T., Ganser D. and ffrench-Constant R., 1998. Duplication of the *Rdl* GABA Receptor Subunit Gene in an Insecticide-resistant Aphid, *Myzus persicae*. *Molecular & General Genetics* 260(2-3): 165-175.

Apanaskevich D.A. and Oliver, Jr. J.H., 2014. Life Cycles and Natural History of Ticks. In: Sonenshine D.E. and Roe R.M, Hrsg. *Biology of Ticks*, Volume 1. Second Edition. *Oxford University Press*, New York.

Asch E.S., Bujak D.I., Weiss M., Peterson M.G., Weinstein A., 1994. Lyme disease - An Infectious and Postinfectious Syndrome. *Journal of Rheumatology* 21(3): 454-461.

Ausubel F.M., Brent R., Kingston R.E., 1997. *Current Protocols in Molecular Biology*, Wiley, New York.

Barker S.C. and Murrell A., 2004. Systematics and Evolution of Ticks with a List of Valid Genus and Species Names. *Parasitology* 129: 15-36.

- Bar-Lev D.D., Degani-Katzav N., Perelman A. and Paas Y., 2011.** Molecular Dissection of Cl⁻-selective Cys-loop Receptor Points to Components that are Dispensable or Essential for Channel Activity. *The Journal of Biological Chemistry* 286(51): 43830-43841.
- Barnard E.A., Skolnick P., Olsen R.W., Mohler H., Sieghart W., Biggio G., Braestrup C., Bateson A.N. and Langer S.Z., 1998.** International Union of Pharmacology. XV. Subtypes of γ -Aminobutyric Acid_A Receptors: Classification on the Basis of Subunit Structure and Receptor Function. *Pharmacological Reviews* 50(2): 291-313.
- Bertani G., 1951.** Studies on Lysogenesis I. The Mode of Phage Liberation By Lysogenic *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology* 62(3): 293-300.
- Bettler B., Kaupmann K., Mosbacher J. and Gassmann M., 2004.** Molecular Structure and Physiological Functions of GABA(B) Receptors. *Physiological Reviews* 84(3): 835-867.
- Birnboim H.C. and Doly J., 1979.** A Rapid Alkaline Extraction Procedure for Screening Recombinant Plasmid DNA. *Nucleic Acids Research* 7(6): 1513-1523.
- Birnboim H.C., 1983.** A Rapid Alkaline Extraction Method for the Isolation of Plasmid DNA. *Methods in Enzymology* 100: 243-255.
- Black W.C. IV and Piesman J., 1994.** Phylogeny of Hard- and Soft-Tick Taxa (Acari: Ixodida) Based on Mitochondrial 16S rDNA Sequences. *Proceedings of the National Academy of Science of the USA* 91: 10034-10038.
- Blom N., Gammeltoft S. and Brunak S., 1999.** Sequence- and Structure-Based Prediction of Eukaryotic Protein Phosphorylation Sites. *Journal of Molecular Biology* 294(5): 1351-1362.
- Bock R., Jackson L., de Vos A. and Jorgensen W., 2004.** Babesiosis of Cattle. *Parasitology* 129: 247-269.

Boom R., Sol C.J.A., Salimans M.M.M., Jansen C.L., Wertheim-van-Dillen P.M.E., Van der Noordaa J., 1990. Rapid, simple method for purification of nucleic acids. *Journal of Clinical Microbiology* 28: 495-503.

Bowery N.G., Bettler B., Froestl W., Gallagher J.P., Marshall F., Raiteri M., Bonner T.I. and Enna S.J., 2002. International Union of Pharmacology. XXXIII. Mammalian Gamma-Aminobutyric Acid(B) Receptors: Structure and Function. *Pharmacological Reviews* 54(2): 247-264.

Brejč K., van Dijk W.J., Klaassen R.V., Schuurmans M., van Der Oost J., Smit A.B. and Sixma T.K., 2001. Crystal Structure of an ACh-binding Protein Reveals the Ligand-binding Domain of nicotinic receptors. *Nature* 411(6835): 269-276.

Brossard M., 1998. The Use of Vaccines and Genetically Resistant Animals in Tick Control. *Revue scientifique et technique (International Office of Epizootics)* 17(1): 188-199.

Buckingham S.D., Biggin P.C., Sattelle B.M., Brown L.A. and Sattelle D.B., 2005. Insect GABA Receptors: Splicing, Editing, and Targeting by Antiparasitics and Insecticides. *Molecular Pharmacology* 68(4): 942-951.

Canales M., Almazán C., Naranjo V., Jongejan F. and de la Fuente J., 2009. Vaccination with Recombinant *Boophilus annulatus* Bm86 Ortholog Protein, Ba86, Protects Cattle Against *B. annulatus* and *B. microplus* Infestations. *BMC biotechnology* 9: 29.

Carvalho S.M., Belzunces L.P., Carvalho G.A., Brunet J.-L. and Badiou-Beneteau A., 2013. Enzymatic Biomarkers as Tools to Assess Environmental Quality: A Case Study of Exposure of the Honeybee *Apis mellifera* to Insecticides. *Environmental Toxicology and Chemistry* 32(9): 2117-2124.

Castro E., Oset-Gasque M.J., González M.P., 1989. GABA_A and GABA_B Receptors are Functionally Active in the Regulation of Catecholamine Secretion by Bovine Chromaffin Cells. *Journal of Neuroscience Research* 23(3): 290-296.

Charon S., Taly A., Rodrigo J., Perret P. and Goeldner M., 2011. Binding Modes of Noncompetitive GABA-Channel Blockers Revisited Using Engineered Affinity-Labeling Reactions Combined with New Docking Studies. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 59(7): 2803-2807.

Cheng J., Ju X.-L., Chen X.-Y., Liu G.-Y., 2009. Homology Modeling of Human $\alpha 1\beta 2\gamma 2$ and House Fly $\beta 3$ GABA Receptor Channels and Surfex-Docking of Fipronil. *Journal of Molecular Modeling* 15: 1145-1153.

Cole L.M., Nicholson R.A. and Casida J.E., 1992. GABA-Gated Chloride Channel: Binding Site for 4'-Ethynyl-4-*n*-[2,3-³H₂]propylbicycloorthobenzoate ([³H]EBOB) in Vertebrate Brain and Insect Head. *Pesticide Biochemistry and Physiology* 4: 1-8.

Cole L.M., Nicholson R.A. and Casida J.E., 1993. Action of phenylpyrazole insecticides at the GABA-gated chloride channel. *Pesticide Biochemistry and Physiology* 46(1): 47-54.

Collingridge G.L., Olsen R.W., Peters J., and Spedding M., 2009. A nomenclature for ligand-gated ion channels. *Neuropharmacology* 56(1): 2-5.

Costa L.G., 2006. Current issues in organophosphate toxicology. *Clinica Chimica Acta* 366(1-2): 1-13.

Dantas-Torres F., 2008. The brown dog tick, *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806) (Acari: Ixodidae): From taxonomy to control. *Veterinary Parasitology* 152: 173-185.

Dantas-Torres F., 2010. Biology and ecology of the brown dog tick *Rhipicephalus sanguineus*. *Parasites & Vectors* 3: 26.

Dantas-Torres F. and Otrando D., 2011. *Rhipicephalus sanguineus* on dogs: relationships between attachment sites and tick developmental stages. *Experimental and Applied Acarology* 53(4): 389-397.

- Dantas-Torres F., Capelli G., Giannelli A., Ramos R.A., Lia R.P., Cantacessi C., de Caprariis D., De Tommasi A.S., Latrofa M.S., Lacasella V., Tarallo V.D., Di Paola G., Quorollo B., Breitschwerdt E., Stanneck D., Otranto D., 2013.** Efficacy of an imidacloprid/flumethrin collar against fleas, ticks and tick-borne pathogens in dogs. *Parasites & Vectors* 6(1): 245.
- Davies P.A., Hoffmann E.B., Carlisle H.J., Tyndale R.F. and Hales T.G., 2000.** The influence of an endogenous beta3 subunit on recombinant GABA(A) receptor assembly and pharmacology in WSS-1 cells and transiently transfected HEK293 cells. *Neuropharmacology* 39(4): 611-620.
- Davies T.G.E., Field L.M., Usherwood P.N.R. and Williamson M.S., 2007.** DDT, Pyrethrins, Pyrethroids and Insect Sodium Channels. *IUBMB Life* 59(3): 151-162.
- De Castro J.J., 1997.** Sustainable tick and tickborne disease control in livestock improvement in developing countries. *Veterinary Parasitology* 71(2-3): 77-97.
- De La Fuente J. and Kocan K.M., 2006.** Strategies for development of vaccines for control of ixodid tick species. *Parasite Immunology* 28(7): 275-283.
- Dekant W. und Varnvakas S., 2009.** Pestizide. In: Aktories K., Förstermann U., Hofmann F.B. und Starke K., Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie. *Elsevier GmbH*, München.
- Dionisio L., De Rosa M.J., Bouzat C., del Carmen Esani M., 2011.** An intrinsic GABAergic system in human lymphocytes. *Neuropharmacology* 60(2-3): 513-519.
- Dobler G. und Wölfel R., 2009.** Fleckfieber und andere Rickettsiosen. *Deutsches Ärzteblatt* 106(20): 348-354.
- Dong K., 2007.** Insect sodium channels and insecticide resistance. *Invertebrate Neurosciences* 7(1): 17-30.
- Drummond A.J., Ashton B., Buxton S., Cheung M., Cooper A., Heled J., Kearse M., Moir R., Stones-Havas S., Sturrock S., Thierer T., Wilson A., 2010.** Geneious v5.4, Available from <http://www.geneious.com>.

Dumpis U., Crook D. and Oksi J., 1999. Tick-Borne Encephalitis. *Clinical Infectious Diseases* 28: 882-890.

Dupuis J.P., Bazelot M., Barbara G.S., Paute S., Gauthier M. and Raymond-Delpech V., 2010. Homomeric RDL and heteromeric RDL/LCCH3 GABA receptors in the honeybee antennal lobes: two candidates for inhibitory transmission in olfactory processing. *Journal of Neurophysiology* 103(1): 458-468.

Durham W.F., 1987. Toxicology of Insecticides, Rodenticides, Herbicides, and Fungicides. In: Haley, T.J. and Berndt W.O., Handbook of toxicology. *Hemisphere Publishing Corporation, USA.*

Ecobichon D.J., 1991. Toxic effects of pesticides. In: Casarett L.J., Doull J., Amdur M.O. and Klaassen C.D., Casarett and Doull's Toxicology: The Basic Science of Poisons. *Pergamon Press, USA.*

Eguchi Y., Ihara M., Ochi E., Shibata Y., Matsuda K., Fushiki S., Sugama H., Hamasaki Y., Niwa H., Wada M., Ozoe F. and Ozoe Y., 2006. Functional characterization of *Musca* glutamate- and GABA-gated chloride channels expressed independently and coexpressed in *Xenopus* oocytes. *Insect Molecular Biology* 15(6): 773-783.

Eldefrawi M.E.S., Sherby S.M., Abalis I.M. and Eldefrawi A.T., 1985. Interactions of pyrethroid and cyclodiene insecticides with nicotinic acetylcholine and GABA receptors. *Neurotoxicology* 6(2): 47-62.

Elliott M., Farnham A.W., Janes N.F., Needham P.H., Pullman D.A. and Stevenson J.H., 1973. A photostable pyrethroid. *Nature* 246: 169-170.

Erdmanis L., O'Reilly A.O., Williamson M.S., Field L.M., Turberg A., Wallace B.A., 2012. Association of neonicotinoid insensitivity with a conserved residue in the loop D binding region of the tick nicotinic acetylcholine receptor. *Biochemistry* 51(23): 4627-4629.

Ervin R.T., Epplin F.M., Byford R.L. and Hair J.A., 1987. Estimation and Economic Implications of Lone Star Tick (Acari: Ixodidae) Infestation on Weight Gain of Cattle, *Bos taurus* and *Bos taurus* × *Bos indicus*. *Journal of Economic Entomology* 80(2): 443-445.

Estrada-Peña A., Bouattour A., Camicas J.-L., Guglielmone A., Horak I., Jongejan F, Latif A., Pegram R. and Walker A.R., 2006. The known distribution and ecological preferences of the tick subgenus *Boophilus* (Acari: Ixodidae) in Africa and Latin America. *Experimental and Applied Acarology* 38(2-3): 219-235.

French-Constant R.H., Mortlock D.P., Shaffer C.D., MacIntyre R.J. and Roush R.T., 1991. Molecular cloning and transformation of cyclodiene resistance in *Drosophila*: an invertebrate GABA_A receptor locus. *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America* 88(16): 7209-7213.

French-Constant R.H., Steichen J.C., Rocheleau T.A., Aronstein K. and Roush R.T., 1993. A single-amino acid substitution in a gamma-aminobutyric acid subtype A receptor locus is associated with cyclodiene insecticide resistance in *Drosophila* populations. *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America* 90(5): 1957-1961.

Fischer U. und Siegmund B., 2007. Borreliose: Zeckeninfektion mit Tarnkappe. *Hirzel Verlag*, Stuttgart.

Freeman J.M., Davey R.B., Kappmeyer L.S., Kammlah D.M. and Olafson P.U., 2010. Bm86 midgut protein sequence variation in South Texas cattle fever ticks. *Parasites & Vectors* 3: 101.

Galai Y., Canales M., Ben Saïd M., Gharbi M., Mhadhbi M., Jedidi M., de La Fuente J. and Darghouth, M.-A., 2012. Efficacy of *Hyalomma scupense* (Hd86) antigen against *Hyalomma excavatum* and *H. scupense* tick infestations in cattle. *Vaccine* 30(49): 7084-7089.

Gamper N., Fillon S., Feng Y., Friedrich B., Lang P.A., Henke G., Huber S.M., Kobayashi T., Cohen P. and Lang F., 2002. K⁺ channel activation by all three isoforms of serum- and glucocorticoid-dependent protein kinase SGK. *Pflugers Archiv: European Journal of Physiology* 445(1): 60-66.

Gamper N., Stockand J.D. and Shapiro M.S., 2005. The use of Chinese hamster ovary (CHO) cells in the study of ion channels. *Journal of Pharmacological and Toxicological Methods* 51(3): 177-185.

Gant D.B., Chalmers A.E., Wolff M.A., Hoffman H.B. and Bushey D.F., 1998. Fipronil: action at the GABA receptor. *Reviews in Toxicology* 2: 147-156.

García-Reynaga P., Zhao C., Sarpong R. and Casida J.E., 2013. New GABA/Glutamate Receptor Target for [³H]Isoxazoline Insecticide. *Chemical Research in Toxicology* 26 (4): 514-516.

Gassel M., Wolf C., Noack S., Williams H. and Ilg T., 2014. The novel isoxazoline ectoparasiticide fluralaner: Selective inhibition of arthropod γ -aminobutyric acid- and L-glutamate-gated chloride channels and insecticidal/ acaricidal activity. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 45: 111-124.

Geary T.G. and Moreno Y., 2012. Macrocyclic lactone anthelmintics: spectrum of activity and mechanism of action. *Current Pharmaceutical Biotechnology* 13(6): 866-872.

George J.E., 2000. Present and Future Technologies for Tick Control. *Annals of the New York Academy of Science* 916: 583-588.

George J.E., Pound J.M. and Davey R.B., 2004. Chemical control of ticks on cattle and the resistance of these parasites to acaricides. *Parasitology* 129: 353-366.

Ghiasuddin, S.M., Matsumura, F., 1982. Inhibition of gamma-aminobutyric acid (GABA)-induced chloride uptake by gamma-BHC and heptachlor epoxide. *Comparative Biochemistry and Physiology* 73C(1): 141-144.

Giribet G. and Edgecombe G.D., 2013. The Arthropoda: A Phylogenetic Framework. In: Minelli A., Boxshall G. and Fusco G., *Arthropod Biology and Evolution*, Springer-Verlag Berlin Heidelberg.

Gisselmann G., Plonka J., Pusch H. and Hatt H., 2004. *Drosophila melanogaster* GRD and LCCH3 subunits form heteromultimeric GABA-gated cation channels. *British Journal of Pharmacology* 142(3): 409-413.

Goldin A.L., 2006. Expression of Ion Channels in *Xenopus* Oocytes. In: Clare J.J. and Trezise D.J., *Expression and Analysis of Recombinant Ion Channels: From Structural Studies to Pharmacological Screening*, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim.

Graefe K.-H., Lutz W. und Bönisch H., 2011. Duale Reihe Pharmakologie und Toxikologie *Thieme Verlag KG*, Stuttgart.

Graf J.F., Gogolewski R., Leach-Bing N., Sabatini G.A., Molento M.B., Bordin E.L. and Arantes G.J., 2004. Tick control: an industry point of view. *Parasitology* 129: 427-442.

Gray J.S., Dautel H., Estrada-Peña A., Kahl O. and Lindgren E., 2009. Effects of climate change on ticks and tick-borne diseases in Europe. *Interdisciplinary Perspectives on Infectious Diseases* 2009 (Article ID 593232) 1-12.

Guerrero F.D., Lovis L. and Martins J.R., 2012. Acaricide resistance mechanisms in *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. *Revista brasileira de parasitologia veterinária* 21(1): 1-6.

Hanson S.M. and Czajkowski C., 2008. Structural mechanisms underlying benzodiazepine modulation of the GABA_A receptor. *Journal of Neuroscience* 28(13): 3490-3499.

He H., Chen A.C., Davey R.B., Ivie G.W., and George J.E., 1999. Identification of a point mutation in the para-type sodium channel gene from a pyrethroid-resistant cattle tick. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 261(3): 558-561.

- Hedblom E. and Kirkness E.F., 1997.** A Novel Class of GABA_A Receptor Subunit in Tissues of the Reproductive System. *Journal of Biological Chemistry* 272(24): 15346-15350.
- Henderson J.E., Soderlund D.C. and Knipple D.M., 1993.** Characterization of putative γ -aminobutyric acid (GABA) receptor β subunit gene from *Drosophila melanogaster*. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 193(2): 474-482.
- Hilf R.J.C. and Dutzler R., 2008.** X-ray structure of a prokaryotic pentameric ligand-gated ion channel. *Nature* 452(7185): 375-379.
- Hiragaki S., Kobayashi T., Ochiai N., Toshima K., Dekeyser M.A., Matsuda K. and Takeda M., 2012.** A novel action of highly specific acaricide; bifenazate as a synergist for a GABA-gated chloride channel of *Tetranychus urticae* [Acari: Tetranychidae]. *Neurotoxicology* 33(3): 307-313.
- Hoogstraal, H. & Aeschlimann, A., 1982.** Tick–Host Specificity. *Bulletin de la Société Entomologique Suisse* 55: 5-32.
- Hoopengardner B., Bhalla T., Staber C. and Reenan R., 2003.** Nervous System Targets of RNA Editing Identified by Comparative Genomics. *Science* 301(5634): 832-836.
- Hope M., Menzies M. and Kemp D., 2010.** Identification of a dieldrin resistance-associated mutation in *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Acari: Ixodidae). *Journal of Economic Entomology* 103(4): 1355-1359.
- Hosie A.M., Baylis H.A., Buckingham S.D. and Sattelle D.B., 1995.** Actions of the insecticide fipronil, on dieldrin-sensitive and -resistant GABA receptors of *Drosophila melanogaster*. *British Journal of Pharmacology* 115: 909-912.
- Hosie A.H., Aronstein K., Sattelle D.B. and ffrench-Constant R.H., 1997.** Molecular biology of insect neuronal GABA receptors. *Trends in Neuroscience* 20(12): 578-583.

- Hosie A.M., Buckingham S.D., Presnail J.K. and Sattelle D.B., 2001.** Alternative Splicing of a *Drosophila* GABA Receptor Subunit Gene Identifies Determinants of Agonist Potency. *Neuroscience* 102(3): 709-714.
- Hugnet C., Buronrosse F., Pineau X., Cadoré J.L., Lorgue G. and Berny P.J., 1996.** Toxicity and kinetics of amitraz in dogs. *American Journal of Veterinary Research* 57(10): 1506-1510.
- Jensen M.L., Shousboe A. and Ahring P.K., 2005.** Charge selectivity of the Cys-loop family of ligand-gated ion channels. *Journal of Neurochemistry* 92(2): 217-225.
- Jin N., Kolliputi N., Gou D., Weng T. and Liu L., 2006.** A novel function of ionotropic gamma-aminobutyric acid receptors involving alveolar fluid homeostasis. *Journal of Biological Chemistry* 281(47): 36012-36020.
- Joannou M., 2010.** Untersuchungen zu Resistenzmechanismen bei Flöhen. *Diplomarbeit*.
- Johnson R.M., Ellis M.D., Mullin C.A. and Frazier M., 2010.** Pesticides and honey bee toxicity - USA. *Apidologie* 41 (3): 312-331.
- Jones A.K., Buckingham S.D., Papadaki M., Yokota M., Sattelle B.M., Matsuda K. and Sattelle D.B., 2009.** Splice-variant- and stage-specific RNA editing of the *Drosophila* GABA receptor modulates agonist potency. *The Journal of Neuroscience* 29(13): 4287-4292.
- Jones A.K., and Sattelle D.B., 2006.** The cys-loop ligand-gated ion channel superfamily of the honeybee, *Apis mellifera*. *Invertebrate Neuroscience* 6(3): 123-132.
- Jones A.K. and Sattelle D.B., 2007.** The cys-loop ligand-gated ion channel gene superfamily of the red flour beetle, *Tribolium castaneum*. *BMC Genomics* 8: 327.
- Jongejan F. and Uilenberg G., 2004.** The global importance of ticks. *Parasitology* 129: 3-14.

- Kemp D.H., Pearson R.D., Gough J.M. and Willadsen P., 1989.** Vaccination against *Boophilus microplus*: localization of antigens on tick gut cells and their interaction with the host immune system. *Experimental & Applied Acarology* 7(1): 43-58.
- Keramidas A. and Lynch J.W., 2013.** An outline of desensitization in pentameric ligand-gated ion channel receptors. *Cellular and Molecular Life Sciences* 70(7): 1241-1253.
- Kerr D.I.B. and Ong J., 1992.** GABA Agonists and Antagonists. *Medicinal Research Reviews* 12(6): 593-636.
- Kibbe W.A., 2007.** OligoCalc: an online oligonucleotide properties calculator. *Nucleic Acids Research* 35 (webserver issue): W43-W46.
- Klafke G.M., Sabatini G.A., de Albuquerque T.A., Martins J.R., Kemp D.H., Miller R.J., Schumaker T.T., 2006.** Larval immersion tests with ivermectin in populations of the cattle tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Acari: Ixodidae) from State of Sao Paulo, Brazil. *Veterinary Parasitology* 142(3-4): 386-390.
- Knipple D.C. and Soderlund D.M., 2010.** The ligand-gated chloride channel gene family of *Drosophila melanogaster*. *Pesticide Biochemistry and Physiology* 97(2): 140-148.
- Krogh A., Larsson B., von Heijne G., and Sonnhammer E.L.L, 2001.** Predicting transmembrane protein topology with a hidden Markov model: Application to complete genomes. *Journal of Molecular Biology* 305(3): 567-580.
- Krogsgaard-Larsen P., Frølund B., Liljefors T. and Ebert B., 2004.** GABA(A) Agonists and Partial Agonists: THIP (Gaboxadol) as a Non-Opioid Analgesic and a Novel Type of Hypnotic. *Biochemical Pharmacology* 68(8): 1573-1580.
- Kunz S.E. and Kemp D.H., 1994.** Insecticides and acaricides: resistance and environmental impact. *Revue scientifique et technique* 13(4): 1249-1286.

Lahm G.P., Cordova D., Barry J.D., Pahutski T.F., Smith B.K., Long J.K., Benner E.A., Holyoke C.W., Joraski K., Xu M., Schroeder M.E., Wagerle T., Mahaffey M.J., Smith R.M. and Tong M.H., 2013. 4-Azolyphenyl isoxazoline insecticides acting at the GABA gated chloride channel. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* 23(10): 3001-3006.

Lambert J.J., Belelli D., Peden D.R., Vardy A.W. and Peters J.A., 2003. Neurosteroid modulation of GABA_A receptors. *Progress in Neurobiology* 71(1): 67-80.

Lees K., Musgaard M., Suwanmanee, Buckingham S.D., Biggin P. and Sattelle D., 2014. Actions of Agonists, Fipronil and Ivermectin on the Predominant *In Vivo* Splice and Edit Variant (RDL_{bd}, I/V) of the *Drosophila* GABA Receptor Expressed in *Xenopus laevis* Oocytes. *PLoS ONE* 9(5): e97468.

Leff S.E., Rosenfeld M.G. and Evans R.M., 1986. Complex Transcriptional Units: Diversity in Gene Expression by Alternative RNA Processing. *Annual Review of Biochemistry* 55:1091-1117.

Legg J., 1947. Recent developments in tick and buffalo-fly control. *Australian Veterinary Journal* 23(7): 181-185.

Le Goff G., Hamon A., Bergé J.B. and Amichot M., 2005. Resistance to fipronil in *Drosophila simulans*: influence of two point mutations in the RDL GABA receptor subunit. *Journal of Neurochemistry* 92(6): 1295-1305.

Lew A. and Jorgensen W., 2005. Molecular approaches to detect and study the organisms causing bovine tick borne diseases: babesiosis and anaplasmosis. *African Journal of Biotechnology* 4(4): 292-302.

Liu Y., Chen L.; Chen Z.; Bigelow Dyk M.; Vega H.; Krieger R., 2011. Cotton socks monitor the indoor distribution, fate, and persistence of fipronil following Frontline application to companion animals. *Abstracts of Papers, 242nd ACS National Meeting & Exposition, Denver, CO, United States, August 28-September 1, 2011.*

Löscher W. and Rogawski M.A., 2012. How theories evolved concerning the mechanism of action of barbiturates. *Epilepsia* 53(8): 12-25.

Ludmerer S.W., Warren V.A., Williams B.S., Zheng Y., Hunt D.C., Ayer M.B., Wallace M.A., Chaudhary A.G., Egan M.A., Meinke P.T., Dean D.C., Garcia M.L., Cully D.F. and Smith M.M., 2002. Ivermectin and nodulisporic acid receptors in *Drosophila melanogaster* contain both gamma-aminobutyric acid-gated *Rdl* and glutamate-gated GluCl alpha chloride channel subunits. *Biochemistry*. 41(20): 6548-6560.

Lummis, S.C.R., 1990. GABA receptors in insects. *Comparative Biochemistry and Physiology C, Comparative Pharmacology* 95(1): 1-8.

Lundkvist Å, Wallensten A., Vene S. and Hjertqvist M., 2011. Tickborne encephalitis increasing in Sweden, 2011. *Eurosurveillance* 16(39): pii=19981.

Macdonald R.L. and Olsen R.W., 1994. GABA_A Receptor Channels. *Annual Review of Neuroscience* 17: 569-602.

Malawista S.E., Allen M.D., Steere A.C. and Hardin J.A., 1984. Lyme Disease: A Unique Human Model for an Infectious Etiology of Rheumatic Disease. *The Yale Journal of Biology and Medicine* 57(4): 473-477.

Marsella R., 1999. Advances in flea control. *Veterinary Clinics of North America – Journal of Small Animal Practice* 29(6): 1407-1424.

Massover W.H., 1973. Complex surface invaginations in frog oocytes. *The Journal of Cell Biology* 58(2): 485-491.

Matthewson M.D. and Baker J.A.F., 1975. Arsenic resistance in species of multi-host ticks in the Republic of South Africa and Swaziland. *Journal of the South African Veterinary Association* 46(4): 341-344.

McGonigle I. and Lummis S.C.R., 2009. RDL Receptors. *Biochemical Society Transactions* 37(6): 1404-1406.

- McGonigle I. and Lummis S.C.R., 2010.** Molecular characterization of agonists that bind to an insect GABA receptor. *Biochemistry* 49(13): 2897-2902.
- Mehlhorn H., 2007.** Encyclopedia of Parasitology, 3rd Edition. *Springer-Verlag*, Berlin Heidelberg New York.
- Menzer R.E., 1991.** Water and soil pollutants. In: Amdur M.O., Doull J. and Klaassen C.D., Casarett and Doull's Toxicology – The Basic Science of Poisons. *Pergamon Press*, USA.
- Milligan C.J., Buckley N.J., Garret M., Deuchars J., Deuchars S.A., 2004.** Evidence for inhibition mediated by coassembly of GABA_A and GABA_C receptor subunits in native central neurons. *Journal of Neuroscience* 24(33): 7241-7250.
- Miyazawa A., Fujiyoshi Y. and Unwin N., 2003.** Structure and gating mechanism of the acetylcholine receptor pore. *Nature* 423(6943): 949-955.
- Mody I. and Pearce R.A., 2004.** Diversity of inhibitory neurotransmission through GABA_A receptors. *Trends in Neurosciences* 27(9): 569–575.
- Mokrab Y., Bavro V.N., Mizuguchi K., Todorov N.P., Martin I.L., Dunn S.M., Chan S.L. and Chau P.L., 2007.** Exploring ligand recognition and ion flow in comparative models of the human GABA type A receptor. *Journal of Molecular Graphics & Modelling* 26(4): 760-774.
- Morgan J.A.T., Corley S.W., Jackson L.A., Lew-Tabor A.E., Moolhuijzen P.M. and Jonsson N.N., 2009.** Identification of a mutation in the para-sodium channel gene of the cattle tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* associated with resistance to synthetic pyrethroid acaricides. *International Journal for Parasitology* 39(7): 775-779.
- Moss S.J. and Smart T.G., 2001.** Constructing inhibitory synapses. *Nature Reviews Neurosciences* 2(4): 240-250.
- Mukhebi A.W., Perry B.D. and Kruska R., 1992.** Estimated economics of theileriosis control in Africa. *Preventive Veterinary Medicine* 12(1-2): 73-85.

- Murrell A. and Barker S.C, 2003.** Synonymy of *Boophilus* Curtice, 1891 with *Rhipicephalus* Koch, 1844 (Acari: Ixodidae). *Systematic Parasitology* 56(3): 169-172.
- Nagaraj S.H., Gasser R.G. and Ranganathan S., 2006.** A hitchhiker's guide to expressed sequence tag (EST) analysis. *Briefings in Bioinformatics* 8(1): 6-21.
- Nakao T., Hama M, Kawahara N. and Hirase K., 2012.** Fipronil resistance in *Sogatella furcifera*: Molecular cloning and functional expression of wild-type and mutant RDL GABA receptor subunits. *Journal of Pesticide Science* 37(1): 37-44.
- Nakao T., Banba S., Nomura M., Hirase K., 2013.** Meta-diamide insecticides acting on distinct sites of RDL GABA receptor from those for conventional noncompetitive antagonists. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 43(4): 366-375.
- Nakao T. and Hirase K., 2013.** A comparison of the modes of action of novel meta-diamide insecticides and conventional noncompetitive antagonists on the *Spodoptera litura* RDL GABA receptor. *Journal of Pesticide Science* 38(3): 123-128.
- Narahashi M., 1971.** Mode of Action of Pyrethroids. *Bulletin of the World Health Organization* 44: 337-345.
- Narahashi T., Zhao X., Ikeda T., Nagata K., and Yeh J.Z., 2007.** Differential actions of insecticides on target sites: basis for selective toxicity. *Human & Experimental Toxicology* 26(4): 361-366.
- Narahashi T., Zhao X., Ikeda T., Salgado V.L., and Yeh J.Z., 2010.** Glutamate-activated chloride channels: Unique fipronil targets present in insects but not in mammals. *Pesticide Biochemistry and Physiology* 97(2): 149-152.
- Nathwani D., Hamlet N. and Walker E., 1990.** Lyme disease: a review. *British Journal of General Practice* 40(331): 72-74.
- Nava S., Guglielmone A.A. and Mangold A.J., 2009.** An overview of systematics and evolution of ticks. *Frontiers in Bioscience* 14: 2857-2877.

- Oliver, Jr. J.H., 1989.** Biology and systematics of ticks (Acari: Ixodidae). *Annual Review of Ecology and Systematics* 20: 397-430.
- Olsen R.W. and Sieghart W., 2008.** International Union of Pharmacology. LXX. Subtypes of γ -Aminobutyric Acid(A) Receptors: Classification on the Basis of Subunit Composition, Pharmacology, and Function. Update. *Pharmacological Reviews* 60(3): 243-260.
- Osborne R.H., 1996.** Insect neurotransmission: transmitters and their receptors. *Pharmacology Therapy* 69(2): 117-142.
- Ozoe Y., Asahi M., Ozoe F., Nakahira K. and Mita T., 2010.** The antiparasitic isoxazoline A1443 is a potent blocker of insect ligand-gated chloride channels. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 391(1): 744-749.
- Ozoe Y., 2013.** γ -Aminobutyrate- and Glutamate-Gated Chloride Channels as Targets of Insecticides. In: Cohen E., Simpson S.J. and Casas J., Target Receptors in the Control of Insect Pests: Part I, *Elsevier*, UK.
- Parida S.K., Dash S., Patel S., Mishra B.K., 2006.** Adsorption of organic molecules on silica surface. *Advances of Colloid and Interface Science* 121: 77-110.
- Parola P. and Raoult D., 2001.** Ticks and Tickborne Bacterial Diseases in Humans: An Emerging Infectious Threat. *Clinical Infectious Diseases* 32(6): 897-928.
- Petersen T.N., Brunak S., von Heijne G. and Nielsen H., 2011.** SignalP 4.0: discriminating signal peptides from transmembrane regions. *Nature Methods* 8: 785-786.
- Prichard R., Ménez C. and Lespine A., 2012.** Moxidectin and the avermectins: Consanguinity but not identity. *International Journal for Parasitology: Drugs and Drug Resistance* 2: 134-153.
- Rauh J.J., Lummis S.C.R. and Satelle D.B., 1990.** Pharmacological and biochemical properties of insect GABA receptors. *Trends in Pharmacological Sciences* 11(8): 325-329.

Rauter C. and Hartung T., 2005. Prevalence of *Borrelia burgdorferi* Sensu Lato Genospecies in *Ixodes ricinus* Ticks in Europe: a Metaanalysis. *Applied and Environmental Microbiology* 71 (11): 7203-7216.

Richter S., Steinhäuser K.-G. und Fiedler H., 2001. Globaler Vertrag zur Regelung von POPs: Die Stockholm Konvention. *Umweltwissenschaften und Schadstoffforschung – Zeitschrift für Umweltchemie und Ökotoxikologie* 13(1): 39-44.

Riss J., Cloyd J., Gates J. and Collins S., 2008. Benzodiazepines in epilepsy: pharmacology and pharmacokinetics. *Acta Neurologica Scandinavica* 118(2): 69-86.

Robert-Koch-Institut, 2013. FSME: Risikogebiete in Deutschland. *Epidemiologisches Bulletin* 18/2013.

Rorsman P., Berggren P.-O., Bokvist K., Ericson H., Möhler H., Östenson C.-G. and Smith P.A. 1989. Glucose-inhibition of glucagon secretion involves activation of GABA_A-receptor chloride channels. *Nature* 341: 233-236.

Rudolph U. and Knoflach F., 2011. Beyond classical benzodiazepines: novel therapeutic potential of GABA_A receptor subtypes. *Nature Reviews. Drug Discovery* 10(9): 685-697.

Sambrook J. and Russell D., 2001. Molecular Cloning: A Laboratory Manual (3rd ed.). *Cold Spring Harbor Laboratory Press*, New York.

Samish M., Ginsberg H. and Glazer I., 2004. Biological control of ticks. *Parasitology* 129: 389-403.

Schmidt, M., 2008. GABA_C receptors in retina and brain. *Results and Problems in Cell Differentiation* 44: 49-67. In: Darlison M.G.: Inhibitory Regulation of Excitatory Neurotransmission, *Springer-Verlag*, Berlin Heidelberg.

Schnatterer, S., 2012. Phenylpyrazole-Containing Fiprole Insecticides. In: Lamberth C. and Dinges J., Bioactive Heterocyclic Compound Classes: Agrochemicals, *Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA*, Weinheim, Germany, 239-250.

Schnee M., Rauh J., Buckingham S.D. and Sattelle D.B., 1997. Pharmacology of skeletal muscle GABA-gated chloride channels in the cockroach *Periplaneta Americana*. *The Journal of Experimental Biology* 200(23): 2947-2955.

Schofield P.R., Darlison M.G., Fujita N., Burt D.R., Stephenson F.A., Rodriguez H., Rhee L.M., Ramachandran J., Reale V., Glencorse T.A., Seeburg P.H. and Barnard E.A., 1987. Sequence and functional expression of the GABA_A receptor shows a ligand-gated receptor super-family. *Nature* 328(6127): 221-227.

Schoft V.K., Schopoff S. and Jantsch M.F. 2007. Regulation of glutamate receptor B pre-mRNA splicing by RNA editing. *Nucleic Acids Research* 35(11): 3723-3732.

Schumacher, I., 2013. Untersuchungen zum kombinierten Einsatz von Metarhizium anisopliae und niedrig dosierten insektiziden/ akariziden Wirkstoffen auf die Zecken *Amblyomma haebraeum*, *Rhipicephalus sanguineus* und *Rhipicephalus microplus*. *Dissertation*, Gottfried Wilhelm Leibniz Universität Hannover.

Schwenk J., Metz M., Zolles G., Turecek R., Fritzius T., Bildl W., Tarusawa E., Kulik A., Unger A., Ivankova K., Seddik R., Tiao J.Y., Rajalu M., Trojanova J., Rohde V., Gassmann M., Schulte U., Fakler B. and Bettler B., 2010. Native GABA_B receptors are heteromultimers with a family of auxiliary subunits. *Nature* 465(7295): 231-235.

Seddik R., Jungblut S.P., Silander O.K., Rajalu M., Fritzius T., Besseyrias V., Jacquier V., Fakler B., Gassmann M. and Bettler B., 2012. Opposite effects of KCTD subunit domains on GABA(B) receptor-mediated desensitization. *Journal of Biological Chemistry* 287(47): 39869-39877.

Shaw R.D., 1970. Tick control on domestic animals II. The effect of modern treatment methods. *Tropical Science* 12: 29-36.

Sigal L.H., 1992. Current recommendations for the treatment of Lyme disease. *Drugs* 43 (5): 683-699.

Sigel E., 2002. Mapping of the benzodiazepine recognition site on GABA(A) receptors. *Current Topics in Medicinal Chemistry* 2(8): 833-839.

- Simon J., Wakimoto H., Fujita N., Lalande M. and Barnard E.A., 2004.** Analysis of the set of GABA_A receptor genes in the human genome. *Journal of Biological Chemistry* 279: 41422-41435.
- Simonsen C.C. and Levinson A.D., 1983.** Isolation and expression of an altered mouse dihydrofolate reductase cDNA. *Proceedings of the National Academy of Science of the U.S.A.* 80: 2495-2499.
- Smart T.G., 1997.** Regulation of excitatory and inhibitory neurotransmitter-gated ion channels by protein phosphorylation. *Current Opinion in Neurobiology* 7(3): 358-367.
- Smirnov A.A., 2009.** Biochemical mechanisms of *Ixodes* resistance to acaricides. *Vestnik Rossiiskoi Akademii Sel'skokhozyaistvennykh Nauk* 4: 80-82.
- Smit A.B., Syed N.I., Schaap D., van Minnen J., Klumperman J., Kits K.S., Lodder H., van der Schors R.C., van Elk R., Sorgedrager B., Brejc K., Sixma T.K. and Geraerts W.P., 2001.** A glia-derived acetylcholine-binding protein that modulates synaptic transmission. *Nature* 411(6835): 261-268.
- Smith T. and Kilbourne F.L., 1893.** Investigations into the nature, causation and prevention of Texas or southern cattle fever. *Bureau of Animal Industry* 1: 301-324.
- Smith G.B. and Olsen R.W., 1995.** Functional domains of GABA_A receptors. *Trends in Pharmacological Science* 16(5): 162-168.
- Soderlund D.M. and Bloomquist J.R., 1989.** Neurotoxic Actions of Pyrethroid Insecticides. *Annual Review of Entomology* 34: 77-96.
- Springell P.H., 1983.** The cattle tick in relation to animal production in Australia. *FAO Animal Production and Health Paper* 36, FAO, Rome.
- Stamm S., Ben-Ari S., Rafalska I., Tang Y., Zhang Z., Toiber D., Thanaraj T.A., Soreq H., 2005.** Function of alternative splicing. *Gene* 344:1-20.
- Stone B.F., 1957.** Resistance to DDT in the cattle tick, *Boophilus microplus* (Canestrini). *Australian Journal of Agricultural Research* 8(4):424-431.

Stone B.F. and Webber L.G., 1960. Cattle ticks, *Boophilus microplus*, resistant to DDT, BHC, and Dieldrin. *Australian Journal of Agricultural Research* 11(1): 106-119.

Taylor M.A., 2001. Recent Developments in Ectoparasiticides. *The Veterinary Journal* 161(3): 253-268.

Temeyer K.B., Olavson P.U. and Miller R.J., 2009. Genotyping mutations in BmAChE3: A survey of organophosphate-resistant and –susceptible strains of *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. *Journal of Medical Entomology* 46(6): 1355-1360.

Turusov V., Rakitsky V. and Tomatis L., 2002. Dichlorodiphenyltrichloroethane (DDT): ubiquity, persistence, and risks. *Environmental Health Perspectives* 110(2): 125-128.

Unwin N., 2005. Refined structure of the nicotinic acetylcholine receptor at 4Å resolution. *Journal of Molecular Biology* 346(4): 967-989.

Vithlani M., Terunuma M. and Moss S.J., 2011. The Dynamic Modulation of GABA_A Receptor Trafficking and Its Role in Regulating the Plasticity of Inhibitory Synapses. *Physiological Reviews* 91(3): 1009-1022.

Von Loewenich F.D., Stumpf G., Baumgarten B.U., Röllinghoff M., Dumler J.S. and Bogdan C., 2003. A case of equine granulocytic ehrlichiosis provides molecular evidence for the presence of pathogenic anaplasma phagocytophilum (HGE agent) in Germany. *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases* 22(5): 303-305.

Von Rotz A., Mumcuoglu Y., Pohlenz J.F., Suter M., Brossard M. and Barth D., 1983. Experimental infestation of cattle with ectoparasites and their effect on leather quality. *Journal of veterinary medicine* 30(6): 397-407.

Walker A.R., Bouattour A., Camicas J.-L., Estrada-Peña A., Horak I.G., Latif A.A., Pegram R.G. and Preston P.M., 2003. Ticks of Domestic Animals in Africa: a Guide to Identification of Species. *Bioscience Reports*, Edingburgh, UK.

- Whiting P., McKernan R.M. and Iversen L.L., 1990.** Another mechanism for creating diversity in γ -aminobutyrate type A receptors: RNA splicing directs expression of two forms of $\gamma 2$ subunit, one of which contains a protein kinase C phosphorylation site. *Proceedings of the National Academy of Science of the USA* 87(24): 9966-9970.
- WHO, 1957.** In: *WHO Technical Report Series*, 7th Report 125.
- Willadsen P., 1997.** Vaccines, Genetics and Chemicals in Tick Control: The Australian Experience. *Tropical Animal Health and Production* 29(4): 91-94.
- Willadsen P., 2006.** Tick control: Thoughts on a research agenda. *Veterinary Parasitology* 138(1-2): 161-168.
- Williamson M.S., Denholm I., Bell C.A. and Devonshire A.L., 1993.** Knockdown resistance (kdr) to DDT and pyrethroid insecticides maps to a sodium channel gene locus in the housefly (*Musca domestica*). *Molecular and General Genetics* 240(1): 17-22.
- Wolff M.A. and Wingate V.P.N., 1998.** Characterization and comparative pharmacological studies of a functional γ -aminobutyric acid (GABA) receptor cloned from the tobacco budworm, *Heliothis virescens* (Noctuidae:Lepidoptera). *Invertebrate Neuroscience* 3(4): 305-315.
- Wolstenholme A.J. and Rogers A.T., 2005.** Glutamate-gated chloride channels and the mode of action of the avermectin/milbemycin anthelmintics. *Parasitology* 131: 85-95.
- Wondji C.S., Dabire R.K., Tukur Z., Irving H., Djouaka R. and Morgan J.C., 2011.** Identification and distribution of a GABA receptor mutation conferring dieldrin resistance in the malaria vector *Anopheles funestus* in Africa. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 41(7): 484-491.
- Wright, D.E. 1986.** Biological activity and mode of action of avermectins. In: Ford, M.G, Lunt G.G. and Reay R.C., *Neuropharmacology and Pesticide Action*, Ellis Horwood, Chicester.

Xiang Y.Y., Wang S., Liu M., Hirota J.A., Li J., Ju W., Fan Y., Kelly M.M., Ye B., Orser B., O'Byrne P.M., Inman M.D., Yang X. and Lu W.Y., 2007. A GABAergic system in airway epithelium is essential for mucus overproduction in asthma. *Nature Medicine* 13(7): 862-867.

Zhang H.G., Lee H.J., Rocheleau T., French-Constant R.H. and Jackson M.B., 1995. Subunit composition determines picrotoxin and bicuculline sensitivity of *Drosophila* γ -aminobutyric acid receptors. *Molecular Pharmacology* 48(5): 835-840.

Zhao C. and Casida J.E., 2014. Insect γ -Aminobutyric Acid Receptors and Isoxazoline Insecticides: Toxicological Profiles Relative to the Binding Sites of [³H]Fluralaner, [³H]-4'-Ethynyl-4-*n*-propylbicycloorthobenzoate and [³H]Avermectin. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 62(5): 1019-1024.

Zheng Y., Priest B., Cully D.F. and Ludmerer S.W., 2003. Rdl^{Dv}, a novel GABA-gated chloride channel gene from the American dog tick *Dermacentor variabilis*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 33(6): 595-599.

VIII Anhang

VIII.1 Ergänzende Daten

VIII.1.1 Plasmidkarten der Zecken-*rrdII* pcDNA3.1(+)-Konstrukte

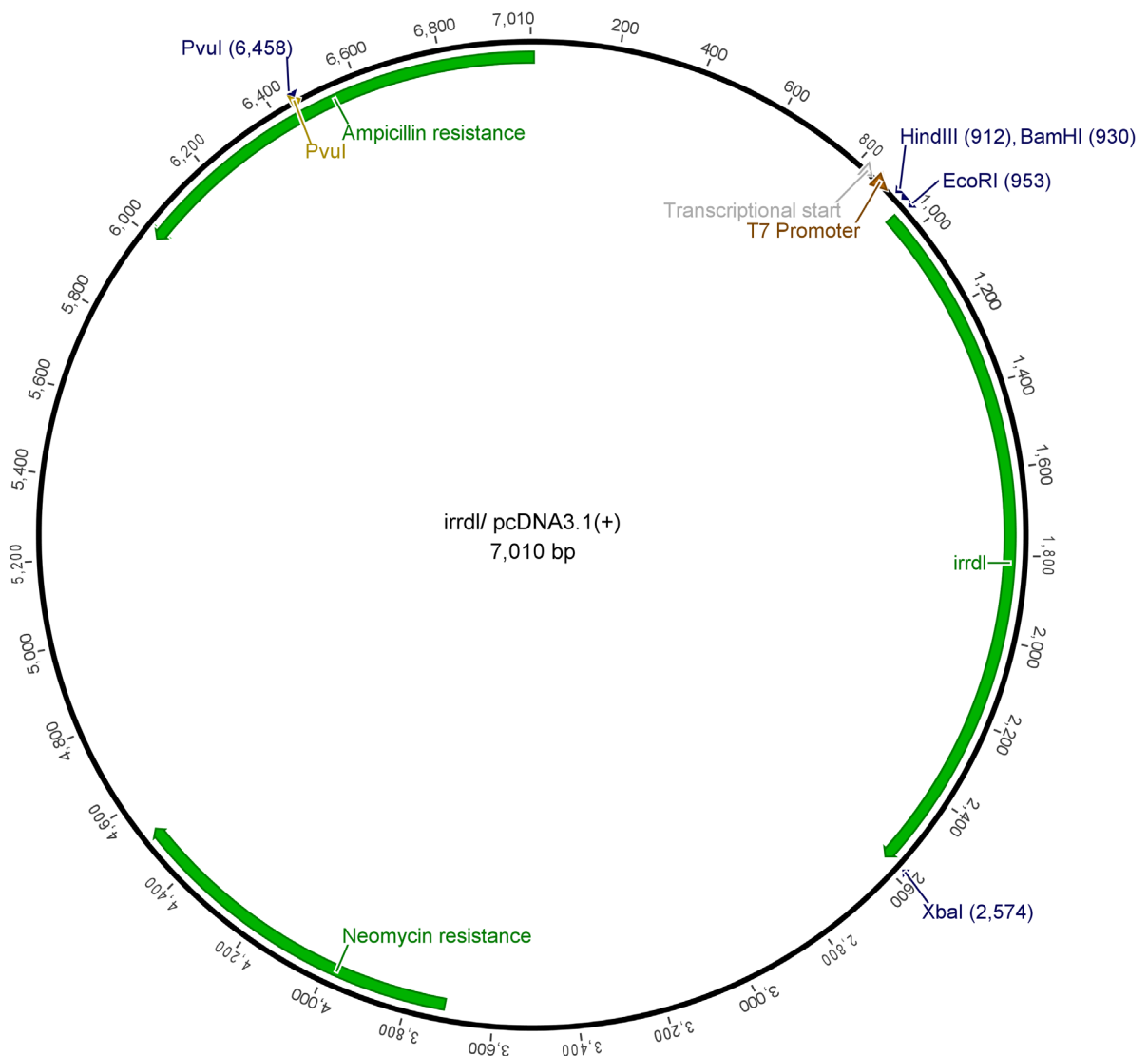


Abb. VIII.1 Plasmidkarte des Konstruktes *irrdII* pcDNA3.1(+)

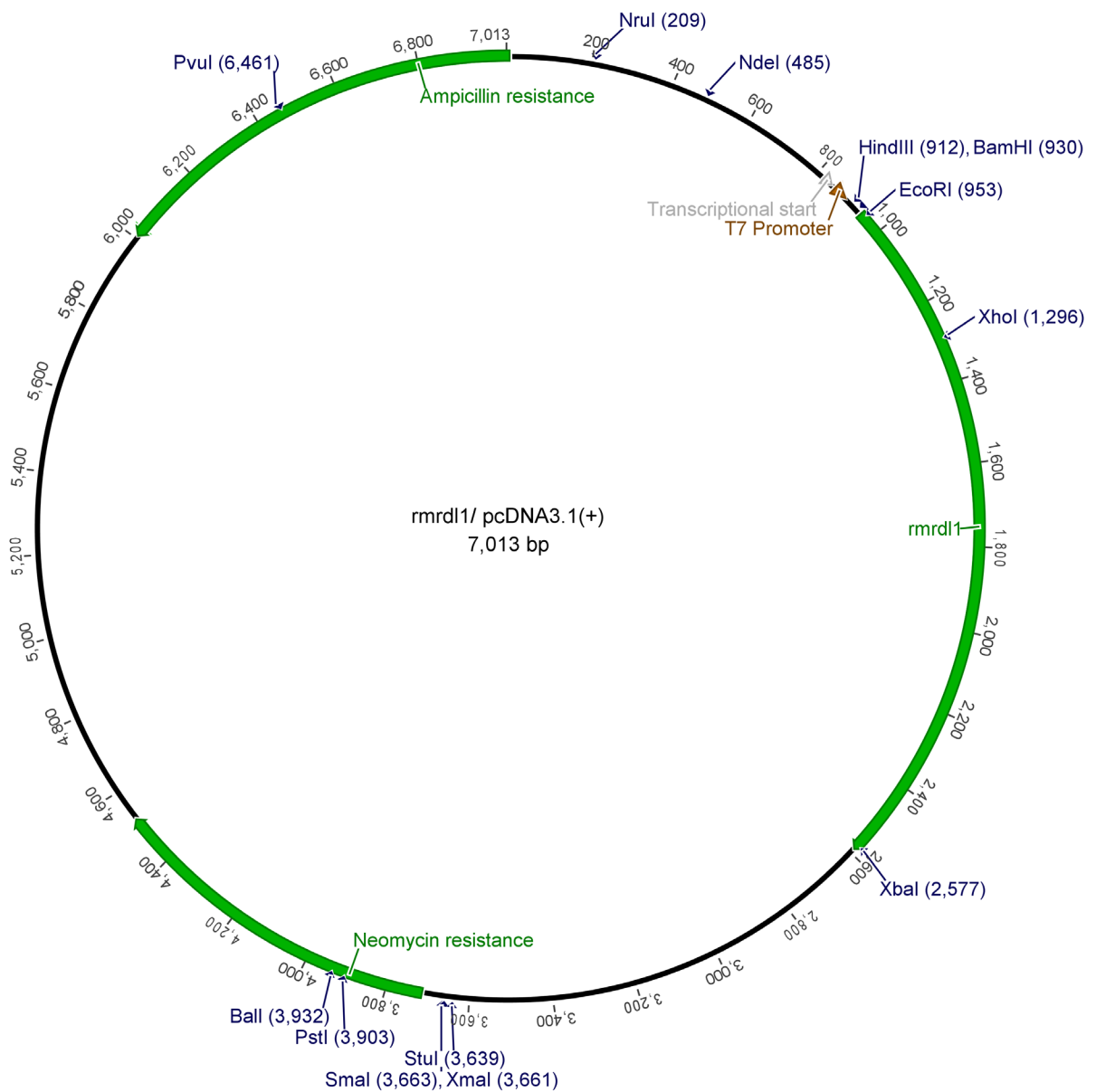


Abb. VIII.2 Plasmidkarte des Konstruktes *rmrd1/ pcDNA3.1(+)*

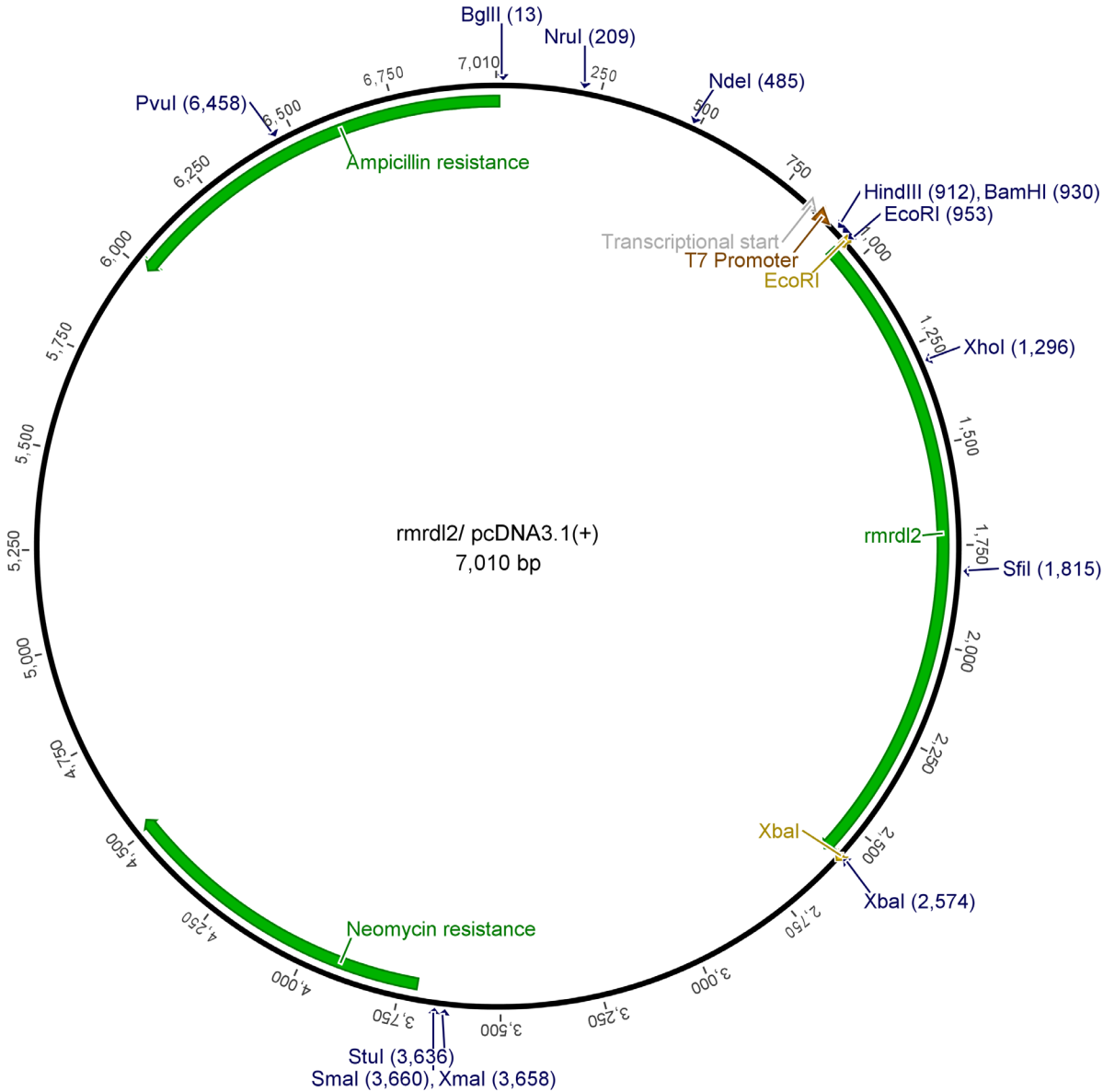


Abb. VIII.3 Plasmidkarte des Konstruktes *rmrDl2/ pcDNA3.1(+)*

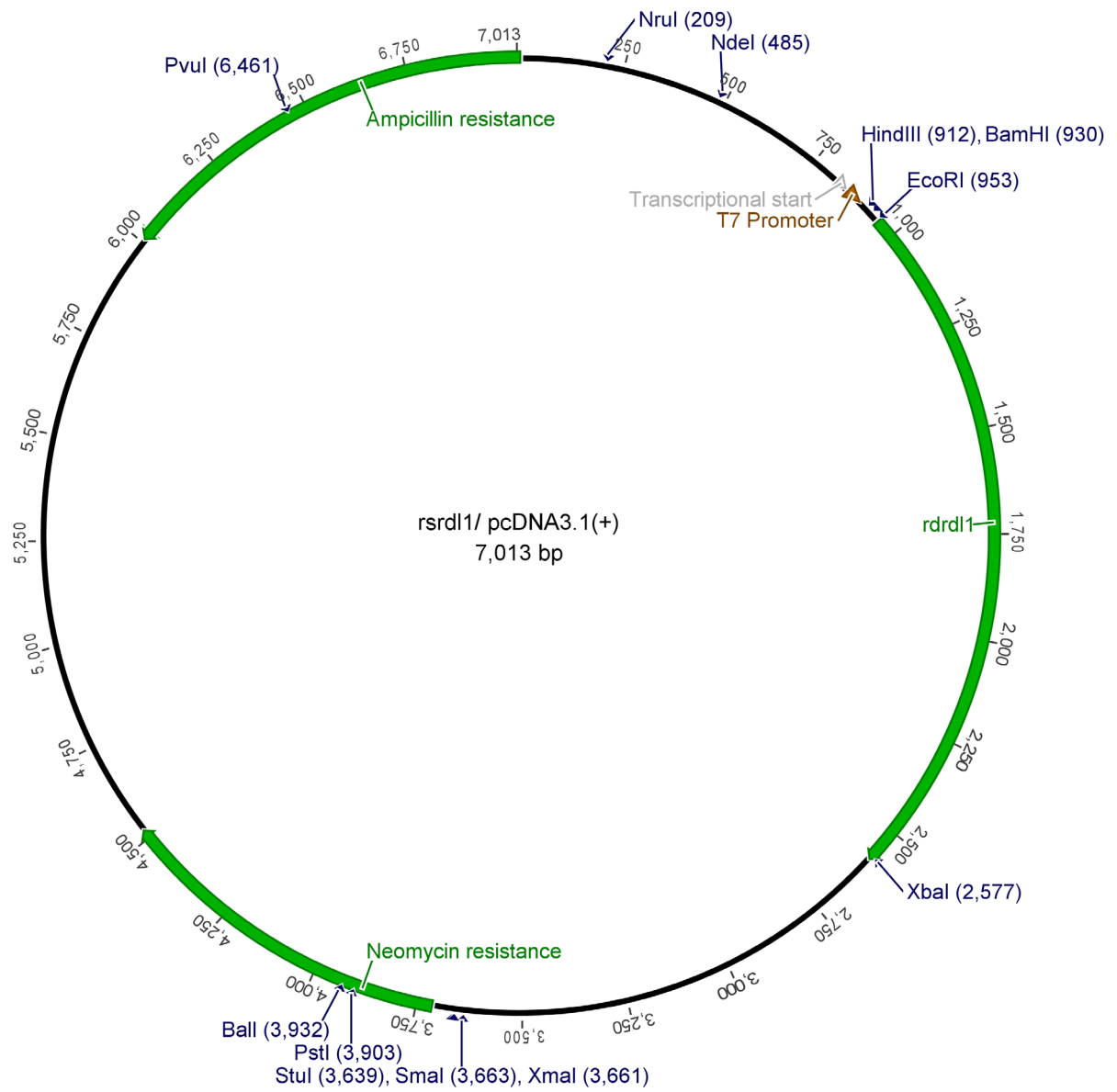


Abb. VIII.4 Plasmidkarte des Konstruktes *rsrd11/ pcDNA3.1(+)*

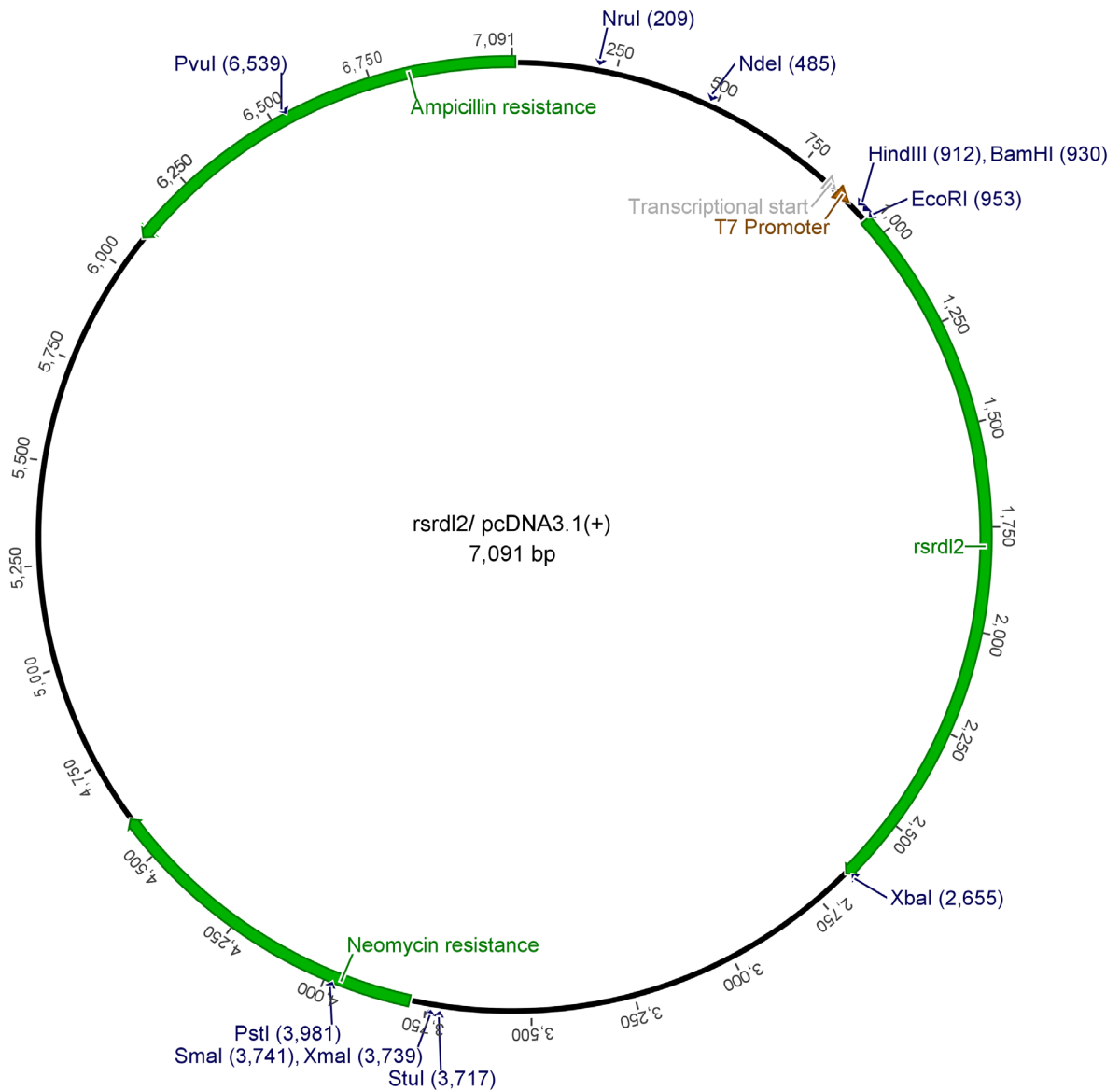


Abb. VIII.5 Plasmidkarte des Konstruktes *rsrdl2/ pcDNA3.1(+)*

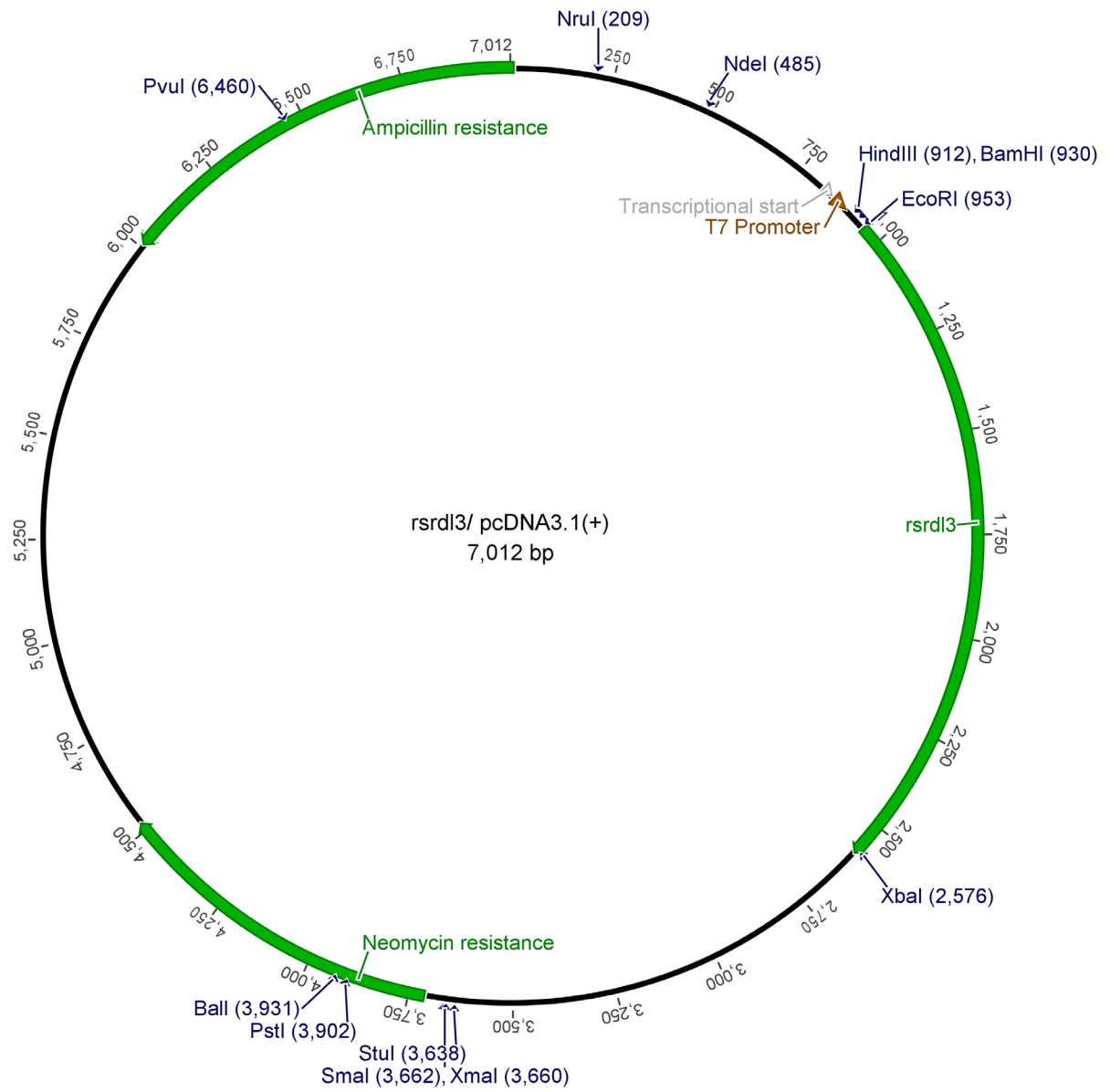


Abb. VIII.6 Plasmidkarte des Konstruktes *rsrdI3/ pcDNA3.1(+)*

VIII.1.2 Vollständige cDNA-Sequenzen und abgeleitete Aminosäuresequenzen

| | | | | | | | |
|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|----|
| IrRDL | 1 | 10 | 20 | 30 | 40 | 50 | 60 |
| | Ä | C | C | A | T | G | A |
| | T | M | R | Q | A | M | A |
| IrRDL | 70 | 80 | 90 | 100 | 110 | 120 | |
| | A | T | C | G | C | C | |
| | I | A | F | G | P | R | |
| IrRDL | 130 | 140 | 150 | 160 | 170 | 180 | |
| | C | A | A | A | C | A | |
| | Q | N | I | T | C | A | |
| IrRDL | 190 | 200 | 210 | 220 | 230 | 240 | |
| | C | C | C | A | A | C | |
| | P | N | Y | G | G | L | |
| IrRDL | 250 | 260 | 270 | 280 | 290 | 300 | |
| | A | C | G | G | T | C | |
| | T | V | S | E | V | Q | |
| IrRDL | 310 | 320 | 330 | 340 | 350 | 360 | |
| | G | A | C | G | A | G | |
| | D | E | R | A | R | S | |
| IrRDL | 370 | 380 | 390 | 400 | 410 | 420 | |
| | G | T | G | G | C | T | |
| | V | A | E | R | I | W | |
| IrRDL | 430 | 440 | 450 | 460 | 470 | 480 | |
| | C | A | T | A | T | G | |
| | H | M | A | T | T | P | |
| IrRDL | 490 | 500 | 510 | 520 | 530 | 540 | |
| | A | G | C | A | T | C | |
| | S | I | R | A | L | V | |
| IrRDL | 550 | 560 | 570 | 580 | 590 | 600 | |
| | A | G | A | C | A | A | |
| | R | Q | A | T | C | I | |
| IrRDL | 610 | 620 | 630 | 640 | 650 | 660 | |
| | C | G | G | T | G | T | |
| | R | W | S | D | G | D | |
| IrRDL | 670 | 680 | 690 | 700 | 710 | 720 | |
| | A | A | G | G | T | C | |
| | K | V | L | G | A | C | |
| IrRDL | 730 | 740 | 750 | 760 | 770 | 780 | |
| | C | G | A | C | T | G | |
| | R | L | V | T | C | E | |
| IrRDL | 790 | 800 | 810 | 820 | 830 | 840 | |
| | A | T | C | C | T | G | |
| | I | P | A | S | L | I | |
| IrRDL | 850 | 860 | 870 | 880 | 890 | 900 | |
| | A | C | G | C | P | G | |
| | T | P | A | R | A | T | |
| IrRDL | 910 | 920 | 930 | 940 | 950 | 960 | |
| | A | G | T | A | C | A | |
| | S | T | N | A | A | L | |
| IrRDL | 970 | 980 | 990 | 1,000 | 1,010 | 1,020 | |
| | A | C | A | T | G | T | |
| | T | C | F | V | M | V | |
| IrRDL | 1,030 | 1,040 | 1,050 | 1,060 | 1,070 | 1,080 | |
| | A | A | G | A | A | A | |
| | K | R | I | C | M | R | |
| IrRDL | 1,090 | 1,100 | 1,110 | 1,120 | 1,130 | 1,140 | |
| | A | G | A | C | A | A | |
| | R | Q | K | R | I | A | |
| IrRDL | 1,150 | 1,160 | 1,170 | 1,180 | 1,190 | 1,200 | |
| | C | C | G | A | G | A | |
| | P | E | M | V | V | K | |
| IrRDL | 1,210 | 1,220 | 1,230 | 1,240 | 1,250 | 1,260 | |
| | T | C | C | A | A | G | |
| | S | Q | G | T | C | A | |
| IrRDL | 1,270 | 1,280 | 1,290 | 1,300 | 1,310 | 1,320 | |
| | G | A | C | C | A | A | |
| | D | Q | C | T | G | C | |
| IrRDL | 1,330 | 1,340 | 1,350 | 1,360 | 1,370 | 1,380 | |
| | C | A | A | G | C | T | |
| | Q | A | Q | C | A | Q | |
| IrRDL | 1,390 | 1,400 | 1,410 | 1,420 | 1,430 | 1,440 | |
| | G | A | C | C | A | A | |
| | D | F | K | G | F | S | |
| IrRDL | 1,450 | 1,460 | 1,470 | 1,480 | 1,490 | 1,500 | |
| | A | T | C | G | A | G | |
| | I | E | S | A | F | C | |
| IrRDL | 1,510 | 1,520 | 1,530 | 1,540 | 1,550 | 1,560 | |
| | G | A | C | A | A | G | |
| | D | K | Y | T | S | C | |
| IrRDL | 1,570 | 1,580 | 1,590 | 1,600 | 1,610 | 1,614 | |
| | A | T | C | A | T | T | |
| | I | I | Y | L | H | I | |

Abb. VIII.7 cDNA Sequenz und abgeleitete Aminosäuresequenz von IRRDL

RmRDL1 ¹ A C C A T G A G G C ¹⁰ A G G C G A T G G C ²⁰ G T F C A G T T C ³⁰ T G G T C C T T C G ⁴⁰ T T C T T C G ⁵⁰ T G G C C G T C G C T ⁶⁰
 RmRDL1 ⁷⁰ G T C A C C A G T ⁸⁰ G C G G T C R G G A ⁹⁰ T A A T G G T C ¹⁰⁰ A G C C C C C T G ¹¹⁰ C G G C C P G G G A C ¹²⁰ A A A C G C A A C G T ¹³⁰
 RmRDL1 ¹³⁰ G G A C A A A C A ¹⁴⁰ T C A C G C A G A T ¹⁵⁰ T C T G A A T G C ¹⁶⁰ C T T C T T T A C A C G T ¹⁷⁰ G G T A C G ¹⁸⁰ A C A G G A G G G T G ¹⁹⁰
 RmRDL1 ¹⁹⁰ A G G C C A A A T ²⁰⁰ T A T G G C G G T G ²¹⁰ T T C A G T G G A ²²⁰ A G T T G G C G T C ²³⁰ A T A T G C A G A ²⁴⁰ T A T A T C A G C A T A ²⁵⁰
 RmRDL1 ²⁵⁰ A G T A C A G T C ²⁶⁰ T C T G A A G T A C A A A T G G A C T T ²⁷⁰ F A C T T S G G A C T ²⁸⁰ T C T A T T T C C ²⁹⁰ G G C A A T C G T G G ³⁰⁰
 RmRDL1 ³¹⁰ C G G G A C G A G C ³²⁰ G A C T C T C G T T C C A G A A A A G ³³⁰ C C C A G A C C T C C G A G A G C A T G A ³⁴⁰ C G G T G G G C G C T ³⁵⁰
 RmRDL1 ³⁶⁰ G A A G T G G C C G ³⁷⁰ A G A G G A T C T G G G T A C C C G A ³⁸⁰ C A C C T T C T T C G C C A A C G A G A ³⁹⁰ A G A G C G C C T A C ⁴⁰⁰
 RmRDL1 ⁴¹⁰ T T T C A T G C G G ⁴²⁰ C C A C C A C G C C P N A A C A C T T T F C C T C R G A A T C G G T T C S G G A G G A G A G V T T T F C ⁴³⁰
 RmRDL1 ⁴⁴⁰ C G C A G T A T T C ⁴⁵⁰ G A C T G A C G G T G A C T G C C A G S ⁴⁶⁰ C T G C C C A A T G G A T C T C A G A T A T T T C C C G A T G ⁴⁷⁰
 RmRDL1 ⁴⁸⁰ G A C A G A C A A G ⁴⁹⁰ C G T G C A C T A T A G A G A T A G A A A G T T T T G G T T A C A C C A T G A A G A C A T C C G C ⁵⁰⁰
 RmRDL1 ⁵¹⁰ T A T C G G T G W T ⁵²⁰ C G G A C G G T G A C A C G T S C G T C C G R A T C G C A A G G A A G T G A G T T G C C G C A G ⁵³⁰
 RmRDL1 ⁵⁴⁰ T T C A A A G T C C ⁵⁵⁰ T C G G T C A C G T C C A A A A A G C A A A A G A G G T T G C C C T A A C G A C A G G A A A C T A C ⁵⁶⁰
 RmRDL1 ⁵⁷⁰ T C C C G C C T G G ⁵⁸⁰ T A T G T G A A A T A C G G T T C G C C C G C T C A T G G G C T A C T A C C T G A T C C A G A T C ⁵⁹⁰
 RmRDL1 ⁶⁰⁰ T A C A T C C C G G ⁶¹⁰ C C G G A T L G A T I C G T G G T T A T T C C T T W G G T C C S C T T T W G C T C C A C C G T A A C ⁶²⁰
 RmRDL1 ⁶³⁰ G C T A G T C C A G ⁶⁴⁰ C T C G C G T C G C G C T C G G C G T C A C C A C C G T G C T C A C A A T G A C C A C A C T C A T G ⁶⁵⁰
 RmRDL1 ⁶⁶⁰ T C C A G T A C C A ⁶⁷⁰ A N C G C A G C G C T G C C C A A A A T A T C C T A C G T C A A G A G T A T C G A C G T C T A C C T G ⁶⁸⁰
 RmRDL1 ⁶⁹⁰ G G C A C A T G T T ⁷⁰⁰ F G V A A T M G G T G T F T A C C G C G C T C L L T G G A G T A C G C C G C G G T A G G A T A T C T C ⁷¹⁰
 RmRDL1 ⁷²⁰ G G C A A G A G A I ⁷³⁰ T C A C C A T G A G G A A A A C C C G C T G T C A G C A G C T G G C A A A A C T T G C A G A G C A A ⁷⁴⁰
 RmRDL1 ⁷⁵⁰ C A C A G G C A G A ⁷⁶⁰ G G T G C G C C G C T G C T T C T T C C A A C G A G C C A A G S C T C T G A G C C C T T G C T A G C ⁷⁷⁰
 RmRDL1 ⁷⁸⁰ A G T C T G A A G T ⁷⁹⁰ A T S C C A T I G T V C A A G A C G G T C G G T S C C T G T C A A G T T T T G T C P T G C T G C G G T G ⁸⁰⁰
 RmRDL1 ⁸¹⁰ G C A T C C C A A G ⁸²⁰ G A C A A C C G A G G A A G C A C P A C C A A C C G G A T T A C C A T G G G T C G C A G A G G C ⁸³⁰
 RmRDL1 ⁸⁴⁰ G C A G A C C A A T ⁸⁵⁰ G T T G C C C T G G T C T C C A G G G T T C A T G T C A G G T C T G C C C G C T G C G G T V C G C ⁸⁶⁰
 RmRDL1 ⁸⁷⁰ T C A C A A A C T ⁸⁸⁰ C A A C A A C A G G C T C C A C P A G G A I P M E V R L K M ⁸⁹⁰
 RmRDL1 ⁹⁰⁰ G T T G A C C C A A ⁹¹⁰ A A G G A T T C A G C A A A T C C T S G A C T C T G G A G A A C A C C G T C A A C G G C G C G C ⁹²⁰
 RmRDL1 ⁹³⁰ G A C A T C G A G G ⁹⁴⁰ C A G C G T T T T G C A A G A A C C C A A C A A A T T A T T G G C G T C G G C C C T T C C G A T ⁹⁵⁰
 RmRDL1 ⁹⁶⁰ A T C G A C A A G T ⁹⁷⁰ A C T C C C G A G T G G T G T T C C C G T T T C G T C T G T T C A A C C T C A T G T A C ⁹⁸⁰
 RmRDL1 ⁹⁹⁰ T G G A T C A T T ¹⁰⁰⁰ Y L H A T C A G C G A C G T T C T G C C G G A C G A C G T T G G C G A C G A C T A G ¹⁰¹⁰
 RmRDL1 ¹⁰²⁰ T G G A T C A T T ¹⁰³⁰ Y L H A T C A G C G A C G T T C T G C C G G A C G A C G T T G G C G A C G A C T A G ¹⁰⁴⁰
 RmRDL1 ¹⁰⁵⁰ T G G A T C A T T ¹⁰⁶⁰ Y L H A T C A G C G A C G T T C T G C C G G A C G A C G T T G G C G A C G A C T A G ¹⁰⁷⁰
 RmRDL1 ¹⁰⁸⁰ T G G A T C A T T ¹⁰⁹⁰ Y L H A T C A G C G A C G T T C T G C C G G A C G A C G T T G G C G A C G A C T A G ¹¹⁰⁰
 RmRDL1 ¹¹¹⁰ T G G A T C A T T ¹¹²⁰ Y L H A T C A G C G A C G T T C T G C C G G A C G A C G T T G G C G A C G A C T A G ¹¹³⁰
 RmRDL1 ¹¹⁴⁰ T G G A T C A T T ¹¹⁵⁰ Y L H A T C A G C G A C G T T C T G C C G G A C G A C G T T G G C G A C G A C T A G ¹¹⁶⁰
 RmRDL1 ¹¹⁷⁰ T G G A T C A T T ¹¹⁸⁰ Y L H A T C A G C G A C G T T C T G C C G G A C G A C G T T G G C G A C G A C T A G ¹¹⁹⁰
 RmRDL1 ¹²⁰⁰ T G G A T C A T T ¹²¹⁰ Y L H A T C A G C G A C G T T C T G C C G G A C G A C G T T G G C G A C G A C T A G ¹²²⁰
 RmRDL1 ¹²³⁰ T G G A T C A T T ¹²⁴⁰ Y L H A T C A G C G A C G T T C T G C C G G A C G A C G T T G G C G A C G A C T A G ¹²⁵⁰
 RmRDL1 ¹²⁶⁰ T G G A T C A T T ¹²⁷⁰ Y L H A T C A G C G A C G T T C T G C C G G A C G A C G T T G G C G A C G A C T A G ¹²⁸⁰
 RmRDL1 ¹²⁹⁰ T G G A T C A T T ¹³⁰⁰ Y L H A T C A G C G A C G T T C T G C C G G A C G A C G T T G G C G A C G A C T A G ¹³¹⁰
 RmRDL1 ¹³²⁰ T G G A T C A T T ¹³³⁰ Y L H A T C A G C G A C G T T C T G C C G G A C G A C G T T G G C G A C G A C T A G ¹³⁴⁰
 RmRDL1 ¹³⁵⁰ T G G A T C A T T ¹³⁶⁰ Y L H A T C A G C G A C G T T C T G C C G G A C G A C G T T G G C G A C G A C T A G ¹³⁷⁰
 RmRDL1 ¹³⁸⁰ T G G A T C A T T ¹³⁹⁰ Y L H A T C A G C G A C G T T C T G C C G G A C G A C G T T G G C G A C G A C T A G ¹⁴⁰⁰
 RmRDL1 ¹⁴¹⁰ T G G A T C A T T ¹⁴²⁰ Y L H A T C A G C G A C G T T C T G C C G G A C G A C G T T G G C G A C G A C T A G ¹⁴³⁰
 RmRDL1 ¹⁴⁴⁰ T G G A T C A T T ¹⁴⁵⁰ Y L H A T C A G C G A C G T T C T G C C G G A C G A C G T T G G C G A C G A C T A G ¹⁴⁶⁰
 RmRDL1 ¹⁴⁷⁰ T G G A T C A T T ¹⁴⁸⁰ Y L H A T C A G C G A C G T T C T G C C G G A C G A C G T T G G C G A C G A C T A G ¹⁴⁹⁰
 RmRDL1 ¹⁵⁰⁰ T G G A T C A T T ¹⁵¹⁰ Y L H A T C A G C G A C G T T C T G C C G G A C G A C G T T G G C G A C G A C T A G ¹⁵²⁰
 RmRDL1 ¹⁵³⁰ T G G A T C A T T ¹⁵⁴⁰ Y L H A T C A G C G A C G T T C T G C C G G A C G A C G T T G G C G A C G A C T A G ¹⁵⁵⁰
 RmRDL1 ¹⁵⁶⁰ T G G A T C A T T ¹⁵⁷⁰ Y L H A T C A G C G A C G T T C T G C C G G A C G A C G T T G G C G A C G A C T A G ¹⁵⁸⁰
 RmRDL1 ¹⁵⁹⁰ T G G A T C A T T ¹⁶⁰⁰ Y L H A T C A G C G A C G T T C T G C C G G A C G A C G T T G G C G A C G A C T A G ¹⁶¹⁰
 RmRDL1 ¹⁶¹⁷ T G G A T C A T T ¹⁶¹⁷ Y L H A T C A G C G A C G T T C T G C C G G A C G A C G T T G G C G A C G A C T A G *

Abb. VIII.8 cDNA Sequenz und abgeleitete Aminosäuresequenz von RMRDL1

RmRDL2 ¹ A C C A T G A G G ¹⁰ C A G G C G A T G G ²⁰ G T T C A G T T G ³⁰ C T G G T C C T T C ⁴⁰ G T T C T C T C G ⁵⁰ T G G C C G T C G C ⁶⁰ T

RmRDL2 ⁷⁰ G T C A C C A G T G ⁸⁰ C C G G T C G G G A ⁹⁰ T A A T G G T C C ¹⁰⁰ A G C C C C C T G C ¹¹⁰ A G C C G G G A C ¹²⁰ A A A C G C A A C G T

RmRDL2 ¹³⁰ G G A C A A A A C ¹⁴⁰ A T C A G C G A G A ¹⁵⁰ T T C T G A A T G C ¹⁶⁰ C T T C T T A C A C ¹⁷⁰ G T G G T T A C G ¹⁸⁰ A C A G G A G G G T G

RmRDL2 ¹⁹⁰ A G G C C A A A T ²⁰⁰ T A T G G C G G T T ²¹⁰ C C A G T G G A ²²⁰ A G T T G G C G T C ²³⁰ A C T A T G C A G A ²⁴⁰ T T A T C A G C A T A

RmRDL2 ²⁵⁰ A G T A G T C T C ²⁶⁰ T G A A G T A C A A A T G G A C T T ²⁷⁰ T A C T T C G G A C T T ²⁸⁰ C T A T T T C C G G C A A T C G T G G

RmRDL2 ³¹⁰ C G G G A C G A E ³²⁰ G C A C T C C G T T C C A G A A A A G ³³⁰ C C A G A C C T C ³⁴⁰ G A G A G C A T G A ³⁵⁰ C G G T G G G C G C ³⁶⁰ T

RmRDL2 ³⁷⁰ G A A G T G G C C ³⁸⁰ G A G A G G A T C T G G T A C C C G A ³⁹⁰ C A C C T C T T C ⁴⁰⁰ C C A A C G A G A ⁴¹⁰ A G A G C G C C T A C ⁴²⁰

RmRDL2 ⁴³⁰ T T T C A T G C G ⁴⁴⁰ G C C A C C A C G C C C A A C A C T T T ⁴⁵⁰ C C T C C G A A T C G G T T C C G A G G A G A G G T T T T C

RmRDL2 ⁴⁹⁰ C G C A G T A T T ⁵⁰⁰ C G A C T G A C G G T G A C T G C C A G ⁵¹⁰ C T G C C C A A T G G A ⁵²⁰ T C T C A G A T A ⁵³⁰ T T T C C C G A T G ⁵⁴⁰

RmRDL2 ⁵⁵⁰ G A C A G A C A A ⁵⁶⁰ G C G T G C A C T A T A G A G A T A G A ⁵⁷⁰ A A G T T T T G G T ⁵⁸⁰ A C A C C A T G A ⁵⁹⁰ A A G A C A T C C G C ⁶⁰⁰ R

RmRDL2 ⁶¹⁰ T A T C R G G T W ⁶²⁰ G T S G D G G T G A C A C G T S C G T C C G T A T I G C C A A G G A A G T G A G T T G C C G C A G

RmRDL2 ⁶⁷⁰ T T C A A A G T C ⁶⁸⁰ C T C G G T C A C G T C C A A A A A G C ⁶⁹⁰ A A A A G A G G T T G ⁷⁰⁰ C C T A A C G A C A G G G A A C T A C ⁷¹⁰ T G N Y C

RmRDL2 ⁷³⁰ T C C C G C T T G ⁷⁴⁰ V T T T G T G A G A T A C G C T T C G T ⁷⁵⁰ G C G T T C A T G G G C T A T T A C C ⁷⁶⁰ T G A T C C A G A T G ⁷⁷⁰ L I Q M

RmRDL2 ⁷⁹⁰ T A C A T C C C P ⁸⁰⁰ T G C T G G A C T T A T C G T C G T A A C ⁸¹⁰ C T C S T W G G T C T C ⁸²⁰ T T T W G G C T C C A C C G T A A C ⁸³⁰ T A C

RmRDL2 ⁸⁵⁰ G C T A G C C C P ⁸⁶⁰ G C C C G C G T G G C C T T A G G C G T ⁸⁷⁰ C A C C A C T G T G C T C A C C A T G A C A A C G C T A A T G ⁸⁸⁰ L T M T L M G

RmRDL2 ⁹¹⁰ T C C A G C A C G ⁹²⁰ A A C G T G C T C T G C C C A A A A T ⁹³⁰ A T C G T A C G T C ⁹⁴⁰ A A G A G C A T T G A C G T C T A C C T G ⁹⁵⁰ L G

RmRDL2 ⁹⁷⁰ G G A A C G T G C ⁹⁸⁰ T T F C G T G A T G G T G T T T G C G G C ⁹⁹⁰ C C T C C T L G A A A T A C G C C A C G G T A G G A T A T C T T ¹⁰⁰⁰ L T

RmRDL2 ¹⁰³⁰ G G C A A G A G A ¹⁰⁴⁰ A T C A C C A T G A A G A G G A C G G C ¹⁰⁵⁰ A A G C A A C A G T T G G C C A A G C T G G C G C A G G A G ¹⁰⁶⁰ Q E G

RmRDL2 ¹⁰⁹⁰ C A T G C C T C C ¹¹⁰⁰ C G G A A T G C A C T A C C A C C C A C ¹¹¹⁰ T G C G G A G C C T G A G C C G G A G C ¹¹²⁰ C G A T G A T G G T C ¹¹³⁰ P M M V

RmRDL2 ¹¹⁵⁰ A G T C C G G A A ¹¹⁶⁰ C T C C C G A T T C C C A A G A T G G C ¹¹⁷⁰ C G G T C G C A G A G G C G C A G A C C ¹¹⁸⁰ A A T G C T G C C C T ¹¹⁹⁰ P P

RmRDL2 ¹²¹⁰ G G T C T C C A G ¹²²⁰ G G T T C A T G T C A G T T C T G C C C ¹²³⁰ G C T G C G G T C G C C T C A C A A A C T C A A C A A C A G ¹²⁴⁰ Q Q Q

RmRDL2 ¹²⁷⁰ G C T C C T C C A ¹²⁸⁰ C A G G G A T A C C T A T G A A T C A C A A A G T C A G G A G C C T T A T A G G A C T A T G G T G ¹²⁹⁰ A P Y R T M V

RmRDL2 ¹³³⁰ G T T A T G C C P ¹³⁴⁰ A G S A R G G A A C T G C A C A T A A C C G G C T G C C A C G A A G T A C R G T C L C A A A A T G G T T ¹³⁵⁰ P H E V R L M G V

RmRDL2 ¹³⁹⁰ G A C C C C A A A ¹⁴⁰⁰ G G A T T C A G C A A A T C C T C G A C T C T G G A G A A C A C G T C A A C G G C G C C G G A C ¹⁴¹⁰ D P K G F S K S S T L E N A T V N G A P D

RmRDL2 ¹⁴⁵⁰ A T C G A G G C A ¹⁴⁶⁰ G C G T T T T G C A A G A A C C C C A A C A A A T T A T T T G G C G T C A G C C C T T C C G A T A T C ¹⁴⁷⁰ I E A A F C K N P N K L F G V S P S D I C

RmRDL2 ¹⁵¹⁰ G A C A A G T A C ¹⁵²⁰ T C C C R A G T V G T T F C C C G T T T G C T F C G T C T G T T T C A A C C T C A T M G T A C T G G ¹⁵³⁰ D K Y S R V T F P V L V L F N L T A M Y A G W

RmRDL2 ¹⁵⁷⁰ A T C A T T T A C ¹⁵⁸⁰ C T G C A C A T C A G C G A C G T T C T G C C G G A C G A C G T T G G C G A C G A C T A G ¹⁵⁹⁰ I I Y L H I S D V L P D D V G D D * ¹⁶⁰⁰ ¹⁶¹⁰ ¹⁶¹⁴

Abb. VIII.9 cDNA Sequenz und abgeleitete Aminosäuresequenz von RMRDL2

RsRDL1 ¹ A C C A T G A G G ¹⁰ C A G G C G A T G G ²⁰ C G T F C A G T T G ³⁰ C T G G T C C T T C ⁴⁰ G T T C T C T C G ⁵⁰ T G G C C G T C G C T ⁶⁰

RsRDL1 ⁷⁰ G T C A C C A G T ⁸⁰ G C A G G T C G G G A T A A T A G G T C C ⁹⁰ A G C C C C P C T L G C G G C C P G G A C A A A C G C A A C G T ¹⁰⁰ ¹¹⁰ G T C A C C A G T ¹²⁰ A T G G C G G A T A A T A G G T C C ¹³⁰ A G C C C C P C T L G C G G C C P G G A C A A A C G C A A C G T ¹⁴⁰ ¹⁵⁰ G T C A C C A G T ¹⁶⁰ A T G G C G G A T A A T A G G T C C ¹⁷⁰ A G C C C C P C T L G C G G C C P G G A C A A A C G C A A C G T ¹⁸⁰

RsRDL1 ¹⁹⁰ G A G C C A A A T ²⁰⁰ A T G G C G G C G T T C C A G T G G A ²¹⁰ A G T T G G C G T C ²²⁰ A C T A T G C A G A T ²³⁰ T A T C A G C A T A ²⁴⁰

RsRDL1 ²⁵⁰ A G T A C A G T C T C T G A A G T A C A A A T G G A C T T ²⁶⁰ T A C T T T C G G A C T T C T A T T T C C G G C A A T C S T G G ²⁷⁰ ²⁸⁰ C G G G A C G A G C ²⁹⁰ G A C T C T C G T F C Q K S ³⁰⁰ C C A G A C C T C G A A A G C A T G A C G G T C G G C G C T ³¹⁰ ³²⁰ G A A G T G G C C G A G A G G A T C T G G T A C C C G A ³³⁰ C A C C T T C T T C G C C A A C G A G A ³⁴⁰ A G A G C G C C T A C ³⁵⁰ ³⁶⁰ T T T C A T G C G G C C A C C A C T T T F C C T C C R A A T C G G T T C S G G A G G A G A G G T C T T F C ³⁷⁰ ³⁸⁰ C G C A G T A T T C G A C T G A C G G T G A C T G C C A G ³⁹⁰ S C C P A M G D L R Y F P M G ⁴⁰⁰ ⁴¹⁰ G A C A G A C A A G C G T G C A C T A T A G A A A T A G A ⁴²⁰ A A G T T T T G G T T A C A C C A T G A A A G A C A T C C G C ⁴³⁰ ⁴⁴⁰ T A C C G G T G G T C G G A C G G C G A C A C G T S C C G T C C G A A T I G C C A A G G A G V T A G A G T L G C C G C A G ⁴⁵⁰ ⁴⁶⁰ T T C A A A G T C C T C G G T C A C G T C C A A A A A G C ⁴⁷⁰ A A A G A G G T T G C C C T A A C G A C A G G A A A C T A C ⁴⁸⁰ ⁴⁹⁰ T C C C G C C T G G T A T G T G A A A T A C G G T T C G C ⁵⁰⁰ C G C T C C A T G G G C T A C T A C C L G A T C C A G A T C ⁵¹⁰ ⁵²⁰ T A C A T C C C G G C C G G A T L G A T I C G T V G V T A T T C S T W G G T C T C C T T T W G C L T C C A C C G T A A C ⁵³⁰ ⁵⁴⁰ G C T A G T C C A G C T C G C G T C G C G C T C A C C A C G T G C T C A C A A T G A C C A C A C T C A T G ⁵⁵⁰ ⁵⁶⁰ T C C A G T A C C A A C G C A G C G G T G C C C A A A A T A T C T C T A C G T C A A G A G T A T C G A C G T C T A C C T G ⁵⁷⁰ ⁵⁸⁰ G G C A C A T G T T F C G T A A T M V T F T T A C C G C G T C L G G A G T A C G C C G G T A G G A T Y C L T C ⁵⁹⁰ ⁶⁰⁰ G G C A A G A G A A T C A C C A T G A G G A A A A C C C G T G T C A G C A G C T G G C A A A A C T T T G C A G A G C A A ⁶¹⁰ ⁶²⁰ C A C A G G C A G A G A T G C G C A A A A S C G C T T C T T C C A A C G A G C C A A G C T C T G A G C C C T T G C T A G C C ⁶³⁰ ⁶⁴⁰ H R Q R C A A A S S N E P S S E P S L L A ⁶⁵⁰ ⁶⁶⁰ A G T C P E A V S I V K A T C G G T T C S T G T C A A G T T T C P T G C A G G V T G ⁶⁷⁰ ⁶⁸⁰ C A T C C C A A G G A G A C A A C C G A G G A A A C C C G T G T C A G C A G C T G G C A A A A C T T T G C A G A G C A A ⁶⁹⁰ ⁷⁰⁰ C A C A G G C A G A G A T G C G C A A A A S C G C T T C T T C C A A C G A G C C A A G C T C T G A G C C C T T G C T A G C C ⁷¹⁰ ⁷²⁰ A S P A R V A L G V T A C C A T G T T C A A A G A C G G T C G G T T C S T G T C A A G T T T C P T G C A G G V T G ⁷³⁰ ⁷⁴⁰ T C C A G T A C C A A C G C A G C G G T G C C C A A A A T A T C T C T A C G T C A A G A G T A T C G A C G T C T A C C T G ⁷⁵⁰ ⁷⁶⁰ S S T N A A L P K I S Y V K S I D V Y L ⁷⁷⁰ ⁷⁸⁰ G G C A C A T G T T F C G T A A T M V T F T T A C C G C G T C L G G A G T A C G C C G G T A G G A T Y C L T C ⁷⁹⁰ ⁸⁰⁰ G G C A A G A G A A T C A C C A T G A G G A A A A C C C G T G T C A G C A G C T G G C A A A A C T T T G C A G A G C A A ⁸¹⁰ ⁸²⁰ G C A G G C A G A G A T G C G C A A A A S C G C T T C T T C C A A C G A G C C A A G C T C T G A G C C C T T G C T A G C C ⁸³⁰ ⁸⁴⁰ A S P A R V A L G V T A C C A T G T T C A A A G A C G G T C G G T T C S T G T C A A G T T T C P T G C A G G V T G ⁸⁵⁰ ⁸⁶⁰ A G T C C C A A G G A G A T A T C C A T G T T C A A A G A C G G T C G G T T C S T G T C A A G T T T C P T G C A G G V T G ⁸⁷⁰ ⁸⁸⁰ G C A T C C C A A G G A G A C A A C C G A G G A A A C C C G T G T C A G C A G C T G G C A A A A C T T T G C A G A G C A A ⁸⁹⁰ ⁹⁰⁰ C A C A G G C A G A G A T G C G C A A A A S C G C T T C T T C C A A C G A G C C A A G C T C T G A G C C C T T G C T A G C C ⁹¹⁰ ⁹²⁰ H R Q R C A A A S S N E P S S E P S L L A ⁹³⁰ ⁹⁴⁰ A S P A R V A L G V T A C C A T G T T C A A A G A C G G T C G G T T C S T G T C A A G T T T C P T G C A G G V T G ⁹⁵⁰ ⁹⁶⁰ G C A T C C C A A G G A G A C A A C C G A G G A A A C C C G T G T C A G C A G C T G G C A A A A C T T T G C A G A G C A A ⁹⁷⁰ ⁹⁸⁰ G C A G A C C A A T G T T G C C C T G G T C T C C A G G G T T C A T G T C A G G T C T G C C C C G T G C G G T C G C C ⁹⁹⁰ ^{1,000} A S P A R V A L G V T A C C A T G T T C A A A G A C G G T C G G T T C S T G T C A A G T T T C P T G C A G G V T G ^{1,010} ^{1,020} G C A T C C C A A G G A G A C A A C C G A G G A A A C C C G T G T C A G C A G C T G G C A A A A C T T T G C A G A G C A A ^{1,030} ^{1,040} H R Q R C A A A S S N E P S S E P S L L A ^{1,050} ^{1,060} A S P A R V A L G V T A C C A T G T T C A A A G A C G G T C G G T T C S T G T C A A G T T T C P T G C A G G V T G ^{1,070} ^{1,080} G C A T C C C A A G G A G A C A A C C G A G G A A A C C C G T G T C A G C A G C T G G C A A A A C T T T G C A G A G C A A ^{1,090} ^{1,100} C A C A G G C A G A G A T G C G C A A A A S C G C T T C T T C C A A C G A G C C A A G C T C T G A G C C C T T G C T A G C C ^{1,110} ^{1,120} H R Q R C A A A S S N E P S S E P S L L A ^{1,130} ^{1,140} A S P A R V A L G V T A C C A T G T T C A A A G A C G G T C G G T T C S T G T C A A G T T T C P T G C A G G V T G ^{1,150} ^{1,160} G C A T C C C A A G G A G A C A A C C G A G G A A A C C C G T G T C A G C A G C T G G C A A A A C T T T G C A G A G C A A ^{1,170} ^{1,180} G C A G A C C A A T G T T G C C C T G G T C T C C A G G G T T C A T G T C A G G T C T G C C C C G T G C G G T C G C C ^{1,190} ^{1,200} A S P A R V A L G V T A C C A T G T T C A A A G A C G G T C G G T T C S T G T C A A G T T T C P T G C A G G V T G ^{1,210} ^{1,220} G C A T C C C A A G G A G A C A A C C G A G G A A A C C C G T G T C A G C A G C T G G C A A A A C T T T G C A G A G C A A ^{1,230} ^{1,240} G C A G A C C A A T G T T G C C C T G G T C T C C A G G G T T C A T G T C A G G T C T G C C C C G T G C G G T C G C C ^{1,250} ^{1,260} A S P A R V A L G V T A C C A T G T T C A A A G A C G G T C G G T T C S T G T C A A G T T T C P T G C A G G V T G ^{1,270} ^{1,280} G C A T C C C A A G G A G A C A A C C G A G G A A A C C C G T G T C A G C A G C T G G C A A A A C T T T G C A G A G C A A ^{1,290} ^{1,300} H R Q R C A A A S S N E P S S E P S L L A ^{1,310} ^{1,320} A S P A R V A L G V T A C C A T G T T C A A A G A C G G T C G G T T C S T G T C A A G T T T C P T G C A G G V T G ^{1,330} ^{1,340} G C A T C C C A A G G A G A C A A C C G A G G A A A C C C G T G T C A G C A G C T G G C A A A A C T T T G C A G A G C A A ^{1,350} ^{1,360} T S A C A A A C T C A C A A C A G G C T C C P C A C P A G G G A T A C C P T A T M G A A G V T A C R T C L A A A T G ^{1,370} ^{1,380} G T T G A C C C C A A A G G A T T C A G C A A A T C C T C G A C T C T G G A G A A C A C C G T C A A C C G G C G C G C C G ^{1,390} ^{1,400} G A C A T C G A G G C A G C G T T T T G C A A A G A A C C C A A C A A A T T A T T T G G C G T C G G C C C T T C C G A T ^{1,410} ^{1,420} H R Q R C A A A S S N E P S S E P S L L A ^{1,430} ^{1,440} A S P A R V A L G V T A C C A T G T T C A A A G A C G G T C G G T T C S T G T C A A G T T T C P T G C A G G V T G ^{1,450} ^{1,460} G C A T C C C A A G G A G A C A A C C G A G G A A A C C C G T G T C A G C A G C T G G C A A A A C T T T G C A G A G C A A ^{1,470} ^{1,480} G A C A T C G A G G C A G C G T T T T G C A A A G A A C C C A A C A A A T T A T T T G G C G T C G G C C C T T C C G A T ^{1,490} ^{1,500} I V K A T C G G T T C S T G T C A A G T T T C P T G C A G G V T G ^{1,510} ^{1,520} A T C G A C A A G T A C T C C C G A G T G G T G T T C C C G T T T G C T C G T C T G T T C G G C C T C A T G T A C ^{1,530} ^{1,540} I V K A T C G G T T C S T G T C A A G T T T C P T G C A G G V T G ^{1,550} ^{1,560} T G G A T C A T T T A C C T G C A C A T C A G C G A C G T T C T G C C G G A C G A C G T T G G C G A C G A C T A G ^{1,570} ^{1,580} W I I Y L H I S D V L P D C G D V G D D * ^{1,590} ^{1,600} ^{1,610} ^{1,617}

Abb. VIII.10 cDNA Sequenz und abgeleitete Aminosäuresequenz von RSRDL1

RsRDL2 1 A C C A T G A G G C 10 A G G C G A T G G C 20 G T T C A G T T G 30 C T G G T C C T T C 40 G T T C T C T T C G 50 T G G C C G T C G C 60 T

RsRDL2 G T C A C C A G T 70 G C C G G T C G G G A T A A T G G T C C 80 A G C C C C C T T G 90 C G G C C G G A C A 100 A A C G C A A C R T 120

RsRDL2 G G A C A A A A C 130 A T C A C G C A G A T T C T G A A T G C 140 C T T C T T T A C A C 150 G T G G G T A C G A C A G G A G G T G 180 G

RsRDL2 A G G C C A A A T 190 T A T G G C G G C G T T C C A G T G G A A G T T G G C G T C A C T A T G C A G A T T A T C A G C A T A 240 A

RsRDL2 A G T A C A G T C 250 T S E A A G T A C A A A T G G A C T T F A C T T S G G A C T F C T A T T F C C G G C A A T C S T G 300 G

RsRDL2 C G G G A C G A G 310 C G A C T C T C G T T C C A G A A A A G 320 C C C A G A C C T C 330 G A A A G C A T G A C 340 G G T C G G C G C 360 T

RsRDL2 G A A G T G G C C 370 G A E A G G A T C T G G G T A C C C G A C A C C T F C T T C G C A C A N G E A G A K A G A S C G C C T A C 420 C

RsRDL2 T T T C A T G C G 430 C C A C C A C G C C A A C A C T T T F C C T C G A A T C 440 G G T T C C G G A G 450 G A G A G G T C T T F 480 C

RsRDL2 C G C A G T A T T 490 C G A C T G A C G G T G A C T G C C A G S C T G C C C A A T M G G A D T C T C A G A T A C T F C C C G A T G 540 G

RsRDL2 G A C A G A C A A 550 G C T G C A C T A T A G A A A T A G A A A G T T T T G G T T A C A C C A T G A A A G A C A T C C G C 600 C

RsRDL2 T A C C G G T G T 610 C S G D A C G G C G A C A C T S C G T C C G A A T I G C C A K G G A G V T A G A G T L G C C G C A G 660 G

RsRDL2 T T C A A A G T C 670 C T C G G T C A C G T C C A A A A A G C A A A A G A G G T T G C C T A A C G A C A G G A A A C T A C 720 C

RsRDL2 T S C C G G C T L 730 G T T V T C G A A A T A C G G T T C G T C C G R T T C S A T M L G G T T A T T A C C T G A T C C A G A T C 780 C

RsRDL2 T A C A T C C C C 790 G C C A G T T T G A T C G T G G T T A T T T C G T G G G T C T C C T T T T G G C T C C A C C G T A A C 840 C

RsRDL2 G C T A C A C C A 850 G T C G C G T C T C C C T G G G C A T G A C C A C A G T G C T C A C C A T G A C C A C A C T C A T G 900 G

RsRDL2 T C C A G T A C C 910 A A C G C A G C A C T A A A A T C T C G T A C G T G A A G A G T A C G A C A T C T A C C T G 960 G

RsRDL2 G G G A C T T G T 970 T T C G T A A T G G T G T T T G C C T C 980 G C T C C T G G A G T A C G C C G G V T A G G A T A T C T G 1,020 G

RsRDL2 G G C A A G A R A 1,030 A T C G C C A T G A G R A A G C C C R C T G C C A A C A G C T L G G C T A A G C T L G G C C G A E A G A G 1,080 G

RsRDL2 C A C A G A C A G 1,090 A K A G C G A G C T A A A C G C C G C T T S G G C A G G T G A A G C C G G C T C A G A G C C C T T G C T G 1,140 G

RsRDL2 G C C A G T C C T 1,150 G A E A G T G C C P G G T A G V C A A G A C T G G T V C G G T T S C C T G T C A A G V T T T C T G C P T G C T A G C G 1,200 G

RsRDL2 G T G G C A T C C 1,210 C A A G G A C A A C C G A G G A A G C A C C A C C A A C C G G A T T T A C C A T G G G T C G C A G A 1,260 G

RsRDL2 G G C G C A G A D 1,270 C A A T G T T C C C C T G G T C L T C C A Q G G G T T S A T G T C A G G T V T G C C C C G C T G C G G V T C 1,320 G

RsRDL2 G C C T C A C A A 1,330 A C T C A A C A A C A G G C T C C T C C 1,340 A C C A G G A T A C C T A T G A A T C A C A A A G T C A G 1,380 G

RsRDL2 G A G C C T T A T 1,390 G G A C T A T G G T G G T T A T G C C P G A G S A G R A A C T G T C A C A T A A C C G G C T G C C A C 1,440 C

RsRDL2 G A A G T A C G T 1,450 C T C A A A A T G G T T G A C C C C A A A G G A T T C A G C A A A T C C T C G A C T C T G G A G A A C 1,500 C

RsRDL2 A C C G T C A A C 1,510 G G C G C G C G G G A C A T C G A G G C A G C G T T T T G C A A G A A C C C A A C A A A T T A T T F 1,560 T

RsRDL2 G G C G T C A G C 1,570 C C C T T C C G A T A T C G A C A A G T A C T C C C G A G T G T G T T C C C G V T T T C C T T C G T C 1,620 C

RsRDL2 T G T T T C G A C 1,630 C T C A T G T A C T G G A T C A T T T A Y C C T G C A C A T C A S D V T L T G C C G G A C G A C 1,680 C

RsRDL2 G T T G G C G A C 1,690 G A C T A G * 1,695

Abb. VIII.11 cDNA Sequenz und abgeleitete Aminosäuresequenz von RSRDL2

RsRDL3 ¹ A C C A T G A G G C ¹⁰ A G G C G A T G G ²⁰ C G T T C A G T T G ³⁰ C T G G T C C T T C ⁴⁰ G T T C T C T T C G ⁵⁰ T G G C C G T C G C ⁶⁰ T
 T M R Q A M A F S C W S S F V L F V A V A
 RsRDL3 ⁷⁰ G T C A C C A G T G ⁸⁰ C C G G T C G G G ⁹⁰ A T A A T G G T C ¹⁰⁰ A G C C C C C T G C ¹¹⁰ G G C C G G G A C ¹²⁰ A A A C G C A A C G T
 V T S A G R D N G P A P L R P G Q T Q R
 RsRDL3 ¹³⁰ G G A C A A A A C ¹⁴⁰ A T C A C G C A G A ¹⁵⁰ T T C T G A A T G C ¹⁶⁰ C T T C T T A C ¹⁷⁰ A C G T G G G T A C G ¹⁸⁰ A C A G G A G G G T G
 G N C I T C Q I T N A F T F T A C R G G Y D C A G R G V
 RsRDL3 ¹⁹⁰ A G G C C A A A T ²⁰⁰ T A T G G C G G C G ²¹⁰ T T C C A G T G G A ²²⁰ A G T T G G C G T C ²³⁰ A C T A T G C A G A ²⁴⁰ T T A T C A G C A T A
 R P N T Y T G V P V E V G V T M Q I I S I
 RsRDL3 ²⁵⁰ A G T A C A G T C T ²⁶⁰ C T G A A G T A C ²⁷⁰ A A A T G G A C T T ²⁸⁰ T A C T T C G G A C T ²⁹⁰ T C T A T T T C C ³⁰⁰ G G C A A T C G T G G
 S T V S E V Q M D F T S D F Y F R Q S W
 RsRDL3 ³¹⁰ C G G G A C G A G ³²⁰ C R G A C T C T S G T ³³⁰ T C C A G A A A A S ³⁴⁰ C C C A G A C C T C G ³⁵⁰ A A A G C A T G A ³⁶⁰ C G G T C G G C G A T
 G D E R L T C T F C Q K S P A D A C L E S A M T G T V C G G C A T
 RsRDL3 ³⁷⁰ G A A G T G G C C G ³⁸⁰ A G A A G A T C T ³⁹⁰ G G G T A C C C G A ⁴⁰⁰ C A C T T C T T C ⁴¹⁰ G C C A A C G A G A ⁴²⁰ A G A G C G C C T A C
 E V A E K I W V A P D T F F A N E K S A Y
 RsRDL3 ⁴³⁰ T T T C A T G C G G ⁴⁴⁰ C C A C C A C G C C ⁴⁵⁰ C A A C A C T T T ⁴⁶⁰ C C T C C G A A T C ⁴⁷⁰ G G T T C C G G A G ⁴⁸⁰ G A G A G G T C T T C
 F H A A T T P N T F L R I G S G G E V F
 RsRDL3 ⁴⁹⁰ C G C A G T A T T ⁵⁰⁰ C G A C T G A C G G T ⁵¹⁰ G A C T G C C A G S ⁵²⁰ T G C C C A A T G G A T C T C A G A T ⁵³⁰ A C T T C C C P A T G
 R S T I V L T V A T A S T G C P A M G D T C L A R A Y T F C C G A M
 RsRDL3 ⁵⁴⁰ G A C A G A C A A G ⁵⁵⁰ C G T G C A C T A T A G ⁵⁶⁰ A A A T A G A A A G ⁵⁷⁰ T T T T G G T T A C A C C A T G A ⁵⁸⁰ A A G A C A T C C C G C
 D R Q A C T I E I E S F G T Y T M K D I R
 RsRDL3 ⁵⁹⁰ T A C C G G T G G T ⁶⁰⁰ C G G A C G G C G A ⁶¹⁰ C A C G T C C G T C ⁶²⁰ C G A A T C G C C A A G G A G G T A G ⁶³⁰ A G T T G C C G C A G
 Y R W S D G D T S V R I A K E V E L P Q
 RsRDL3 ⁶⁴⁰ T T C A A A G T C ⁶⁵⁰ C T G G T C A G T C C ⁶⁶⁰ A A A A G C A A A G A G G T T G ⁶⁷⁰ C C C T A A C G A C A G G A A A C T A C
 T F K A V L H V Q A K A K E V T G C C T A A T T A T T A C
 RsRDL3 ⁶⁸⁰ T C C C G G C T G G ⁶⁹⁰ T T T G C G A A A T A C ⁷⁰⁰ G G T T C G T C C G T T C C A T G G G T T A T T A C C ⁷¹⁰ T G A T C C A G A T C
 S R L V C E I R F V C R S M G Y Y L I Q I
 RsRDL3 ⁷²⁰ T A C A T C C C C G ⁷³⁰ C C A G T T T G A T C G T ⁷⁴⁰ G G T T A T T T C G T G G G T C T C C T T T T G G C ⁷⁵⁰ T C C A C C G T A A C
 Y I P A S L I V V I S W V S F W L H R N
 RsRDL3 ⁷⁶⁰ G C T A C A C A G C ⁷⁷⁰ T C R G C G T C T C ⁷⁸⁰ S C L T G G G C G T G A C C A C A G T G C T C A C C A T G A C C A C A C T C A T G
 A T P A R V S C L V V T A C V L L M T G C T A C A T G A T C A C A C T C A M
 RsRDL3 ⁷⁹⁰ T C C A G T A C C A ⁸⁰⁰ C G C A G C A C T G C C T A A A A T ⁸¹⁰ C T C G T A C G T G A A G A G T A T C G ⁸²⁰ A C A T C T A C C T G
 S S T N A A L P K I S Y V K S I D I Y L
 RsRDL3 ⁸³⁰ G G G A C T T G T T ⁸⁴⁰ T F G T A A T G G T G T T G C C T C ⁸⁵⁰ G C T C C T G G A G T A C G C C A C G G T A G G A T A T C T G
 G T C V M V F A S L L L E Y A T V G V L G Y L
 RsRDL3 ⁸⁶⁰ G G C A A G A G A A ⁸⁷⁰ T C G C C A T G A G G A A A G C C C G C T G C C A A C A G C T G G C A A A G C T G G C C G A A G E
 G K R A I A C R R K A C R Q L A A K L A A E E
 RsRDL3 ⁸⁸⁰ C A C A G A C A G A ⁸⁹⁰ A G C G A G C T A A C G C C G C T T C ⁹⁰⁰ G C C G G T G A A G C C G C T C A G A G C C C T T G C T A
 H R Q A K R A N A A S A G E A G S E P L L
 RsRDL3 ⁹¹⁰ G C C A G T C C T G A ⁹²⁰ A G T G C C G G T A G T C A A G A C ⁹³⁰ G T C G G T C G C G G A G G C G C A G A C C A A T G T T C
 A S P E V P V K T V G G R G G A G A D Q C C
 RsRDL3 ⁹⁴⁰ C C T G G T C T C A ⁹⁵⁰ G G T T C A T G T C A G G T C T G C C C G C T G C G G T C G C C T C A C A A A C T C A A C A A
 P G L Q G S C Q P A A V A S Q A T Q Q
 RsRDL3 ⁹⁶⁰ C A G G C T C C T C A ⁹⁷⁰ C C A C A G G A T A C C T A T G A A T C A C A A A G T C A G G G A G C C T T A T A G G A C T A T G
 Q A P P G I P M N H K V R E P Y R T M
 RsRDL3 ⁹⁸⁰ G T G G T T A T G C ⁹⁹⁰ C P S A G C A G G A A C T G T C A C A T A A C C G G C T G C C A C G A A G T A C G T C T C A A A A T G
 V V M P R N C H I T G C H E A V R L K M
 RsRDL3 ¹⁰⁰⁰ G T T G A C C C A A ¹⁰¹⁰ G G G A T T C A G S C A A A T C C T C G A C T C T G G A G A A C A C C G T C G G C G G C G C C G
 V D P K G F S A K S S G T L E N T V G G G A P
 RsRDL3 ¹⁰²⁰ G A C A T C G A G G C ¹⁰³⁰ A G C G T T T G C A A G A A C C C A A C A A T T A T T G G C G T C A G C C C T C C G A T
 D I E A A F C K N P A N K A L F G G V S P S D
 RsRDL3 ¹⁰⁴⁰ A T C G A C A A G T A ¹⁰⁵⁰ C T C C C G A G T G G T G T T C C C G T T T C G T C T G T T C G A C C T C A T G T A C
 I D K Y S R V F P V C F V C T F G T F D L M Y
 RsRDL3 ¹⁰⁶⁰ T G G A T C A T T T A ¹⁰⁷⁰ C C T G C A C A T I S G A C G T C T G C C G G A C G A C G T T G G C G A C G A C T A G
 W I I Y L H I S D V L P F D A C V G G D D *

Abb. VIII.12 cDNA Sequenz und abgeleitete Aminosäuresequenz von RSRDL3

VIII.2 Abkürzungsverzeichnis

| | | | |
|---------|---|-------|--|
| AS | Aminosäuren | ORF | Offener Leserahmen |
| 3-APS | 3-Aminopropan-1-sulfonsäure | PCR | Polymerase-Kettenreaktion |
| bp | Basenpaare | rdl | resistance to dieldrin |
| Cafty | Calcium-freie Tyrode | RFU | Raw Fluorescence Unit |
| cDNA | komplementäre DNA | RNA | Ribonukleinsäure |
| CI | Konfidenzintervall | rpm | Umdrehungen pro Minute |
| ZNS | Zentralnervensystem | RT | Reverse Transkription |
| DNA | Desoxyribonukleinsäure | s | Sekunde |
| dNTP | Desoxynukleotid-Triphosphat | SD | Standardabweichung |
| EDTA | Ethylendiamintetraessigsäure | SDS | Sodiumdodecylsulfat |
| FBS | Fötales Kälberserum (fetal bovine serum) | SOC | Super Optimal Broth Medium |
| g | Gramm | TAE | Tris-Acetat-EDTA |
| x g | Erdbeschleunigung | TEVC | Zwei-Elektroden- Spannungsklemme (Two-Electrode Voltage Clamp) |
| GABA | γ -Aminobuttersäure | THIP | 4,5,6,7-Tetrahydroisoxazolo [5,4-c]pyridin-3-ol hydrochloride |
| Std | Stunde(n) | TM | Transmembrandomäne |
| kb | Kilobasenpaare | Tris | Tris (hydroxymethyl)-aminoethan |
| l | Liter | U | Unit/ Einheit |
| μ g | Mikrogramm | UPGMA | Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean |
| μ M | Mikromolar | UV | Ultraviolett |
| mg | Milligramm | vs | versus (lat. gegenübergestellt) |
| min | Minute(n) | v/v | Volumen pro Volumen |
| nAChR | nikotinischer Acetylcholinrezeptor | w/v | Gewicht pro Volumen |
| nM | Nanomolar | w/w | Gewicht pro Gewicht |
| ml | Milliliter | | |
| OD | Optische Dichte | | |
| OP | Organophosphat | | |

VIII.3 Abbildungsverzeichnis

| | | |
|------------|--|----|
| Abb. I.1 | Klassische Systematik der Zecken nach Hoogstraal (PAROLA, 2001)..... | 2 |
| Abb. I.2 | Morphologie einer Schildzecke am Beispiel von <i>Hyalomma</i> | 3 |
| Abb. I.3 | Adulte weibliche Schildzecken..... | 4 |
| Abb. I.4 | Lebensstadien von <i>Rhipicephalus (Boophilus) microplus</i> | 5 |
| Abb. I.5 | Lebensstadien von <i>Ixodes ricinus</i> | 6 |
| Abb. I.6 | Lebensstadien von <i>Rhipicephalus sanguineus</i> | 7 |
| Abb. I.7 | Strukturformeln bekannter Vertreter von Arthropodiziden aus verschiedenen chemischen Klassen | 12 |
| Abb. I.8 | Struktur des GABA-gesteuerten Chloridkanals | 19 |
| Abb. II.1 | Schematischer Ablauf des Membranpotential-Assays am Beispiel einer Messung von DMSO und Fipronil mit 20 μ M GABA..... | 47 |
| Abb. III.1 | Sequenz-Alignment der publizierten GABA-Rezeptor RDL-Sequenzen aus Zecken mit verschiedenen orthologen Sequenzen aus den Insekten <i>Drosophila melanogaster</i> , <i>Musca domestica</i> und <i>Aedes aegypti</i> | 50 |
| Abb. III.2 | Amplifikation der <i>rdl</i> -Gene aus verschiedenen Zeckenspezies unter Verwendung des für die Sequenz aus <i>Rhipicephalus (Boophilus) microplus</i> spezifischen Primerpaares RmRdIF und RmRdIR | 51 |
| Abb. III.3 | Vorhersage der Sekundärstruktur von IRRDL | 53 |
| Abb. III.4 | Signalpeptid-Vorhersage in RMRDL1 | 54 |
| Abb. III.5 | Sequenz-Alignment der identifizierten GABA-Rezeptor RDL-Sequenzen aus den untersuchten Zeckenspezies..... | 55 |
| Abb. III.6 | Phylogenetischer Stammbaum von RDL-Untereinheiten verschiedener Zecken- und Insekten-Spezies basierend auf einem Aminosäurenvergleich und mittels UPGMA (Unweighted Pair Group Method)-Verfahren generiert | 56 |
| Abb. III.7 | Integritätsanalyse durch native Agarose-Gelelektrophorese der denaturierten synthetisierten cRNA..... | 57 |
| Abb. III.8 | Expressionstest der identifizierten homopentameren RDL-Rezeptor-Untereinheiten der drei Zeckenspezies | 59 |

| | | |
|--------------|---|-----|
| Abb. III.9 | Dosis-abhängige Aktivierung der IRRDL- und RMRDL1-Homooligomere exprimiert in <i>Xenopus laevis</i> Oozyten durch die Agonisten GABA und Muscimol | 61 |
| Abb. III.10 | Dosis-abhängige Inhibition der IRRDL- und RMRDL1-Homooligomere exprimiert in <i>Xenopus laevis</i> -Oozyten durch verschiedene Antagonisten | 63 |
| Abb. III.11 | Membranpotential-Assay mit nicht transfizierten und mit dem nicht klonierten Vektor pcDNA3.1(+) transfizierten CHO- Zellen..... | 66 |
| Abb. III.12 | Zusammenfassung der Selektionsmethoden zur Generation der stabilen Zelllinie. | 67 |
| Abb. III.13 | Klonselektion nach Transfektion mit <i>rmdl1/</i> pcDNA3.1(+). | 68 |
| Abb. III.14 | Subklonierung des expandierten Klons 2F4..... | 70 |
| Abb. III.15 | Zeitabhängige Einlagerung des blauen Farbstoffes der MPA-Lösung in 2F4-5F4 .. | 71 |
| Abb. III.16 | Einfluss verschiedener Tyroden auf den Membranpotential-Assay | 72 |
| Abb. III.17 | Membranpotential-Assay mit verschiedenen Zellzahlen..... | 74 |
| Abb. III.18 | DMSO-Toleranz des Membranpotential-Assays | 76 |
| Abb. III.19 | Dosis-abhängige Stimulation und Inhibition des stabil in CHO-Zellen exprimierten RMRDL1-Homooligomers durch GABA und α -Endosulfan..... | 77 |
| Abb. IV.1 | Strukturformeln der getesteten Agonisten | 93 |
| Abb. VIII.1 | Plasmidkarte des Konstruktes <i>irrdll</i> pcDNA3.1(+). | 122 |
| Abb. VIII.2 | Plasmidkarte des Konstruktes <i>rmdl1/</i> pcDNA3.1(+) | 123 |
| Abb. VIII.3 | Plasmidkarte des Konstruktes <i>rmdl2/</i> pcDNA3.1(+) | 124 |
| Abb. VIII.4 | Plasmidkarte des Konstruktes <i>rsrd1/</i> pcDNA3.1(+) | 125 |
| Abb. VIII.5 | Plasmidkarte des Konstruktes <i>rsrd2/</i> pcDNA3.1(+) | 126 |
| Abb. VIII.6 | Plasmidkarte des Konstruktes <i>rsrd3/</i> pcDNA3.1(+) | 127 |
| Abb. VIII.7 | cDNA Sequenz und abgeleitete Aminosäuresequenz von IRRDL..... | 128 |
| Abb. VIII.8 | cDNA Sequenz und abgeleitete Aminosäuresequenz von RMRDL1 | 129 |
| Abb. VIII.9 | cDNA Sequenz und abgeleitete Aminosäuresequenz von RMRDL2..... | 130 |
| Abb. VIII.10 | cDNA Sequenz und abgeleitete Aminosäuresequenz von RSRDL1 | 131 |
| Abb. VIII.11 | cDNA Sequenz und abgeleitete Aminosäuresequenz von RSRDL2 | 132 |
| Abb. VIII.12 | cDNA Sequenz und abgeleitete Aminosäuresequenz von RSRDL3 | 133 |

VIII.4 Tabellenverzeichnis

| | | |
|------------|--|----|
| Tab. II.1 | Bezeichnungen, Sequenzen und Verwendungszweck der eingesetzten Primer | 32 |
| Tab. II.2 | Zusammensetzung und Reaktionsbedingungen der durchgeführten Polymerase-Kettenreaktionen..... | 35 |
| Tab. III.1 | Sequenz-Eigenschaften der <i>rdl</i> -Sequenzen von <i>I. ricinus</i> , <i>R. microplus</i> und <i>R. sanguineus</i> aus dieser Studie | 52 |
| Tab. III.2 | Übersicht der Expressionseigenschaften der RDL-Homooligomere der identifizierten Sequenzen aus drei Zeckenspezies | 58 |
| Tab. III.3 | Zusammenfassung der pharmakologischen Eigenschaften von IRRDL und RMRDL gegenüber bekannten Agonisten des GABA _A -Rezeptors | 62 |
| Tab. III.4 | Zusammenfassung der pharmakologischen Eigenschaften von IRRDL und RMRDL gegenüber bekannter Antagonisten des GABA _A -Rezeptors..... | 64 |
| Tab. III.5 | Zusammenfassung der Parameter aus Dosis-Wirkungs-Kurven von GABA zur Bestimmung der optimalen Zellzahl. | 75 |
| Tab. III.6 | Zusammenfassung der pharmakologischen Eigenschaften des stabil in CHO-Zellen exprimierten RMRDL1 gegenüber bekannten Agonisten und Antagonisten des GABA _A -Rezeptors gemessen im Membranpotential-Assay..... | 79 |

VIII.5 Selbstständigkeitserklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Dissertation selbstständig verfasst habe und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt habe. Wörtlich und inhaltlich übernommene Gedanken wurden als solche kenntlich gemacht. Die Dissertation wurde in der vorgelegten oder in ähnlicher Form noch bei keiner anderen Institution eingereicht.

Ich habe bisher keine erfolglosen Promotionsversuche unternommen.

Dormagen, den _____

Melania Akköse

VIII.6 Veröffentlichungen und Tagungsbeiträge

JOANNOU M., TURBERG A.

(2010): "In-vitro characterization of susceptibility pattern of field and laboratory flea strains against ectoparasitocides" in Form eines Vortrags. Tagung der Deutschen Gesellschaft für Parasitologie, 16. - 20. März 2010, Düsseldorf (Deutschland)

JOANNOU M., WILLIAMSON M., TURBERG A.

(2011): „Analyzing targets and enzymes relevant for acaricide resistance by pyrosequencing the transcriptome of ixodid ticks“ in Form eines wissenschaftlichen Posters. Seventh Ticks and Tick-borne Pathogens International Conference, 28. Aug - 2. Sept 2011, Zaragoza (Spanien)

JOANNOU M., WILLIAMSON M., TURBERG A.

(2011): „GABA-gated Chloride Channels in Ticks“ in Form eines wissenschaftlichen Posters. Sixth International Symposium on Molecular Insect Science, 2. - 5. Okt 2011, Amsterdam (Niederlande)

AKKOESE M., MUELLER T., TURBERG A.

(2012): „Molecular and Functional Analysis of GABA-gated Chloride Channels in Ticks: Promising Targets for New Acaricidal Compounds“ in Form eines wissenschaftlichen Posters. Bayer Science Day 23. Okt 2012, Köln (Deutschland)

VIII.7 Danksagung

Bei Herrn Prof. Dr. Georg Groth möchte ich mich für die Übernahme des Erstgutachtens, für seine ständige Diskussionsbereitschaft und sein Interesse an einem Thema der „etwas anderen Art“ bedanken.

Herrn Prof. Dr. Dieter Willbold danke ich für die freundliche Übernahme des Koreferats.

Ein besonderer Dank gilt Herrn Dr. Andreas Turberg für die Möglichkeit ein vielseitiges, interessantes Thema zu bearbeiten, für die intensive Betreuung der Arbeit, für wertvolle Hilfestellungen und Diskussionen und für die kritische Durchsicht des Manuskripts. Ich danke ihm dafür, dass er mich immer unterstützt und ermutigt hat, an mich selbst zu glauben.

Many thanks to Prof. Linda Field for the great collaboration and for the provision of a temporary work place at Rothamsted Research. A special thank goes to Dr. Martin Williamson for his great support with the molecular-biological experiments, for always taking the time to answer my questions and for a lot of funny moments in the lab.

Herrn Dr. Horst-Peter Antonicek und Herrn Roland Kunze danke ich für die Unterstützung bei den initialen elektrophysiologischen Experimenten an Oozyten.

Bei Herrn Dr. Thomas Müller von Bayer Healthcare bedanke ich mich für die Bereitstellung des zeitweiligen Arbeitsplatzes, seine ständige Diskussionsbereitschaft und engagierte Unterstützung während der zellbiologischen Arbeiten. Ein besonderer Dank geht hierbei an Magdalena Platzk für die Unterstützung bei der Entwicklung der stabilen Zelllinie, die Einweisung in die Grundlagen der Zellkultur und für manches spontane Einspringen im Labor.

Herrn Prof. Dr. Thomas Ilg danke für die kritische Durchsicht des Manuskriptes und seine konstruktive Kritik.

Allen Labormitarbeitern der Bayer Animal Health GmbH danke ich für das nette Klima und die tolle Unterstützung. Besonders Ilona Hanussek und Marion Hilgers, die so oft meine Vergesslichkeit kompensiert, gute Nachrichten mit mir gefeiert und mich in schwierigen Phasen wieder aufgebaut haben.

Frau Dr. Anna Lena Reinbeck danke ich für ihre Freundschaft, ihre unermüdliche Unterstützung, für stundenlanges Fachsimpeln, wöchentliche Portionen Motivation in der Endphase der Arbeit und dafür, dass wir immer das gleiche denken.

Meinen Eltern gilt besonderer Dank für die Ermöglichung des gesamten Studiums, dass sie immer an mich geglaubt haben und aus mir den Menschen gemacht haben, der ich heute bin.

Mein größter Dank gilt meinem Ehemann Ismail für seine Liebe, Geduld und bedingungslose Unterstützung. Ich danke ihm dafür, dass alle Höhen mit ihm doppelt so schön und alle Tiefen halb so schlimm waren, dass er immer an meiner Seite ist und für alles, wofür man keine Worte finden kann. Ohne ihn wäre ich nie so weit gekommen.