

(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES
PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum
14. März 2002 (14.03.2002)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer
WO 02/20830 A2

(51) Internationale Patentklassifikation⁷:
1/02, 1/68, C12N 15/00, C07K 14/435

C12Q 1/25,

(74) Gemeinsamer Vertreter: **BAYER AKTIENGESELLSCHAFT**; 51368 Leverkusen (DE).

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP01/09771

(22) Internationales Anmeldedatum:
24. August 2001 (24.08.2001)

(25) Einreichungssprache: Deutsch

(26) Veröffentlichungssprache: Deutsch

(30) Angaben zur Priorität:
100 44 098.3 7. September 2000 (07.09.2000) DE
100 53 785.5 30. Oktober 2000 (30.10.2000) DE

(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme von US): **BAYER AKTIENGESELLSCHAFT** [DE/DE]; 51368 Leverkusen (DE).

(72) Erfinder; und

(75) Erfinder/Anmelder (nur für US): **VON SAMSON-HIMMELSTJERNA, Georg** [DE/DE]; Neuenkamper Str. 21, 42657 Solingen (DE). **HARDER, Achim** [DE/DE]; Europa Ring 54, 51109 Köln (DE). **WUNDERLICH, Frank** [DE/DE]; Burgstr. 31, 41469 Neuss (DE). **SCHMITT-WREDE, Hans-Peter** [DE/DE]; An der Wolfskaul 18, 41812 Erkelenz (DE). **SAEGER, Beate** [DE/DE]; Werstener Feld 48, 40591 Düsseldorf (DE).

(81) Bestimmungsstaaten (national): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.

(84) Bestimmungsstaaten (regional): ARIPO-Patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI-Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Veröffentlicht:

— ohne internationalen Recherchenbericht und erneut zu veröffentlichen nach Erhalt des Berichts

Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes und der anderen Abkürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on Codes and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe der PCT-Gazette verwiesen.

(54) Title: TEST SYSTEMS AND THE USE THEREOF FOR IDENTIFYING AND CHARACTERIZING COMPOUNDS

(54) Bezeichnung: TESTSYSTEME UND DEREN VERWENDUNG ZUR IDENTIFIZIERUNG UND CHARAKTERISIERUNG VON VERBINDUNGEN

(57) Abstract: The invention relates to test systems that are based on transmembrane receptors from helminths and arthropods and to their use for identifying and characterizing substances that are effective against helminths, arthropods or that have an effect on the calcium metabolism of organisms and/or cells. The invention further relates to the use of a specific ligand in said test system and to the use thereof as an anthelmintic or arthropodan active substance.

(57) Zusammenfassung: Die Erfindung betrifft auf Transmembranrezeptoren aus Helminthen und Arthropoden basierende Testsysteme und deren Verwendung zur Identifizierung und Charakterisierung von Stoffen mit Wirkungen gegen Helminthen, Arthropoden oder mit Wirkung auf den Calciumhaushalt von Organismen und/oder Zellen. Die Erfindung betrifft weiterhin die Verwendung eines spezifischen Liganden in diesem Testsystem und dessen Verwendung als anthelmintischer oder arthropodizider Wirkstoff.



WO 02/20830 A2

Testsysteme und deren Verwendung zur Identifizierung und Charakterisierung von Verbindungen

- 5 Die vorliegende Erfindung betrifft auf Transmembranrezeptoren aus Helminthen und Arthropoden basierende Testsysteme und deren Verwendung zur Identifizierung und Charakterisierung von Stoffen mit Wirkungen gegen Helminthen, Arthropoden oder mit Wirkung auf den Calciumhaushalt von Organismen und/oder Zellen. Die Erfindung betrifft weiterhin die Verwendung eines spezifischen Liganden in diesem
- 10 Testsystem und dessen Verwendung als anthelmintischer oder arthropodizider Wirkstoff.

Parasitische Helminthen und Arthropoden stellen für Menschen und Tiere ein erhebliches Gesundheitsproblem dar. Allein im Bereich der Landwirtschaft betragen die

15 jährlich zur Bekämpfung oder Vermeidung von derartigen Parasiten hervorgerufenen Schädigungen weltweit mehr als 7 Mrd. DM (Stand 1997). Zur Behandlung von durch die vorwiegend von Helminthen verursachten Endoparasitosen, sowie die in erster Linie durch Arthropoden hervorgerufenen Ektoparasitosen stehen eine große Zahl von Wirksubstanzen aus einer Reihe von Wirkstoffklassen zur Verfügung.

20 Während der letzten zwei Jahrzehnte haben insbesondere derartige Wirkstoffe, die gleichzeitig eine sehr gute Wirkung gegen mehrere Parasitenspezies innerhalb eines Stammes (z.B. Helminthen), oder sogar über verschiedene zoologische Stämme hinweg (z.B. Helminthen und Insekten) aufweisen, an Bedeutung gewonnen. Zu ersteren zählen unter anderem die Breitspektrumanthelmintika wie z.B. die Benzimidazole oder die Imidazothiazole, während die makrozyklischen Laktone zu den letzteren

25 zählen.

Mit den makrozyklischen Laktonen wurde zuletzt vor ca. zwei Jahrzehnten eine neue, breit wirksame Wirkstoffgruppe in den Markt eingeführt. Inzwischen haben je-

30 doch eine Vielzahl von Endo-, als auch Ektoparasitenspezies Resistenzen gegen Vertreter einzelner, teilweise auch mehrerer Wirkstoffklassen gleichzeitig entwickelt.

Daher besteht ein ständiger und zunehmend dringender Bedarf, neue antiparasitisch wirksame Substanzen zu entwickeln.

Zu den wenigen neuen aussichtsreichen Wirkstoffgruppen, an denen gegenwärtig gearbeitet wird, gehören die cyclischen Depsipeptide, welche Gegenstand umfangreicher Patent- (WO 93/19053, EP-OS 626 376, WO 94/19334, WO 95/07272, EP-OS 626 375, EP-OS 657 171, EP-OS 657 172, EP-OS 657 173) und Forschungsaktivitäten sind (Conder et al. 1995; Martin et al. 1996; Sasaki et al. 1992; Terada M 1992; Samson-Himmelstjerna et al. 2000) .

Zur Aufklärung des Wirkmechanismus eines Vertreters dieser Wirkstoffgruppe, dem PF 1022A (cyclo(-D-Lac-L-MeLeu-D-PhLac-L-MeLeu-)₂) sind bereits mehrere Studien beschrieben worden (vgl. dazu Angaben in DE-A-197 04 024). Dazu gehörte auch die Identifizierung und Charakterisierung eines spezifischen Bindungsproteins für zyklische Depsipeptide und der für das Protein kodierenden DNA-Sequenz aus dem Schafparasiten *Haemonchus contortus* (DE-A-197 04 024). Im Rahmen der hier vorliegenden Erfindung wird die funktionale Interaktion des o.a. Proteins, genannt HC110-R, unter anderem mit dem Liganden BAY 44-4400 (cyclo(-D-Lac-L-MeLeu-D-p-Morpholinyl-PhLac-L-MeLeu-), als einem weiteren Vertreter der zyklischen Depsipeptide beschrieben. Dazu wurden rekombinante eukaryotische Zelllinien konstruiert, in denen das HC110-R, basierend auf der in der früheren Anmeldung DE-A-197 04 024 beschriebenen Sequenz ID No. 2, exprimiert wird.

Der vorliegenden Erfindung liegt demnach insbesondere die Aufgabe zugrunde, auf Basis von Transmembranrezeptoren von Helminthen und Arthropoden, bevorzugt aus Nematoden und Akarina, besonders bevorzugt aus Trichostrongylidae, ganz besonders bevorzugt aus *Haemonchus* spp. und insbesondere auf Basis des Rezeptors HC110-R aus *H. contortus*, Testsysteme mit einem hohen Durchsatz an Testverbindungen (High Throughput Screening Assays; HTS-Assays) bereitzustellen.

Als homologe Proteine werden solche Proteine betrachtet, die eine zumindest 70 %ige Identität, vorzugsweise 80 %ige Identität, besonders bevorzugt 90 %ige Identität, ganz besonders bevorzugt 95 %ige Identität, mit einer Sequenz gemäß SEQ ID NO: 2 des Dokuments DE-A-197 04 024, dessen Inhalt ausdrücklich Teil der vorliegenden Anmeldung sein soll, über eine Länge von wenigstens 20, vorzugsweise wenigstens 25, besonders bevorzugt wenigstens 30 fortlaufenden Aminosäuren und ganz besonders bevorzugt über deren Gesamtlängen aufweisen.

Der Grad der Identität der Aminosäuresequenzen wird vorzugsweise bestimmt mit Hilfe des Programms GAP aus dem Programmpaket GCG, Version 9.1 unter Standardeinstellungen (Devereux et al. 1984).

Die Aufgabe wird gelöst durch die Bereitstellung von Polypeptiden, welche zumindest eine biologische Aktivität eines GPCR-Rezeptors ausüben sowie durch die Bereitstellung eines Verfahrens zur Gewinnung dieser Polypeptide und durch die Bereitstellung von Verfahren zum Identifizieren von nematizid und arthropodizid wirksamen Verbindungen.

Auf rekombinanten Mikroorganismen basierende Testsysteme wurden bereits vielfältig zur Identifizierung von pharmazeutisch wirksamen Substanzen verwendet, unter anderem auch unter Verwendung von Mikroorganismen, die rekombinant parasitische Gene exprimieren (Klein und Geary 1997). Bisher sind jedoch keine Systeme bekannt, in denen parasitische Transmembranrezeptoren als rekombinante, funktionale Proteine in eukaryotischen Zellen als Targets verwendet werden. Durch die in dieser Erfindung beschriebenen Prüfsysteme lassen sich im High-Throughput-Screening (HTS), bzw. im Ultra-HTS neue Agonisten und Antagonisten dieser neuen Rezeptorklasse identifizieren.

Die rekombinante Expression von Rezeptoren aus Nematoden hat sich regelmäßig als schwierig erwiesen. So ist es bisher im allgemeinen nicht gelungen, G-Protein gekoppelte Rezeptoren (GPCR) aus Nematoden so zu exprimieren, dass ihre funktionalen

Eigenschaften (z.B. Empfindlichkeit gegenüber Inhibitoren) denen natürlicher Rezeptoren entspricht.

5 Es ist von großer praktischer Bedeutung, beispielsweise für die Suche nach neuen Anthelmintika oder Arthropodiziden, Rezeptoren aus Helminthen, insbesondere Nematoden sowie aus Arthropoden in eukaryotischen Systemen funktionell auszuprägen.

10 Der vorliegenden Erfindung liegt somit auch die Aufgabe zu Grunde, eine Möglichkeit zur Expression von Transmembranrezeptoren, vor allem von GPC-Rezeptoren aus Nematoden und Arthropoden bereit zu stellen und darauf basierend ein Testsystem zu entwickeln, das die Identifizierung von neuen nematizid und arthropodizid wirksamen Substanzen ermöglicht.

15 Die vorliegende Erfindung betrifft somit insbesondere die Expression und Verwendung eines orphanen G-Protein-gekoppelten Rezeptors aus Helminthen und Arthropoden, bevorzugt aus Nematoden und Akarina, besonders bevorzugt aus Trichostrongylidae, ganz besonders bevorzugt aus Haemonchus und am meisten bevorzugt aus dem parasitären Nematoden *H. contortus* als Zielprotein für die
20 effektive Suche nach nematiziden Wirkstoffen.

Dieser Rezeptor wurde in einer cDNA-Bibliothek identifiziert, die aus dem gastrointestinalen Nematoden *H. contortus* gewonnen wurde. Die cDNA kodiert für ein heptahelikales Transmembranprotein einer Größe von 110 kDa, das als HC110-R bezeichnet wurde. Das Protein gehört zur Sekretin-Familie von G-Protein gekoppelten
25 Rezeptoren (GPCR) und zeigt eine hohe Ähnlichkeit zu Latrophilin (Abb.5).

Der HC110-R Rezeptor als Target

30 Der GPCR Latrophilin wurde ursprünglich aus dem Gehirn von Säugern isoliert. Latrophilin hat eine molekulare Masse von 210 kDa und wird posttranslational an

Rest 18 stromaufwärts des ersten Transmembransegments gespalten, besteht also aus zwei nichtkovalent verknüpften Untereinheiten. Die Untereinheit p120 enthält den N-terminalen, hydrophilen extrazellulären Anteil, die p85-Untereinheit enthält die sieben Transmembran-Domänen und die intrazelluläre C-terminale Region des Latrophilins, die für GPCRs ungewöhnlich groß ist. Vor kurzem wurden zwei enge Homologe identifiziert, Latrophilin-2 und Latrophilin-3 (siehe auch Abb. 6). Letzteres wird bevorzugt, wie auch das Latrophilin-1, im Gehirn exprimiert, während Latrophilin-2 ubiquitär mit einer Präferenz für Plazenta, Niere, Milz, Ovarien, Herz und Lunge von Säugern exprimiert wird (Ichtchenko et al. 1999; Sugita et al. 1998).

Obwohl HC110-R nur etwa halb so groß ist wie das 210 kDa große Latrophilin, erstreckt sich die Ähnlichkeit der Sequenz auch auf eine funktionelle Ähnlichkeit. Für beide Rezeptoren ist der endogene Ligand noch unbekannt, aber sowohl Latrophilin als auch HC110-R werden durch den künstlichen Liganden α -LTX (alpha-Latrotoxin) beeinflusst.

Werden z. B. HEK-293-Zellen transient mit Latrophilin transfiziert, verursacht die Zugabe von α -LTX den Einstrom von externem Ca^{2+} , wie anhand eines Versuchsansatzes mit radioaktivem $^{45}\text{Ca}^{2+}$ gezeigt werden kann. α -LTX verursacht einen solchen Ca^{2+} -Einstrom auch bei HEK-293-Zellen, die transient mit HC110-R transfiziert wurden, was zum Beispiel durch Ca^{2+} -Imaging beobachtet werden kann (siehe auch Abb. 10 und 11).

Dieser Ca^{2+} -Einstrom ist allerdings sehr komplex. Liegt das HC110-R als Konstrukt mit C-terminalem Green-Fluorescent-Protein (GFP) Anhang vor, ist er biphasisch, d.h. es zeigt sich eine Änderung nach ca. 3 und eine weitere nach ca. 22 Minuten. Wird dem HC110-R jedoch nur ein Myc-His-Tag N-terminal vorangestellt, so wird Haupteinstrom bereits ca. 2-3 Minuten nach Zugabe von α -LTX beobachtet. Der Grund hierfür ist bislang unbekannt, die Reaktion auf die α -LTX Zugabe ist jedoch, wie die späteren Ausführungen zeigen, spezifisch:

1. Der Ca^{2+} -Einstrom kann nicht beobachtet werden in nicht transfizierten Zellen sowie in Zellen, die transient mit einem β_2 -adrenergen Rezeptor aus der Maus transfiziert wurden.
- 5 2. Die Änderungen der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ sind α -LTX dosisabhängig (Abb. 10).
3. Die biphasische Änderung benötigt den Einstrom von Ca^{2+} , der durch Ca^{2+} -Kanäle erfolgt, die von Cd^{2+} blockiert werden können, vor allem solche des L-Typs, wie anhand deren Empfindlichkeit gegenüber Nifedipin zu erkennen
10 ist.

Der genaue Mechanismus der Interaktion von α -LTX mit HC110-R und die Weiterleitung von Signalen muss noch geklärt werden. Am Beispiel des Latrophilin-1 konnte gezeigt werden, dass nur eine einzige Transmembran-Domäne für den durch
15 α -LTX bedingten Ca^{2+} -Einstrom in HEK-293-Zellen nötig ist (Kraspernov et al. 1999).

Die Tatsache, daß Nifedipin die Wirkung des α -LTX in dem hier beschriebenen System blockiert, zeigt, dass sich das Systems auch für die Identifizierung neuer
20 spezifischer Calcium-Kanal-Blocker eignet. Nifedipin gehört zu einer Klasse von Calcium-Kanal Agonisten und Antagonisten, die entsprechend ihrer Bindung an einen spezifischen Ort eines Calcium-Kanals eingeteilt werden, z. B. anhand ihrer Bindung an Kanäle des L-Typs. Bei den wichtigsten drei Klassen von Calcium-Kanal-Blockern (L-Typ) handelt es sich um Benzoacetonitrile (z. B. Verapamil, WO
25 91/02497), Benzothiazepinone (z. B. Diltiazem) und 1,4-Dihydropyridin-Derivate wie Nifedipin, Nivaldipin, Nimodipin, Nicardipin, Isradipin, Amlodipin, Nitrendipine, Felodipin oder Nisoldipin (Bacon et al. 1989; WO 90/09792). Eine weitere Klasse von Blockern von Calcium-Kanälen des L-Typs sind 1,3-Diphosphonate, z. B. Belfosodil.

- Gegenstand dieser Erfindung ist daher auch die Verwendung von α -LTX bindenden Transmembranrezeptoren zur Identifizierung von neuen Calcium-Kanal-Blockern. Besonders bevorzugt werden dabei heptahelikale Transmembranrezeptoren verwendet, besonders bevorzugt handelt es sich um G-Protein bindende Rezeptoren.
- 5 Ganz besonders bevorzugt ist die Verwendung von Transmembranrezeptoren der Sekretin-Familie. Am meisten bevorzugt ist die Verwendung des HC110-R Rezeptors gemäß SEQ ID. NO: 2 sowie dazu zu 70 %, bevorzugt zu 80 %, besonders bevorzugt zu 90 % und besonders bevorzugt zu 95 % homologer Rezeptorproteine.
- 10 Die vorliegenden Daten zeigen auch, dass HC110-R ein Target für das neue anthelmintische Depsipeptid BAY44-4400 ist. BAY44-4400 stört die Signalübertragung durch α -LTX in HEK-293-Zellen, die mit HC110-R transfiziert wurden (Abb. 12). Diese Störung kann auf der ionophoren Aktivität des BAY 44-4400 beruhen, wie es für andere Depsipeptide typisch ist, z. B. dem Beauvericin, Enniatin
- 15 etc. (Geßner et al. 1996). BAY44-4400 verursacht jedoch keine Änderungen in nicht transfizierten Zellen. Ausserdem stört BAY44-4400 nicht die durch Isoproterenol induzierte Signalübertragung durch mit dem β_2 -adrenergen Rezeptor der Maus transfizierten HEK-293-Zellen. Darüber hinaus wirkt BAY44-4400 als Antagonist von α -LTX, während BAY44-4400 alleine die Ca^{2+} -Konzentration in HC110-R
- 20 transfizierten HEK-293-Zellen nicht beeinflusst.

Das HC110-R-Protein

- Das in DE 197 04 024 A1 beschriebene Membranprotein wurde als ein mögliches
- 25 Zielprotein für den anthelmintischen Wirkstoff PF1022A identifiziert. Zur Identifizierung möglicher Zielproteine wurde eine λ ZAPII cDNA-Expressions-Bibliothek des parasitären Nematoden *Haemonchus contortus* hergestellt und die cDNA-Bibliothek mit Hilfe eines Konjugats aus PF1022A und KLH (keyhole limpet hemocyanin), PF1022A-KLH, und polyklonalen Antikörpern gegen dieses Konjugat
- 30 durchsucht (siehe Bsp. 1). Die Überprüfung von etwa $1,5 \times 10^6$ nicht amplifizierten, rekombinanten Klonen ergab einen 3036 bp langen cDNA-Klon, der an eine 3,6 kb

große mRNA aus *H. contortus* hybridisierte (siehe auch Bsp. 2). Um die 3'- und 5'-Enden zu vervollständigen, wurde die RACE-PCR-Technik verwendet (Bsp. 4). Schließlich wurde eine 3539 bp lange cDNA erhalten, die als HC110-R bezeichnet wurde. Diese cDNA kodiert für 986 Aminosäuren (110 kDa), wobei der offene Leserahmen mit dem ATG¹⁰⁰ beginnt (Abb. 2). Das Startkodon ist zur optimalen Initiation der Translation von einer Kozak-Sequenz umgeben. Das abgeleitete Molekulargewicht des Proteins wurde durch die *in vitro* Translation der *in vitro* transkribierten HC110-R RNA bestätigt.

Die Aminosäuresequenz des HC110-R Proteins weist einige besondere Merkmale auf. Der extrazelluläre N-terminale Teil des Proteins besteht aus insgesamt 535 Resten. Der N-Terminus enthält ein Signalpeptid mit einer Länge von 21 Aminosäuren und einer Spaltstelle an Position 18. Darauf folgt eine Lektin-ähnliche Sequenz (AS 22-125) und ein sogenannter "Thr-Stretch" (AS 128-147), der nur durch ein Serin in Position 144 unterbrochen wird. Stromabwärts des "Thr-Stretch" folgt ein cysteinreiches Motiv der Struktur CX₉WX₁₂CX₉WXCX₅WX₉CX₃W (AS 166-221). Darüberhinaus enthält das Protein HC110-R sieben hydrophobe, α -helikale Transmembran-Domänen zwischen den Resten 536 und 772. Direkt stromaufwärts der Transmembran-Region existiert eine weitere 4-Cys-Region der Struktur CXWWX₆WX₄CX₁₁CXC (AS 478-524). In der Transmembranregion gibt es drei extrazelluläre Loops enthaltend die Reste 587-597, 654-673 und 743-749 und drei intrazelluläre Loops (Position 559-569, 627-636, 696-724). Der C-Terminus ist 214 Reste lang (24 kDa) und enthält einen prolinreichen Teil (AS 845-861) und eine PEST-Region (AS 915-933). Schließlich existieren noch drei putative N-Glykosylierungsstellen an den Resten 26, 499 und 862 sowie 14 putative Phosphorylierungsstellen in der abgeleiteten intrazellulären Domänen (siehe auch Abb. 6).

Die Analyse von Datenbanken ergab eine 48%ige Identität und 76%ige Ähnlichkeit des HC110-R-Proteins mit einem unbekannten Transmembranprotein (1014 AS), welches aus dem genomischen Klon B0457 (GenBankTM Accession Number

Z54306) des Nematoden *Caenorhabditis elegans* abgeleitet wurde (siehe auch Abb. 3).

5 Der Begriff "Identität" wie er hier verwendet wird, beschreibt die Zahl von Sequenzpositionen, die in einem so genannten "Alignment" identisch sind. Sie wird in Prozent der "Alignment"-Länge angegeben.

10 Der Begriff "Ähnlichkeit", wie er hierin verwendet wird, beschreibt die Ähnlichkeit von Sequenzen auf Basis einer Ähnlichkeitsmetrik, also eines Maßes dafür, als wie ähnlich man beispielsweise ein Valin zu einem Threonin oder zu einem Leucin annehmen will.

15 Der Begriff "Homologie", wie er hierin verwendet wird, bedeutet evolutionäre Verwandtschaft, wenn sich also zwei homologe Proteine sich aus einer gemeinsamen Verläufersequenz entwickelt haben. Der Begriff hat nicht unbedingt etwas mit Identität oder Ähnlichkeit zu tun, abgesehen davon, dass homologe Sequenzen meist ähnlicher sind, oder in einem "Alignment" mehr identische Positionen besitzen als nicht-homologe Sequenzen.

20 Der Vergleich beider Sequenzen zeigt gemeinsame Merkmale beider Proteine, so zum Beispiel die Lektin-ähnliche Sequenz, den "Thr-Stretch", die Cys-Motive und die PEST-Sequenz. Die höchste Identität ist im Bereich der Transmembranregion zu finden (62%), wogegen eine geringer ausgeprägte Identität in der N-terminalen (44%) und C-terminalen (50%) Region zu finden ist.

25 Darüberhinaus weist das Protein HC110-R eine 20-30%ige Identität mit heptahelikalen G-Protein-gekoppelten Transmembranrezeptoren (GPCR) auf, besonders mit der Sekretin-Subfamilie. Vergleiche von sieben Transmembran-Domänen zeigen hohe Identität und Ähnlichkeit hinsichtlich Struktur und Sequenz
30 zwischen verschiedenen GPCR der Sekretin-Subfamilie und HC110-R (Abb. 4).

Latrophilin, ein Mitglied der Sekretin-Subfamilie, aus Säugern wie dem Menschen (Gen Bank TM Accession Nr.: E1360690), dem Rind (z. B. G416021, G416053 und G4185804), und der Ratte (U78105 oder U72487) zeigt eine etwas höhere Identität (31 %) zu HC110-R als andere Sekretin-Rezeptoren. Vor allem die Transmembran-
5 regionen zeigen eine Identität von 45-48 %. HC110-R und der 1466 Aminosäuren große Latrophilin-1 GPCR (U78105) aus der Ratte weisen gemeinsame Merkmale auf, z. B. die Lektin-Domäne, die cysteinreiche Region und ein konserviertes 4-Cys-Motiv vor der Transmembranregion. Letzteres wurde vor kurzem als Proteolysestelle von Latrophilin und anderen großen Sekretin GPCR vorgeschlagen. Dagegen enthält
10 der N-Terminus des HC110-R nicht die Olfactomedin-Region und die Pro/Thr-Region des Latrophilins, während Latrophilin wiederum nicht den "Thr-Stretch" des HC110-R aufweist.

Gegenstand der vorliegenden Anmeldung ist deshalb auch die Verwendung G-
15 Protein gekoppelten Transmembranrezeptoren mit sieben Transmembran-Domänen aus Helminthen zum Identifizieren von anthelmintisch wirksamen Substanzen. Bevorzugt werden erfindungsgemäß Transmembranrezeptoren verwendet, die der Sekretin-Subfamilie zugeordnet werden können.

20 Zelluläre Lokalisation

Transiente Transfektionsexperimente mit einem HC110-R-GFP-Fusionsprotein wurden in verschiedenen Säugerzelllinien durchgeführt, so zum Beispiel COS-7-Zellen oder HEK-293-Zellen (Abb. 7). Die heterologe Expression wurde gewählt, da
25 bislang noch keine Zelllinien aus *H. contortus* etabliert wurden.

Zur Proteinlokalisierung in lebenden Zellen (siehe Abb. 8) läßt sich das grün-fluoreszierende Protein (Green Fluorescent Protein, GFP) aus der pazifischen Qualle *Aequorea victoria* verwenden. Auf zellulärer Ebene dient GFP als ein *in vivo*
30 Reporter, um die Frequenz einer transienten oder stabilen Transfektion aufzuzeigen und auf subzellulärer Ebene zur Lokalisation von Proteinen. Wildtyp-GFP ist ein 27

kD-Monomer aus 238 Aminosäuren, das nach Anregung mit UV-Licht (360 – 400 nm; Max. bei 395 nm) oder blauem Licht (440 – 480 nm; Max. bei 475 nm) grünes Licht mit einem Maximum von 509 nm emittiert, ohne dazu exogene Substrate oder Kofaktoren zu benötigen (Chalfie *et al.* 1994). GFP läßt sich somit direkt durch
5 Fluoreszenzmikroskopie *in vivo* nachweisen und sein Fluoreszenzverhalten bleibt auch als Teil eines Fusionsproteins im wesentlichen unverändert. EGFP (‘enhanced’ GFP) stellt eine genetische Variante des Wildtyp-GFP dar und wird zur Transfektion von Säugerzellen eingesetzt (Yang *et al.* 1996). Das Anregungsmaximum von EGFP wurde durch Substitution von Ser⁶⁵ durch Thr auf nur einen Peak bei 490 nm ver-
10 schoben. Die Vektoren pEGFP-C1 (GenBank Accession Nr.: U55763) und pEGFP-N3 (GenBank Accession Nr.: U55762) [Clontech, Palo Alto, CA, U.S.A.] exprimieren EGFP unter der Kontrolle des starken konstitutiven CMV-Promotors und können zur Fusion von anderen Proteinen an den N- bzw. C-Terminus von EGFP verwendet werden.

15 Stabile Zelllinien bieten gegenüber einer transienten Expression den Vorteil, daß jede Zelle das gewünschte Protein dauerhaft exprimiert und eine Isolation des Proteins nach der Lokalisation möglich wird. Um das Protein Fluoreszenz-mikroskopisch oder mit Hilfe eines Western Blots nachzuweisen, wird ein Antikörper gegen das
20 gewünschte Protein benötigt, oder es bietet sich an, einen Expressionsvektor zu wählen, der beispielsweise ein Myc- oder His-Tag C-terminal mit dem eigentlichen Protein im richtigen Leseraster fusioniert, gegen die es dann käufliche, meist sogar monoklonale Antikörper gibt.

25 Gegenstand der vorliegenden Erfindung sind ebenfalls Zellen, die die stabile Expression des Rezeptors HC 110-R sowie dazu homologer Proteine ermöglichen.

Wirkung von alpha-Latrotoxin auf das HC110-R Protein

Zur weiteren Substantiierung der Ähnlichkeit zwischen HC110-R und Latrophilin sowie zur Überprüfung der Funktionalität des rekombinant exprimierten HC110-R wurden HEK-293-Zellen transient und stabil mit HC110-R-GFP-Fusionsprotein transfiguriert und mit alpha-Latrotoxin (α -LTX) stimuliert.

Alpha-Latrotoxin ist ein präsynaptisches Neurotoxin, das aus dem Gift der Schwarzen Witwe (*Latrodectus mactans*) gewonnen werden kann. Es ist bekannt für seine Toxizität für das zentrale Nervensystem von Vertebraten, wo es durch die Erhöhung der $[Ca^{2+}]_i$ und die Stimulation der unkontrollierten Exozytose von Neurotransmittern die Depolarisation von Neuronen auslöst. So ist auch bekannt geworden, dass die Wirkung des α -Latrotoxins zumindest teilweise durch Latrophilin vermittelt wird. Dabei wird angenommen, dass die Toxizität des α -Latrotoxins auf dessen Fähigkeit beruht, mit Rezeptoren, die mit GTP-bindenden Protein gekoppelt sind (GPCR), zu interagieren. Diese Rezeptoren vermitteln normalerweise die Wirkung endogener Hormone oder Neuropeptide (Holz und Habener 1998).

In der vorliegenden Erfindung wurde die sogenannte " Ca^{2+} -Imaging"-Technik verwendet, um die Reaktion transfigurerter HEK-293-Zellen auf α -LTX zu testen, indem die Änderung des intrazellulär vorliegenden Ca^{2+} $[Ca^{2+}]_i$ bestimmt wird (siehe Bsp. 24 und Abb. 9, 10 und 11).

α -LTX verursacht einen biphasischen Anstieg von $[Ca^{2+}]_i$. Bei einer Konzentration von 75 nM induziert α -LTX zunächst einen sehr kleinen Anstieg von nur $5 \pm 0,2$ nM 2 Minuten nach α -LTX-Zugabe und einen stärkeren, verzögerten Anstieg von etwa $220 \pm 14,9$ nM Ca^{2+} nach 22 Minuten. Mit zunehmender Konzentration von α -LTX (7,5 nM- 120 nM) wird der erste Anstieg größer, während sich der zweite Anstieg verringert. Bei einer Konzentration von 120 nM α -LTX erreicht der erste Anstieg Werte von etwa $135 \pm 13,6$ nM Ca^{2+} , während der zweite Anstieg sich auf einen Wert

von $50 \pm 7,1$ nM Ca^{2+} absenkt. Der gleiche Verlauf bei Einsatz von 90 nM und 120 nM α -LTX deutet auf eine Sättigung hin.

5 Transfiziert man HEK-293-Zellen mit einem N-terminalen GFP-getagtem HC110-R-Konstrukt und stimuliert sie mit 75 nM α -LTX kommt es zu einem geringfügig reduzierten 2. Peak. Schließlich wurde auch dann eine nur geringfügig verminderte Reaktion auf α -LTX hin festgestellt, wenn das HC110-R Protein mit einem N-terminalen GFP-Tag versehen wurde. Daher kann davon ausgegangen werden, daß das Anhängen eines GFP-Tags N- oder C-terminal keinen wesentlichen Einfluß auf die
10 α -LTX-Bindung und die nachstehende Signaltransduktion durch HC110-R hat.

Zellen, die nicht oder nur mit GFP transient transfiziert worden waren, zeigen keine Reaktion auf α -LTX. Werden HEK-293-Zellen transient mit anderen C-terminal GFP-getagten G-Protein gekoppelten Rezeptoren transfiziert, z. B. dem β_2 -
15 adrenergen Rezeptor der Maus, oder dem humanen muscarinergen H1 Acetylcholin-Rezeptor, verursacht α -LTX in einer Konzentration von 75 nM nur einen geringen (von etwa $40 \pm 10,4$ nM nach etwa 20 Minuten) bis keinen Anstieg der $[\text{Ca}^{2+}]_i$.

Der durch α -LTX bedingte Anstieg der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ kann sowohl den Einstrom von
20 extrazellulärem Ca^{2+} als auch den Ausstrom von intrazellulärem Ca^{2+} nach sich ziehen. Wird extrazelluläres Ca^{2+} vor oder nach der Zugabe von α -LTX mit 2 mM EGTA entfernt, zeigt sich nur ein kleiner Anstieg der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ von HEK-293-Zellen, die das HC110-R-GFP-Fusionsprotein exprimieren. Daraus wird ersichtlich, dass α -LTX in erster Linie den Einstrom von extrazellulärem Ca^{2+} verursacht. Dieser Ca^{2+} -
25 Einstrom basiert nicht auf einfacher Diffusion, sondern geht mit Hilfe von Ca^{2+} -Kanälen in der Plasmamembran vonstatten.

Bei einem Großteil der Ca^{2+} -Kanäle, die am Ca^{2+} -Einstrom beteiligt sind, handelt es sich um solche des L-Typs, da 15 μM Nifedipin bereits ausreichen, den durch α -LTX
30 induzierten Anstieg von $[\text{Ca}^{2+}]_i$ signifikant zu unterdrücken. Dabei wird der erste An-

stieg vollständig inhibiert, der zweite Anstieg sinkt von $267 \pm 12,7$ nM auf $30 \pm 5,4$ nM ab.

5 Auch die den C-terminal Myc/His-getaggten HC110-R Rezeptor exprimierende stabile bzw. transiente HEK-293-Zelllinie reagiert dosisabhängig auf α -LTX (Abb. 10). 7,5 nM α -LTX sind auch hier noch zu gering, um einen α -LTX-induzierten Ca^{2+} -Einstrom zu erzeugen. Aber bereits 25 nM α -LTX sind ausreichend, um eine Erhöhung der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ von $130 \pm 38,0$ nM bereits nach 2 min zu erzeugen. Bei
10 Zugabe von 75 nM α -LTX kommt es zu einem Ca^{2+} -Einstrom von $296 \pm 91,5$ nM, der ebenfalls 2 min nach α -LTX-Gabe stark zunimmt und erst nach 27 min wieder seinen ursprünglichen Ca^{2+} -Gehalt erreicht. Dieses Ca^{2+} -Signal gleicht dem zweiten verzögerten Ca^{2+} -Peak HC110-R-GFP transfizierter HEK-293-Zellen bei gleicher α -LTX Konzentration (75 nM) in der Höhe des Signals und in seinem Verlauf, die Antwort erfolgt nur - wie auch bei höheren Konzentrationen (90 nM und 120 nM)
15 HC110-R-GFP transfizierter Zellen – unmittelbar nach α -LTX-Zugabe.

Gegenstand der Erfindung ist deshalb ebenfalls die Verwendung von α -LTX als Agonist von Transmembranrezeptoren der Sekretin-Familie aus Nematoden. Bevorzugt wird α -LTX als Agonist des HC110-R Rezeptors gemäß SEQ ID NO: 2 verwendet sowie von dazu zu 70 %, bevorzugt zu 80 %, besonders bevorzugt zu 90 % und
20 ganz besonders bevorzugt zu 95 % homologer Rezeptorproteine.

Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist ebenfalls die Verwendung von α -LTX als Nematizid.
25

Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist ebenfalls die Verwendung von α -LTX in einem Verfahren zum Identifizieren von nematizid oder arthropodizid wirksamen Verbindungen, wobei die Verbindungen als Agonisten oder Antagonisten der Transmembranrezeptoren wirksam sein können.
30

Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist ebenfalls die Verwendung von α -LTX in einem Verfahren zum Identifizieren von Verbindungen, die Calcium-Kanäle blockieren.

5 **Einfluss von BAY 44-4400 auf die Wirkung von α -LTX**

PF1022A übt seine Wirkung auf Nematoden in Abhängigkeit von der jeweiligen Spezies bei Konzentrationen im Bereich von 100-800 ng/ml aus (Terada, 1992). Um jeweils eine mögliche Wechselwirkung zwischen PF1022A mit HC110-R und der
10 durch HC110-R vermittelten Signalübertragung zu untersuchen, wurde in den folgenden Ca^{2+} -Imaging Experimenten in mit FURA-2 beladenen und mit HC110-R-GFP transfizierten HEK-293-Zellen das BAY44-4400 verwendet, das ein leichter lösliches Derivat von PF1022A ist.

15 Bei einer Konzentration von 400 ng/ml rufen weder das sehr effektive Nematizid BAY44-4400 noch die nahezu ineffektive Antipode PF1022-001 eine Ca^{2+} -Antwort in HC110-R-GFP transfizierten HEK 293-Zellen hervor, selbst wenn die Zellen für 90 Minuten mit dem Wirkstoff vorinkubiert worden waren. Im Gegensatz dazu beeinflussen beide Substanzen die durch α -LTX bedingte Signalübertragung, wenn
20 auch in verschiedenem Ausmaß (Abb. 12 und 14). Bei Anwesenheit von 4 ng/ml BAY44-4400 ruft α -LTX einen nur geringen Ca^{2+} -Anstieg mit einem Maximum von $44 \pm 6,0$ nM Ca^{2+} nach 14 Minuten hervor (Abb. 12). Bei Anwesenheit von PF1022-001 verursacht α -LTX jedoch einen größeren Anstieg von $103 \pm 11,5$ nM Ca^{2+} nach 6 Minuten (Abb. 10B). In einem anderen Ansatz wurden die Zellen entweder mit 4
25 ng/ml oder 400 ng/ml BAY44-4400 und PF1022A für 90 Minuten vorinkubiert, die Wirkstoffe dann entfernt bevor die Zellen mit α -LTX stimuliert wurden. HEK-293-Zellen, die mit PF1022A vorinkubiert worden waren, zeigten keine signifikante Änderung in ihrer Reaktion auf α -LTX. Nur BAY44-4400 beeinflusste die Empfindlichkeit der Zellen gegenüber α -LTX. Bei einer Konzentration von BAY44-
30 4400 von 4 ng/ml induzierte α -LTX einen Ca^{2+} -Anstieg ($95 \pm 20,5$ nM Ca^{2+}), 19 Minuten bevor ein stabiles Ca^{2+} -Niveau erreicht wurde. Bei 400 ng/ml BAY44-4400

verursachte α -LTX nur einen Anstieg der Ca^{2+} -Konzentration auf etwa $65 \pm 7,5$ nM Ca^{2+} . Zusätzlich war dieser kleinere Anstieg um 12 Minuten verschoben.

5 Um die Spezifität dieser Ergebnisse zu untermauern, wurde weiterhin der Effekt von 1mM Carbachol auf das endogene, natürliche M1-R in nicht transfizierten HEK-293-Zellen gemessen. Die Anwesenheit von 400 ng/ml BAY44-4400 veränderte die Antwort der Zellen nicht. Auch die durch Isoproterenol und Arecolin induzierte Stimulation des endogenen, natürlichen β_2 -R oder des nikotinischen cholinergen Rezeptors in HEK-293-Zellen wurde durch BAY44-4400 in keiner Weise beeinflusst.
10

Im Rahmen der vorliegenden Erfindung wurde schließlich durch Ca^{2+} -Imaging der Einfluss von BAY 44-4400, einer besser löslichen Variante von PF1022A, auf das HC110-R-Protein in HEK-293-Zellen untersucht, die transient oder stabil ein C-terminal mit GFP versehenes HC110-R-Protein exprimieren. Bei einer Inkubation von HEK-293-Zellen mit nur 400 ng/ml BAY 44-4400 reagieren die Zellen für 50 Minuten in keiner vergleichbaren Weise mit einer Änderung der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration. Allerdings kann ein Einfluss des BAY 44-4400 bei Anwesenheit des α -LTX festgestellt werden. Inkubiert man Zellen 6 Minuten vor der Zugabe von 75 nM α -LTX mit BAY 44-4400, verringert sich der Einfluss des α -LTX auf die Ca^{2+} -Konzentration. Der erste kleine Anstieg der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ verschwindet und der zweite wird 15 Minuten nach der Zugabe von α -LTX um 85 % reduziert. Die Reaktion auf α -LTX verstärkt sich noch mehr, wenn die Zellen für 60 Minuten mit BAY 44-4400 vorinkubiert werden, bevor die Zellen für 30 Minuten mit FURA versetzt werden. Es ergibt sich ein völliges Verschwinden des ersten Ca^{2+} -Anstiegs sowie ein nur sehr geringer zweiter Anstieg von 70 nM $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 30 Minuten nach Zugabe von 75 nM α -LTX.
20
25
30

Um den spezifischen Einfluss von BAY 44-4400 auf die Wirkung von α -LTX zu zeigen, wurden zwei Kontrollexperimente durchgeführt. Zunächst wurden HEK-293-Zellen transient oder stabil mit einem C-terminal mit einem GFP-Tag versehenen β_2 -

adrenergen Rezeptor aus der Maus transfiziert und Isoproterenol als Ligand verwendet.

5 Tatsächlich verursacht Isoproterenol auch eine signifikante Ca^{2+} -Antwort: direkt nach der Zugabe von Isoproterenol ergibt sich nur ein Ca^{2+} -Anstieg. Dieser Anstieg wird jedoch nicht durch BAY 44-4400 beeinflusst.

10 Weiterhin wird die Spezifität der Wechselwirkung zwischen BAY 44-4400 mit HC110-R mit Hilfe des optischen Antipoden gezeigt, die die Stelle des BAY 44-4400 als Ligand einnehmen. Nach Vorinkubation der Zellen mit 400 ng/ml eines anthelmintisch 100-fach schwächer wirksamen Derivates von PF1022A des PF1022-001: cyclo(-L-Lac-D-MeLeu-L-PhLac-D-Me-Leu-)₂ (auch als optischer Antipode bezeichnet) für 90 Minuten ergibt sich nur ein Ca^{2+} -Anstieg von 110 nM 6 Minuten nach Zugabe von 75 nM α -LTX, also eine Verringerung um 59 %. Wenn 4 ng/ml des
15 optischen Antipode 6 Minuten vor der Zugabe von 75 nM α -LTX zugegeben werden, ergibt sich ein Anstieg von 67 nM $[\text{Ca}^{2+}]_i$ direkt nach der Zugabe des α -LTX. Mit zunehmender Konzentration des optischen Antipode verringert sich der Anstieg auf 20 nM Ca^{2+} .

20 Der Ausdruck "Polypeptide", wie er hierin verwendet wird, bezieht sich sowohl auf kurze Aminosäureketten, die gewöhnlich als Peptide, Oligopeptide oder Oligomere bezeichnet werden, als auch auf längere Aminosäureketten, die gewöhnlich als Proteine bezeichnet werden. Er umfasst Aminosäureketten, die entweder durch natürliche Prozesse, wie posttranslationale Prozessierung, oder durch chemische Verfahren, die
25 Stand der Technik sind, modifiziert sein können. Solche Modifikationen können an verschiedenen Stellen und mehrfach in einem Polypeptid vorkommen, wie beispielsweise an dem Peptid-Rückgrat, an der Aminosäure-Seitenkette, am Amino- und/oder am Carboxy-Terminus. Sie umfassen beispielsweise Acetylierungen, Acylierungen, ADP-Ribosylierungen, Amidierungen, kovalente Verknüpfungen mit Flavinen, Häm-Anteilen, Nukleotiden oder Nukleotid-Derivaten, Lipiden oder Lipid-Derivaten oder
30 Phosphatidylinositol, Cyclisierungen, Disulfidbrückenbildungen, Demethylierungen,

Cystin-Bildungen, Formylierungen, gamma-Carboxylierungen, Glycosylierungen, Hydroxylierungen, Iodierungen, Methylierungen, Myristoylierungen, Oxidationen, proteolytische Prozessierungen, Phosphorylierungen, Selenoylierungen und tRNA-vermittelte Additionen von Aminosäuren.

5

Die Polypeptide können erfindungsgemäß in der Form "reifer" Proteine oder als Teile größerer Proteine, z.B. als Fusionsproteine verwendet werden. Weiterhin können sie Sezernierungs- oder "Leader"-Sequenzen, Pro-Sequenzen, Sequenzen, die eine einfache Reinigung ermöglichen, wie mehrfache Histidin-Reste, oder zusätz-

10

liche stabilisierende Aminosäuren aufweisen.

Als homologe Proteine oder Polypeptide werden solche Proteine oder Polypeptide betrachtet, die eine zumindest 70 %ige Identität, vorzugsweise 80 %ige Identität, besonders bevorzugt 90 %ige Identität, ganz besonders bevorzugt 95 %ige Identität, mit einer Sequenz gemäß SEQ ID NO: 2 des Dokuments DE-A-197 04 024, dessen In-

15

halt ausdrücklich Teil der vorliegenden Anmeldung sein soll, über eine Länge von wenigstens 20, vorzugsweise wenigstens 25, besonders bevorzugt wenigstens 30 fortlaufenden Aminosäuren und ganz besonders bevorzugt über deren Gesamtlängen aufweisen.

20

Die Polypeptide müssen für ihre erfindungsgemäße Verwendung nicht vollständige Rezeptoren darstellen, sondern können auch nur Fragmente davon sein, solange sie zumindest noch die biologische Aktivität der vollständigen Rezeptoren aufweisen. Dabei müssen die Polypeptide nicht von Transmembranrezeptoren aus *H. contortus* ableitbar sein. Als erfindungsgemäß werden auch Polypeptide betrachtet, die Trans-

25

membranrezeptoren von anderen Helminthen- oder auch Arthropodenspezies entsprechen oder Fragmenten davon, die noch die biologische Aktivität dieser Rezeptoren ausüben können.

30

Die Polypeptide können für ihre erfindungsgemäße Verwendung im Vergleich zu der entsprechenden Region natürlich vorkommender GPCR-Rezeptoren Deletionen oder

Aminosäuresubstitutionen aufweisen, solange sie zumindest noch eine biologische Aktivität der vollständigen Rezeptoren ausüben. Konservative Substitutionen sind bevorzugt. Solche konservativen Substitutionen umfassen Variationen, wobei eine Aminosäure durch eine andere Aminosäure aus der folgenden Gruppe ersetzt wird:

5

1. Kleine aliphatische, nicht-polare oder wenig polare Reste: Ala, Ser, Thr, Pro und Gly;
2. Polare, negativ geladene Reste und deren Amide: Asp, Asn, Glu und Gln;
3. Polare, positiv geladene Reste: His, Arg und Lys;
- 10 4. Große aliphatische, nicht-polare Reste: Met, Leu, Ile, Val und Cys; und
5. Aromatische Reste: Phe, Tyr und Trp.

Die folgende Liste zeigt bevorzugte konservative Substitutionen:

Ursprünglicher Rest	Substitution
Ala	Gly, Ser
Arg	Lys
Asn	Gln, His
Asp	Glu
Cys	Ser
Gln	Asn
Glu	Asp
Gly	Ala, Pro
His	Asn, Gln
Ile	Leu, Val
Leu	Ile, Val
Lys	Arg, Gln, Glu
Met	Leu, Tyr, Ile
Phe	Met, Leu, Tyr
Ser	Thr
Thr	Ser
Trp	Tyr
Tyr	Trp, Phe
Val	Ile, Leu

Die vorstehend und in DE-A-197 04 024 unter SEQ ID NO:1 und SEQ ID NO: 3 beschriebenen Sequenzen können außerdem zum Auffinden von Genen verwendet werden, die für Polypeptide kodieren, welche am Aufbau von funktionell ähnlichen Transmembranrezeptoren in Helminthen oder Arthropoden beteiligt sind. Unter funktionell ähnlichen Rezeptoren werden gemäß der vorliegenden Erfindung Rezeptoren verstanden, die Polypeptide umfassen, welche sich zwar hinsichtlich der Aminosäuresequenz von den hierin beschriebenen Polypeptiden unterscheiden, aber im wesentlichen dieselbe biologische Funktion haben.

Der Ausdruck "im wesentlichen dieselbe biologische Funktion", wie er hierin verwendet wird, bedeutet eine Beteiligung am Aufbau von funktionsfähigen G-Protein gekoppelten heptahelikalen Transmembranrezeptoren, besonders solcher
5 Rezeptoren der Sekretin-Subfamilie, bzw. eine dem HC110-R Rezeptor aus *H. contortus* entsprechende Funktion. Eine solche Funktion beinhaltet auch die vorstehend beschriebenen Eigenschaften des Rezeptors, wie der Sensitivität gegenüber α -LTX als Agonisten oder Nifedipin als Antagonisten des α -LTX.

10 Der Ausdruck "hybridisieren", wie er hierin verwendet wird, beschreibt den Vorgang, bei welchem ein einzelsträngiges Nukleinsäuremolekül mit einem komplementären Strang eine Basenpaarung eingeht. Auf diese Weise können ausgehend von der hierin offenbarten Sequenzinformation beispielsweise DNA-Fragmente aus anderen Nematoden als *H. contortus* sowie aus Arthropoden isoliert werden, welche für
15 Polypeptide mit der biologischen Aktivität von GPCR-Rezeptoren codieren.

In Hinblick auf eine geeignete Sonde werden die aminoterminalen und carboxyterminalen cDNA-Abschnitte bevorzugt. Die Hybridisierungsbedingungen werden so gewählt, dass auch weniger ähnliche Sequenzen aus anderen Organismen detektierbar
20 sind. Die Hybridisierungsbedingungen unter erniedrigter Stringenz können beispielsweise wie folgt aussehen: in 6xSSC/0% Formamid als Hybridisierungslösung wird zwischen 40-55°C hybridisiert. Die Bedingungen des spezifischen 2. Waschschritt müssen ausgetestet werden, z.B. initial 2xSSC bei 50°C, dann Abschätzung der Signalintensitäten. Daraufhin folgt die Modifikation der Waschbedingungen.

25 Beispielhaft werden nachfolgend geeignete Hybridisierungsbedingungen angegeben:

Hybridisierungslösung: 6xSSC / 0 % Formamid, bevorzugte Hybridisierungslösung:
6xSSC / 25 % Formamid

30 Hybridisierungstemperatur: 34°C, bevorzugte Hybridisierungstemperatur: 42°C

1. Waschschrift: 2xSSC bei 40°C
2. Waschschrift: 2xSSC bei 45°C; bevorzugter 2. Waschschrift: 0,6xSSC bei
5 55°C; besonders bevorzugter 2. Waschschrift: 0,3xSSC bei 65°C.

Hybridisierungsbedingungen werden nach folgender Formel näherungsweise berechnet:

- 10 Die Schmelztemperatur $T_m = 81.5^{\circ}\text{C} + 16.6 \log[c(\text{Na}^+)] + 0.41(\%G + C) - 500/n$
(Lottspeich und Zorbas 1998).

Dabei ist c die Konzentration und n die Länge des hybridisierenden Sequenzabschnitts in Basenpaaren. Für eine Sequenz >100 bp entfällt der Ausdruck $500/n$. Mit
15 höchster Stringenz wird bei einer Temperatur $5-15^{\circ}\text{C}$ unterhalb T_m und einer Ionenstärke von 15 mM Na^+ (entspricht $0.1 \times \text{SSC}$) gewaschen. Wird eine RNA-Probe zur Hybridisierung verwendet, so ist der Schmelzpunkt um $10-15^{\circ}\text{C}$ höher.

Die im erfindungsgemäßen Verfahren zum Identifizieren von nematizid und arthropodizid wirksamen Verbindungen verwendeten Polypeptide werden von den in DE-A-197 04 024 unter SEQ ID NO: 1 und SEQ ID NO: 3 beschriebenen Nukleinsäuren
20 kodiert.

Weiterhin werden zur erfindungsgemäßen Verwendung solche Nukleinsäuren erfasst,
25 die eine zumindest 70 %ige Identität, vorzugsweise 80 %ige Identität, besonders bevorzugt 90 %ige Identität, ganz besonders bevorzugt 95 %ige Identität mit einer Sequenz gemäß SEQ ID NO: 1 oder SEQ ID NO: 3 über eine Länge von wenigstens 20, vorzugsweise wenigstens 100, besonders bevorzugt wenigstens 500 fortlaufenden Nukleotiden und ganz besonders bevorzugt über deren Gesamtlänge aufweisen.

Die erfindungsgemäße Nukleinsäure kann ebenfalls zur Herstellung transgener Invertebraten verwendet werden. Diese können in Testsystemen eingesetzt werden, die auf einer vom Wildtyp abweichenden Expression der erfindungsgemäßen Rezeptoren oder Varianten hiervon basieren. Ferner fallen hierunter sämtliche transgenen Invertebraten, bei denen durch die Modifikation anderer Gene oder Genkontrollsequenzen (z.B. Promotoren) eine Veränderung der Expression der erfindungsgemäßen Rezeptoren oder deren Varianten eintritt.

Die Herstellung der transgenen Invertebraten erfolgt beispielsweise in *Drosophila melanogaster* durch P-Element-vermittelten Gentransfer oder in *Caenorhabditis elegans* durch Transposon-vermittelten Gentransfer (z.B. durch Tc1, Plasterk 1996).

Gegenstand der Erfindung sind somit auch transgene Invertebraten, die zumindest eine der erfindungsgemäßen Nukleinsäuren enthalten, vorzugsweise transgene Invertebraten der Arten *Drosophila melanogaster* oder *Caenorhabditis elegans*, sowie deren transgene Nachkommen. Vorzugsweise enthalten die transgenen Invertebraten die erfindungsgemäßen Rezeptoren in einer vom Wildtyp abweichenden Form.

Die erfindungsgemäße Nukleinsäure kann auf die übliche Weise hergestellt werden. Beispielsweise kann das Nukleinsäuremolekül vollständig chemisch synthetisiert werden. Man kann auch nur kurze Stücke der erfindungsgemäßen Sequenz chemisch synthetisieren und solche Oligonukleotide radioaktiv oder mit einem Fluoreszenzfarbstoff markieren. Die markierten Oligonukleotide können verwendet werden, um ausgehend von Nematoden-mRNA oder Insekten-mRNA hergestellte cDNA-Banken zu durchsuchen. Klone, an die die markierten Oligonukleotide hybridisieren, werden zur Isolierung der betreffenden DNA ausgewählt. Nach der Charakterisierung der isolierten DNA erhält man auf einfache Weise die erfindungsgemäße Nukleinsäure.

Die erfindungsgemäße Nukleinsäure kann auch mittels PCR-Verfahren unter Verwendung chemisch synthetisierter Oligonukleotide hergestellt werden.

Der Ausdruck "Oligonukleotid(e)", wie er hierin verwendet wird, bedeutet DNA-Moleküle, die aus 10 bis 50 Nukleotiden, vorzugsweise 15 bis 30 Nukleotiden, bestehen. Sie werden z.B. chemisch synthetisiert und können als Sonden verwendet werden.

5

Die erfindungsgemäße Nukleinsäure kann zur Isolierung und Charakterisierung der regulatorischen Regionen, die natürlicherweise benachbart zu der kodierenden Region vorkommen, verwendet werden. Solche regulatorischen Regionen sind somit ebenfalls Gegenstand der vorliegenden Erfindung.

10

In den erfindungsgemäßen Verfahren kommen ebenfalls Vektoren zum Einsatz, die eine erfindungsgemäß zu verwendende Nukleinsäure oder ein erfindungsgemäß zu verwendendes DNA-Konstrukt enthalten. Als Vektoren können alle in molekularbiologischen Laboratorien verwendete Phagen, Plasmide, Phagmide, Phasmide, Cosmide, YACs, BACs, künstliche Chromosomen oder Partikel, die für einen Partikelbeschuss geeignet sind, verwendet werden.

15

Bevorzugte Vektoren sind pBIN und seine Derivate für pflanzliche Zellen, pFL61 für Hefezellen, pBLUESCRIPT-Vektoren für bakterielle Zellen, lamdaZAP (Fa. Stratagene) für Phagen.

20

Im Rahmen der vorliegenden Erfindung wurden verschiedene Vektoren verwendet und mehrere Konstrukte erstellt. Die Vektoren, die zur transienten bzw. stabilen Transformation von Zelllinien und zur stabilen Expression des HC110-R Rezeptors verwendet wurden, sind ebenfalls Gegenstand der vorliegenden Erfindung.

25

Zur transienten Expression in eukaryotischen Zellen wurden EGFP-Konstrukte hergestellt, die zur Expression von Fusionsproteinen mit einem N-terminalen EGFP-Tag (EGFP-HC110-R) oder einem C-terminalen EGFP-Tag (HC110-R-EGFP) führen. Die von diesen Vektoren und den herkömmlichen GFP-Vektoren sowie Rotshift- und

30

Blaushift-Varianten kodierten Polypeptide sind ebenfalls Gegenstand der vorliegenden Erfindung.

5 Für die stabile Expression wurde ein weiteres Konstrukt, der Vektor pMyc6xHis, verwendet, der ebenfalls Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist. Der Vektor pMyc6xHis leitet sich von dem Vektor pSecTagA [Invitrogen, Leek, NL] durch Doppelverdau mit den Restriktionsenzymen NheI und SfiI, gefolgt von ‚blunting‘ der Enden und Religation des Vektors ab.

10 Gegenstand der vorliegenden Erfindung sind auch Wirtszellen, die eine erfindungsgemäß zu verwendende Nukleinsäure oder einen erfindungsgemäß zu verwendenden Vektor enthalten. Insbesondere ist die stabil transformierte Zelllinie HEK-293 mit HC110-R-Myc/His Gegenstand dieser Erfindung, die unter der Nummer DSM ACC2464 bei der internationalen Hinterlegungsstelle DSMZ-Deutsche Sammlung
15 von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Mascheroder Weg 1b in 38 124 Braunschweig hinterlegt wurde.

Gegenstand der vorliegenden Erfindung sind ebenfalls Wirtszellen, die eine erfindungsgemäß zu verwendende Nukleinsäure oder einen erfindungsgemäß zu verwendenden Vektor enthalten, sowie einen Vektor, der die Zellen zur Expression von
20 Aequorin befähigt, einem Lumineszenz-Protein, das in Gegenwart von Ca^{2+} Licht emittiert. Durch entsprechende Wirtszellen wird es möglich gemacht, die Veränderung der Ca^{2+} -Konzentration und damit die Wirkung von Substanzen z. B. auf HC110-R mit Hilfe des Indikators Aequorin zu verfolgen. Insbesondere ist die zur
25 Expression von Aequorin befähigte, stabil transformierte Zelllinie HEK-293 mit HC110-R-Myc/His Gegenstand der Erfindung, die unter der Nummer DSM ACC2465 bei der internationalen Hinterlegungsstelle DSMZ-Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Mascheroder Weg 1b in 38 124 Braunschweig hinterlegt wurde.

Der Ausdruck "Wirtszelle", wie er hierin verwendet wird, bezieht sich auf Zellen, die natürlicherweise die erfindungsgemäßen Nukleinsäuren nicht enthalten.

5 Als Wirtszellen eignen sich vorzugsweise eukaryotische Zellen, wie Hefen, Säuger-, Amphibien-, Insekten- oder Pflanzenzellen. Bevorzugte eukaryotische Wirtszellen sind HEK-293-, Schneider S2-, Spodoptera Sf9-, Kc-, CHO-, HepG-2-, K1- COS-1-, COS-7-, HeLa-, C127-, 3T3- oder BHK-Zellen und insbesondere Xenopus-Oocyten, ganz besonders eignen sich HEK-293- oder COS-7-Zellen.

10 Gegenstand dieser Erfindung ist ebenfalls die Verwendung von DNA entsprechend der in Anmeldung DE-A-197 04 024 beschriebenen Sequenz ID No. 2 zur Detektion von DNA aus Helminthen, bevorzugt aus dem Stamm Nematoda, besonders bevorzugt aus der Familie Trichostrongylidae, ganz besonders bevorzugt der Gattung Haemonchus und am meisten bevorzugt der Art *Haemonchus contortus*.

15 Die Erfindung bezieht sich dabei auf Oligonukleotide die einer Region der oben beschriebenen DNA-Sequenz oder deren komplementärem Strang entsprechen und an diese hybridisieren können. Die Erfindung bezieht sich auf die Verwendung dieser Oligonukleotide oder Teilen davon als

20

- a) Proben in Northern- oder Southern-Blot-Assays,
- b) PCR-Primer in einem diagnostischen Verfahren zur Detektion der oben genannten Nematoden, wobei die DNA der betreffenden Helminthen spezifisch
25 mit Hilfe der Primer und der PCR-Technik amplifiziert und dann identifiziert wird.

30

Gegenstand der Erfindung ist auch ein Verfahren zur Detektion von Helminthen, bevorzugt aus dem Stamm Nematoda, besonders bevorzugt aus der Familie Trichostrongylidae, ganz besonders bevorzugt der Gattung Haemonchus und am meisten bevorzugt der Art *Haemonchus contortus*, wobei Oligonukleotide wie oben

beschrieben zu DNA-Sequenzen spezifisch hybridisieren, die aus den genannten Organismen stammen, und die dann mit Hilfe der PCR-Technik amplifiziert werden.

Die Detektion von Organismen wie obengenannt kann z.B. erfolgen, indem man

5

a) eine Oligonukleotidprobe bzw. Primer zur Verfügung stellt, die an die erfindungsgemäße, für HC110-R kodierende, DNA oder dazu komplementäre Stränge hybridisieren oder an die 5'- oder 3'-flankierenden Regionen derselben,

10

b) die Oligonukleotidprobe bzw. die Primer mit einer entsprechend aufbereiteten, DNA enthaltenden Probe in Kontakt bringt,

15

c) die Hybridisierung des Oligonukleotids bzw. Primers detektiert (z.B. mit Hilfe der Polymerase-Kettenreaktion),

d) die detektierte Sequenz des HC110-R-Gens sequenziert, und

20

e) die Sequenz mit den erfindungsgemäßen DNA-Sequenzen vergleicht, bevorzugt mit der in Anmeldung DE-A-197 04 024 beschriebenen Sequenz ID No. 2.

25

Gegenstand der Erfindung ist deshalb ebenfalls ein diagnostischer Testkit zur Detektion von von Helminthen, bevorzugt aus dem Stamm Nematoda, besonders bevorzugt aus der Familie Trichostrongylidae, ganz besonders bevorzugt der Gattung *Haemonchus* und am meisten bevorzugt der Art *Haemonchus contortus*, der unter anderem Oligonukleotide wie oben beschrieben zur Verfügung stellt, die in Verfahren zur Detektion von Spezies aus den genannten systematischen Gruppen verwendet werden können.

30

Gegenstand der Erfindung ist ebenfalls ein diagnostischer Testkit wie vorstehend beschrieben, wobei die in diesem Kit zur Verfügung gestellten Oligonukleotide mit einem detektierbaren Marker versehen sind. Solche detektierbaren Marker können u.a. Enzyme beinhalten, Enzym-Substrate, Coenzyme, Enzyminhibitoren, Fluoreszenzmarker, Chromophore, lumineszente Marker und Radioisotope.

Gegenstand dieser Erfindung ist auch die Verwendung der vorstehend genannten HC110-R-Polypeptide oder Fragmente davon sowie von dazu zu 70 %, bevorzugt zu 80 %, besonders bevorzugt zu 90 % und besonders bevorzugt zu 95 % homologer Rezeptorproteine aus Helminthen, bevorzugt aus dem Stamm Nematoda, besonders bevorzugt aus der Familie Trichostrongylidae, ganz besonders bevorzugt der Gattung *Haemonchus* und am meisten bevorzugt der Art *Haemonchus contortus* zur Herstellung von Vakzinen, die mindestens ein HC110-R-Polypeptid oder Fragment oder ein dazu zu 70 %, bevorzugt zu 80 %, besonders bevorzugt zu 90 % und besonders bevorzugt zu 95 % homologes Rezeptorprotein davon enthalten. Das Vakzin ist dabei in der Lage eine Immunantwort hervorzurufen, die spezifisch ist für ein vorstehend beschriebene HC110-R Protein.

In einer bevorzugten Ausführungsform enthält das Vakzin eine antigene Determinante, z.B. eine einzelne Determinante eines Polypeptids mit einer Aminosäuresequenz gemäß der in Anmeldung DE-A-197 04 024 beschriebenen Sequenz ID No. 2 oder eines Polypeptids, das von der vorstehend genannten DNA oder Fragmenten davon kodiert wird.

Gegenstand der vorliegenden Erfindung sind weiterhin Verfahren zum Herstellen der erfindungsgemäß zu verwendenden Polypeptide. Zur Herstellung der Polypeptide, die von den bekannten Nukleinsäuren kodiert werden, können Wirtszellen, die diese Nukleinsäuren enthalten, unter geeigneten Bedingungen kultiviert werden. Die gewünschten Polypeptide können danach auf übliche Weise aus den Zellen oder dem Kulturmedium isoliert werden. Die Polypeptide können auch in *in vitro*-Systemen hergestellt werden.

Ein schnelles Verfahren zum Isolieren der erfindungsgemäßen Polypeptide, die von Wirtszellen unter Verwendung einer erfindungsgemäßen Nukleinsäure synthetisiert werden, beginnt zum Beispiel, wie in den Beispielen beschrieben, mit der Expression
5 eines Fusionsproteins, wobei der Fusionspartner auf einfache Weise affinitätsgereinigt werden kann. Der Fusionspartner kann beispielsweise Glutathion S-Transferase sein. Das Fusionsprotein kann dann an einer Glutathion-Affinitätssäule gereinigt werden. Der Fusionspartner kann durch partielle proteolytische Spaltung beispielsweise an Linkern zwischen dem Fusionspartner und dem zu reinigenden erfindungsgemäßen
10 Polypeptid abgetrennt werden. Der Linker kann so gestaltet werden, dass er Ziel-Aminosäuren, wie Arginin- und Lysin-Reste einschließt, die Stellen für eine Spaltung durch Trypsin definieren. Um solche Linker zu erzeugen, können Standard-Klonierungsverfahren unter Verwendung von Oligonukleotiden angewendet werden. Ein weiteres mögliches Verfahren basiert auf der Verwendung von Histidin-Fusions-
15 proteinen und deren Aufreinigung über Ni^{2+} -Talonsäulen.

Weitere mögliche Reinigungsverfahren basieren auf präparativer Elektrophorese, FPLC, HPLC (z.B. unter Anwendung von Gelfiltrations-, Reversphasen- oder leicht hydrophoben Säulen), Gelfiltration, differentieller Präzipitation, Ionenaustausch-
20 Chromatographie und Affinitätschromatographie.

Da rezeptorähnliche Proteinkinasen Membranproteine darstellen, werden in den Reinigungsverfahren vorzugsweise Detergenzextraktionen durchgeführt, beispielsweise unter Verwendung von Detergenzien, die die Sekundär- und Tertiärstrukturen der
25 Polypeptide nicht oder nur wenig beeinflussen, wie nicht-ionische Detergenzien.

Die Reinigung der erfindungsgemäß zu verwendenden Polypeptide kann die Isolierung von Membranen ausgehend von Wirtszellen, die die erfindungsgemäßen Nukleinsäuren exprimieren, umfassen. Vorzugsweise exprimieren solche Zellen die Polypeptide in
30 einer ausreichenden Kopienanzahl, so dass die Menge der Polypeptide in einer Membranfraktion mindestens 10-fach höher ist als diejenige, die in vergleichbaren

Membranen von Zellen gefunden wird, die das HC110-R-Gen natürlicherweise exprimieren; besonders bevorzugt ist die Menge mindestens 100-fach, ganz besonders bevorzugt mindestens 1000-fach höher.

- 5 Die Ausdrücke "Isolierung oder Reinigung", wie sie hierin verwendet werden, bedeuten, dass die Polypeptide von anderen Proteinen oder anderen Makromolekülen der Zelle oder des Gewebes abgetrennt werden. Vorzugsweise ist eine erfindungsgemäße, die Polypeptide enthaltende Zusammensetzung hinsichtlich des Proteingehalts gegenüber einer Präparation aus den Wirtszellen mindestens 10-fach und besonders be-
10 vorzugt mindestens 100-fach angereichert.

Die erfindungsgemäßen Polypeptide können auch ohne Fusionspartner mit Hilfe von Antikörpern, die an die Polypeptide binden, affinitätsgereinigt werden.

- 15 Weiterhin sind Antikörper Gegenstand der Erfindung, die spezifisch an die vorstehend genannten Polypeptide bzw. Rezeptoren binden. Die Herstellung solcher Antikörper erfolgt auf die übliche Weise. Beispielsweise können solche Antikörper produziert werden durch die Injektion eines substantiell immunkompetenten Wirts mit einer für die Antikörperproduktion effektiven Menge eines erfindungsgemäßen Transmem-
20 branrezeptors wie des HC110-R Rezeptors aus *H. contortus* oder eines Fragments davon und durch nachfolgende Gewinnung dieses Antikörpers. Weiterhin läßt sich in an sich bekannter Weise eine immortalisierte Zelllinie erhalten, die monoklonale Antikörper produziert. Die Antikörper können gegebenenfalls mit einem Nachweis-
25 reagenz markiert sein. Bevorzugte Beispiele für ein solches Nachweis-Reagenz sind Enzyme, radioaktiv markierte Elemente, fluoreszierende Chemikalien oder Biotin. Anstelle des vollständigen Antikörpers können auch Fragmente eingesetzt werden, die die gewünschten spezifischen Bindungseigenschaften besitzen.

- 30 Der Ausdruck "Agonist", wie er hierin verwendet wird, bezieht sich auf ein Molekül, das Transmembranrezeptoren aktiviert.

Der Ausdruck "Antagonist", wie er hierin verwendet wird, bezieht sich auf ein Molekül, das einen Agonisten von seiner Bindungsstelle verdrängt oder die Funktion des Agonisten inhibiert.

5 Der Ausdruck "Modulator", wie er hierin verwendet wird, stellt den Oberbegriff zu Agonist bzw. Antagonist dar. Modulatoren können kleine organisch-chemische Moleküle, Peptide oder Antikörper sein, die an die erfindungsgemäßen Polypeptide binden. Weiterhin können Modulatoren kleine organisch-chemische Moleküle, Peptide oder Antikörper sein, die an ein Molekül binden, welches wiederum an die
10 erfindungsgemäßen Polypeptide bindet, und dadurch deren biologische Aktivität beeinflusst. Modulatoren können Mimetika von natürlichen Substraten und Liganden darstellen.

Vorzugsweise handelt es sich bei den Modulatoren um kleine organisch-chemische
15 Verbindungen.

Die Bindung der Modulatoren an die Polypeptide kann die zellulären Vorgänge auf eine Weise verändern, die zum Absterben der damit behandelten Helminthen oder Arthropoden führt.

20 Daher erstreckt sich die vorliegende Erfindung auch auf die Verwendung von Modulatoren der Polypeptide als Anthelmintika und Arthropodizide.

Insbesondere ist die Verwendung des α -LTX als Anthelmintikum ebenfalls Gegen-
25 stand dieser Erfindung.

Die erfindungsgemäße Verwendung der Nukleinsäuren bzw. Polypeptide in einem erfindungsgemäßen Verfahren ermöglicht auch das Auffinden von Verbindungen, die an die erfindungsgemäßen Rezeptoren binden. Diese können ebenfalls als Anthelmintika,
30 z.B. als Nematizide bei Pflanzen oder als anthelmintische Wirkstoffe bei Tieren angewandt werden. Beispielsweise werden Wirtszellen, die die Nukleinsäuren enthalten und

die entsprechenden Rezeptoren bzw. Polypeptide exprimieren oder die Genprodukte selbst mit einer Verbindung oder einem Gemisch von Verbindungen unter Bedingungen in Kontakt gebracht, die die Wechselwirkung zumindest einer Verbindung mit den Wirtszellen, den Rezeptoren oder den einzelnen Polypeptiden erlauben.

5

Insbesondere ist ein Verfahren Gegenstand der vorliegenden Erfindung, dass zur Identifizierung von nematiziden Wirkstoffen geeignet ist, die an Transmembranrezeptoren aus Helminthen oder Arthropoden binden, bevorzugt an GPCR der Sekretin-Subfamilie, besonders bevorzugt an den Rezeptor HC110-R aus *H. contortus* sowie an
10 dazu zu 70 %, bevorzugt zu 80 %, besonders bevorzugt zu 90 % und ganz besonders bevorzugt an dazu zu 95 % sequenzidentische Rezeptoren binden. Die Verfahren können jedoch auch mit einem HC110-R homologen Rezeptor aus einer anderen als der hier genannten Spezies durchgeführt werden. Verfahren, die andere als den erfindungsgemäßen HC110-R Rezeptor verwenden, sind von der vorliegenden Erfindung
15 voll umfasst.

Die erfindungsgemäßen Verfahren schließen Hochdurchsatz-Screening (z.B. high throughput screening (HTS) und ultra high throughput screening (UHTS)) ein. Dafür können sowohl Wirtszellen als auch zellfreie Präparationen verwendet werden, die
20 die erfindungsgemäßen Nukleinsäuren und/oder die erfindungsgemäßen Polypeptide enthalten.

Zellfreie Testsysteme

25 Viele Testsysteme, die die Prüfung von Verbindungen und natürlichen Extrakten zum Ziel haben, sind auf hohe Durchsatzzahlen ausgerichtet, um die Zahl der untersuchten Substanzen in einem gegebenen Zeitraum zu maximieren. Testsysteme, die auf zellfreiem Arbeiten beruhen, brauchen gereinigtes oder semi-gereinigtes Protein. Sie sind geeignet für eine "erste" Prüfung, die in erster Linie darauf abzielt, einen
30 möglichen Einfluß einer Substanz auf das Zielprotein zu detektieren.

Effekte wie Zelltoxizität werden in diesen *in vitro* Systemen in der Regel ignoriert. Die Testsysteme überprüfen dabei sowohl inhibierende bzw. suppressive Effekte der Substanzen, als auch stimulatorische Effekte. Die Effektivität einer Substanz kann durch konzentrationsabhängige Testreihen überprüft werden. Kontrollansätze ohne Tests Substanzen können zur Bewertung der Effekte herangezogen werden.

Auf Zellen basierende Testsysteme

Durch die anhand der vorliegenden Erfindung verfügbaren, stabil mit HC110-R transformierten Zelllinien, aber auch durch die anhand der vorliegenden Erfindung identifizierbaren entsprechenden, homologen Rezeptoren aus anderen Spezies, wird die Entwicklung von Testsystemen, die auf Zellen basieren, zur Identifizierung von Substanzen ermöglicht, die die Aktivität von HC110-R und homologer Rezeptoren modulieren.

Ebenso wird durch die vorliegende Erfindung die Identifizierung von weiteren Verbindungen ermöglicht, die als Calcium-Kanal-Blocker wirksam sind.

Um Modulatoren aufzufinden, kann ein synthetischer Reaktionsmix (z.B. Produkte der *in vitro*-Translation) oder ein zellulärer Bestandteil, wie eine Membran oder irgendeine andere Präparation, die das Polypeptid enthält, zusammen mit einem markierten Substrat oder Liganden der Polypeptide in Gegenwart und Abwesenheit eines Kandidatenmoleküls, das ein Agonist oder Antagonist sein kann, inkubiert werden. Die Fähigkeit des Kandidatenmoleküls, die Aktivität der erfindungsgemäßen Polypeptide zu erhöhen oder zu hemmen, wird erkennbar an einer erhöhten oder verringerten Bindung des markierten Liganden oder an einer erhöhten oder verringerten Umsetzung des markierten Substrates. Moleküle, die gut binden und zu einer erhöhten Aktivität der erfindungsgemäßen Polypeptide führen, sind Agonisten. Moleküle, die gut binden, aber nicht die biologische Aktivität der erfindungsgemäßen Polypeptide auslösen, sind wahrscheinlich gute Antagonisten.

Scintillation Proximity Assay (SPA)

Eine Möglichkeit zur Identifizierung von Substanzen, die die Aktivität von HC110-R bzw. dazu homologer Rezeptorproteine modulieren, ist der sogenannten

5 "Scintillation Proximity Assay" (SPA), siehe EP-A- 015 473. Dieses Testsystem nutzt die Interaktion eines Rezeptors (z.B. HC110-R) mit einem radiomarkierten Liganden (z.B. ein kleines organisches Molekül oder ein zweites, radioaktiv markiertes Proteinmolekül). Der Rezeptor ist dabei an kleine Kügelchen ("Microspheres") oder Perlen ("Beads") gebunden, die mit szintillierenden

10 Molekülen versehen sind. Im Verlauf des Abfalls der Radioaktivität wird die szintillierende Substanz im Kügelchen durch die subatomaren Partikel des radioaktiven Markers angeregt und ein detektierbares Photon emittiert. Die Testbedingungen werden so optimiert, daß nur jene vom Liganden ausgehenden Partikel zu einem Signal führen, die von einem an den Rezeptor bzw. HC110-R

15 gebundenen Liganden ausgehen.

In einer möglichen Ausführungsform ist HC110-R an die Beads gebunden, entweder zusammen oder ohne interagierende bzw. bindende Testsubstanzen. Verwendet werden könnten dabei auch Fragmente des HC110-R Rezeptors. Ein radioaktiv mar-

20 kierter Ligand könnte z. B. markiertes α -LTX, Nifedipin oder ein markiertes Depsipeptid sein. Bei einer Bindung eines bindenden Liganden an den immobilisierte HC110-R Rezeptor, müßte dieser Ligand eine bestehende Interaktion zwischen dem immobilisiertem HC110-R und dem markierten Liganden inhibieren oder aufheben, um selbst im Bereich der Kontaktfläche zu binden. Eine erfolgte Bindung an den

25 immobilisierte HC110-R Rezeptor kann dann anhand eines Lichtblitzes detektiert werden. Entsprechend wird ein bestehender Komplex zwischen einem immobilisierten und einem freien, markierten Liganden durch die Bindung einer Testsubstanz zerstört, was zu einem Abfall der detektierten Lichtblitzintensität führt. Das Testsystem entspricht dann einem komplementären Inhibitions-System.

Two Hybrid System

Ein weiteres Beispiel für ein auf ganzen Zellen basierendes Testsystem ist das sogenannte "Two Hybrid System". Ein spezifisches Beispiel dafür ist die sogenannte
5 "Interaction Trap", die Interaktions-Falle. Es handelt sich dabei um eine genetische Selektion von interagierenden Proteinen in Hefe (siehe z.B. Gyuris et al. 1993). Das Testsystem ist darauf ausgelegt, die Interaktion zweier Proteine zu detektieren und zu beschreiben, indem eine erfolgte Interaktion zu einem detektierbaren Signal führt.

10 Ein solches Testsystem kann auch an die Prüfung großer Zahlen von Testsubstanzen in einem gegebenen Zeitraum angepaßt werden.

Das System beruht auf der Konstruktion zweier Vektoren, dem "Bait"- und dem "Prey"-Vektor. Ein für ein erfindungsgemäßes HC110-R oder Fragmente davon
15 kodierendes Gen wird in den Bait-Vektor kloniert und dann als Fusionsprotein mit dem LexA-Protein, einem DNA-bindenden Protein, exprimiert. Ein zweites Gen, kodierend für ein Interaktionspartner von HC110-R, beispielsweise für ein α -LTX, wird in den Prey-Vektor kloniert, wo es als Fusionsprotein mit dem B42-Prey-Protein exprimiert wird. Beide Vektoren liegen in einem *Saccharomyces cerevisiae*-Wirt vor,
20 der Kopien von LexA-bindender DNA auf der 5'-Seite eines lacZ- oder HIS3-Reportergens enthält. Findet eine Interaktion zwischen den beiden Fusions-Proteinen statt, kommt es zur Aktivierung der Transkription des Reportergens. Führt die Anwesenheit einer Testsubstanz zur Inhibition oder zur Störung der Interaktion, können die beiden Fusions-Proteine nicht mehr interagieren und das
25 Produkt des Reportergens wird nicht mehr hergestellt.

Verdrängungstest

Ein weiteres Beispiel für ein Verfahren, mit welchem Modulatoren der erfindungsgemäßen Polypeptide aufgefunden werden können, ist ein Verdrängungstest, bei dem
30 man unter dafür geeigneten Bedingungen die erfindungsgemäßen Polypeptide und

einen potenziellen Modulator mit einem Molekül, das bekanntermaßen an die erfindungsgemäßen Polypeptide bindet, wie einem natürlichen Substrat oder Liganden oder einem Substrat- oder Liganden-Mimetikum zusammenbringt. Bevorzugt wird dazu in erfindungsgemäßer Weise das α -LTX verwendet.

5

Im Rahmen von molekularen Interaktionsstudien unter Verwendung des vollständigen HC110-R Proteins bzw der N- und/oder C-terminalen Deletionsmutanten von HC110-R, oder auch mit durch *in vitro* Mutagenese bzw. sonstige bekannte Methoden veränderten HC110-R Molekülvarianten, kann ein bekanntes Analysesystem eingesetzt werden, z.B. von Biacore AB, Uppsala, Schweden. Dabei kann einerseits

10

(i) das HC110-R Protein oder Fragmente davon über bekannte chemische Methoden (Kopplung über Amine, Thiole, Aldehyde) oder Affinitätsbindung (z.B. Streptavidin-Biotin, IMAC) an einen Biochip gekoppelt oder andererseits

15

(ii) α -LTX oder ein anderer Modulator z.B. BAY 44-4400 oder andere mögliche Liganden wie unter (i) beschrieben an den Chip gekoppelt werden.

20

Die Bindung eines in Lösung befindlichen Liganden (HC110-R Protein, bzw. ein beliebiger Modulator z.B. BAY 44-4400 etc.) an die immobilisierten Moleküle ist physikalisch messbar. Bei dem Biacore Instrument wird der Ligand auf einem Sensorchip immobilisiert, der eine dünne Goldschicht aufweist. Die Analytlösung wird durch eine Mikroflussszelle auf dem Chip perfundiert. Bindung des Analyten an den immobilisierten Liganden erhöht die lokale Konzentration auf der Oberfläche, wobei der Brechungsindex des Mediums nahe der Goldschicht graduell erhöht wird. Dies hat einen Einfluß auf die Interaktion zwischen freien Elektronen (Plasmonen) in dem Metall und Photonen, die vom Instrument emittiert werden. Diese physikalischen Änderungen sind proportional zur Masse und Molekülzahl auf dem Chip, die Ligand-Analyt Bindung wird in Echtzeit registriert, wodurch Bestimmung der

25

30

apparenten Assoziations-/Dissoziationsrate möglich ist (Fivash et al. 1998). Durch Wettbewerbsversuche wird die Spezifität der Bindung validiert.

Entsprechende Messungen dienen auch zur Bestimmung der für die Bindung von
5 Liganden wichtigen HC110-R Proteindomänen sowie die Identifikation neuer noch
nicht bekannter Liganden des HC110-R.

Calcium Imaging

10 Als weiteres Verfahren zur Detektion von mit dem HC110-R interagierenden
Substanzen ist das Calcium Imaging oder Signaling anzusehen (siehe z.B. Abb. 10 und
11). Dabei kommen Calcium-Indikatoren zum Einsatz mit deren Hilfe Änderungen im
intrazellulären Calciumspiegel detektierbar gemacht werden. Im Rahmen dieser
Verfahren kommen HC110-R exprimierende Zellen zum Einsatz, die mit Calcium-
15 Indikatoren beladen werden. Unter UV-Anregung kommt es dann bei einem durch
einen HC110-R Agonisten hervorgerufenen Calcium-Einstrom, bzw. bei Freisetzung
intrazellulären Calciums zu einer Änderung der Absorption in Abhängigkeit der
Calciumbeladung des Indikators. Ein Antagonist läßt sich in einem derartigen System
durch die vollständige oder teilweise Unterdrückung des von dem Agonisten (z.B. α -
20 LTX) induzierten Calciumsignals erkennen. Als mögliche Calcium-Indikatoren
kommen dazu das Fura-2 (Sigma) oder Indo-1 (Molecular Probes) in Betracht.

Weitere Calcium Indikatoren lassen sich durch sichtbares Licht anregen und ändern in
Abhängigkeit von ihrer Calciumbeladung detektierbar ihr Fluoreszenzverhalten. Die
25 Indikatoren Fluo-3 und Fluo-4 weisen eine hohe Calciumaffinität auf. Fluo-4 eignet
sich mit seinem stärkeren Fluoreszenzsignal dabei insbesondere für Messungen bei
Testsystemen, bei denen die Zellen nur in geringer Dichte eingesetzt werden, wie im
Falle der HEK293-Zellen. Weitere Indikatoren sind Rhod-2, x-Rhod-1, Fluo-5N, Fluo-
5F, Mag-Fluo-4, Rhod-5F, Rhod-5N, Y-Rhod-5N, Mag-Rhod-2, Mag-X-Rhod-1,
30 Calcium Green-1 und -2, Calcium Green-5N, Oregon Green 488 BAPTA-1, Oregon
Green 488 BAPTA-2 und -5N, Fura Red, Calcein und ähnliche.

- Eine Alternative zur Beladung von Zellen mit Calcium Indikatoren stellt die rekombinante Expression von Photoproteinen in den Zielzellen dar. Diese Photoproteine reagieren dann in Form einer Lichtemission nachdem sie mit Calciumionen einen
- 5 Komplex eingegangen sind. Ein in zahlreichen Untersuchungen und Testsystemen bereits vielfach verwendetes Photoprotein ist das Aequorin. Die das Zielprotein und gleichzeitig das Aequorin exprimierenden Zellen werden in diesem Testverfahren zunächst mit dem Luminophor Coelenterazin beladen. Das von den Zellen gebildete Apoequorin bildet mit dem Coelenterazin und Kohlendioxid einen Komplex. Tritt an-
- 10 schließend Calcium in die Zelle hinzu und bindet an den Komplex, kommt es zur Freisetzung von Kohlendioxid und blauem Licht (Emissions-Maximum ~466 nm). Die Lichtemission korreliert dabei mit der intrazellulär herrschenden Calciumkonzentration.
- 15 Gegenstand dieser Erfindung ist damit ebenfalls die Verwendung von HC110-R, Fragmenten davon oder ähnlicher Proteine aus anderen Organismen in einem Testverfahren, in dem die Funktion des Rezeptors oder die Bindung von Modulatoren an den Rezeptor mittels eines durch Aequorin oder ähnlichen Photoproteinen vermittelten Lichtsignals detektiert wird.
- 20 Unter Verwendung von Wirtszellen oder transgenen Invertebraten, die die erfindungsgemäße Nukleinsäure enthalten, ist es auf diese Weise auch möglich, Substanzen aufzufinden, welche die Expression der Rezeptoren verändern. Auch solche Substanzen können wertvolle Anthelminthika darstellen.
- 25 Die mit Hilfe des erfindungsgemäßen Verfahrens gefundenen Wirkstoffe eignen sich entsprechend zur Bekämpfung von tierischen Schädlingen, insbesondere Insekten, Spinnentieren und Nematoden, die in der Landwirtschaft, in Forsten, im Vorrats- und Materialschutz sowie auf dem Hygienesektor vorkommen. Besonders eignen sich die
- 30 mit dem erfindungsgemäßen Verfahren gefundenen Wirkstoffe zur Bekämpfung von Nematoden und Spinnentieren. Zu den oben erwähnten Schädlingen gehören:

- Aus der Ordnung der Isopoda z.B. *Oniscus asellus*, *Armadillidium vulgare*, *Porcellio scaber*.
- Aus der Ordnung der Diplopoda z.B. *Blaniulus guttulatus*.
- 5 Aus der Ordnung der Chilopoda z.B. *Geophilus carpophagus*, *Scutigera* spp..
- Aus der Ordnung der Symphyla z.B. *Scutigereilla immaculata*.
- Aus der Ordnung der Thysanura z.B. *Lepisma saccharina*.
- Aus der Ordnung der Collembola z.B. *Onychiurus armatus*.
- Aus der Ordnung der Orthoptera z.B. *Acheta domesticus*, *Gryllotalpa* spp., *Locusta*
- 10 *migratoria migratorioides*, *Melanoplus* spp., *Schistocerca gregaria*.
- Aus der Ordnung der Blattaria z.B. *Blatta orientalis*, *Periplaneta americana*, *Leucophaea maderae*, *Blattella germanica*.
- Aus der Ordnung der Dermaptera z.B. *Forficula auricularia*.
- Aus der Ordnung der Isoptera z.B. *Reticulitermes* spp..
- 15 Aus der Ordnung der Phthiraptera z.B. *Pediculus humanus corporis*, *Haematopinus* spp., *Linognathus* spp., *Trichodectes* spp., *Damalinia* spp..
- Aus der Ordnung der Thysanoptera z.B. *Hercinothrips femoralis*, *Thrips tabaci*, *Thrips palmi*, *Frankliniella accidentalis*.
- Aus der Ordnung der Heteroptera z.B. *Eurygaster* spp., *Dysdercus intermedius*,
- 20 *Piesma quadrata*, *Cimex lectularius*, *Rhodnius prolixus*, *Triatoma* spp.
- Aus der Ordnung der Homoptera z.B. *Aleurodes brassicae*, *Bemisia tabaci*, *Trialeurodes vaporariorum*, *Aphis gossypii*, *Brevicoryne brassicae*, *Cryptomyzus ribis*, *Aphis fabae*, *Aphis pomi*, *Eriosoma lanigerum*, *Hyalopterus arundinis*,
- 25 *Phylloxera vastatrix*, *Pemphigus* spp., *Macrosiphum avenae*, *Myzus* spp., *Phorodon humuli*, *Rhopalosiphum padi*, *Empoasca* spp., *Euscelis bilobatus*, *Nephotettix cincticeps*, *Lecanium corni*, *Saissetia oleae*, *Laodelphax striatellus*, *Nilaparvata lugens*, *Aonidiella aurantii*, *Aspidiotus hederae*, *Pseudococcus* spp., *Psylla* spp.
- 30 Aus der Ordnung der Lepidoptera z.B. *Pectinophora gossypiella*, *Bupalus piniarius*, *Cheimatobia brumata*, *Lithocolletis blancardella*, *Hyponomeuta padella*, *Plutella*

- xylostella*, *Malacosoma neustria*, *Euproctis chrysorrhoea*, *Lymantria* spp.,
Bucculatrix thurberiella, *Phyllocnistis citrella*, *Agrotis* spp., *Euxoa* spp., *Feltia* spp.,
Earias insulana, *Heliothis* spp., *Mamestra brassicae*, *Panolis flammea*, *Spodoptera*
spp., *Trichoplusia ni*, *Carpocapsa pomonella*, *Pieris* spp., *Chilo* spp., *Pyrausta*
5 *nubilalis*, *Ephestia kuehniella*, *Galleria mellonella*, *Tineola bisselliella*, *Tinea*
pellionella, *Hofmannophila pseudospretella*, *Cacoecia podana*, *Capua reticulana*,
Choristoneura fumiferana, *Clysia ambiguella*, *Homona magnanima*, *Tortrix*
viridana, *Cnaphalocerus* spp., *Oulema oryzae*.
- Aus der Ordnung der Coleoptera z.B. *Anobium punctatum*, *Rhizopertha dominica*,
10 *Bruchidius obtectus*, *Acanthoscelides obtectus*, *Hylotrupes bajulus*, *Agelastica alni*,
Leptinotarsa decemlineata, *Phaedon cochleariae*, *Diabrotica* spp., *Psylliodes*
chrysocephala, *Epilachna varivestis*, *Atomaria* spp., *Oryzaephilus surinamensis*,
Anthonomus spp., *Sitophilus* spp., *Otiorrhynchus sulcatus*, *Cosmopolites sordidus*,
Ceuthorrhynchus assimilis, *Hypera postica*, *Dermestes* spp., *Trogoderma* spp.,
15 *Anthrenus* spp., *Attagenus* spp., *Lyctus* spp., *Meligethes aeneus*, *Ptinus* spp., *Niptus*
hololeucus, *Gibbium psylloides*, *Tribolium* spp., *Tenebrio molitor*, *Agriotes* spp.,
Conoderus spp., *Melolontha melolontha*, *Amphimallon solstitialis*, *Costelytra*
zealandica, *Lissorhoptrus oryzophilus*.
- Aus der Ordnung der Hymenoptera z.B. *Diprion* spp., *Hoplocampa* spp., *Lasius* spp.,
20 *Monomorium pharaonis*, *Vespa* spp.
- Aus der Ordnung der Diptera z.B. *Aedes* spp., *Anopheles* spp., *Culex* spp.,
Drosophila melanogaster, *Musca* spp., *Fannia* spp., *Calliphora erythrocephala*,
Lucilia spp., *Chrysomyia* spp., *Cuterebra* spp., *Gastrophilus* spp., *Hyppobosca* spp.,
Stomoxys spp., *Oestrus* spp., *Hypoderma* spp., *Tabanus* spp., *Tannia* spp., *Bibio*
25 *hortulanus*, *Oscinella frit*, *Phorbia* spp., *Pegomyia hyoscyami*, *Ceratitis capitata*,
Dacus oleae, *Tipula paludosa*, *Hylemyia* spp., *Liriomyza* spp..
- Aus der Ordnung der Siphonaptera z.B. *Xenopsylla cheopis*, *Ceratophyllus* spp..
- 30 Aus der Klasse der Arachnida z.B. *Scorpio maurus*, *Latrodectus mactans*, *Acarus*
siro, *Argas* spp., *Ornithodoros* spp., *Dermanyssus gallinae*, *Eriophyes ribis*,

Phyllocoptura oleivora, *Boophilus* spp., *Rhipicephalus* spp., *Amblyomma* spp., *Hyalomma* spp., *Ixodes* spp., *Psoroptes* spp., *Chorioptes* spp., *Sarcoptes* spp., *Tarsonemus* spp., *Bryobia praetiosa*, *Panonychus* spp., *Tetranychus* spp., *Hemitarsonemus* spp., *Brevipalpus* spp..

5

Zu den pflanzenparasitären Nematoden gehören z.B. *Pratylenchus* spp., *Radopholus similis*, *Ditylenchus dipsaci*, *Tylenchulus semipenetrans*, *Heterodera* spp., *Globodera* spp., *Meloidogyne* spp., *Aphelenchoides* spp., *Longidorus* spp., *Xiphinema* spp., *Trichodorus* spp., *Bursaphelenchus* spp.

10

Die mit dem erfindungsgemäßen Verfahren gefundenen Wirkstoffe wirken nicht nur gegen Pflanzen-, Hygiene- und Vorratsschädlinge, sondern auch auf dem veterinärmedizinischen Sektor gegen tierische Parasiten (Ektoparasiten) wie Schildzecken, Lederzecken, Räudemilben, Laufmilben, Fliegen (stechend und

15 leckend), parasitierende Fliegenlarven, Läuse, Haarlinge, Federlinge und Flöhe. Zu diesen Parasiten gehören:

Aus der Ordnung der Anoplurida z.B. *Haematopinus* spp., *Linognathus* spp., *Pediculus* spp., *Phthirus* spp., *Solenopotes* spp..

20

Aus der Ordnung der Mallophagida und den Unterordnungen Amblycerina sowie Ischnocerina z.B. *Trimenopon* spp., *Menopon* spp., *Trinoton* spp., *Bovicola* spp., *Werneckiella* spp., *Lepikentron* spp., *Damalina* spp., *Trichodectes* spp., *Felicola* spp..

25

Aus der Ordnung Diptera und den Unterordnungen Nematocerina sowie Brachycerina z.B. *Aedes* spp., *Anopheles* spp., *Culex* spp., *Simulium* spp., *Eusimulium* spp., *Phlebotomus* spp., *Lutzomyia* spp., *Culicoides* spp., *Chrysops* spp., *Hybomitra* spp., *Atylotus* spp., *Tabanus* spp., *Haematopota* spp., *Philipomyia* spp., *Braula* spp., *Musca* spp., *Hydrotaea* spp., *Stomoxys* spp., *Haematobia* spp., *Morellia*

30 spp., *Fannia* spp., *Glossina* spp., *Calliphora* spp., *Lucilia* spp., *Chrysomyia* spp.,

Wohlfahrtia spp., *Sarcophaga* spp., *Oestrus* spp., *Hypoderma* spp., *Gasterophilus* spp., *Hippobosca* spp., *Lipoptena* spp., *Melophagus* spp..

5 Aus der Ordnung der Siphonapterida z.B. *Pulex* spp., *Ctenocephalides* spp.,
Xenopsylla spp., *Ceratophyllus* spp..

Aus der Ordnung der Heteropterida z.B. *Cimex* spp., *Triatoma* spp., *Rhodnius* spp.,
Panstrongylus spp..

10 Aus der Ordnung der Blattarida z.B. *Blatta orientalis*, *Periplaneta americana*,
Blattella germanica, *Supella* spp..

Aus der Unterklasse der Acaria (Acarida) und den Ordnungen der Meta- sowie
Mesostigmata z.B. *Argas* spp., *Ornithodoros* spp., *Otobius* spp., *Ixodes* spp.,
15 *Amblyomma* spp., *Boophilus* spp., *Dermacentor* spp., *Haemophysalis* spp.,
Hyalomma spp., *Rhipicephalus* spp., *Dermanyssus* spp., *Raillietia* spp.,
Pneumonyssus spp., *Sternostoma* spp., *Varroa* spp..

Aus der Ordnung der Actinedida (Prostigmata) und Acaridida (Astigmata) z.B.
20 *Acarapis* spp., *Cheyletiella* spp., *Ornithocheyletia* spp., *Myobia* spp., *Psorergates*
spp., *Demodex* spp., *Trombicula* spp., *Listrophorus* spp., *Acarus* spp., *Tyrophagus*
spp., *Caloglyphus* spp., *Hypodectes* spp., *Pterolichus* spp., *Psoroptes* spp.,
Chorioptes spp., *Otodectes* spp., *Sarcoptes* spp., *Notoedres* spp., *Knemidocoptes*
spp., *Cytodectes* spp., *Laminosioptes* spp..

25 Die mit Hilfe des erfindungsgemäßen Verfahrens gefundenen Wirkstoffe eignen sich
auch zur Bekämpfung von Milben, insbesondere Hausstaubmilben z.B.
Dermatophagoides pteronyssinus und *D. farinae*.

30 Die mit den erfindungsgemäßen Verfahren gefundenen Wirkstoffe eignen sich auch
zur Bekämpfung von Arthropoden, die landwirtschaftliche Nutztiere, wie z.B.

- Rinder, Schafe, Ziegen, Pferde, Schweine, Esel, Kamele, Büffel, Kaninchen, Hühner, Puten, Enten, Gänse, Bienen, sonstige Haustiere wie z.B. Hunde, Katzen, Stubenvögel, Aquarienfische sowie sogenannte Versuchstiere, wie z.B. Hamster, Meerschweinchen, Ratten und Mäuse befallen. Durch die Bekämpfung dieser
- 5 Arthropoden sollen Todesfälle und Leistungsminderungen (bei Fleisch, Milch, Wolle, Häuten, Eiern, Honig usw.) vermindert werden, so daß durch den Einsatz der erfindungsgemäßen Wirkstoffe eine wirtschaftlichere und einfachere Tierhaltung möglich ist.
- 10 Verbindungen, die mit Hilfe der beschriebenen Verfahren und Polypeptide gefunden werden, sind ebenfalls wertvoll zur Behandlung von Tieren und Menschen, die mit pathogenen Endoparasiten des Menschen oder von Nutztieren, Hobbytieren, Zootieren sowie Labor und Versuchstieren infiziert sind.
- 15 Die Verbindungen können in allen Entwicklungsstadien normaler, sensibler Stämme und auch resistenter Stämme verwendet werden. Durch die Behandlung mit Mitteln, die eine oder mehrere dieser Verbindungen enthalten, können sowohl wirtschaftliche Verluste bei Nutztieren und Krankheiten bei Menschen und Tieren vermieden oder behandelt werden. Die folgenden Parasiten sind dabei von besonderem Interesse als
- 20 Ziele der gefundenen Wirkstoffe:
- Enoplida, z.B. *Trichuris* spp., *Capillaria* spp., *Trichomosoides* spp., *Trichinella* spp.
- Rhabditia, z.B. *Micronema* spp., *Strongyloides* spp.
- Strongylida, z.B. *Strongylus* spp., *Triodontophorus* spp., *Oesophagodontus* spp.,
- 25 *Trichonema* spp., *Gyalocephalus* spp., *Cylindropharynx* spp., *Poteriostomum* spp., *Cyclocercus* spp., *Cylicostephanus* spp., *Oesophagostomum* spp., *Chabertia* spp., *Stephanurus* spp., *Ancylostoma* spp., *Uncinaria* spp., *Bunostomum* spp., *Globocephalus* spp., *Syngamus* spp., *Cyathostomum* spp., *Cylicocylus* spp., *Neostongylus* spp., *Cystocaulus* spp., *Pneumostongylus* spp., *Spicocaulus* spp.,
- 30 *Elaphostongylus* spp., *Parelaphostongylus* spp., *Crenosoma* spp., *Paracrenosoma* spp., *Angiostrongylus* spp., *Aelurostrongylus* spp., *Filaroides* spp., *Parafilaroides*

spp., *Trichostrongylus* spp., *Haemonchus* spp., *Ostertagia* spp., *Marshallagia* spp., *Cooperia* spp., *Nematodirus* spp., *Hyostrogylus* spp., *Obeliscoides* spp., *Amidostomum* spp., *Ollulanus* spp., *Dictyocaulus* spp., *Muellerius* spp., *Protostrongylus* spp.

5

Oxyurida, z.B. *Oxyuris* spp., *Enterobius* spp., *Passalurus* spp., *Syphacia* spp., *Aspiculuris* spp., *Heterakis* spp.

10 Ascaridia, z.B. *Ascaris* spp., *Toxascaris* spp., *Toxocara* spp., *Parascaris* spp., *Anisakis* spp., *Ascaridia* spp.

Spirurida, z.B. *Gnathostoma* spp., *Physaloptera* spp., *Thelazia* spp., *Gongylonema* spp., *Habronema* spp., *Parabronema* spp., *Draschia* spp., *Dracunculus* spp.

15 Filariida, z.B. *Stephanofilaria* spp., *Parafilaria* spp., *Setaria* spp., *Loa* spp., *Dirofilaria* spp., *Litomosoides* spp., *Brugia* spp., *Wuchereria* spp., *Onchocerca* spp.

Gigantorhynchida, z.B. *Filicollis* spp., *Moniliformis* spp., *Macracanthorhynchus* spp., *Prosthenorchis* spp.

Mastigophora (Flagellata)

20 Trypanosomatidae, z.B. *Trypanosoma b. brucei*, *T. b. gambiense*, *T. b. rhodesiense*, *T. congolense*, *T. cruzi*, *T. evansi*, *T. equinum*, *T. lewisi*, *T. percae*, *T. simiae*, *T. vivax*, *Leishmania brasiliensis*, *L. donovani*, *L. tropica*

Trichomonadidae, z.B. *Giardia lambilia*, *G. canis*.

Sarcomastigophora (Rhizopoda), z.B. *Entamoeba histolytica*

Hartmanellidae, z.B. *Acanthamoeba* sp., *Hartmanella* spp.

25 Apicomplexa (Sporozoa), z.B. *Eimeria acervulina*, *E. adenoides*, *E. alabamensis*, *E. anatis*, *E. anseris*, *E. arloingi*, *E. ashata*, *E. auburnensis*, *E. bovis*, *E. brunetti*, *E. canis*, *E. chinchillae*, *E. chupearum*, *E. columbae*, *E. contorta*, *E. crandallii*, *E. deblickei*, *E. dispersa*, *E. ellipsoides*, *E. falciformis*, *E. faurei*, *E. labbeana*, *E. leucarti*, *E. magna*, *E. maxima*, *E. media*, *E. meleagridis*, *E. meleagritidis*, *E. mitis*,
30 *E. necatrix*, *E. ninakohlyakimovae*, *E. ovis*, *E. parva*, *E. pavonis*, *E. perforans*, *E. phasani*, *E. piriformis*, *E. praecox*, *E. residua*, *E. scabra*, *E. spec.*, *E. stiedai*, *E. suis*,

E. tenella, *E. truncata*, *E. truttae*, *E. zuernii*, *Globidium spec.*, *Isospora belli*, *I. canis*, *I. felis*, *I. ohioensis*, *I. rivolta*, *I. spec.*, *I. suis*, *Neospora caninum*, *Cystisospora spec.* *Cryptosporidium spec.*

Toxoplasmodidae, z.B. *Toxoplasma gondii*

- 5 Sarcocystidae, z.B. *Sarcocystis bovicanis*, *S. bovihominis*, *S. neuvona*, *S. ovis*, *S. ovifelis*, *S. spec.*, *S. suihominis*

Leucozoide, z.B. *Leucozytozoon simondi*

Plasmodiidae, z.B. *Plasmodium berghei*, *P. falciparum*, *P. malariae*, *P. ovale*, *P. vivax*, *P. spec.*

- 10 Piroplasma, z.B. *Babesia argentina*, *B. bovis*, *B. canis*, *B. spec.*, *Theileria parva*, *T. spec.*

Adeleina, z.B. *Hepatozoon canis*, *H. spec.*

Weiterhin von Bedeutung sind

15

Myxospora und Microspora, z.B. *Glugea spec.* und *Nosema spec.*, sowie *Pneumocystis carinii*, Ciliophora (Ciliata), z.B. *Balantidium coli*, *Ichthyophthirius spec.*, *Trichondina spec.* oder *Epistylis spec.*

- 20 Die gefundenen Verbindungen und Mittel sind ebenfalls effektiv gegenüber Protozoen von Insekten, wie solche des Stammes Microsporidia, besonders solche der Ordnung Nosema, ganz besonder solche der Art *Nosema apis*, die Parasiten der Honigbiene sind.

- 25 Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist deshalb auch die Verwendung von Verbindungen, die mit einen erfindungsgemäßen Verfahren und/oder unter Verwendung der erfindungsgemäßen Nukleinsäuren oder Polypeptide gefunden wurden, zur Herstellung eines Mittels der Bekämpfung von Helminthen und/oder Arthropoden.

Beispiele

1. Konstruktion und Durchsuchen der cDNA-Bibliothek

Die Konstruktion der cDNA-Bibliothek, die Herstellung von KLH-PF1022A-Konjugat und Antiserum gegen PF1022A sowie das Immunscreening der cDNA-Bibliothek und die DNA-Analyse erfolgte wie in WO 98/15625 beschrieben.

2. Isolierung von RNA

Die totale RNA wurde entsprechend der GTC/CsCl-Kissen-Methode aus adulten *Haemonchus contortus* Nematoden extrahiert und isoliert (Sambrook et al. 1989) oder durch einen einzigen Schritt durch GTC/Phenol/Chloroform-Extraktion gewonnen (Chomczynski und Sacchi 1987). Poly (A)⁺ RNA wurde durch Chromatographie an oligo(dT)Cellulose isoliert (Aviv und Leder, 1972).

3. Northern Blotting

Glyoxylierte totale RNA aus *Haemonchus contortus* (20 µg pro Bahn) wurden im Agarosegel aufgetrennt (Sambrook et al. 1989; McMaster und Carmichael 1977) und auf eine Hybond N Membran (Amersham) mittels basischer Kapillar-Transfer-methode übertragen (Chomczynski, 1992). Radiomarkierte Proben wurden durch randomisierte Markierung linearisierter Plasmid-DNA (HC110-R) hergestellt, wobei ein Megaprime-Kit (Amersham, Braunschweig, Deutschland) und 50 µCi [α -³²P]dCTP (3000 Ci/mmol, ICN, Meckenheim, Deutschland) verwendet wurden. Die Hybridisierung wurde über Nacht durchgeführt bei 65°C in 6 x SSC (1x SSC: 0,15 M NaCl, 0,015 M Na-Citrat), 5x Denhardt's Reagenz (0,1 % Polyvinylpyrrolidon, 0,1 % BSA, 0,1 % Ficoll 400), 0,1 % SDS und 100 µg/ml Heringssperma-DNA. Die Filter wurden unter hoher Stringenz in 0,1xSSC und 0,1 % SDS bei 65°C gewaschen und exponiert (Kodak BioMax MS Filme bei -80°C), siehe Abb. 1 (A).

4. 5'- und 3'-RACE-PCR

Zur Isolierung der im identifizierten cDNA Klon fehlenden 5'- und 3'-Enden wurde das Verfahren des 5'/3'-RACE angewendet.

5

Das 5'-RACE beruht auf der spezifischen Amplifizierung des 5'-Endes eines Gens aus mRNA. Mit Hilfe eines sequenzspezifischen Primers und der AMV Reversen Transkriptase wird der cDNA-Erststrang synthetisiert. An das Produkt wird ein poly (A)-Schwanz angehängt, so dass in der nachfolgenden PCR ein oligo dT-Anker-primer und ein "nested" sequenzspezifischer Primer eingesetzt werden kann. In einer zweiten PCR kann ein weiterer "nested" Primer verwendet werden, um die Spezifität zu gewährleisten.

10

Im 3'-RACE erfolgt die cDNA-Erststrangsynthese mit einem oligo dT-Primer und die nach-folgenden PCR Reaktionen mit sequenzspezifischen Primern.

15

cDNA wurde aus 1 µg totaler *H. contortus* RNA mit dem Primer 5'-GGT CAC CGT CGT CCC AGA AA-3' synthetisiert unter Verwendung des 5'-RACE Kits von GIBCO BRL (Eggenstein, Deutschland). Dazu wurde die Superscript Reverse Transkriptase verwendet. Das C-Tailing des C-Terminus der cDNA wurde mit Hilfe der Terminalen Desoxynukleotidyltransferase durchgeführt. Die erste Amplifikation erfolgte mit 400 nM eines oligo-desoxy-inosyl-Anker-Primers (5'-CUA CUA CUA CUA GGC CAC GCG TCG ACT AGT ACG GGI IGG GII GGG IIG-3') und 400 nM des ersten "nested" Primers 5'-CCA TTC GAT TCC TCT TCT CG-3' (Birsner und Grob, Denzlingen, Deutschland) in 50 µl enthaltend 200 µM jedes dNTP, 1,5 mM MgCl₂, ein Fünftel der "tailed" cDNA und 2,5 U der nativen Taq-Polymerase. Die erste Denaturierung erfolgte bei 94°C für 5 Minuten, gefolgt von 35 Zyklen zu je 1 Minute bei 94°C, 1 Minute bei 53°C und 2 Minuten bei 72°C, wiederum gefolgt von einem letzten Syntheseschritt von 10 Minuten bei 72°C. Die Reaktionsbedingungen für die "nested" PCR waren dieselben wie oben beschrieben, mit der Ausnahme, dass 1 µl des ersten Amplifikationsproduktes als Template

20

25

30

verwendet wurde, sowie der genspezifische zweite "nested" Primer 5'-GTC GAT GGT GCA GAT TTC GC-3', eine verkürzte Form des Anker-Primers (5'-CUA CUA CUA CUA GGC CAC GCG TCG ACT AGT AC-3') und nur 25 Zyklen bei einer Annealing-Temperatur von 53°C durchgeführt wurden.

5

Die 3'-RACE-PCR (GIBCO BRL, Eggenstein, Deutschland) wurde mit 1 µg der totalen RNA adulter *H. contortus* und 500 nM des oligo dT Adapter-Primers 5'-GGC CAC GCG TCG ACT AGT ACT TTT TTT TTT TTT TTT T-3' durchgeführt, beginnend mit einer Präinkubation für 10 Minuten bei 70°C und 2 Minuten bei 4°C.

10 Nach Zugabe von 2,5 mM MgCl₂, 500 µM jedes dNTP, 10 µM DTT und 200 U Super-Script II Reverse Transkriptase in 20 µl wurde die cDNA für 50 Minuten bei 42°C und in einem abschließenden Schritt für 15 Minuten bei 70°C und 10 Minuten bei 4°C inkubiert. Die RNA wurde durch 2 U *E. coli* RNase H und einer Inkubation bei 37°C für 10 Minuten entfernt. Die erste Amplifikation erfolgte mit 400 nM eines
15 universellen Adapter-Primers (5'-CUA CUA CUA CUA GGC CAC GCG TCG ACT AGT AC-3') und 400 nM des sequenzspezifischen Primers 5'-TTTGTTCTT CCT TGG TAT CC-3' in 50 µl enthaltend 200 mM jedes dNTP, 1,5 mM MgCl₂, ein Zehntel der "tailed" cDNA und 2,5 U native Taq-DNA-Polymerase. Der erste Denaturierungsschritt erfolgte bei 94°C für 3 Minuten, gefolgt von 35 Zyklen zu je 1
20 Minute bei 94°C, 1 Minute bei 51°C und 2 Minuten bei 72°C sowie einem abschließenden Syntheseschritt von 15 Minuten bei 72°C. Für die "nested" PCR wurden 2 µl der ersten Amplifikation bei ansonsten gleichen Bedingungen verwendet, wobei nun der kürzere Adapter-Primer 5'-GGC CAC GCG TCG ACT AGT AC-3' und der "nested" Primer 5'-ACA CTC TAA TCT CCA ACT G-3' bei nunmehr 30
25 Zyklen verwendet wurden. Die PCR-Produkte wurden auf 2%igen Agarose-Gelen analysiert, eluiert und in den TA-Vektor pMosBlue (Amersham, Braunschweig, Deutschland) kloniert.

5. Transfer der RNA

Der Transfer der aufgetrennten RNA aus dem Glyoxalgel bzw. genom. DNA aus einem TBE-Agarosegel auf eine neutrale Hybond-N Nylonmembran [Amersham, Braunschweig] erfolgt nach dem 'Downward Alkaline Capillary Transfer' in alkalischer Transferlösung nach der Methode von Chomczynski (1992) für 2 h. Danach wird die Membran für 20 min in 0,2 M Natriumphosphat-Puffer (pH 6,8) neutralisiert, getrocknet und für 20 - 60 min bei 80°C gebacken. Für die Hybridisierung gegen radioaktiv markierte Sonden wird die Membran mit 5 ml/cm² Prähybridisierungslösung in Kunststofftüten eingeschweißt und für 3 h bei 65°C inkubiert. Zur Hybridisierung wird der Puffer durch Hybridisierungslösung ersetzt. Bei Verwendung von Rapid Hyb.-Lösung [Amersham, Braunschweig] erfolgt die Prähybridisierung in 30 min bei 65°C ohne zusätzliche Prähybridisierungslösung. Nach Zugabe der durch 'Random Priming' radioaktiv markierten Sonde erfolgt die Hybridisierung bei 65°C über Nacht. Danach wird die Membran einmal mit 65°C warmem 2x SSC / 0,1 % SDS für 20 min und dreimal mit 0,1x SSC / 0,1 % SDS für je 1 h gewaschen. Die Exposition der Membran erfolgt auf Kodak X-OMAT oder Kodak BIOMAX-MS Röntgenfilmen mit entsprechender Verstärkerfolie bei -80°C.

6. *In vitro* Transkription und Translation

Das TNT T7/T3 gekoppelte Retikulocytenlysatsystem (Promega) wurde verwendet, um die volle Länge der kodierenden Sequenz von HC110-R in der Gegenwart von ³⁵S-markiertem Methionin und Cystein (ICN, Eschwege, Deutschland) entsprechend den Vorschriften des Herstellers zu transkribieren und translatieren. Die RNA wurde mit einem Kaninchen Retikulocytenlysatsystem (Promega, Serva, Heidelberg) translatiert, wobei eine 40 µCi ³⁵S-markierte Mischung (>1000 Ci/mmol, ICN, Meckenheim, Deutschland), 1 µg zirkularisierte HC110-R Plasmid-DNA und 10 U T3-RNA-Polymerase verwendet wurden. Die Reaktion wurde bei 30°C für 90 Minuten durchgeführt. Eine positive Kontrolle enthielt 1 µg Luciferase-Kontroll-DNA.

Die Reaktionsprodukte wurden durch SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (Lämmli 1970) aufgetrennt und mit Hilfe der "Amplify Fluorography Solution" (Amersham Pharmacia Biotech) oder 1 M Natriumsalicylat (pH 7) fluorographiert (Chamberlain 5 1979), die Gele dann getrocknet und exponiert (Kodak BioMax MR Film mit Verstärker bei -80°C), siehe Abb. 1 (B).

Alternativ wurde zur *in vitro* Synthese eines RNA-Transkriptes aus in pBluescript SK klonierter HC110-R cDNA das 'MAXIscript *In Vitro* Transcription Kit' von 10 Ambion (Heidelberg) herangezogen. 4 μg HC110-R Plasmid-DNA wurden mit dem Restriktionsenzym Hind III bzw. Sal I hinter dem Stop-Codon linearisiert, mit Phenol-Chloroform extrahiert, in 3 Vol. Ethanol gefällt und in DEPC- H_2O gelöst. In einem 50 μl Reaktionsansatz wurden 2 μg HC110-R cDNA mit 2,5 μl 200 mM DTT, je 2,5 μl 10 mM ATP, CTP, GTP und UTP, 5 μl 10x Transkriptionspuffer, 1,6 μl 15 RNasin-Inhibitor (40 U / μl) (Promega, Heidelberg) und 2 μl T3-Phagen-Polymerase (10 U / μl) versetzt und für 2 h bei 37°C inkubiert. Nach 1 h wurden noch einmal 2 μl T3-Phagen-Polymerase (10 U / μl) hinzugegeben. Der Ansatz wurde mit 1,5 μl RNasefreier DNase I (2 U / μl) und 1 μl RNasin-Inhibitor (40 U/ μl) versetzt, für 15 min bei 37°C inkubiert, mit Phenol-Chloroform extrahiert, in 3 Vol. Ethanol 20 gefällt und in 25 μl DEPC- H_2O resuspendiert. 1/5 Vol. der Probe wurde in einem Glyoxalgel analysiert.

7. DNA-Analyse

25 Die Klone wurden durch die Didesoxynukleotid-Kettenterminationsmethode unter Zuhilfenahme der automatisierten Laser-Fluoreszenz-Sequenzierung (LICOR 4000; MWG, Ebersberg, Deutschland) sequenziert sowie des "Thermo Sequenase fluorescent-labeled cycle sequencing kit" (Amersham, Braunschweig, Deutschland). Die Sequenzen beider Stränge wurden bestimmt und die Sequenzdaten mit der GCG- 30 Software (Genetics Computer Group Inc., Madison, WI, USA) sowie der PC/GENE-Software (Intelligenetics, Mountain View, CA, USA). Die Programme FASTA

(Pearson und Lipman 1988), BLITZ (Smith und Waterman 1981) und BLAST (Altschul und Lipmann 1990) wurden verwendet, um die EMBL- und Swiss-Prot Protein-Datenbanken nach Sequenzähnlichkeiten der abgeleiteten Proteinsequenz zu durchsuchen. Die Proteinsequenzen wurden mit SAPS analysiert (Brendel et al.
5 1992), sowie mit PROSITE und Prot-Param (Appel et al. 1994).

8. Herstellung von Proteinextrakten aus *Haemonchus contortus*

50 – 100 mg in flüssigem Stickstoff eingefrorene *H. contortus*-Würmer wurden in
10 1 ml TRIZOL [Gibco, Karlsruhe] aufgenommen. Die Nematoden wurden zusammen mit dem TRIZOL 3x für 15 sec in einem Glas-Potter homogenisiert und für 5 min bei RT inkubiert. Nach Zugabe von 200 µl Chloroform pro ml TRIZOL und Schütteln der Probe für 15 sec wurde der Ansatz für weitere 2 - 3 min bei RT inkubiert, bevor er für 10 min bei 7.000 - 12.000 rpm und 4°C zentrifugiert wurde. Die obere wäßrige
15 Phase enthält die RNA, die Interphase die genomische DNA, die rote organische Phase die Proteine (Coombs et al. 1990; Chomczynski 1993). Die wäßrige Phase wurde entfernt und separat aufbereitet. Die Interphase und organische Phase wurden mit 300 µl 100 % Ethanol pro ml TRIZOL versetzt, gut durchmischt und für 2-3 min bei RT inkubiert. Nach einer Zentrifugation für 2.000 rpm für 5 min und 4°C wurde
20 der Protein-Überstand vorsichtig in ein neues Eppendorfgefäß überführt und mit 1 ml Isopropanol für 10 min bei RT gefällt. Es wurde erneut für 10 min bei 12.000 rpm und 4°C zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Proteinpellet 3x mit je 2 ml 0,3 M Guanidin-Hydrochlorid-Lösung in 95 % Ethanol versetzt, „gevortext“, für 20 min bei RT inkubiert und für 5 min bei 7.500 rpm und 4°C zentrifugiert. Danach
25 wurde das Pellet in 2 ml 100 % Ethanol gelöst, für 20 min bei RT gefällt und für 5 min bei 7.500 rpm und 4°C pelletiert. Das Pellet wurde kurz vakuumgetrocknet und in Harnstoff-Lysispuffer (8 M) resuspendiert. Unlösliches Material wurde durch eine Zentrifugation für 10 min bei 10.000 rpm und 4°C entfernt, der Überstand in ein neues Eppendorfgefäß überführt und nach Bestimmung der Proteinkonzentration bis
30 zur Weiterverarbeitung bei -20°C gelagert.

9. Herstellung von Proteinextrakten aus Hefezellen

Zur Herstellung von Proteinextrakten aus einer Hefekultur wurden 5 ml YPAD-Medium mit einer Hefe-Einzelkolonie angeimpft und bis zur Sättigung bei 30°C geschüttelt (2 Tage). Jeweils 2 ml einer solchen Hefekultur wurden für 2 min bei 3.000 rpm und 4°C (Heraeus Biofuge 15 R) abzentrifugiert, einmal mit H₂O gewaschen, in 250 µl Hefe-Lysispuffer resuspendiert, in ein kleines Reagenzglas überführt, mit Glasperlen (Ø 0,5 mm) bis knapp unter den Flüssigkeitsspiegel aufgefüllt und für 5 min auf höchster Stufe „gevortext“. Anschließend wurde 4x RotiLoad-Puffer (Roth, Karlsruhe) zugegeben und der Ansatz für 5 min bei 95°C inkubiert. Die aufgeschlossenen Zellen wurden in ein Eppendorfgefäß überführt und die Zelltrümmer für 5 min bei 14.000 rpm (Eppendorf Centrifuge 5415 C) abzentrifugiert. Jeweils 20 µl der so aufbereiteten Proben wurden auf ein SDS-Polyacrylamidgel aufgetragen.

10. Herstellung von Proteinextrakten aus *E. coli*-Zellen

Zur Herstellung von Proteinextrakten wurden 1×10^7 *E. coli*-Zellen aus einer 5 ml Über-Nacht-Kultur für 5 min bei 5.000 rpm und 4°C in einer Heraeus-Untertisch-zentrifuge pelletiert, mit 5 ml PBS gewaschen und erneut abzentrifugiert. Das Pellet wurde danach in 1 ml TRIZOL (Gibco, Karlsruhe) resuspendiert und weiter aufgearbeitet.

Alternativ hierzu wurde das mit PBS gewaschene Zellpellet wieder in PBS⁻ resuspendiert und die Zellen mit Hilfe von mehreren kurzen Ultraschallimpulsen (Sonifier B-12, Branson Sonic Power Company, Danbury, U.S.A.), flüssigem Stickstoff und durch Zugabe von Lysozym zerstört.

In Anschluß an die Proteinbestimmung wurde 4x RotiLoad-Puffer (Roth, Karlsruhe) zugegeben und die Fraktion durch Auftragung auf ein SDS-Polyacrylamidgel analysiert. Dabei wurde pro Spur eine Proteinmenge von insgesamt 10 – 20 µg aufgetragen.

11. Herstellung von Proteinextrakten aus der Zellkultur

Eine konfluente 35 mm Zellkulturschale adhärenter Zellen bzw. $5 - 10 \times 10^6$ nicht-adhärenter Säuger-Zellen in FCS-haltigem Medium wurden zuvor mit einer Trypsin-EDTA-Lösung abtrypsiniert oder mechanisch nach Kälteeinwirkung mit einem Zellschaber abgelöst, in ein Eppendorfgefäß überführt, für 10 sec bei 13.000 rpm und RT pelletiert, zweimal mit PBS gewaschen und erneut abzentrifugiert. Nach Aufnahme der Zellen in 1 ml TRIZOL wurden diese durch kräftiges „Vortexen“ oder durch
5
10
15
mehrfaches Ziehen der Zellen durch die Kanüle einer Einwegspritze lysiert und für 5 min bei RT inkubiert. Alternativ hierzu kann das Zellpellet auch in 1 ml PBS oder Harnstoff-Lysispuffer (8 M) resuspendiert und einer kurzen Ultraschallbehandlung (Sonifier B-12, Branson Sonic Power Company, Danbury, U.S.A.) unterzogen werden. Danach wird der Proteingehalt nach Bradford (1976) oder Lowry *et al.* (1951) bestimmt.

12. Induzierbare Protein-Expression in *E. coli*

Zur Herstellung von polyklonalen Antikörpern gegen das HC110-R Protein wurden
20
drei HC110-R Fragmente - die komplette HC110-R cDNA, das N-terminale Ende ohne TM-Domänen und das C-terminale Ende nach der 7. TM-Domäne - in den Expressionsvektor pRSET B (Invitrogen, Leek, NL) kloniert und so N-terminal mit einem 6xHis-Tag unter Beachtung des Leserasters fusioniert.

25
Der komplette kodierende Bereich von HC110-R wurde mit dem P84_ATG BamHI 5'-Primer 5'-CTG CCG GAT CCT CGG TTT AAT ACC AAC ATG AGG-3' und dem P3121_TGA HindIII 3'-Primer 5'-GCA CTA AGC TTG ACT GAA GCG CAC AAC CTC G-3', der N-Terminus bis zur 1. Transmembrandomäne wurde mit den Primern P84_ATG BamHI 5'-Primer (s. o.) und dem P1434_TGA HindIII 3'-Primer
30
5'-GGC TCA AGC TTA TCA GAG AAC AAG CGA CAC GGC-3', und der C-Terminus beginnend nach der 7. Transmembrandomäne wurde mit dem P2486_ATG

BamHI 5'-Primer 5'-CTA TCG GAT CCC AAC ATG GCT GGC TCC CGT GAT ACC TCT AGG-3' und dem P3121_TGA HindIII 3'-Primer (s. o.) amplifiziert. Die Annealingtemperatur betrug bei allen drei Plasmid-PCR zunächst über 5 Zyklen 56°C und dann über 30 Zyklen 62°C. Die PCR-Produkte wurden mit den Enzymen BamHI und HindIII verdaut und gerichtet in den ebenfalls BamHI / HindIII linearisierten pRSET B-Expressionsvektor ligiert.

In dem pRSET B-Vektor wird die Expression über einen viralen Promoter des Bakteriophagen T7 kontrolliert. Die Klonierung erfolgte deshalb in dem XL1-Blue *E. coli* Stamm, der kein Gen der T7 RNA Polymerase enthält. Das rekombinante Plasmid wurde danach in T7 Polymerase exprimierenden BL21(De3)pLysS *E. coli*-Zellen transformiert, die zusätzlich das Plasmid pACYC184 enthalten, das über eine Chloramphenicolresistenz stabilisiert wird, und in geringen Mengen das T7-Lysozym, einen natürlichen Inhibitor der T7 RNA-Polymerase, exprimieren. Da diese Zellen unter der Kontrolle des lacUV5 Promoters stehen, erfolgt bei IPTG-Induktion die Expression der T7 RNA Polymerase und damit auch die des Fusionsproteins.

Eine Einzelkolonie mit dem gewünschten HC110-R Plasmid wurde von einer frischen LB-Platte mit 50 µg / ml Ampicillin und 35 µg / ml Chloramphenicol in 50 ml LB-Medium unter gleichem Selektionsdruck überimpft und ÜN bei 37°C und 280 rpm bis zur stationären Phase geschüttelt. Diese ÜN-Kultur wurde anschließend auf OD₆₀₀ = 0,3 verdünnt und 100 ml der Kultur bei 37°C und 280 rpm bis zu einer OD₆₀₀ = 0,6 - 0,5 weitergeschüttelt.

1 OD₆₀₀ -Einheit wurde abgenommen, die nicht-induzierten Zellen kurz abzentrifugiert und in 150 µl 8 M-Harnstoff-Lysispuffer, pH 8,0, und 50 µl 4xRotiLoad-Puffer [Roth, Karlsruhe] aufgenommen. Die nicht-induzierte Probe wurde für 2 min denaturiert, die genomische DNA durch kurze Ultraschallimpulse von wenigen Sekunden im Sonifier B-12 [Branson Sonic Power Company, Danbury, U.S.A.]

geschert und unlösliche Partikel durch eine 3minütige Zentrifugation bei 14.000 rpm pelletiert.

Die Expression des Fusionsproteins wurde durch Zugabe von 1 mM IPTG induziert und die 100 ml Kultur für weitere 3 - 4 h bei 37°C inkubiert. Nach der Inkubation wurden die induzierten Zellen für 15 min bei 5.000 rpm und 4°C (Heraeus-Untertischzentrifuge) abzentrifugiert, das Pellet in PBS gewaschen und anschließend in 8 ml 8 M-Harnstoff-Lysispuffer resuspendiert. Der Aufschluß der Zellen erfolgte durch 3maliges Eintauchen der Zellen in flüssigen Stickstoff und anschließendes Auftauen bei 37°C. Nach der ersten Stickstoffbehandlung wurden 0,75 mg/ml Lysozym zugesetzt. Nach der letzten Inkubation in flüssigem Stickstoff erfolgte eine Inkubation für 20 min bei 16°C, gefolgt von kurzen Ultraschallimpulsen zu je 10 sec und einer Abkühlung im Eiswasserbad, bis die Lösung eine wasserähnliche Viskosität aufwies. Nach einer 10minütigen Zentrifugation bei 13.000 rpm und 4°C (Beckman J2-21; JS 13.1-Rotor) wurde eine induzierte 150 µl Probe entnommen, mit 50 µl 4xRotiLoad-Puffer (Roth) versetzt und die Induktion des jeweiligen HC110-R Proteinfragmentes zusammen mit der nicht-induzierten Probe durch SDS-PAGE mit anschließender Coomassiefärbung bzw. Western Blot-Analyse mit einem Maus-anti-His-Antikörper überprüft.

20

Der restliche Überstand wurde für die weitere Aufreinigung mittels Affinitätschromatographie in ein frisches Gefäß überführt und bei - 20°C gelagert.

13. Proteinaufreinigung durch Metall-Affinitätschromatographie

25

Die Anreicherung erfolgte unter denaturierenden Bedingungen über das N-terminale 6xHis-Tag mit Hilfe des IMAC-Systems ('Immobilized Metal Affinity Chromatography') über TALONspin-Säulen von Clontech [Palo Alto, U.S.A.]. Das Harz der Säule wurde zunächst separat mit 5 Vol. 8 M-Harnstoff-Lysispuffer, pH 8,0, äquilibriert, für 4 min bei 3.000 rpm und 4°C sedimentiert und zusammen mit dem HC110-R Protein-Überstand für 20 min bei RT unter leichtem Schütteln inkubiert.

30

Nach einer erneuten Zentrifugation wurde das Harz 3mal mit dem 10fachen Volumen 8 M-Harnstoff-Lysispuffer, pH 8,0, für 10 min bei RT unter leichtem Schütteln gewaschen und wieder abzentrifugiert. Nach dem letzten Waschschrift wurde das Pellet in 1 ml 8 M-Harnstoff-Lysispuffer aufgenommen und damit die Säule beladen; diese wurde im folgenden noch 2mal mit dem 3fachen Volumen 8 M-Harnstoff-Lysispuffer gewaschen, bevor die Elution mit Imidazolhaltigem 8 M-Harnstoff-Lysispuffer in mehreren Fraktionen zu je 150 µl erfolgte. Der Gehalt von Fusionsprotein in den Fraktionen wird durch Gelanalyse und Proteinbestimmung nach Bradford ermittelt.

10

14. Proteinaufreinigung durch Affinitätschromatographie

An dieser Stelle soll beispielhaft die Proteinaufreinigung durch Metall-Affinitätschromatographie beschrieben werden. Die Anreicherung erfolgte unter denaturierenden Bedingungen über das N-terminale 6xHis-Tag mit Hilfe des IMAC-Systems ('Immobilized Metal Affinity Chromatography') über TALONspin-Säulen von Clontech [Palo Alto, U.S.A.]. Das Harz der Säule wurde zunächst separat mit 5 Vol. 8 M-Harnstoff-Lysispuffer, pH 8,0, äquilibriert, für 4 min bei 3.000 rpm und 4°C sedimentiert und zusammen mit dem HC-1 Protein-Überstand für 20 min bei RT unter leichtem Schütteln inkubiert. Nach einer erneuten Zentrifugation wurde das Harz 3mal mit dem 10fachen Volumen 8 M-Harnstoff-Lysispuffer, pH 8,0, für 10 min bei RT unter leichtem Schütteln gewaschen und wieder abzentrifugiert. Nach dem letzten Waschschrift wurde das Pellet in 1 ml 8 M-Harnstoff-Lysispuffer aufgenommen und damit die Säule beladen; diese wurde im folgenden noch 2mal mit dem 3fachen Volumen 8 M-Harnstoff-Lysispuffer gewaschen, bevor die Elution mit Imidazolhaltigem 8 M-Harnstoff-Lysispuffer in mehreren Fraktionen zu je 150 µl erfolgte. Der Gehalt von Fusionsprotein in den Fraktionen wird durch Gelanalyse und Proteinbestimmung nach Bradford ermittelt.

20

25

15. Aminosäuresequenzanalyse

Zur Überprüfung der deduzierten Aminosäure-Sequenz ausgehend von dem cDNA-full length Klon HC110-R wurde das 3'-Ende bestehend aus 688 bp (Pos. 2486-3182) mit einem vorangestellten Start-Codon und Kozak-Sequenz in den pRSET B-Expressionsvektor kloniert und in kompetenten BL21(DE3)pLysS *E. coli*-Zellen die Expression des 21 kD Proteins (189 AS) durch Zugabe von 1mM IPTG induziert. Das mit einem N-terminalen HisTag versehene Fusionsprotein wurde über eine Talon-Matrix angereichert und mittels Centriconröhrchen aufkonzentriert und entsalzt. Wegen des N-terminalen HisTags wurde eine C-terminale Protein-Ansequenzierung von 1 nM des 21 kD HC110-R Proteins nach dem schrittweisen Schlack-Kumpf-Abbau (Schlack *et al.* 1926) in einer Modifikation von Boyd (Boyd *et al.* 1992) von der Firma TopLab (Martinsried) durchgeführt. Die Sequenzierung der abgespaltenen Aminosäuren erfolgte in einem Aminosäuresequenzierer PROCISE 492 (PE Applied Biosystems, Weiterstadt) und wurde mit dem PROCISE C Reversed phase HPLC System, bestehend aus einem ABI 140C Mikrogradienten System und einem ABI 785A UV / VIS Detektor, analysiert und mit der PROCISE C Kontrollsoftware sowie der ABI Data Analysis Software identifiziert.

25 pmol des 21 kD HC110-R Proteins wurden durch 2 % Trypsin (Roche Molecular Biochemicals, Mannheim) bei 37°C über Nacht intern gespalten. Insgesamt wurden vier Peptidfragmente durch einen Vergleich des HC110-R Standardchromatogrammes nach dem Trypsin-Verdau mit dem Chromatogramm des Trypsin-Blankverdaus ausgewählt, um die Sequenzierung von tryptischen Autolyseprodukten auszuschließen. Diese vier Peptidfragmente wurden einer N-terminalen Protein-Ansequenzierung nach dem Verfahren des schrittweisen Edman-Abbaues in einer Modifikation nach Hunkapiller *et al.* (1983) durch die Firma TopLab (Martinsried) unterzogen. Die gespaltenen Peptidfragmente wurden mittels HPLC aufgetrennt und fraktioniert. Die auf Immobilon geblottete Peptidfraktion wurde in die Reaktionskammer des Aminosäuresequenzierers PROCISE 492 (Applied Biosystems, Weiterstadt) eingebracht und die Aminosäuren in einem 140 C-PTH-

Analyser und UV-Detektor 785 A (Applied Biosystems, Weiterstadt) abgetrennt. Die Aminosäuren wurden quantitativ durch 'Reversed Phase' HPLC erfaßt und über Retentionszeitvergleich mit einem vor der Sequenzanalyse erstellten Standardchromatogramm identifiziert.

5

16. Zellkulturlinien

Die folgenden Zellkulturlinien wurden über die Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH [Braunschweig] bezogen [Drexler *et al.* 1995]:

- 10 **COS-7-Zellen** (DSM: ACC 60) - Affe, Niere
 HEK-293-Zellen (ATCC: CRL 1573) - Human, embryonal, Niere

17. Kultivierung der verschiedenen Zellkulturlinien

15

Die Kultivierung der adhärenenten Zelllinien COS-7 und HEK-293 erfolgte in 110 mm Gewebekulturschalen [Greiner, Solingen] in einem Volumen von 10 ml Medium bei 37°C, 5 % CO₂ und 95 % Luftfeuchtigkeit. Zur Aufrechterhaltung der Zellkultur wurden COS-7- und HEK-293-Zellen in DMEM-Medium kultiviert. Die Medien
20 enthielten 3,024 g/l NaHCO₃, 10 % FCS, 50 U / ml Penicillin, sowie 50 µg/ml Streptomycin und wurden vor Gebrauch auf 37°C erwärmt. Zur Subkultivierung der COS-7-Zellen wurden diese für 2 h bei 4°C gelagert und anschließend mechanisch mit einem Zellschaber von der Kulturschale abgelöst. Die HEK-293-Zellen ließen sich direkt mit einer Glaspipette vom Boden der Kulturschale ablösen.

25

18. Transiente und stabile Transfektion von eukaryotischen Zellen

Um Fremd-DNA transient in Säuger-Zellen einzubringen, wurde das nicht-liposomale Transfektionsreagenz FuGENE 6 von Roche Molecular Biochemicals
30 (Mannheim) eingesetzt (Kurachi *et al.* 1998). Dazu wurden ca. 0,5 - 1,5 x 10⁵ Zellen in 2 ml Medium auf 35 mm große Gewebekulturschalen ausgebracht, in die für die

spätere konfokale Laserscanning-Mikroskopie ein steriles, mit 1 % Gelatine beschichtetes Objektträgergläschen gelegt wurde. Die Zellen wurden bei 37°C, 5 % CO₂ und 95 % Luftfeuchtigkeit über Nacht kultiviert. Vor der Transfektion wurde noch einmal das Medium gewechselt. Für die Transfektion wurden pro Reaktionsansatz 3 µl FuGENE 6 [Roche Molecular Biochemicals] in 97 µl serumfreiem Medium verdünnt und für 5 min bei RT inkubiert. Tropfenweise wurden je 100 µl des verdünnten FuGENE 6 pro Ansatz zu 1-2 µg Plasmid-DNA (0,5-1 µg/µl) pipettiert, vorsichtig gemischt und für weitere 15 min bei RT inkubiert. Danach wurde der komplette Reaktionsansatz tropfenweise zu den Zellen gegeben und durch leichtes Schwenken der Schale die Transfektionsmischung gleichmäßig verteilt. Die Zellen wurden ohne Mediumwechsel für 1 - 2 Tage weiterkultiviert. Bei jeder Transfektion wurden folgende 3 Negativkontrollen stets mit durchgeführt: eine 35 mm-Gewebe-
kulturschale mit 0,5 - 1,5 x 10⁵ Zellen wurde nicht transfiziert, einer zweiten Schale wurde zwar DNA, aber kein FuGENE 6 im Transfektionsansatz zugesetzt und einer dritten Schale wurde FuGENE 6, aber keine DNA zugefügt.

Für eine stabile Transfektion wurde das gewünschte Plasmid HC110-R im richtigen Leseraster in den leicht modifizierten Expressionsvektor pSecTag A [Invitrogen, Leek, NL] bzw. pIRES_{neo} [Clontech, Palo Alto, U.S.A.] kloniert. Diese Vektoren tragen ein Resistenzgen als Marker, so daß bei Zugabe von Zeozin bzw. G418 oder Bleomycin 48 72 h nach der transienten Transfektion und bei jedem folgenden Mediumwechsel nur erfolgreich transfizierte Zellen, die das Resistenzgenprodukt dauerhaft exprimieren, überleben. Die optimale Konzentration des Zeozin- bzw. G418-haltigen Selektionsmediums wurde zuvor durch Anlegen einer Verdünnungsreihe für die jeweilige Zelllinie ermittelt.

19. Zelluläre Lokalisation rekombinanter Proteine in Säuger-Zellen

Die vollständige kodierende Region der *HC110-R*-DNA wurde in die HindIII/Sall-Stelle von *pEGFP-N3* kloniert, um das HC110-R-Protein C-terminal mit GFP (Green Fluorescent Protein) zu verknüpfen. Das 137 kDa große Fusionsprotein wird in

transient transformierten Empfängerzelllinien exprimiert, was durch Western-Blot-Analyse nachgewiesen werden kann. Die CLSM (Confocal Laser Scanning Microscopy) zeigt, dass das HC110-R-GFP-Fusionsprotein in COS-7 und HEK-293-Zellen im Cytoplasma lokalisiert ist sowie in geringerem Ausmaß auch an der Plasmamembran (siehe auch Abb. 8).

Für die konfokale Laserscanning-Mikroskopie wurde ein Zeiss IM 35 Mikroskop (Zeiss, Oberkochen) mit einem Leica CLSM-Aufsatz TCS NT ('Confocal Laser Scanning Microscope Unit', Leica Lasertechnik, Heidelberg), Version 1.5.451, verwendet. Die Fluoreszenz des GFP-Proteins sowie des Farbstoffes Fluoreszein-Isothiocyanat (FITC) wurde bei 488 nm mit einem Argon-Laser, die für Rhodamin, Texas-Rot, Phycoerythrin, Alexa 568, LysoTrackerTMRed DND-99, MitoTrackerTMRed CMX Ros bzw. Propidiumiodid bei 568 nm mit einem Krypton-Laser angeregt. Z-Serien von optischen Schnitten durch die Zelle wurden mit einer Auflösung von 1024 x 1024 Pixel und einer Schichttiefe von 0,5 µm gescannt (Giese *et al.* 1995). Die Auswertung erfolgte mit der AVS Software (Advanced Visual Systems Inc., Waltham, M.A., U.S.A.) sowie später mit Adobe Photoshop 5.0 und Corel Draw 8.0 für Windows.

Das Fusionsprotein findet sich dabei vor allem in sauren Lysosomen, wie die Kolokalisierung mit Hilfe von LysoTrackerTM, eine Probe zur Markierung saurer Organellen, zeigt. Die das HC110-R-Protein enthaltenden Vesikel wurden vermehrt in der Nähe des Nukleus beobachtet. Zur Kontrolle wurden ein Fusionsprotein aus GFP und dem β_2 -adrenergen GPCR aus der Maus hergestellt (Accession Number X155643, Nakada *et al.* 1989), dessen Transfektion im gleichen Verteilungsmuster innerhalb der Zelle resultierte wie im Falle des HC110-R-GFP-Fusionsproteins (Abb. 8).

20. EGFP-Konstrukte für die transiente Expression

Die Vektoren pEGFP C1 und pEGFP N3 (Clontech, Palo Alto, CA, U.S.A.) wurden mit den Restriktionsenzymen Hind III und Sal I geschnitten. Die Amplifizierung der

5 HC110-R ‚full length‘ cDNA erfolgte mit dem P83EGFP_ATG HindIII 5'-Primer 5'-GGT AGA AGC TTT TCG GTT TAA TAC CAA CAT GAG G-3' und dem P3057EGFP_o.TGA SalI 3'-Primer 5'-CTG TGT CGA CAA CAT TTC GCC AAT AGT TAG G-3' bei einer Annealing-Temperatur von 65°C. Das PCR-Produkt wurde anschließend ebenfalls mit den Enzymen Hind III und SalI geschnitten und unter

10 Erzeugung eines offenen Leserasters zwischen die Hind III und SalI-Schnittstellen des jeweiligen Vektors ligiert und transformiert. Das entstehende Fusionsprotein mit dem N-terminalen GFP-Tag wurde GFP-HC110-R, das mit dem C-terminalen EGFP-Tag HC110-R-GFP genannt. Ein β_2 -Adrenerger Rezeptor aus der Maus (Gen Bank Accession Nr.: P18762; Nakada *et al.* 1989) wurde mit einem C-terminalen EGFP-

15 Tag fusioniert, indem die ‚full length‘ cDNA mit dem P117Maus β_2 AR XhoI 5'-Primer 5'-TAC CTC GAG CTG CTA ACC TGC CAG CCA TG-3' und dem P1349Maus β_2 AR EcoRI 3'-Primer 5'-TGT AGA ATT CTT CCT TCC TTG GGA GTC AAC GCT-3' mit einer Annealingtemperatur von 55/60°C amplifiziert, mit den Restriktionsenzymen XhoI und EcoRI geschnitten und in den XhoI – EcoRI

20 linearisieren pEGFP N3 ligiert wurde. Ebenfalls in den XhoI – EcoRI geschnittenen pEGFP N3-Vektor wurde die ‚full length‘ cDNA eines humanen muscarinischen Rezeptors 1 (huM1Rez.; Gen Bank Accession Nr.: Y00508; Allard *et al.* 1987) ligiert, die zuvor mit dem P70HumM1Rez XhoI 5'-Primer 5'-ATA TCT CGA GAG CCC CAC CTA GCC ACC ATG AAC A-3' und dem P1465HumM1Rez EcoRI 3'-

25 Primer 5'-GAC GAA TTC CAT TGG CGG GAG GGA GTG CGG T-3' bei 55/60°C amplifiziert wurde. Die resultierenden Fusionsproteine mit offenem Leseraster wurden Maus β_2 AR-EGFP und huM1Rez-EGFP genannt.

21. HC110-R-MycHis-Tag Konstrukte für die stabile oder transiente Transfektion

Der Vektor pMyc6xHis leitet sich von dem Vektor pSecTagA [Invitrogen, Leek, NL] durch Doppelverdau mit den Restriktionsenzymen NheI und SfiI, gefolgt von
5 ,blunting' der Enden und Religation des Vektors. Die codierende Region von HC110-R wurde mit Hilfe der PCR-Primer P83MycTag_ATG BamHI 5'-Primer 5'-ATA GGA TCC TTC GGT TTA ATA CCA ACA TGA GG-3' und P3058MycTag_o.TGA XbaI 3'-Primer 5'-CCT GTC TAG AAA CAT TTC GCC
10 AAT AGT TAG G-3' bei einer Annealingtemperatur von 56/60°C amplifiziert, mit den Enzymen BamHI und XbaI geschnitten und in den gleichfalls BamHI XbaI linearisierten pMyc6xHis-Vektor ligiert und in *E. coli* DH5 α -Zellen transformiert. Im folgenden wurden COS-7-Zellen stabil mit dem Konstrukt transfiziert und unter Zeocin-Selektionsdruck gehalten.

15 Parallel hierzu wurde die HC110-RMycHis-cDNA mit den Primern P83_ATGNotI-5' 5'-ATA TTG CGG CCG CTT CGG TTT AAT ACC AAC ATG-3' und pMycHis_TGABamHI-3' 5'-CGC GGA TCC TAG AAG GCA CAG TCG AGG-3' amplifiziert, nachgeschnitten und in den gleichfalls BamHI und NotI restringierten
20 bicistronischen Expressionsvektor pIRES1neo (GenBank Accession Nr.: U89673) (Clontech, Palo Alto, U.S.A.) ligiert. Der pIRES1neo Vektor enthält zusätzlich eine interne Ribosomen-Bindestelle (IRES) des Enzephalomyocarditis-Virus (ECMV) kurz vor dem Start-ATG des Neomycin-Resistenzgens (Rees *et al.* 1996). Auf diese Weise werden zwei offene Leseraster, das des HC110-R und das des Antibiotika-Re-
25 sistenzmarkers, von nur einer mRNA mit einem humanen Cytomegalovirus- (CMV-) Promoter translatiert (Jackson *et al.* 1990; Jang *et al.* 1988). Die Selektion erfolgte durch G418 (Calbiochem-Novabiochem, La Jolla, CA, U.S.A.) in COS-7- und HEK-293-Zellen.

22. Konfokale Laserscanning-Mikroskopie

Für die konfokale Laserscanning-Mikroskopie wurde ein Zeiss IM 35 Mikroskop (Zeiss, Oberkochen) mit einem Leica CLSM-Aufsatz TCS NT ('Confocal Laser Scanning Microscope Unit', Leica Lasertechnik, Heidelberg), Version 1.5.451, verwendet. Die Fluoreszenz wurde bei 488 nm mit einem Argon-Laser, bei 568 nm mit einem Krypton-Laser angeregt. Z-Serien von optischen Schnitten durch die Zelle wurden mit einer Auflösung von 1024 x 1024 Pixel und einer Schichttiefe von 0,5 µm gescannt (Giese *et al.* 1995). Die Auswertung erfolgte mit der AVS Software (Advanced Visual Systems Inc., Waltham, M.A., U.S.A.) sowie später mit Adobe Photoshop 5.0 und Corel Draw 8.0 für Windows.

23. Bindungsstudien von α -LTX an HC110-R Fragmente

Proteine (20 µg/Bahn) wurden durch SDS-PAGE (Lammli *et al.*, 1970) aufgetrennt und auf Nitrocellulosemembranen elektrogeblotted. Im Falle von α -LTX-Bindungsexperimenten wurden die Blots bei Raumtemperatur mit α -LTX bei einer Konzentration von 20 nM in TST für 2h inkubiert. Nach dreimaligem Waschen mit TST wurde ein anti- α -LTX-Antikörper (aus Kaninchen, Calbiochem-Novabiochem) bei einer Konzentration von 0,1 µg/ml und ein mit Peroxidase konjugierter und gegen IgG aus Kaninchen gerichteter Antikörper (aus Ziege, Verdünnung: 1:25 000) verwendet. Die Detektion der Antikörper erfolgte in allen Experimenten mit ECL (Amersham-Pharmacia). Siehe auch Abbildung 9.

24. Calcium-Imaging

Die intrazelluläre freie Ca^{2+} -Konzentration $[\text{Ca}^{2+}]_i$ wurde in transient mit dem HC110-R-EGFP- bzw. β_2 -AR-EGFP-Konstrukt transfizierten COS-7- und HEK293-Zellen mit Hilfe der Calcium-Imaging-Methode gemessen (siehe auch Abb. 11). Je 2×10^5 COS-7- und HEK293-Zellen wurden auf ein mit 1 %iger Gelatine beschichtetes 42 mm großes Deckgläschen in 55 mm großen Gewebekulturschalen

mit 5 ml DMEM-Medium (mit 10 % FCS und Pen / Strep) ausgebracht. Die Transfektion erfolgte mit Hilfe des nicht-liposomalen Transfektionsreagenzes FuGENE 6 (Roche Molecular Biochemicals, Mannheim). Dabei wurden 6 µl FuGENE 6 in 200 µl DMEM-Medium ohne FCS zunächst für 5 min bei RT und
5 nach Zugabe von 4 µg Plasmid-DNA für weitere 15 min bei RT inkubiert, bevor der gesamte Transfektionsansatz tropfenweise zu den Zellen pipettiert wurde. Transfiziert wurden Konstrukte des HC110-R ‚full length‘ Klonen mit einem im richtigen Leseraster fusionierten GFP-Tag und die komplette cDNA des β_2 -Adrenergen Rezeptors, die ebenfalls mit einem GFP-Tag am 3'-Ende versehen
10 worden war. Als Kontrolle dienten 4 µg Plasmid-DNA des reinen pEGFP-N3-Expressionsvektors (Clontech, Heidelberg), sowie nicht-transfizierte Zellen, denen das Transfektionsreagenz FuGENE 6 ohne DNA zugesetzt wurde.

Die Beladung der Zellen mit 1 µM Fura-2 / Acetoxymethylester (Fura-2 / AM)
15 (Sigma, Deisenhofen) erfolgte 48 h nach der Transfektion in einer Na^+ -HBS-Lösung (150 mM NaCl; 5,4 mM KCl; 1,8 mM CaCl_2 ; 0,8 mM $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$; 20 mM Glucose; 20 mM Hepes in H_2O , pH 7,3) für 30 min bei 37°C, 5 % CO_2 und 95 % Luftfeuchtigkeit. Nach der Inkubation wurden die mit Fura-2 / AM beladenen Zellen in einem Inversmikroskop (Zeiss, Aciort, Germany) und parallel hierzu in einem
20 digitalen ‚Imaging‘-Fluoreszenzmikroskop (PTI) betrachtet und bei einer Wellenlänge von 440 bzw. 490 nm in transfizierte, sowie nicht transfizierte Zellen unterschieden. Durchschnittlich wurden je 5-7 transfizierte und nicht transfizierte Zellen durch das Setzen eines ROI (‚region of interest‘) ausgewählt. Die Messung der Extinktion erfolgte bei 340 nm (Calcium-gebundenes Fura-2 / AM) und 380 nm
25 (freies Fura-2 / AM), die der Emission bei 510 nm. Die Auswertung erfolgte mit der Image Master 1.x-Software durch Bildung des Quotienten von 340:510 nm, 380:510 nm und des Ratio von 340/380:510 nm (‚background corrected images‘) als eine Funktion des zugefügten Agens.

30 Die Zugabe von Agentien erfolgte stets 6 min nach Beginn der Messung durch Abnahme eines entsprechenden Volumens Na^+ -HBS-Puffer und direktes Zupipettieren

der Agentien in das Probengefäß für weitere 30 bis 50 min. Das Gesamtvolumen im Probengefäß betrug während des gesamten Versuches konstant 1,5 ml. Zu den das Fusionsprotein HC110-R-GFP exprimierenden COS-7-Zellen wurden zunächst 30 nM und 75 nM α -Latrotoxin (α -LTX, RBI. Natick, U.S.A.), zu den HC110-R-GFP exprimierenden HEK-293-Zellen wurden zur Ermittlung der Dosisabhängigkeit verschiedene Konzentrationen an α -LTX (7,5 nM; 25 nM; 50 nM, 75 nM, 90 nM und 120 nM), bzw. zur Ermittlung der optimalen Wirkkonzentration verschiedene Konzentrationen des zyklischen Depsipeptids BAY 44-4400 (100 ng/ml (89,3 nM), 333 ng / ml (297 nM); 400 ng / ml (357 nM), 1 μ g/ml (893 nM), 10 μ g/ml (8,9 μ M) in 0,1 % DMSO) jeweils 6 min nach Versuchsbeginn zugesetzt. In einigen Experimenten wurden die HEK-293-Zellen für 90 min mit 4 bzw. 400 ng/ml BAY 44-4400, bzw. mit 4 bzw. 400 ng / ml des anthelmintisch inaktiven optischen Antipoden PF1022-001 in Na^+ -HBS bei 37°C, 5 % CO_2 und 97 % Luftfeuchte vorinkubiert und die Zellen nach 60 min durch Zusetzen von 1 μ M Fura-2/AM zur BAY 44-4400-Lösung, bzw. zum PF1022-001, während der restlichen 30 min beladen. Nach dem Einbringen der Zellen in die Apparatur wurden auch hier 6 min nach Versuchsbeginn 75 nM α -LTX zugesetzt. An HEK-293-Zellen, die den β_2 -Adrenergen Rezeptor mit C-terminalem GFP-Tag (β_2 -R-GFP) exprimieren, wurde die optimale α -LTX-Konzentration von 75 nM ausgetestet. CdCl_2 (je 1 μ M und 10 μ M) wurden in Na^+ -HBS, Nifedipin (15 μ M) und EGTA (2 mM) in 0,1 % DMSO gelöst. Die Zugabe von CdCl_2 und Nifedipin erfolgte direkt zu Versuchsbeginn und vor α -LTX-Zugabe, EGTA wurde sowohl zu Versuchsbeginn, als auch 4 min nach α -LTX-Zugabe. Gelöstes α -LTX lag in einer Konzentration von 300 nM in 50 mM Tris-HCl, pH 8,0, vor; BAY 44-4400 wurde zunächst in reinem DMSO (Stammlösungen zwischen 0,004-10 μ g/ml) gelöst. Die Stammlösungen wurden in dem Na^+ -HBS-Puffer auf die gewünschte Konzentration eingestellt. Die maximal lösbare Menge des Wirkstoffes BAY 44-4400 bei einer Endkonzentration von 0,1 % DMSO wurde durch Anlegen einer Verdünnungsreihe in Na^+ -HBS ermittelt. Weder 0,1 % DMSO noch eine andere Testkomponente interagiert bei den gewählten Konzentrationen mit Fura-2 / AM.

Die Daten wurden mit Hilfe des Tabellenkalkulationsprogrammes Excel 98 ausgewertet. Die Ergebnisse resultieren aus wenigstens 2 - 4 reproduzierten Versuchen zu je 4-8 transfizierten und nicht-transfizierten Zellen.

- 5 Die intrazelluläre Calcium-Konzentration wurde nach Grynkiewicz et al. (1985) nach vorausgehende Kalbrierung gemäß McCormack *et al.* (1991) berechnet.

25. Bindung von PF1022A an HC110-R

- 10 Im Folgenden soll die Bindung von PF1022A und dem Morpholin-Derivat BAY44-4400 an HC110-R durch SDS-PAGE, Liganden-Präzipitation und analytische Durchflußcytometrie gezeigt werden. Außerdem soll überprüft werden, ob PF1022A und seine Derivate - ähnlich wie α -LTX - zu Veränderungen der $[Ca^{2+}]_i$ in HC110-R transfizierten HEK-293-Zellen führen oder aber das HC110-R vermittelte α -LTX-
15 'Signalling' beeinflussen.

- Gelegentlich zeigen Antikörper oder Proteine, die in der Immunfluoreszenz deutliche Signale geben, keine Reaktion bei der Anwendung des Immunoblot-Verfahrens. Da zur Durchführung der SDS-PAGE eine Denaturierung der Proteine notwendig ist,
20 kommt es gegebenenfalls zu einer Zerstörung konformationsabhängiger Epitope. Antikörper oder Proteine, die spezifisch solche Epitope erkennen, können deshalb nicht mehr binden. So kann auch weder mit dem biotinylierten Wirkstoff PF1022A, noch mit dem im Vergleich zum PF1022A besser löslichen Morpholin-Derivat BAY44-4400 eine HC110-R spezifische Bindung im Western Blot ausgemacht
25 werden. BAY44-4400 unterscheidet sich von PF1022A durch 2 Morpholin-Reste, die kovalent an die Phenylringe der beiden D-Phenyllactyl-Reste von PF1022A gebunden sind. Renaturiert man die Proteine im SDS-Trenngel jedoch mit Hilfe von Harnstoff, der durch Aufhebung hydrophober Wechselwirkungen eine partielle Entfernung des SDS bewirkt, so kann im Western Blot eine HC110-R spezifische
30 Bindung nachgewiesen werden. Hierzu wurde Gesamtprotein aus nicht transfizierten, aus HC110-R-Myc/His transient exprimierenden HEK-293-Zellen sowie aus dem in

E. coli exprimierten 54 kDa großen N- und dem 21 kDa großen C-Terminus von HC110-R durch SDS-PAGE aufgetrennt, renaturiert und wie gewohnt geblottet. Die Immundetektion erfolgte nach der Inkubation mit dem Liganden BAY44-4400, mit einem Kaninchen-anti-PF1022A-KLH-Immunsereum und einem Ziege-anti-Kaninchen IgG-HRP-Antikörper. Ferner wurde ein partiell renaturiertes SDS-Polyacrylamidgel mit den Proteinfractionen nicht transfizierter, HC110-R-Myc/His transient transfizierter HEK-293-Zellen sowie dem in *E. coli* exprimierten N-Terminus von HC110-R und Gesamtprotein aus *H. contortus* geblottet, mit PF1022A-Biotin inkubiert und über Streptavidin-HRP detektiert. Beide Blots wiesen je eine distinkte 116 kDa große Bande in den HC110-R-Myc/His stabil exprimierenden HEK-293-Zellen auf, wohingegen die Spuren mit nicht transfizierten Zellen keine Bande in dieser Höhe aufwiesen. Ferner banden sowohl das Morpholinderivat BAY44-4400, als auch das biotinylierte PF1022A an den 54 kDa großen N-Terminus von HC110-R, der 21 kDa große C-Terminus zeigte keine spezifische PF1022A-Bindung. Durch das biotinylierte PF1022A konnten in der Gesamt-Proteinfraction adulter *H. contortus* Nematoden insgesamt 2 Banden detektiert werden: Eine 110 kDa große Bande und eine weitere ca. 88 kDa große Bande. Bei letzterer handelt es sich höchstwahrscheinlich um ein biotinyliertes Protein, wie es bereits für den Nematoden *Heterakis spumosa* mit 83 kDa beschrieben wurde, zumal es im Gegensatz zu der 110 kDa großen Bande selbst dann detektiert wird, wenn der Nachweis ausschließlich über Streptavidin-HRP erfolgt. HC110-R-Myc/His stabil transfizierte HEK-293-Zellen weisen dagegen allein unter Streptavidin-HRP keine 116 kDa große Bande mehr auf. Des Weiteren konnte ausgeschlossen werden, dass der verwendete Ziege-anti-Kaninchen IgG-HRP-Sekundärantikörper allein unspezifische Signale verursacht.

Um diese Ergebnisse weiter zu verifizieren, wurde folgende Liganden-Präzipitation durchgeführt. Je 2 mg und 4 mg magnetische Dynal M-280-Streptavidin-gekoppelte Beads wurden mit 500 µg biotinyliertem PF1022A versetzt. Einem Kontrollansatz mit 4 mg Dynal-Beads wurde TST-Puffer anstelle von PF1022A zugesetzt. Überschüssiges PF1022A-Biotin wurde durch magnetische Separation entfernt, bevor ein

Gemisch aus den in *E. coli* exprimierten und zuvor über Affinitätschromatographie aufgereinigten HC110-R N- und C-Terminus zugegeben wurde. Nach erneuter magnetischer Separation zur Abtrennung nicht gebundener HC110-R-Fragmente wurde je ein Aliquot ausgehend von 2 mg und 4 mg Dynal-Beads über SDS-PAGE aufgetrennt und geblottet. Die Detektion des Präzipitates erfolgte über das N-terminal fusionierte His-Tag mit einem Maus-anti-His IgG- und einem Kaninchen-anti-Maus IgG-HRP-Antikörper. Nur die N-terminale 54 kDa große Region von HC110-R wird durch PF1022A präzipitiert, folglich wird der nicht an PF1022A gebundene C-Terminus von HC110-R zuvor durch magnetische Separation entfernt. Unspezifische Bindungen des N- oder C-Terminus von HC110-R an die Streptavidin-gekoppelten Beads wurden ausgeschlossen, indem einem Reaktionsansatz kein biotinyliertes PF1022A zugesetzt wurde.

Die Bindung des Liganden PF1022A *in vivo* an HC110-R wurde außerdem mit Hilfe der FACS-Analyse überprüft (Abb. 13). Hierzu wurden in Dreifach-Ansätzen HEK-293-Zellen transient mit HC110-R-GFP oder GFP-HC110-R transfiziert oder aber transient mit HC110-R-Myc/His und GFP kotransfiziert. Zur Kontrolle wurden nicht transfizierte sowie transient mit dem β_2 -R-GFP oder dem M1-R-GFP transfizierte HEK-293-Zellen eingesetzt. 24 h nach der Transfektion wurden die Zellen mit biotinyliertem PF1022A inkubiert und PF1022A-gebundene Zellen über Streptavidin-Phycoerythrin detektiert und abschließend fixiert. Eine Negativkontrolle HC110-R-GFP transfizierter Zellen wurde ohne PF1022A-Biotin nur mit Streptavidin-Phycoerythrin inkubiert.

Die Fluoreszenzanalyse von je 10000 HEK-293-Zellen erfolgte mit dem FACScan bei einer Anregungswellenlänge von 488 nm hinsichtlich ihrer Zellgröße, Granularität und Fluoreszenzfärbung. Phycoerythrin besitzt - wie auch TRITC - ein mit EGFP überlappendes Absorptionsspektrum bei ausreichend getrennten Emissionsspektren, so daß beide Fluorochrome bei nur einer Wellenlänge angeregt werden können. Zelltrümmer wurden durch das Setzen eines 'Gate' auf die Haupt-Zellpopulation von der Messung der Fluoreszenzintensität ausgeschlossen. Zur quantitativen

Auswertung wurden die Grenzen für negative, ungefärbte und positive, GFP-fluoreszierende Zellen anhand der nicht transfizierten und mit GFP transfizierten Zellen festgelegt. Die 4,6 % grünfluoreszierenden, nicht transfizierten HEK-293-Zellen (Autofluoreszenz) wurden von den anderen GFP-fluoreszierenden Proben abgezogen; und der Wert für die unspezifische Färbung der Zellen durch das mit Phycoerythrin gekoppelte Streptavidin (5,4 %) wurde von allen rotfluoreszierenden Zellen abgezogen (Tab. 1).

Tabelle 1: Nachweis der PF1022A-Bindung an HC110-R transfizierte HEK-293-Zellen durch FACScan

Plasmid	GFP-Fluoreszenz	Phycoerythrin-Fluoreszenz
nicht transfiziert	$0 \pm 0 \%$	$0 \pm 0 \%$
GFP	$17,0 \pm 0,5 \%$	$1,3 \pm 0,4 \%$
HC110-R-GFP	$10,9 \pm 0,2 \%$	$4,5 \pm 0,4 \%$
GFP-HC110-R	$9,4 \pm 2,5 \%$	$2,5 \pm 0,3 \%$
β_2 -R-GFP	$7,6 \pm 0,4 \%$	$0,8 \pm 0,1 \%$
M1-R-GFP	$8,2 \pm 0,7 \%$	$1,6 \pm 0,1 \%$
HC110-R-Myc/His + GFP	$23,1 \pm 2,3 \%$	$10,3 \pm 0,7 \%$

5 Berechnet man den prozentualen Anteil der grünfluoreszierenden Zellen, die nach Abzug der Autofluoreszenz bzw. der unspezifischen Rotfärbung durch Streptavidin-Phycoerythrin auch rotfluoreszierend waren, so binden 41,2 % der HC110-R-GFP exprimierenden Zellen, 26,8 % der GFP-HC110-R exprimierenden Zellen sowie 44,5 % der mit HC110-R-Myc/His und GFP kotransfizierten Zellen PF1022A, da-
 10 gegen binden nur 7,5 % der GFP exprimierenden Zellen, 9,9 % der β_2 -R-GFP exprimierenden Zellen und 19,2 % der M1-R-GFP exprimierenden Zellen PF 1022A (Abb. 13).

15 26. Wechselwirkungen von PF1022A-Derivaten mit HC110-R vermittelter α -LTX Signaltransduktion

PF1022A zeigt neuropharmakologische *in vitro* Aktivität zwischen 10^{-9} - 10^{-3} mg/ml je nach Nematodenart. Um eine mögliche Interferenz von PF1022A und seiner Derivate mit HC110-R und dem durch HC110-R vermittelten α -LTX-‘Signalling’
 20 festzustellen, wurde mit Hilfe der Ca^{2+} -Imaging-Methode der Einfluß von BAY44-4400, einer besser löslichen Morpholin-Variante von PF1022A, auf HC110-R transient oder stabil exprimierende HEK-293-Zellen untersucht. Zur Kontrolle wurde der *in vitro* wie *in vivo* mehr als 100fach weniger wirksame optische

Antipode zu PF1022A, PF1022-001, eingesetzt. BAY44-4400 und PF1022-001 wurden aufgrund ihrer Hydrophobizität zunächst in reinem DMSO gelöst. Die Stammkonzentration wurde dabei so gewählt, daß im Versuchsansatz stets nur 0,1 % DMSO gegenwärtig waren. Für DMSO-Konzentrationen bis einschließlich 0,1 % konnte in Kontrollversuchen ausgeschlossen werden, daß sie in nicht transfizierten wie HC110-R-GFP transfizierten HEK-293-Zellen zu einer Beeinträchtigung der Versuchsergebnisse führten (Abb. 14A). Fura-2 beladene nicht transfizierte sowie mit HC110-R-GFP transfizierte Zellen wurden zum einen mit 100, 300 oder 400 ng/ml sowie 1 oder 10 µg/ml BAY44-4400 und zum anderen mit den gleichen Konzentrationen PF1022-001 stimuliert. Bei keiner Konzentration konnte über den gesamten Zeitraum von 50 min eine Ca^{2+} -vermittelte Antwort festgestellt werden. Abb. 14B und C zeigen exemplarisch die Stimulation HC110-R-GFP und M1-R-GFP transfizierter Zellen mit 400 ng/ml BAY44-4400 und PF1022-001. Da die PF1022A-Derivate möglicherweise auch von den Zellen aufgenommen werden und damit sekundär in Signaltransduktionswege eingreifen können und weil die PF1022A-Derivate je nach Parasit längere Zeit im Wurm verweilen, wurden die Zellen in einigen Versuchen für 90 min mit den Derivaten vorinkubiert. Zellen, die für 90 min mit 4 ng/ml oder 400 ng/ml BAY44-4400 oder PF1022-001 vorinkubiert wurden, zeigten keine Veränderung der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ (Abb. 14D). Bei direkter Zugabe von Konzentrationen ab 300 ng/ml BAY44-4400 konnte - im Gegensatz zu dem optischen Antipoden - eine leichte, aber innerhalb weniger Minuten reversible Zellschwellung als unmittelbare Wirkung auf das Anthelmintikum in HC110-R-GFP transfizierten HEK-293-Zellen auf einem Monitor, der die Zellen 40fach vergrößert darstellte, beobachtet werden.

Von Piperazin weiß man neuesten Versuchen zufolge, daß es die Wirkung von PF1022A/BAY44-4400 in *in vitro*- wie *in vivo*-Versuchen mit *Heterakis spumosa* synergistisch verstärkt. Bei gleichzeitiger Gabe von 400 ng/ml BAY44-4400 mit 1 oder 10 µM Piperazin (Abb. 14F) konnte weder in nicht transfizierten, noch in HC110-R-GFP transient transfizierten HEK-293-Zellen eine Änderung der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ festgestellt werden. Der Kontrollansatz mit 10 µM Piperazin führte ebenfalls in nicht

transfizierten und HC110-R-GFP transfizierten Zellen zu keiner Veränderung des Ca^{2+} -Haushaltes (Abb. 14E).

Im Gegensatz dazu beeinflussten sowohl BAY44-4400, als auch der optische Antipode PF1022-001, in Anwesenheit von 75 nM α -LTX die α -LTX-induzierte Signaltransduktion von HC110-R-GFP exprimierenden HEK-293-Zellen, wenngleich auch in unterschiedlichem Ausmaß (Abb. 14B-E). In einem Kontrollexperiment, in dem man HC110-R-GFP oder M1-R-GFP transfizierten Zellen 6 min vor der Stimulation mit 75 nM α -LTX 0,1 % DMSO zusetzte, konnte ausgeschlossen werden, daß das für BAY44-4400 und auch PF1022-001 verwendete Lösungsmittel in dieser Konzentration einen Einfluß auf die durch α -LTX induzierte Veränderung der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ ausübte. HC110-R-GFP exprimierende Zellen zeigten im Gegensatz zu den M1-R-GFP exprimierenden Zellen nach α -LTX-Zugabe den bereits geschilderten biphasischen Verlauf mit vergleichbaren Werten für $[\text{Ca}^{2+}]_i$ (Abb. 15A).

Inkubierte man HC110-R-GFP exprimierende Zellen 6 min vor der α -LTX-Zugabe mit 4 ng/ml BAY44-4400, so verringerte sich der beschriebene Einfluß des α -LTX auf die Ca^{2+} -Konzentration: Der durch α -LTX induzierte erste kleine Anstieg der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ verschwand und der zweite verzögerte Peak wurde 14 min nach der α -LTX-Zugabe auf $44 \pm 6,0$ nM Ca^{2+} reduziert (Abb. 15B). In Anwesenheit von 4 ng/ml PF1022-001 - die Zugabe erfolgte 6 min vor der Stimulation mit α -LTX - kam es zu einem schnellen sofortigen Anstieg von $103 \pm 11,5$ nM Ca^{2+} (Abb. 15B). Wurde HC110-R-GFP exprimierenden Zellen 6 min vor der α -LTX-Zugabe 400 ng/ml BAY44-4400 zugesetzt, kam es - ähnlich wie bei 4 ng/ml BAY44-4400 (Abb. 15B) - zu einer verzögerten Erhöhung der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ um $49 \pm 4,2$ nM nach 23 min, die 8 min später auf ein verglichen mit den Ausgangswerten um $11 \pm 1,4$ nM leicht erhöhtes Plateau absank (Abb. 15C). Setzte man 400 ng/ml PF1022-001 6 min vor der Inkubation mit 75 nM α -LTX zu, so kam es zu einer schnellen Ca^{2+} -Erhöhung um $112 \pm 14,3$ nM Ca^{2+} (Abb. 15C), wie sie bereits bei Zugabe von 4 ng/ml PF1022-001 beobachtet werden konnte (Abb. 15B). In einem anderen Versuchsansatz wurden HC110-R-GFP exprimierende HEK-293-Zellen jeweils mit 4 ng/ml (Abb. 15D) oder 400 ng/ml BAY44-4400 bzw. PF1022-001 (Abb. 15E) für 90 min vorinkubiert.

Nicht gebundener oder aufgenommener Wirkstoff wurde nach der Inkubation und Beladung der Zellen mit Fura-2/AM sorgfältig gewaschen, bevor die Zellen mit 75 nM α -LTX stimuliert wurden. Mit dem optischen Antipoden PF1022-001 vorinkubierte HC110-R transfizierte Zellen zeigten bei 4 ng/ml PF1022-001 eine Erhöhung der $[Ca^{2+}]_i$ um $102 \pm 6,4$ nM (Abb. 15D) und bei 400 ng/ml eine vergleichbare Erhöhung um $109 \pm 8,4$ nM Ca^{2+} (Abb. 15E). Dieser bereits wenige Minuten nach α -LTX-Zugabe beobachtete Ca^{2+} -Anstieg glich den bereits in Abb. 15B und C beobachteten schnellen Veränderungen der $[Ca^{2+}]_i$, als PF1022-001 unmittelbar vor der Stimulation mit α -LTX zugegeben wurde. BAY44-4400 dagegen zeigte unterschiedliche Antworten bezüglich des α -LTX induzierten Ca^{2+} -Einstroms: Wurden HC110-R-GFP exprimierende Zellen mit 4 ng/ml BAY44-4400 für 90 min vorinkubiert, kam es durch α -LTX-Induktion zu einer maximalen Erhöhung der $[Ca^{2+}]_i$ um $95 \pm 20,5$ nM bei 10 min, bevor sie auf ein um $23 \pm 2,6$ nM Ca^{2+} erhöhtes ausgedehntes Plateau absank (Abb. 15D). Bei Vorinkubation mit 400 ng/ml BAY44-4400 kam es nach α -LTX-Stimulation zu einer Ca^{2+} -Erhöhung der $[Ca^{2+}]_i$ um maximal $65 \pm 7,5$ nM (Abb. 15D), die zudem noch 12 min verzögert gegenüber der Vorinkubation mit 4 ng/ml BAY44-4400 auftrat (Abb. 15C).

Setzte man stabil HC110-R-Myc/His exprimierenden HEK-293-Zellen 6 min vor der α -LTX-Zugabe 400 ng/ml BAY44-4400 zu, so wird die beobachtete direkte Erhöhung der $[Ca^{2+}]_i$ um $267 \pm 45,8$ nM komplett inhibiert (Abb. 15F). Im Gegensatz dazu führt die Zugabe von 400 ng/ml PF1022-001 mit einer Ca^{2+} -Erhöhung um $209 \pm 33,4$ nM Ca^{2+} zu keiner signifikanten Veränderung der $[Ca^{2+}]_i$ (Abb. 15F).

Um den spezifischen Einfluß von BAY44-4400 auf das α -LTX vermittelte Ca^{2+} -‘Signalling’ in HC110-R exprimierenden Zellen zu zeigen, wurden folgende Kontrollexperimente durchgeführt: Zunächst wurden nicht transfizierte HEK-293-Zellen mit 1 mM Carbamylcholin-Chlorid (Carbachol), einem Liganden für muscarinische Acetylcholin-Rezeptoren, unter An- und Abwesenheit von 400 ng/ml BAY44-4400 stimuliert (Abb. 15G). In beiden Fällen kam es zu einer vergleichbaren sofortigen Erhöhung der $[Ca^{2+}]_i$ durch endogene, natürliche muscarinische Acetyl-

cholin-Rezeptoren um $58 \pm 8,1$ nM Ca^{2+} für HEK-293-Zellen bei Anwesenheit von BAY44-4400 und um $53 \pm 6,8$ nM Ca^{2+} bei Abwesenheit des Anthelmintikums. Die zusätzliche transiente Transfektion von HEK-293-Zellen mit dem C-terminal GFP-fusionierten, humanen muscarinischen M1-Acetylcholin-Rezeptor (M1-R-GFP) führte zu einer gegenüber nicht transfizierten Zellen (Abb. 15G) leichten Erhöhung der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ um $89 \pm 5,5$ nM bei An- und um $85 \pm 6,1$ nM Ca^{2+} bei Abwesenheit von 400 ng/ml BAY44-4400 (Abb. 15H). Auch konnte kein signifikanter Einfluß von BAY44-4400 auf den M1-R-GPCR beobachtet werden. Stimulierte man in nicht transfizierten HEK-293-Zellen die endogen vorhandenen natürlichen β_2 -adrenergen Rezeptoren mit 1 mM Isoproterenol oder die nicotinischen Rezeptoren mit 1 mM Arecolin - wie bereits für Carbachol beschrieben - unter An- und Abwesenheit von 400 ng/ml BAY44-4400, so kam es auch hier zu keinem signifikanten Unterschied der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ (Abb. 15I). Isoproterenol induzierte einen Anstieg der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ von $45 \pm 4,7$ nM in An- und eine Zunahme von $48 \pm 5,7$ nM Ca^{2+} in Abwesenheit von BAY44-4400. Infolge der Arecolin-Stimulation kommt es in Anwesenheit von BAY44-4400 zu einer Erhöhung um $28 \pm 4,1$ nM Ca^{2+} , in Abwesenheit des Wirkstoffes um $27 \pm 3,5$ nM Ca^{2+} (Abb. 15I).

27. Gewinnung von Antikörpern

Zur Gewinnung von Antikörpern wurden weibliche NMRI-Mäusen sowie Kaninchen (Chinchilla-Bastarde) eingesetzt. Für die Immunisierung der NMRI-Mäuse wurden 3×15 µg des aufgereinigten 21 kD großen C-terminalen HC110-R Proteinfragmentes in je 100 µl PBS⁻ zusammen mit 100 µl FCA gelöst und an den Tagen 1, 8 und 15 zwei naiven NMRI-Mäusen subkutan gespritzt. Die Blutabnahme und Serumgewinnung erfolgte am Tag 23.

Zur Serumgewinnung wurde das durch Herzpunktion gewonnene Blut zunächst für 1 h bei 37°C und dann für mindestens 2 h bei 4°C inkubiert. Anschließend wurden die zellulären Bestandteile zweimal für 10 min bei 3000 rpm und 4°C in der Beckman GPKR-Zentrifuge pelletiert und der Überstand daraufhin für 45 min bei

56°C inaktiviert. Nach einer weiteren 10minütigen Zentrifugation bei 13000 rpm und 4°C in der Heraeus Biofuge 15R konnte das Serum abgenommen und bis zum weiteren Gebrauch bei -20°C gelagert werden.

- 5 Zwei Kaninchen wurde nach der ersten Blutentnahme und Gewinnung des Prä-immunserums zunächst 50 µg des C-terminalen 21 kD großen HC110-R Proteins, sowie des 54 kD großen N-terminalen HC110-R Proteins in einer zu gleichen Teilen aus PBS⁻ und FCA bestehenden Suspension subkutan injiziert. Zwei weitere Immunisierungen mit je 100 µg Antigen erfolgten am Tag 31 und Tag 79 nach der ersten
- 10 Immunisierung. Eine erste Blutentnahme wurde am Tag 43 durchgeführt. Eine zweite Blutentnahme und Serumgewinnung erfolgte am Tag 98 nach der ersten Immunisierung.

Beschreibung der Abbildungen

Abbildung 1: HC110-R mRNA und Protein

- 5 (A) Northern Blot Analyse unter Verwendung von Gesamt-RNA aus *Haemonchus contortus* und der 3,6 kbp cDNA von HC110-R.
- (B) 10% SDS-PAGE-Fluorogramm von *in vitro* translatiertem ³⁵S-markierten HC110-R-Protein. *In vitro*-Translation von 1 µg *in vitro* transkribierter HC110-R mRNA (HC110-R), Negativ-Kontrolle ohne HC110-R mRNA (control), 1µg Luciferase mRNA als Positiv-Kontrolle (luciferase).

10

Abbildung 2: Full length cDNA-Sequenz von HC110-R und abgeleitete Aminosäuresequenz

- Das Kozak-Motiv (Kozak, 1989) und das Polyadenylierungssignal von HC110-R (GenBank Accession Nr.: AJ272270) sind unterstrichen; das Startkodon in Position 100 ist fett gedruckt. Signalpeptid (Reste 1-21, fett), Lektin-ähnliche Sequenz (Reste 22-125, gepunktet), Thr-Stretch (Reste 128-147, grau unterlegt); Cystein-reicher Bereich der Struktur CX₉WX₁₂CX₉WXCX₅WX₉CX₃W (Reste 166-221, geschwungene Linie, Cys- und Trp-Reste zusätzlich fett); 4-Cys-Region der Struktur CXWWX₆WX₄CX₁₁CXC (Reste 478-524, gestrichelt, Cys- und Trp-Reste zusätzlich fett); die 7 Transmembranregionen (zwischen Resten 563-772, fett und unterstrichen); der Prolin-reiche Stretch (Reste 845-861, grau unterlegt), die PEST-Region (Reste 915-933, grau unterlegt); die N-Glykosylierungsstelle (Reste 26, 499 und 862, fett); die hochkonservierte putative Disulfidbindung des Cys-Cys-Paares zwischen Sekretin GPCRs (Position 595 und 666, fett und doppelt unterstrichen).

Abbildung 3: Alignment der abgeleiteten Aminosäuresequenzen des *H. contortus* HC110-R und *Caenorhabditis elegans* Cosmid-Klons B0457 (CE-B0457; GenBank Accession Nr.: Z54306)

- 5 Signalpeptid (SP, Reste 1-21, fett), Lektin-ähnliche Sequenz (Lektin, Reste 22-125, gepunktet); Thr-Stretch (T-reich, Reste 128-147, grau unterlegt); Cys-reiche Region der Struktur CX₉WX₁₂CX₉WXCX₅WX₉CX₃W (C-Signatur, Reste 166-221, geschwungene Linie, Cys- und Trp-Reste zusätzlich fett); 4-Cys-Motiv der Struktur CXWWX₆WX₄CX₁₁CXC (4 C-Region, Reste 478-524, gestrichelt, Cys- und Trp-Reste zusätzlich fett); die 7 Transmembranregionen (zwischen Resten 536-772, fett und unterstrichen); der Pro-reiche Stretch (P-reich, Reste 845-861, grau unterlegt); die PEST-Region (PEST, Reste 915-933, grau unterlegt); die N-Glykosylierungsstellen (Reste 26, 499 und 862, fett); die hochkonservierte putative Disulfidbindung des Cys-Cys-Paares zwischen Sekretin GPCRs (Position 595 und 666, fett und
- 10 doppelt unterstrichen). Identische Aminosäuren sind mit Sternchen markiert, sehr nahe miteinander verwandte Aminosäuren mit einem Doppelpunkt, verwandte Aminosäuren mit einem einzelnen Punkt.
- 15

20 **Abbildung 4: Alignment des 7-Transmembranrezeptors HC110-R und mehrerer anderer Rezeptoren der Sekretin-Subfamilie**

- HC110-R: *Haemonchus contortus* heptahelikaler Orphan-Transmembranrezeptor (Accession Nr.: AJ272270); BTLAT3: *Bos taurus* Latrophilin-3 (mehrere Splicing-Varianten, Accession Nr.: G4164053-G4164075); RNLAT1: *Rattus norvegicus*
- 25 Latrophilin-1 (Accession Nr.: U78105, U72487); MMEMR1: *Mus musculus* EMR1 Hormonrezeptor Vorläufer (Accession Nr.: Q61549); HSCD97: *Homo sapiens* Leukozyten Aktivierungsantigen CD97 (Accession Nr.: P48960); MMCADH: *M. musculus* Cadherin 7-Transmembranrezeptor-Vorläufer (Accession Nr.: G3800738); XLXRF1: *Xenopus laevis* Corticotropin Releasing Rezeptor-Vorläufer (Accession
- 30 Nr.: O42602); RNVIP1: *R. norvegicus* vasoaktiver intestinaler Polypeptidrezeptor-Vorläufer 2 (Accession Nr.: Q02643). Die sieben Transmembrandomänen sind grau

unterlegt (I-VII) und die hochkonservierte putative Disulfidbindung ist fett dargestellt.

Abbildung 5: Alignment der abgeleiteten Aminosäuresequenzen des *H. contortus* HC 110-R und *R. norvegicus* Latrophilin-1 (GenBank Acc. Nr. U78105, U72487)

Signalpeptid (SP, Reste 1-21, fett), Lektin-ähnliche Sequenz (Lektin, Reste 22-125, gepunktet); Thr-Stretch (T-reich, Reste 128-147, grau unterlegt); Cys-reiche Region der Struktur CX₉WX₁₂CX₉WXCX₅WX₉CX₃W (C-Signatur, Reste 166-221, geschwungene Linie, Cys- und Trp-Reste zusätzlich fett); 4-Cys-Motiv der Struktur CXWWX₆WX₄CX₁₁CXC (4 C-Region, Reste 478-524, gestrichelt, Cys- und Trp-Reste zusätzlich fett); die 7 Transmembranregionen (zwischen Resten 536-772, fett und unterstrichen); der Pro-reiche Stretch (P-reich, Reste 845-861, grau unterlegt); die PEST-Region (PEST, Reste 915-933, grau unterlegt); die N-Glykosylierungsstellen (Reste 26, 499 und 862, fett); die hochkonservierte putative Disulfidbindung des Cys-Cys-Paares zwischen Sekretin GPCRs (Position 595 und 666, fett und doppelt unterstrichen). Identische Aminosäuren sind mit Sternchen markiert, sehr nahe miteinander verwandte Aminosäuren mit einem Doppelpunkt, verwandte Aminosäuren mit einem einzelnen Punkt.

Abbildung 6: Struktur des HC110-R-Proteins und des Latrophilin-1 der Ratte

- (A) Hydrophobizitätsplot von HC110-R mit der 7-Transmembrandomäne.
- (B) Proteinstruktur von HC110-R mit den folgenden charakteristischen Motiven: Signalsequenz (SP), Lektin-Domäne (lectin), Thr-Stretch (T-stretch), Cys-Motiv (signature), 4-Cys-Region (4C-region), 7-Transmembrandomäne (1-7, schwarz), das Pro-reiche Motiv (P-rich) und die PEST-Sequenz (PEST). Die putativen Glykosylierungsstellen sind unter dem Diagramm dargestellt (N),

die Cys-Reste der 4C-Region und die beiden konservierten Cys-Reste der putativen Disulfidbindung ebenfalls (dünne Linie ohne Großbuchstaben).

- 5 (C) Proteinstruktur von Latrophilin-1. Latrophilin-1 hat keinen Thr-Stretch, enthält aber ein zusätzliches Olfaktomedin-Bindungsmotiv (olfactomedin), eine Pro-Thr-Region (P-T-Region), eine Linker-Domäne (linker) und eine lange, mehrere Repeats enthaltende Region (long).

Abbildung 7: Expression von HC110-R-GFP in HEK-293 und COS-7-Zellen

10

- (A) Gesamtprotein aus transient mit GFP (GFP) oder HC110-R-GFP (HC110-R) transfizierten sowie nicht transfizierten (n. t.) HEK-293- und COS-7-Zellen wurde 24 h nach der Transfektion über die Trizol-Methode isoliert.

- 15 (B) Gesamtprotein aus transient mit β_2 -R-GFP (β_2 -R) oder M1-R-GFP (M1-R) transfizierten sowie nicht transfizierten (n. t.) HEK-293-Zellen wurde 24 h nach der Transfektion über die Trizol-Methode isoliert. SDS-Marker-Banden bei 116, 90, 70 und 55 kDa (Marker).

- 20 Je 20 μ g Gesamtprotein pro Spur wurden über ein 10 %iges SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt und auf eine Nitrocellulosemembran geblottet. Nach dem Blocken in RotiBlock-Lösung über Nacht erfolgte die Immundetektion mit dem monoklonalen Maus-anti-GFP IgG-Primär- (0,4 μ g/ml) und dem monoklonalen Kaninchen-anti-Maus IgG-HRP-Sekundärantikörper (1:25000) durch das ECL-System.

25

Abbildung 8: Zelluläre Lokalisation von HC110-R und β_2 -R in transfizierten COS-7-Zellen durch CLSM

5 COS-7-Zellen wurden mit HC110-R-GFP und β_2 -R-GFP transfiziert, die beide einen C-terminalen GFP-Tag tragen. Die CLSM wurde 24 Stunden nach der Transfektion durchgeführt. Der Balken entspricht 10 μ m.

10 (A) HC110-R-GFP wird an der Plasmamembran und in cytoplasmischen Kompartimenten exprimiert. In der Nähe des Nukleus kann eine Verdichtung von cytoplasmischen Vesikeln beobachtet werden.

(B) CLSM-Kolokalisation des grünen HC110-R-GFP-Proteins mit sauren Lysosomen, gefärbt mit LysoTracker Red DND-99 bei 37°C für 1h.

15 (C) β_2 -R-GFP transfizierte Zellen zeigen ein ähnliches GFP-Fluoreszenzmuster wie HC110-R-GFP, bzw. wie unter Punkt (A) beschrieben. Der Rezeptor kann an der Plasmamembran und in Vesikeln lokalisiert werden und kann teilweise mit sauren Lysosomen, gefärbt mit LysoTracker Red DND-99 bei 37°C für 1h, kolokalisiert werden.

20

(D) Exprimierter β_2 -R-GFP kolokalisiert teilweise mit dem endoplasmatischen Retikulum, gefärbt mit monoklonalen anti-KDEL-Antikörpern.

Abbildung 9: Bindung von α -Latrotoxin an HC110-R

25

(A) 5 μ g Gesamtprotein isolierter *Latrodectus revivensis* Giftdrüsen (1) sowie reines 130 kDa großes α -LTX (2), ferner je 40 μ g Gesamtprotein stabil mit dem HC110-R-Myc/His-Konstrukt in dem pIRES1neo-Vektor transfizierter HEK-293-Zellen (3), nicht transfizierter Zellen (4) und des in *E. coli* induzierten 54 kDa großen N-Terminus (6) und 21 kDa großen C-Terminus (7) von HC110-R wurden in einem 10 %igen SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt,

30

geblottet und über Nacht geblockt. Die denaturierten Proteine wurden für 2 h mit 20 nM α -LTX inkubiert und mögliche Bindungen von α -LTX mit einem Kaninchen-anti- α -LTX IgG- (1:5000), einem Ziege-anti-Kaninchen IgG-HRP-Antikörper (1:25000) und dem ECL-System detektiert.

5

- (B) Je 40 μ g Gesamtprotein des in *E. coli* induzierten C- (1) und N-Terminus (2) von HC110-R sowie nicht transfizierter (3) und stabil mit HC110-R-Myc/His transfizierter HEK-293-Zellen (4) und adulter *H. contortus* Nematoden (5) wurde in einem 10 %igen SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt und mit einem 4 M Harnstoff-haltigem Renaturierungspuffer partiell renaturiert. Der Blot wurde über Nacht geblockt, mit 20 nM reinem α -LTX inkubiert und α -LTX bindende Proteine mit einem Kaninchen-anti- α -LTX IgG-Antikörper (1:5000), Biotin-Protein A (1:100), Streptavidin-Peroxidase (1:3000) und dem ECL-System nachgewiesen.

15

Abbildung 10: Dosisabhängigkeit von α -LTX auf das HC110-R-vermittelte Ca^{2+} -Signalling

HEK-293-Zellen wurden 48 h nach der transienten Transfektion mit HC110-R-GFP für 30 min mit 1 μ M Fura-2/AM beladen. Die Stimulation der Zellen erfolgte 6 min nach Beginn der Messung mit unterschiedlichen α -LTX-Konzentrationen für weitere 44 min. Gemessen wurde der Quotient aus 340/380 nm (Ratio) in Abhängigkeit von der Zeit. n gibt die Anzahl der ausgewählten Zellen an.

- (A) HC110-R-GFP exprimierende Zellen wurden mit 7,5 nM (schwarze Linie) oder 25 nM α -LTX (graue Linie) stimuliert.

- (B) HC110-R-GFP exprimierenden Zellen wurde 50 nM (graue Linie) oder 75 nM α -LTX (schwarze Linie) zugesetzt.

30

(C) HC110-R-GFP exprimierende Zellen wurden mit 90 nM (graue Linie) oder 120 nM α -LTX (schwarze Linie) stimuliert.

5 (D) Auf der Abszisse ist die $[Ca^{2+}]_i$ in nM, auf der Ordinate sind die zur Stimulation von HC110-R-GFP exprimierenden HEK-293-Zellen eingesetzten α -LTX-Konzentrationen (0, 7,5, 25, 50, 75, 90 und 120 nM) für den ersten schnellen Peak (1. Peak, graue Linie) und den zweiten verzögerten Peak (2. Peak, schwarze Linie) aufgetragen.

10 **Abbildung 11: Ca^{2+} -Imaging von HC110-R transfizierten HEK 293-Zellen**

(A) C-terminal mit GFP getaggttes HC110-R (HC110-R-GFP): schwarze Linie.
N-terminal mit GFP getaggttes HC110-R (GFP-HC110-R): graue Linie.

15 (B) 75 nM α -LTX mit nicht-transfizierten HEK-293-Zellen (n. t., schwarze Linie) und GFP-transfizierten Zellen (GFP, graue Linie).

(C) 75 nM α -LTX mit Zellen, die mit C-terminal getaggttem humanen M1 muskarinischen Acetylcholinrezeptor (M1-R-GFP, graue Linie) und mit
20 C-terminal getaggttem β_2 -adrenergem Acetylcholinrezeptor aus der Maus (β_2 -R-GFP, schwarze Linie) transfiziert wurden.

(D) HC110-R-GFP transfizierte Zellen wurden 6 Minuten vor α -LTX-Zugabe (75 nM) mit 2 mM EGTA behandelt (+EGTA, graue Linie). In der Kontrolle
25 wurde EGTA weggelassen (-EGTA, schwarze Linie).

(E) 2mM EGTA wurden 10 min nach α -LTX-Zugabe (75 nM) zugesetzt (+EGTA, graue Linie). Dem Kontrollansatz wurde kein EGTA zugesetzt (-EGTA, schwarze Linie).

- (F) Zur Kontrolle wurden nicht transfizierte (n. t., graue Linie) und HC110-R-GFP exprimierende Zellen (schwarze Linie) über 30 Minuten mit 2 nM EGTA verstetzt.

5 **Abbildung 12: Störung der durch α -LTX bedingten Signalübertragung durch BAY44-4400**

HEK-293-Zellen wurden transient mit GFP-getagtem HC110-R-Protein transfiziert und 48 h nach der Transfektion stimuliert (Pfeile). Ca^{2+} -Imaging wurde für 50 Mi-
10 nuten (Abb. A-D) durchgeführt, Kontrollexperimente mit verschiedenen endogenen natürlichen Rezeptoren nicht-transfizierter HEK-293-Zellen für 20 Minuten. n = Anzahl der Zellen.

- (A) Zugabe von 400 ng/ml BAY44-4400 (schwarze Linie) oder von PF1022-001
15 (graue Linie) zu den Zellen. Zur Kontrolle wurden die Zellen nach der Zugabe von BAY44-4400 oder PF1022-001 mit Na^+ -HBS-HEPES-Puffer (HBS) behandelt, der auch als Lösungsmittel für die jeweiligen Substanzen diente.

- 20 (B) Durch α -LTX (75 nM) bedingte Signalübertragung in Gegenwart von 4 ng/ml BAY44-4400 (schwarze Linie) und PF1022-001 (graue Linie).

- (C) Durch α -LTX bedingte Signalübertragung in Zellen, die für 90 Minuten mit
25 4 ng/ml BAY44-4400 (schwarze Linie) oder PF1022-001 (graue Linie) vorinkubiert wurden. Die Substanzen wurden vor der Zugabe von α -LTX wieder entfernt.

- (D) Durch α -LTX bedingte Signalübertragung in HC110-R-GFP transfizierten
30 Zellen, die für 90 Minuten mit 400 ng/ml BAY44-4400 (schwarze Linie) oder PF1022-001 (graue Linie) vorinkubiert wurden. Die Substanzen wurden vor der Zugabe von α -LTX wieder entfernt.

- 5 (E) Nicht-transfizierte HEK-293-Zellen wurden mit 1 mM Carbamylcholinechlorid (Carbachol) für 100 s in An- (400 ng/ml BAY44-4400, schwarze Linie) oder Abwesenheit von 400 ng/ml BAY44-4400 (graue Linie, -BAY44-4400) stimuliert.
- 10 (F) Nicht-transfizierte HEK-293-Zellen wurden mit 1 mM Isoproterenol und mit 1 mM Arecolin für jeweils 100 s in An- (400 mg/ml BAY 44-4400, scharze Linie) oder Abwesenheit von 400 ng/ml BAY44-4400 (-BAY44-4400, graue Linie) stimuliert.

Abb. 13: Nachweis der PF1022A-Bindung an HC110-R transfizierte HEK-293-Zellen durch FACScan

- 15 Je 5×10^5 nicht transfizierte, transient mit GFP, HC110-R-GFP, GFP-HC110-R, β_2 -R-GFP und M1-R-GFP transfizierte sowie transient mit HC110-R-Myc/His und GFP kotransfizierte HEK-293-Zellen wurden 24 h nach der Transfektion mit 0,5 μ g/ml PF1022A-Biotin und Streptavidin-Phycoerythrin (1:300) inkubiert und anschließend
- 20 fixiert. Als Negativkontrolle wurden HC110-R-GFP transfizierte Zellen ohne PF1022A-Biotin nur mit Streptavidin-Phycoerythrin inkubiert. Nach Abzug der Autofluoreszenz, d. h. der 4,6 % nicht transfizierten Zellen (n. t.) im Grünkanal von allen grün-fluoreszierenden Zellen und der durch Streptavidin-Phycoerythrin bedingten 4,4 % unspezifischen Färbung im Rotkanal wurde der prozentuale Anteil der
- 25 GFP-fluoreszierenden Zellen (GFP, HC110-R-GFP, GFP-HC110-R, β_2 -R-GFP, M1-R-GFP und HC110-R-Myc/His + GFP) ermittelt, die PF1022A gebunden haben (PF1022A-Bindung in %). Die Standardabweichung ergibt sich durch die Bestimmung der Mittelwerte von Dreifach-Ansätzen.

Abb. 14: Einfluß von BAY44-4400 und dem optischen Antipoden PF1022-001 auf das HC110-R vermittelte Ca^{2+} -‘Signalling‘

Die Beladung der Zellen mit 1 μM Fura-2/AM erfolgte in nicht transfizierten HEK-293-Zellen sowie 48 h nach der transienten Transfektion mit HC110-R-GFP oder M1-R-GFP. Gemessen wurde der Quotient aus 340/380 nm (Ratio) in Abhängigkeit von der Zeit. n gibt die Anzahl der ausgewählten Zellen an.

- 5
- (A) Nicht transfizierte (n. t., graue Linie) und HC110-R-GFP transfizierte (HC110-R-GFP, schwarze Linie) Zellen wurden zur Kontrolle nach 6 min mit 0,1 % des Lösungsmittels DMSO in Na^+ -HBS-Puffer versetzt.
- 10
- (B) HC110-R-GFP (schwarze Linie) und M1-R-GFP (graue Linie) transfizierte Zellen wurden nach 6 min mit 400 ng/ml BAY44-4400 stimuliert.
- 15
- (C) Wie (B), HC110-R-GFP (schwarze Linie) und M1-R-GFP (graue Linie) transfizierte Zellen wurden nach 6 min mit 400 ng/ml PF1022-001 stimuliert.
- (D) HC110-R-GFP exprimierende Zellen wurden für 90 min mit 400 ng/ml BAY44-4400 (schwarze Linie) oder PF1022-001 (graue Linie) vorinkubiert und nicht gebundene Substanzen vor der Messung gewaschen.
- 20
- (E) Nicht transfizierten (n. t., graue Linie) und HC110-R-GFP exprimierenden Zellen (HC110-R-GFP, schwarze Linie) wurde nach 6 min 10 μM Piperazin zugesetzt.
- 25
- (F) Wie (E), nur wurde nicht transfizierten (n. t., graue Linie) und HC110-R-GFP exprimierenden Zellen (HC110-R-GFP, schwarze Linie) nach 6 min ein Gemisch aus 10 μM Piperazin und 400 ng/ml BAY44-4400 verabreicht.
- 30

Abb. 15: Wechselwirkungen des HC110-R vermittelten α -LTX Signalling durch PF1022A-Derivate

Die Beladung der Zellen mit 1 μ M Fura-2/AM erfolgte in nicht transfizierten HEK-293-Zellen sowie 48 h nach der transienten Transfektion mit HC110-R-GFP oder M1-R-GFP. Die eingesetzte α -LTX-Menge betrug stets 75 nM. Für die Versuche mit den Kontrollsubstanzen wurden die Zellen mit einer Fließgeschwindigkeit von 1,6 ml Na^+ -HBS/min umspült. Gemessen wurde der Quotient aus 340/380 nm (Ratio) in Abhängigkeit von der Zeit. n gibt die Anzahl der ausgewählten Zellen an.

10

(A) HC110-R-GFP (schwarze Linie) und M1-R-GFP (graue Linie) exprimierende Zellen wurden 6 min vor der α -LTX-Stimulation mit 0,1 % DMSO versetzt, um auszuschließen, daß DMSO Einfluß auf α -LTX induzierte Veränderungen der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ nimmt.

15

(B) HC110-R-GFP transfizierte Zellen wurden 6 min vor der α -LTX Zugabe mit 4 ng/ml BAY44-4400 (schwarze Linie) oder PF1022-001 (graue Linie) versetzt.

20

(C) Wie (B), nur wurde HC110-R-GFP exprimierenden Zellen 6 min vor der Stimulation mit α -LTX 400 ng/ml BAY44-4400 (schwarze Linie) oder PF1022-001 (graue Linie) zugegeben.

25

(D) HC110-R-GFP transfizierte Zellen wurden für 90 min mit 4 ng/ml BAY44-4400 (schwarze Linie) oder PF1022-001 (graue Linie) vorinkubiert und nicht gebundene Substanzen vor der Messung entfernt. Die Stimulation der Zellen erfolgte nach 6 min mit α -LTX.

30

(E) Wie (D), nur wurden HC110-R-GFP transfizierte Zellen für 90 min mit 400 ng/ml BAY44-4400 (schwarze Linie) oder PF1022-001 (graue Linie) vorinkubiert, nicht gebundene Substanzen vor der Messung entfernt und die

Zellen nach 6 min mit α -LTX stimuliert.

- 5 (F) HC110-R-Myc/His stabil exprimierende Zellen wurden 6 min vor der Zugabe von α -LTX mit 400 ng/ml BAY44-4400 (schwarze Linie) oder PF1022-001 (graue Linie) versetzt.
- 10 (G) Zur Kontrolle wurde nicht transfizierten Zellen in An- (400 ng/ml BAY44-4400, schwarze Linie) oder Abwesenheit (-BAY44-4400, graue Linie) von 400 ng/ml BAY44-4400 nach 6 min 1 mM Carbamylcholin-Chlorid (Carbachol) für 100 s zugesetzt und wieder mit Na^+ -HBS ausgewaschen.
- 15 (H) Wie (G), nur wurden M1-R-GFP transfizierte Zellen in An- (400 ng/ml BAY44-4400, schwarze Linie) oder Abwesenheit (-BAY44-4400, graue Linie) von 400 ng/ml BAY44-4400 nach 6 min mit 1 mM Carbachol für 100 s stimuliert und wieder mit Na^+ -HBS ausgewaschen.
- 20 (I) Zur Kontrolle wurden nicht transfizierte Zellen in An- (400 ng/ml BAY44-4400, schwarze Linie) oder Abwesenheit (-BAY44-4400, graue Linie) von 400 ng/ml BAY44-4400 nach 3 min für 100 s mit 1 mM Isoproterenol und nach 12 min für 100 s mit 1 mM Arecolin stimuliert. Die Substanzen wurden nach den 100 s wieder mit Na^+ -HBS ausgewaschen.

Literatur

1. Allard W.J., Sigal I.S. und Dixon R.A.F. (1987) Sequence of the gene encoding the human M1 muscarinic acetylcholine receptor. *Nucleic Acids Res.* 24, 10604.
5
2. Altschul S.F. und Lipman D.J. (1990) Protein database searches for multiple alignments. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 87, 5509-5513.
3. Appel R.D., Bairoch A. und Hochstrasser D.F. (1994) A new generation of information retrieval tools for biologists: the example of the ExPASy WWW
10 server. *Trends Biochem. Sci.* 19, 258 – 260.
4. Aviv H. und Lederer P. (1972) Purification of biologically active globin messenger RNA by chromatography on oligothymidylic acid-cellulose. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 69, 1408-1412.
5. Bacon K.B., Westwick J. und Camp R.D. (1989) Potent and spezifc
15 inhibition of IL-8-, IL-1 alpha- and IL-1 beta- induced in vitro human lymphocyte migration by calcium channel antagonists. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 165, 349-354.
6. Boyd V.L., Bozzini M., Zon G., Noble R.L. und Mattaliano R.J. (1992) Sequencing of peptides and proteins from the carboxy terminus. *Anal. Biochem.* 206, 344 – 352.
20
7. Bradford M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of proteins utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72, 248 – 252.
8. Brendel V., Bucher P., Nourbakhsh I.R., Blaisdell B.E. und Karlin S. (1992)
25 Methods and algorithms for statistical analysis of protein sequences. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 89, 2002 – 2006.
9. Chalfie M., Tu Y., Euskirchen G., Ward W.W. und Prasher D.C. (1994) Green fluorescent protein as a marker for gene expression. *Science* 263, 725 – 888.
- 30 10. Chan M-S. (1997) The global burden of intestinal nematode infections – fifty years on. *Parasitol. Today* 13, 438-443.

11. Chen W., Terada M. und Cheng J.T. (1996) Characterization of subtypes of gamma-aminobutyric acid receptors in an *Ascaris* muscle preparation by binding assay and binding of PF1022A, a new anthelmintic, on the receptors. *Parasitol. Res.* 82, 97-101.
- 5 12. Chomczynski P. (1992) One-hour downward alkaline capillary transfer for blotting of DNA and RNA. *Anal. Biochem.* 201, 134-139.
13. Chomczynski P. (1993) A reagent for the single-step simultaneous isolation of RNA, DNA and proteins from cell and tissue samples. *BioTechniques* 15, 532 - 534; 536 - 537.
- 10 14. Chomczynski P. und Sacchi N. (1987) Single-step method of RNA-isolation by acid guanidiniumthiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal. Biochem.* 162, 156-159.
- 15 15. Coombs L.M., Pigott D., Proctor A., Eydmann M., Denner J. und Knowles M.A. (1990) Simultaneous isolation of DNA, RNA, and antigenic protein exhibiting kinase activity from small tumor samples using guanidine isothiocyanate. *Anal. Biochem.* 188, 338 - 343.
- 20 16. Conder G.A., Johnson S.S., Nowakowski D.S., Blake T.E., Dutton F.E., Nelson S.J., Thomas E.M., Davis J.P. und Thompson D.P. (1995) Anthelmintic profile of the cyclodepsipeptide PF1022A in *in vitro* and *in vivo* models. *J. Antibiotics* 48, 820-823.
17. Davletov B.A., Meunier F.A., Ashton A.C., Matsushita H., Hirst W.D., Lelianova V.G., Wilkin G.P., Dolly J.O. und Ushkaryov Y.A. (1998) Vescicle exocytosis stimulated by α -latrotoxin is mediated by latrophilin and requires both external and stored Ca^{2+} . *EMBO J.* 17, 3909-3920.
- 25 18. Davletov B.A., Shamotienko O.G., Lelianova V.G., Grishin E.V. und Ushkaryov Y.A. Isolation and biochemical characterization of a Ca^{2+} -independent α -latrotoxin-binding protein. *J. Biol. Chem.* 271, 23239-23245.
- 30 19. Drexler H.G., Dirks W., MacLeod R.A.F., Quentmeier H. und Steube K. (eds.) (1995) *DSM Catalogue of Human and Animal Cell Lines*; Fifth Edition, Braunschweig

20. Jackson R. J., Howell M. T. und Kaminski A. (1990) The novel mechanism of initiation of picornavirus RNA translation. *Trends Biochem. Sci.* 15, 477 - 483.
21. Devereux J., Haeberli P. und Smithies O. (1984) A comprehensive set of
5 sequence analysis programs of VAX. *Nucleic Acids Res.* 12, 387-395.
22. Fivash M., Towler E.M., Fisher R.J. (1998) Biacore for macromolecular interaction. *Curr. Opin. Biotechnol.* 9, 97-101.
23. Fukashe T., Koike T., Chinone S., Akihama S., Iagake H., Takagi M., Shimizu T., Yaguchi T., Sasaki T. und Okada T. (1990) Anthelmintic effects
10 of PF1022A, a new cyclic depsipeptide, on the intestinal parasitic nematodes in dogs and cats. *Proc 110th Meet Jap Soc vet Sci*, 122 (Abstr.).
24. Giese G., Wieggers W., Kubbies M., Scherbarth A. und Traub P. (1995) Okadaic acid co-induces vimentin expression and cell cycle arrest in MPC-11 mouse plasmacytoma cells. *J. Cell. Physiol.* 163, 145 – 154.
- 15 25. Geßner G., Meder S., Rink T. und Boheim G. (1996) Ionophore and anthelmintic activity of PF1022A, a cyclooctadepsipeptide, are not related. *Pestic. Sci.* 48, 399-407.
26. Grynkiewicz G., Poenie M.M. und Tsien R.Y. (1985) A new generation of Ca^{2+} indicators with greatly improved fluorescence properties. *J. Biol. Chem.*
20 260, 3440 – 3450.
27. Gyuris J., Golemis E., Chertkov H. und Brent R. (1993) Cdi 1, a human G1 and S phase protein phosphatase that associates with Cdk 2. *Cell* 75, 791-803.
28. Harder A., Londershausen M. und Mehlhorn H. (1997) The four larval stages and the adults of *Heterakis spumosa* are impaired by the anthelmintic cyclodepsipeptide PF 1022A. *Zbl. Bakteriologie* 286, 212.
25
29. Henkel A.W. und Sankaranarayanan S. (1999) Mechanisms of α -latrotoxin action. *Cell Tissue Res.* 296, 229-233.
30. Holz G.G. und Habener J.F. (1998) Black widow spider alpha-latrotoxin: a presynaptic neurotoxin that shares structural homology with the glucagon-like peptide-1 family of insulin secretagogic hormones, *Comp. Biochem. Physiol. B. Biochem. Mol. Biol.* 121, 177-184.
30

31. Hunkapiller M.W., Hewick R.M., Dreyer W.J. und Hood L.E. (1983) High sensitivity sequencing with a gas phase sequenator. *Meth. Enzymol.* 91, 399 – 413.
32. Ichtchenko, K., Bittner, M.A., Krasnoperov, V., Little, A.R., Chepurny, O., Holz, R.W. und Petrenko, A.G. (1999) A novel ubiquitously expressed α -latrotoxin receptor is a member of the CIRL family of G-protein-coupled receptors. *J. Biological Chem.* 274, 5491-5498.
33. Jackson R.J., Howell M.T. und Kaminski A. (1990) The novel mechanism of initiation of picornavirus RNA translation. *Trends Biochem. Sci.* 15, 477 – 483.
34. Jang S.K., Krausslich H.G., Nicklin M.J., Duke G.M., Palmenberg A.C. und Wimmer E. (1988) A segment of the 5' nontranslated region of encephalomyocarditis virus RNA directs internal entry of ribosomes during *in vitro* translation. *J. Virol.* 62, 2636 – 2643.
35. Kachi S., Ishih A. und Terada M. (1994) Effects of PF1022A on *Angiostrongylus cantonensis* staying in the central nervous system of rats and mice. *Jpn. J. Parasitol.* 43, 483-488.
36. Kachi S., Ishih A. und Terada M. (1995) Effects of PF1022A on adult *Angiostrongylus cantonensis* in the pulmonary arteries and larvae migrating into the central nervous system of rats. *Parasitol. Res.* 81, 631-637.
37. Kachi S., Terada M. und Hashimoto H. (1997) Influence of PF1022A on the motility of *Angiostrongylus cantonensis* *in vitro*. *Parasitol. Res.* 83, 578-582.
38. Kachi S., Terada M. und Hashimoto H. (1998) Effects of amorphous and polymorphs of PF1022A, a new antinematode drug, on *Angiostrongylus costaricensis* in mice. *Jpn. J. Pharmacol.* 77, 235-245.
39. Klein R.D. und Geary T.G. (1997) Recombinant microorganisms as tools for high throughput screening for nonantibiotic compounds, *J. Biomol. Screening* 2, 41-49.
40. Krasnoperov V., Bittner M.A., Holz R.W., Chepurny O. und Petrenko A.G. (1999) Structural requirements for α -latrotoxin binding and α -latrotoxin-stimulated secretion. *J. Biological Chem.* 274, 3590-3596.

41. Kozak M. (1989) The scanning model for translation: An update. *J. Cell Biol.* 108, 229 – 241.
42. Kurachi S., Sze L. und Kurachi K. (1998) Improved Transfection of Hep G2 Cells using FuGENE™ 6 Transfection Reagent. *Biochemica* 3, 43 – 44.
- 5 43. Lämmli U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-685.
44. Lowry O.H., Rosebrough N.J., Farr A.L. und Randall R.J. (1951) Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193, 265 – 275.
45. Martin R.J. (1997) Modes of action of anthelmintic drugs. *Veterinary J.* 154, 11-34.
- 10 46. Martin R.J., Robertson A.P. und Bjorn H. (1997) Target sites of anthelmintics. *Parasitol.* 114, 111-124.
47. Martin R.J., Harder A., Londershausen M. und Jeschke P. (1996) Anthelmintic actions of the cyclic depsipeptide PF1022A and its electrophysiological effects on muscle cells of *Ascaris suum*. *Pestic. Sci.* 48, 343-349.
- 15 48. McCormack J.G. und Cobbold P.H. (1991) Cellular calcium: a practical approach. *The practical approach series, IRL press, Oxford*, 30 – 42.
49. McMaster G.K. und Carmichael G.G. (1977) Analysis of single- and double-stranded nucleic acids on polyacrylamide and agarose gels by using glyoxal and acridine orange. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 74, 4835-4838.
- 20 50. Nakada M.T., Haskell K.M., Ecker D.J., Stadel J.M. und Crooke S.T. (1989) Genetic regulation of beta 2-adrenergic receptors in 3T3-L1 fibroblasts. *Biochem. J.* 260, 53 – 59.
- 25 51. Pearson W.R. und Lipman D.J. (1988) Improved tools for biological sequence comparison. *Proc. Natl. Acad. Sci., U.S.A.* 85, 2444 – 2448.
52. Pearson und Lipman (1988) Petrenko A.G. (1993) α -Latrotoxin receptor. Implications in nerve terminal function. *FEBS Lett.* 325, 81-85.
53. Plasterk R. H. (1996) The Tc1/mariner transposon family. *Curr. Top Microbiol. Immunol.* 204, 125-143.
- 30

54. Rahman M.A., Ashton A.C., Meunier F.A., Davletov B.A., Dolly J.O. und Ushkaryov Y.A. (1999) Norepinephrine exocytosis stimulated by α -latrotoxin requires both external and stored Ca^{2+} and is mediated by latrophilin, G proteins and phospholipase C. *Phil. Trans. R. Soc. Lond. B* 354, 379-386.
- 5 55. Rees S., Coote J., Stables J., Goodson S., Harris S. und Lee M.G. (1996) Bicistronic vector for the creation of stable mammalian cell lines that predisposes all antibiotic-resistant cells to express recombinant protein. *BioTechniques* 20, 102 – 112.
56. Sambrook J., Fritsch E.F. und Maniatis T. (1989) Molecular cloning. A laboratory handbook. *Verlag Cold Spring Harbour Laboratory Press, New York*, 7.43-7.45.
- 10 57. Samson-Himmelstjerna G. von, Harder A., Schnieder T., Kalbe J. und Mencke N. (2000) *In vivo* activities of the new anthelmintic depsipeptide PF 1022A. *Parasitol. Res.* 86, 194-199.
- 15 58. Sasaki T., Takagi M., Yaguchi T., Miyadoh S., Okada T. und Koyama M. (1992) A new anthelmintic cyclodepsipeptide, PF1022A. *J. Antibiotics* 45, 692-697.
59. Schlack P. und Kumpf W. (1926) Über eine neue Methode zur Ermittlung der Konstitution von Peptiden. *Z. Physiol. Chemie Hoppe-Seyler* 154, 125 – 170.
- 20 60. Schmitt-Wrede H.-P., Waldraff A., Krücken J., Harder A. und Wunderlich F. (1999) Characterization of a hexokinase encoding cDNA of the parasitic nematode *Haemonchus contortus*. *Biochim. Biophys. Acta* 1444, 439-444.
61. Seagar M., Lévêque C., Charvin N., Marquèze B., Martin-Moutot N., Boudier J.A., Boudier J.-L., Shoji-Kasai Y., Sato K. und Takahashi M. (1999) Interactions between proteins implicated in exocytosis and voltage-gated calcium channels. *Phil. Trans. R. Soc. Lond. B* 354, 289-297.
- 25 62. Smith T.F. und Waterman M.S. (1981) Identification of common molecular subsequences. *J. Mol. Biol.* 147, 195-197.
63. Sugita S., Ichtchenko K., Khvotchev M. und Südhof T.C. (1998) α -Latrotoxin receptor CIRL/latrophilin 1 (CL1) defines an unusual family of ubiquitous G-protein-linked receptors. *J. Biological Chem.* 273, 32715-32724.
- 30

64. Tagaki M., Sasaki T., Yaguchi T., Kodama Y., Okada T., Miyadoh S. und Koyama M. (1991) On a new cyclic depsipeptide, PF1022A with anthelmintic effects. *Nippon Nogeikagaku Kaishi* 65, 326 (Abstr.).
- 5 65. Terada M. (1992) Neuropharmacological mechanism of action of PF1022A, an antinematode anthelmintic with a new structure of cyclic depsipeptide, on *Angiostrongylus cantonensis* and isolated frog rectus. *Jpn. J. Parasitol.* 41, 1-18.
- 10 66. Terada M., Ishih A., Tungtrongchitr A., Sano M. und Shomura T. (1993) Effects of PF1022A on developing larvae of *Angiostrongylus costaricensis* in mice, with special reference to route, dose and formulation. *Jpn. J. Parasitol.* 42, 199-210.
67. Thomas A.P. und Delaville F. (1991) The use of fluorescent indicators for measurements of cytosolic-free calcium concentration in cell populations and single cells. *IRL Press*, 1-54.
- 15 68. Waller P.J. (1997) Anthelmintic resistance. *Veterinary Parasitology* 72, 391-412 .
69. Waller P.J. (1998) International approaches to the concept of integrated control of nematode parasites of livestock. *Veterinary Parasitology* 73, 155 – 164.
- 20 70. Yang F., Moss L.G. und Phillips G.N. Jr. (1996a.) The molecular structure of green fluorescent protein. *Nature Biotechnology* 14, 1246 – 1251.
71. Yang T.T., Cheng L.Z. und Kain S. R. (1996b) Optimized codon usage and chromophore mutations provide enhanced sensitivity with the green fluorescent protein. *Nucleic Acid Res.* 24, 4592 – 4593.

Original (für EINREICHUNG) - gedruckt am 20.08.2001 11:03:45 AM

0-1	Formular - PCT/RO/134 (EASY) Angaben zu einem hinterlegten Mikroorganismus und/oder anderem hinterlegten biologischen Material erstellt durch Benutzung von	PCT-EASY Version 2.92 (aktualisiert 01.03.2001)
0-2	Internationales Aktenzeichen.	
0-3	Aktenzeichen des Anmelders oder Anwalts	LEA34240-WO
1	Die nachstehenden Angaben betreffen den Mikroorganismus und/oder anderes biologisches Material, der/das in der Beschreibung genannt ist	
1-1	Seite	25
1-2	Zeile	27
1-3	Angaben betr. Hinterlegung	
1-3-1	Name der Hinterlegungsstelle	DSMZ-Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH
1-3-2	Anschrift der Hinterlegungsstelle	Mascheroder Weg 1b, D-38124 Braunschweig, Germany
1-3-3	Datum der Hinterlegung	25 Mai 2000 (25.05.2000)
1-3-4	Eingangsnummer	DSMZ ACC2465
1-4	Weitere Angaben	KEINE
1-5	Bestimmungsstaaten, für die besondere Angaben gemacht werden	alle Bestimmungsstaaten
1-6	Gesondert eingereichte Angaben Diese Angaben werden dem Internationalen Büro später übermittelt	KEINE
2	Die nachstehenden Angaben betreffen den Mikroorganismus und/oder anderes biologisches Material, der/das in der Beschreibung genannt ist	
2-1	Seite	25
2-2	Zeile	14
2-3	Angaben betr. Hinterlegung	
2-3-1	Name der Hinterlegungsstelle	DSMZ-Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH
2-3-2	Anschrift der Hinterlegungsstelle	Mascheroder Weg 1b, D-38124 Braunschweig, Germany
2-3-3	Datum der Hinterlegung	25 Mai 2000 (25.05.2000)
2-3-4	Eingangsnummer	DSMZ ACC2464
2-4	Weitere Angaben	KEINE
2-5	Bestimmungsstaaten, für die besondere Angaben gemacht werden	alle Bestimmungsstaaten

Original (für EINREICHUNG) - gedruckt am 20.08.2001 11:03:45 AM

2-6	Gesondert eingereichte Angaben Diese Angaben werden dem Internationalen Büro später übermittelt	KEINE
-----	---	-------

VOM ANMELDEAMT AUSZUFÜLLEN

0-4	Dieses Formular ist mit der internationalen Anmeldung eingegangen (ja oder nein)	JA
0-4-1	Bevollmächtigter Bediensteter	N. MAILLIARD

VOM INTERNATIONALEN BÜRO AUSZUFÜLLEN

0-5	Dieses Formular ist an folgendem Datum beim internationalen Büro eingegangen	
0-5-1	Bevollmächtigter Bediensteter	

Patentansprüche

1. Verwendung von Calcium-Kanal-Transmembranrezeptoren aus Helminthen zum Identifizieren von anthelminthisch wirksamen Substanzen.
5
2. Verwendung von Calcium-Kanal-Transmembranrezeptoren aus Arthropoden zum Identifizieren von arthropodizid wirksamen Substanzen.
3. Verwendung von Transmembranrezeptoren gemäß Anspruch 1 oder 2, da-
10 durch gekennzeichnet, dass es sich um G-Protein gekoppelte Transmembran-
rezeptoren mit sieben Transmembran-Domänen handelt.
4. Verwendung von Transmembranrezeptoren gemäß einem der Ansprüche 1 bis
15 3, dadurch gekennzeichnet, dass es sich um Transmembranrezeptoren der
Sekretin-Subfamilie handelt.
5. Verwendung von Transmembranrezeptoren gemäß einem der Ansprüche 1, 3
oder 4, dadurch gekennzeichnet, dass es sich um Transmembranrezeptoren
aus Nematoden handelt.
20
6. Verwendung von Transmembranrezeptoren gemäß einem der Ansprüche 2 bis
4, dadurch gekennzeichnet, dass es sich um Transmembranrezeptoren aus
Akarina handelt.
- 25 7. Verwendung von Transmembranrezeptoren gemäß einem der Ansprüche 1
und 3 bis 5, dadurch gekennzeichnet, dass es sich um den Transmembran-
rezeptor HC110-R aus *Haemonchus contortus* handelt.
8. Verwendung von Transmembranrezeptoren gemäß einem der Ansprüche 1 bis
30 6, dadurch gekennzeichnet, dass sie zum Transmembranrezeptor HC110-R
homolog sind.

9. Verwendung von Transmembranrezeptoren gemäß einem der Ansprüche 1 bis 8 zum Identifizieren von Calcium-Kanal-Blockern.
- 5 10. Verwendung von Transmembranrezeptoren gemäß einem der Ansprüche 1 bis 8 zum Identifizieren von Calcium-Kanal-Blockern, dadurch gekennzeichnet, dass es sich um alpha-Latrotoxin bindende Transmembranrezeptoren handelt.
- 10 11. Verwendung von alpha-Latrotoxin als Agonist von Transmembranrezeptoren gemäß einem der Ansprüche 1, 3 bis 5 und 7.
12. Verwendung von alpha-Latrotoxin als Nematizid.
- 15 13. Verwendung von alpha-Latrotoxin in Verfahren zum Identifizieren von nematizid und/oder arthropodizid wirksamen Verbindungen.
- 20 14. Verfahren zur Gewinnung des HC110-R Rezeptors sowie dazu homologer Proteine umfassend die Expression des Polypeptids oder Fragmenten davon in einem prokaryontischen oder eukaryontischen Expressionssystem.
- 25 15. Verfahren gemäß Anspruch 14, dadurch gekennzeichnet, dass es sich um ein eukaryontisches Expressionssystem handelt.
16. Verfahren gemäß Anspruch 15, dadurch gekennzeichnet, dass zur Expression HEK 293- oder COS7-Zellen verwendet werden.
17. Wirtszellen, die eine transiente Expression des Rezeptors HC110-R sowie dazu homologer Proteine ermöglichen.
- 30 18. Wirtszellen, die eine stabile Expression des Rezeptors HC110-R sowie dazu homologer Proteine ermöglichen.

19. Wirtszellen gemäß Anspruch 18, dadurch gekennzeichnet, dass sie Aequorin exprimieren.
- 5 20. Wirtszellen gemäß Anspruch 18, dadurch gekennzeichnet, dass es sich um die stabil transformierte Zelllinie der Hinterlegungsnummer DSM ACC2464 handelt.
- 10 21. Wirtszellen gemäß Anspruch 18 oder 19, dadurch gekennzeichnet, dass es sich um die stabil transformierte Zelllinie der Hinterlegungsnummer DSM ACC2465 handelt.
- 15 22. Vektoren zur stabilen Transformation von Wirtszellen gemäß einem der Ansprüche 18 bis 21 und zur transienten Transformation von Wirtszellen gemäß Anspruch 17.
- 20 23. Vektoren zur stabilen Transformation von Wirtszellen gemäß Anspruch 18 oder 20, dadurch gekennzeichnet, dass es sich um den Vektor pMyc6xHis handelt.
24. Verfahren zum Identifizieren von Agonisten und/oder Antagonisten von Calcium-Kanal-Transmembranrezeptoren aus Helminthen und/oder Arthropoden, umfassend die folgenden Schritte:
- 25 a) Inkontaktbringen einer Wirtszelle gemäß einem der Ansprüche 17 bis 21 oder von Membranen derselben mit einer chemischen Verbindung oder einem Gemisch von chemischen Verbindungen unter Bedingungen, die die Interaktion einer chemischen Verbindung mit dem Polypeptid erlauben, und

- b) Bestimmen der chemischen Verbindung, die spezifisch an das Polypeptid bindet.
25. Verfahren zum Auffinden von Verbindungen, welche die Expression von Calcium-Kanal-Transmembranrezeptoren aus Helminthen oder Arthropoden verändern, umfassend die folgenden Schritte:
- a) Inkontaktbringen einer Wirtszelle gemäß einem der Ansprüche 17 bis 21 mit einer chemischen Verbindung oder einem Gemisch von chemischen Verbindungen,
- b) Bestimmen der Calcium-Kanal-Transmembranrezeptor-Konzentration, und
- c) Bestimmen der Verbindung, welche die Expression des Polypeptids spezifisch beeinflusst.
26. Verfahren gemäß Anspruch 24 oder 25, dadurch gekennzeichnet, dass es sich um G-Protein gekoppelte Transmembranrezeptoren der Sekretin-Subfamilie oder Fragmente davon handelt.
27. Verfahren gemäß Anspruch 24 oder 25, dadurch gekennzeichnet, dass es sich um den Transmembranrezeptor HC110-R oder Fragmente davon sowie dazu homologer Proteine handelt.
28. Verfahren gemäß einem der Ansprüche 24, 26 und 27, dadurch gekennzeichnet, dass man die Testsubstanz unter solchen Bedingungen mit dem Transmembranrezeptor in Kontakt bringt, die eine Interaktion der Rezeptormoleküle mit der Testsubstanz gestatten, und dann

- a) die erfolgte Bindung der Testsubstanz detektiert, und
 - b) die Aktivität des Rezeptormoleküls bei Anwesenheit der Testsubstanz mit dessen Aktivität bei Abwesenheit einer Testsubstanz vergleicht.
- 5 29. Verfahren gemäß einem der Ansprüche 24 bis 28, dadurch gekennzeichnet, dass man ein auf Zellen basierendes Testsystem verwendet.
30. Verfahren gemäß Anspruch 29, dadurch gekennzeichnet, dass man Zellen gemäß einem der Ansprüche 17 bis 21 verwendet.
- 10 31. Verfahren gemäß einem der Ansprüche 24 und 26 bis 28, dadurch gekennzeichnet, dass man ein zellfreies Testsystem verwendet.
32. Verfahren gemäß einem der Ansprüche 24 und 26 bis 31, dadurch gekennzeichnet, dass die Interaktion einer Testsubstanz mit dem Transmembranrezeptor durch die Verdrängung von daran gebundenem alpha-Latrotoxin detektiert wird.
- 15 33. Verfahren gemäß einem der Ansprüche 24 und 26 bis 31, dadurch gekennzeichnet, dass die Interaktion einer Testsubstanz mit dem Transmembranrezeptor durch die Verdrängung von daran gebundenem Nifedipin detektiert wird.
- 20 34. Verwendung von Nifedipin in einem Verfahren gemäß einem der Ansprüche 24 und 26 bis 31.
- 25 35. Substanzen, die in einem Verfahren gemäß einem der Ansprüche 24 bis 34 identifiziert werden.
- 30 36. Verwendung von Substanzen gemäß Anspruch 35 zur Herstellung eines Mittels zur Bekämpfung von Helminthen und/oder Arthropoden.

37. Verwendung von Modulatoren des Rezeptors HC110-R sowie dazu homologer Proteine als Anthelminthika und/oder Arthropodizide.
- 5 38. Verwendung der für den Rezeptor HC110-R kodierenden DNA sowie dazu homologer DNA zur Herstellung transgener Invertebraten.
39. Transgene Invertebraten, die den Rezeptor HC110-R oder dazu homologe Proteine enthalten.
- 10 40. Transgene Invertebraten gemäß Anspruch 39, dadurch gekennzeichnet, dass es sich um *Drosophila melanogaster* und *Caenorhabditis elegans* handelt.
- 15 41. Verwendung von DNA-Oligonukleotiden, die spezifisch an die für den Rezeptor HC110-R kodierende DNA hybridisieren, zur Detektion von DNA, die aus Helminthen stammt.
42. Verfahren zur Detektion von DNA aus Helminthen, dadurch gekennzeichnet, dass man
- 20 a) DNA-Oligonukleotide zur Verfügung stellt, die an die für den Rezeptor HC110-R kodierende DNA oder dazu komplementäre Stränge hybridisieren oder an die 5'- oder 3'- flankierenden Regionen derselben,
- 25 b) die DNA-Oligonukleotide mit einer DNA enthaltenden Probe in Kontakt bringt,
- c) die Hybridisierung des DNA-Oligonukleotids detektiert,
- d) die detektierte Sequenz sequenziert, und
- 30 e) die Sequenz mit der für den Rezeptor HC110-R kodierenden DNA-Sequenz vergleicht.

43. Diagnostischer Testkit umfassend eine für den Rezeptor HC110-R kodierende DNA-Sequenz oder Fragment davon oder dazu homologe DNA-Sequenzen.
44. Diagnostischer Testkit gemäß Anspruch 43, dadurch gekennzeichnet, dass die
5 DNA-Sequenzen mit einem detektierbaren Marker versehen sind.
45. Verwendung des Rezeptors HC110-R oder Fragmenten davon sowie dazu homologer Proteine zur Herstellung von Vakzinen.

- 1 / 24 -

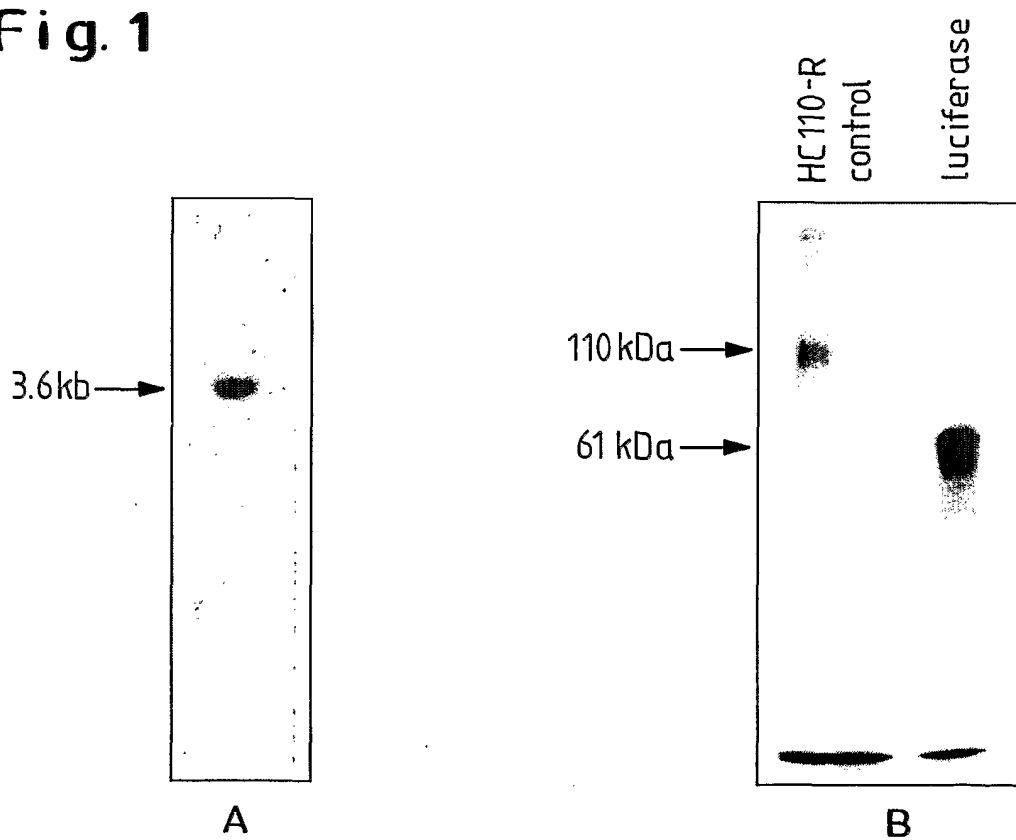
Fig. 1

Fig. 2

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

- 3 / 24 -

F P A S R R R F T F F L V G Y G L P A I I T G A A A Y Y D P 657
ACTGGTTTGGAAACGCAATCATTGCTGGTTACGCACCGACAACCTTTTCATTTTATTCTTTGTGCGACCAGCAGCTGTGATTTTACTG 2160
T G F G T R N H C W L R T D N L F I L F F V A P A A V I L L 687
ACGAATACGATGTTCTGTTCACTATGTGCATTGTATACAGACATTCCAAGTATATCCCCTGTAGGCATGCTGCGGATAATGGAGGT 2250
T N T M F L F M T M C I V Y R H S K Y I P C R H A A D N G G 717
GACATAAGGACTTGGGTCAAAGGAGCGATGGGTCTGGTCTGTCTACTTGGTGTACATGGACTTGTGGCCTTCTCTGGATCGATGATGGC 2340
D I R T W V K G A M G L V C L L G V T W T C G L L W I D D G 747
CATTGATAGTGATGGCATAACGCGTTTACCATTGCGAATTCCTTCAGGGTCTTTTCATCTTTGTCTTCCATGTGCTCTGCTCAGAGAAG 2430
H S I V M A Y A F T I A N S L Q G L F I F V F H V L C S E K 777
ATGCGTTACGATATTGCCCAGTGGTGTGGCAAGCATGGCCTTTTCATGTATCAGCTCTGGCTCCCGTACCTCTAGGGATCTACAAAAA 2520
M R Y D I A R W C G K H G L S C I S S G S R D T S R D L Q K 807
CGTGGAACTATGTCACCGTCGAGAGAGTGGCAGCAATTCATCTATCCACATCGGAGAAGATGCACACATCTCTCGTGGATTGGAA 2610
R G T M S P S E R S G S E F I Y P T S E K M H T S P R G L E 837
TCCTCTCTCAGCTCGGCCTATCTCAACAACCACTCATCCACCCTATCAGCGTCGTCACCGCAACAGCCTAATGGAATTATGACTAC 2700
S S L S S A Y P Q Q P L I H H Y Q R R P P Q Q E N G T Y D Y 867
GCAACAATTGCGTATGGCGAGATGGTACCAGGCCATATGTTACCACGCATGGCCTCCTCGTTTCCATCCAGGTGTTGCCATCCATTAT 2790
A T I A Y G E M V P G H M L P R M A S S F P H P G V A I H Y 897
CCCTCATTGATCTGGATTCTCTACCAACCCAGATCTCCATCATCGCCCTCCACCAGACTTTTCTCCACCACCGCCACCTCCTGCC 2880
P S F D L D S S Y Q P Q I F H H R P P P D F S P P P P P P A 927
CAGGGTACAACACCTTCAAAGTAATCCGTCCCCATCATCAAGATGAGTGACGACTCGGCCTATTCGATGGTGGATCGTCTCGTCCGTA 2970
Q G T T P S K V I R P P S S K M S D D S A Y S D G G S S S V 957
CTCACCACGGAAGTCACACCGTCTGGAGCGACTGTGCTTCAATGGATTGGGCGAGAAATCAACCGCCTAACTATTGGCGAAATGTTTGA 3060
L T T E V T P S G A T V L R M D L G R N Q P P N Y W R N V - 986
GCATGTGTCCCTGTAAATGTTTCTCGAGAGAGATTTTGGCGAGGTGTGCGCTTCAGTCACGGTTTATGACGATCCGGGTGCTTTTGC 3150
AATCATTTTGTATGTGTTGATTTGTTCTTCTTGGTATCCAAGGGCTTTCATCGTCTCCGGACATTCTGTCACTTTTCTACACTCTAAT 3240
GCTCCAATGTCGTTAATATCAGCATATCATCGTCACAATTATGCGCCATTTTCTCAGATTACCGGTTTCTTTGTACATTTGTGGAT 3330
TGAGTTGTAGCTAACTGTAGCTATTAGAGGTATTTTGTATCTAGTCGATAATAGCGCAATATTGTTTACTAATTACTAAGTACTAA 3420
TTGTTTTTTAAGTCCGATTCTGCCTCTATGAAAAATTTGTTTTGTTTCCATCCCGTATCATACTTTTAGGTTGAGATCAATAAA 3510
AACGTAAAATTTG(A)_n 3524

- 4 / 24 -

Fig. 3

	SP	Lectin	
HC110-R	MR-N--VY-----IL---LLSVVGTFTVAEELPAQS-NSSIVVCEGGTAELECPHGMVISIALANYGRYS		58
CE-B0457	MRRNKTTYSLQITILVACLLTPTPTFASNKPTTDESGTISHTICDGEAAELSCPAGKVISIVLGNVGRFS		70
	** * . * ** **: * **: : . : * * . : * * : * * * * * . * * * * *		
HC110-R	ARVCYENEELDDVVP-MTQCHNPKTMTPLRKSCDGRRECHFVVGNDFFVHDPCPGVKKYLEVTYLCVADV		127
CE-B0457	VAVCLPD---NDIVPSNINQNHKTKSILEKKCNGDSMCYFTVDKKTFTEDPCPNTPKYLEVKYNCVPA		137
	. ** : : * * * : * * * * . * . * * * * : * . * . . * . * * * . * * * * . * * . .		
	T-reich	C-Signatur	
HC110-R	TTTTTTTTTTTTTTTTTTEVEDDVKE--MSAKSAPST-----CAATSRRGIEWPATISGTTVNRPC		189
CE-B0457	TTTTTTTTTTTSTTTTSSLIVDEEEEAQKDALNSDIKPVKKKEDVFCSATNRRGVNWQNTKSGTTSSAPC		207
	*****: * * : : * : : * * * * * : * * * * : * * * * . * *		
HC110-R	PEGTRGTSSWKCSAEGWSEPGNTIECRSDWTIQRDALLETIKDQDASGIPPELLRAMTSDTRRPMVAG		259
CE-B0457	PEGSSGKQLWACTEEGQWLTEFPNSAGCESNWISSRNSVLSGVISSEDDVSGLPEFLRNLGSETRRPMVGG		277
	***: * . * * : * * * ** : * : * * . * : . . * . : * * * * * : * : * * * * * *		
HC110-R	DLPKLLNILDIVQDVVGREVVAKSSQKLVNQLIVNVHNLRAKEMWQNWPSVKRQTFATRLNGVERAM		329
CE-B0457	DLPKVLHLLEKTVNVIAEESWAYQHLPLSNKGAVEVMNYMLRNQEIWGSWDVTKRKEFASRFLAEKAM		347
	****: * : * : . : * : . * * . * * : * : : * * : * * * * . * * : * * : : . : * *		
HC110-R	TSSST-TVYSSE-NY-VQPLVMTMESIIRTSSQPSNYFLFPSMALWAGENNVSDVDPREALEMTGLDR		396
CE-B0457	VASAKGMMTSAESNVIVQPAITVEISHKIKMSSQPTDYILEFSAALWNGQN-VDNVNIPRDAILKINKDE		416
	: * . : * : * * * * : * : * : * * * : * * * * * * * * * * * : * .		
HC110-R	ARVYYASFANIGEEMEP-PVEIS-AGSEQKPTGLERRRIVSRVAVSLVLDGKVIRLPILPKPIITFH		464
CE-B0457	TQVFFSSFDNLGAQMTPSDVTVAIAGTDQTEV---RKRRVVSRIVGASLIENGKERRVENLTQPVRTIFY		483
	: * : : * * * * : * * * : * * : * . * : * * * * : * * : * * * * : * * : * * : * * :		
	4 C-Region		
HC110-R	HYPEALRRMSSPECSWWDTEDMKWSTSGCSLQSHNSTHTVCACSHMTHFAVLMDYVGHEISSDNQLLTF		534
CE-B0457	HKESSVRHLSNPTCVWWNHHELKWKPSGCKLSYHNKTMTSCDCTHLTHFAVLMDVRGHDLEIDQTLTL		553
	* : * : * * * * * : : * * * * * . * * * * * * * * * * * * * * : * : * * :		
HC110-R	LTYTGCTLSIVCLTLTFFCFVVFVKGGDRVFIHKNLCASLGIAELVFLAGIWRTEEFECGMIAGCLLY		604
CE-B0457	LTYVGCIIISIIICLLTFFAYLIFSRNGGDRVFIHENLCLSLAIAEITFLAGITRTEDSLQCGIIAVALMY		623
	* * . * * : * * * * * : : * * : * * * * * : * * * * : * * * * * * * : * * : * * : * * :		
HC110-R	FFLSALTWMLEGYQLYQMLVEVFPASRRRFTFFLVGYGLPAIITGAAYYDPTGFGTRNHCWLRTDNLF		674
CE-B0457	MFLSALTWMLEGYHIHRLTEVFPSPRRFTYLLVGYIPPAIITLWAYLYNSDGFPTDHCWLSTQNNF		693
	: * * * * * * * : : * * * * : * * : * * * * * * * * * * * * * * : * : * * *		

- 5 / 24 -

HC110-R	CE-B0457	<u>ILFFVAPAAVILLTNMFLMTMCIIVRHSK--YIPCRHAADNGGDIRTWVKAGMGLVCLLGVTWTCGLL</u> 742 <u>IWFAGPACFIFCANSILVLVKTLCITYQHTSGGYLPCRHDVDSGRSIRNWWKGSALASLLGVTWIFGLF</u> 763 * **..**.*: :*:..*.*:* **:*:, *:**** .*. *.**.****:..*..***** **:
HC110-R	CE-B0457	<u>WIDDGHSIVMAYAFITANSIQGLFIFVFHVLCEKMRDYDIARWCGKHGLSCISSGSRDTSRDLQKRGTM</u> 812 <u>WVEDSRISIVMAYVFTISNSIQGLFIFLHVVFAEKMRKDVGHWMYRRCGGSSNSSPNHNRHNVQDRLMS</u> 833 *:.*:*****.***:*****:***: :**** *:.* :.* .*. *.* :.* :.* **
HC110-R	CE-B0457	P--SERSGSEFIYPTSEKMT----SPR----GLESS--LSSAYPQOPLIHHYORRPPQOPNGTYDYATI 870 PGNVSTSGSDFLYNTNDKYLNTSDTNRNLVYNGIMNHPNQMSVYQQHP--HH-QIYE-QQP-GTYDYATI 898 *.. :*: *:.* :.* * : * *: . *.**.* ** * *** *****
HC110-R	CE-B0457	PEST AYGMVPGHMLPRMASSFPHPGVA-IHYPFDFLDSSYQP-QIFHHRPPPEFSPPPPPAQGT-----T 931 AYGDMMPGH---RVAA--P-PAYQRLAVAEGRYGSQHLYQGWHRPPPEFSPPPPPLSTGPPNSRHYGT 962 ***:.*:** *:.*: * * : .. *.:* * :*****:*****: : * *
HC110-R	CE-B0457	PSKVIRPPSSKMSDDAYSIDGSSSVLTTEVTTPSGATVLRMDLGRNQPPNYWRNV 986 GSSGRPPSSKMSDDAYSIDG--SSMLTTEVTTPQGQTVLRIDL--NKPSMYCQDL 1014 * ***** ***** * ***** *.* * :

- 6 / 24 -

Fig. 4

	I	II	
HC110R	TFLTGTGCTESIVCLTLTFFCFVVEIKGGDRVFIHKNLCASLGIAELVFLA-----	GIWRTEEK-	592
BTLAT3	DVITWVGILLISIVCLLTICITFFCFERGLQSDRNTIHKNLCSLEVAELLFLI-----	GINRTDQPI	938
RNLAT1	SVITWVGIVISIVCLATCISTFCFLRGLQTDNRNTIHKNLCTNLELAELLFLV-----	GIDKTQYEV	915
MEMR1	YIISHVGTVISIVCLALALATFLLCRAVQNHNTYMHHLGVCLFLAKLELT-----	GIDKTDNQT	708
HSCD97	TLITRVGLAISLFCLLLCILTFLVRPIQGSRTTHLHLCTCFVSGSTIFLA-----	GIENEGGQV	515
MMCADH	KTITYVALGVTLAALMLTFLTLRLALRSNQHGIRRNETAALGLAQLVFL-----	GINQAD-LP	525
XLRF1	IVINELGHSTISCALLVAFLFLRLRSIRCLRNLIHWNLTAFILRNVTWFVMQLTSLHEA----	HDSN	184
RNVIP2	KAIYTLGYSVSLMSLTGSIITCLERKLHCTRNTHLNLFLSFLRAISVLKDSVLYSSSGTLRCHDQP		195
HSGHRH	KIIYTVGHSTISIVALEVAITTLVALRRLHCPNRYVHTQLETTFLKAGAVFLKDAALFHSDDTDHC---	S	196
	--i--vG--iSlvcL-l----f---r-l---rn-iH-nLc--l-la---fl-----gi--t----		
	III	IV	
HC110R	---FECGMIAGCLLYFFLSALTWMLEGYQLYQML----	VEVFPASRRRFTFF-LVGYGLPATITGAA	653
BTLAT3	A---CAVEAALLHFFFLAAFTWMELEGVQYIML----	VEVFESEHSRRKYFYLVGYGMPALIVAVSA	999
RNLAT1	A---CPLEAGLLHYFFFLAAFSWLCLEGVHLYLIL----	VEVFESEYSRTKYLYLGGYCFPALVVGIAA	976
MEMR1	A---CALLTAGTLHYFLACFFWMLVEAVMFLMVRNLKVNYFSSRNIMHLCAFGYGLPVLVVIISA		774
HSCD97	G---LRCRLVAGLHLYCFLAFCWMSLEGLEYELV-----	VRVFQGGQLSTRWLCLIGYGVELLIVGVSA	578
MMCADH	---FACTVIAILLHFLYLCTFSWALLEALHLYRALTEVRDVNA-----	SPMRFYMLGWGVPAAITGLAV	587
XLRF1	VVW---CRLVTIAHNYFYVTNFEWMEGEGYIHTAI-----	VLTYSTDKLRKWMETCIGWCIPPELIVAWA	247
RNVIP2	GSWVGCKLSLVFFQYCLMANFYWLLVEGLYIHTLL-----	VAIPLPSR-CFLAYLLIGWGIPSVICIGAWI	259
HSGHRH	FSTVLCKVSVAAASHFATMTNFSWLLAEAVYINCLL-----	ASTSPSSRRAFWWLVLAGWGLPVLFTGTWV	261
	-----C---a--lhy-fl--f-WmlEg--Ly--l-----v-vf-----r-----l-Gyg-Pa-i-g--a		
	V		
HC110R	YYDPTGFGTRNHCWLRTDNLELFEV--APAAVILLTNTMFLMTMCIVYRHSK--YIPCRHAADNGGDI		719
BTLAT3	AVDYRSYGTDKVCWLRLDTYFIWSEI--GPATLIIMLNVTLCIALYKMFHHTAIL----	KPESGCLDNI	1063
RNLAT1	ALDYRSYGTEKACWLVRDNYFIWSEI--GPVSEVIVVNVETMVTLHKMIRSSSVL----	KPDSSRLDNI	1040
MEMR1	SVQPRGYGMHNRCLNTETGFIWSEL--GPVCMITINSVLLAWTLWVLRQKLCSV----	SSEVSKLKDT	838
HSCD97	ATYSKGYGRPRYCWLDFEQGLWSEL--GPVTFILCNAVTFVTTVWKLTKQFSEI----	NPDMKKLKKA	642
MMCADH	GLDPEGYGNDPFCWLSVYDTLIWSFA--GPVAFVSMVSFLYILS-----	ARASCAAQRQGFEEKGPV	648
XLRF1	IGKL-YYDNEK-CWFGKKAGVYTDETYQGPIVLLVLLINFELENIVRILMTKLKLR----	ASTTS--ETIQY	309
RNVIP2	ATRL-SLEDTG-CWDNDHSIPW-WVIRMPILISIVVNEALETISIVRILLQKLT----	SPDVGGNDQSQY	322
HSGHRH	SCKL-AFEDIA-CWDLDDTSPYW-WIIGKPTVLSVGVNEGLETINILRILVRKLE----	PAQGSLSHTQSQY	324
	-----yg---CwI-----fiw-f---gP---ii--N---l-----		

- 7 / 24 -

	VI	VII	
HC110R	RTWVKGAMGLVCLLGVTWTCGLLWIDDGHSIVMAYA--FTIANSLOGLFIEVFHVLCSKMR		779
BTLAT3	KSWVIGATALLCLLGLTWAFGLMYINES-TVIMAY--LFTTFNSLOGMFIEFHCVLQKKVR		1117
RNLAT1	KSWALGATALLFLLGLTWAFGLLEINKE-SVVMAY--LFTTFNAFOGVLEVFHCAIQKKVH		1094
MMEMR1	RLETFKATAQIFLLGCSWVLGIFQIGPL-ASIMAY--LFTTINSLOGAFTLTHCLLNQVR		897
HSCD97	RALTTATAQLFLLGCTWVFGFTIEDDR-SLVLTYY--VFTTILNCLOGAFLYLLHCLLNKKVR		701
MMCADH	SG-LRSSTTVLRLLSATWLLALLSVNSD---TLLFHYLEAACNCVQGPXIFXSIVVXSKEVR		706
XLCRF1	RKAVKATLVLLPPLGITYMLFFVTPGEDEISRIVFIYFNSELOFQGFVSVFYCELNSEVR		371
RNVIP2	KRLAKSTLILLPLFGVHYMVFAAEP--IGISSTYQILFELCVGSEQGLVVAVLYCFLNSEVQ		382
HSGHRH	WRLSKSTLIELPLFGIHYITFENLP--DNAGLGIRLPLELGLGSEQGFVAILYCFLNQEV		384
	----k----ll-LlG-tw--gl-----ay---fti-ns-QG-fif--hc-l---vr		

- 8 / 24 -

Fig. 5

	SP	Lectin	
HC110-R	-----MRNVYILLLSVVGTTFTVAEELPAQSNSSIVVCEGGTAELECPHGMVISIAL		51
Latrophilin-1	MARLAAALWSLCVTTVLVTSATQGLSRAGLPFGLMRRELACEGYPIELRCPSGSDVIMVEN		60
	* :*: : . ** :.*** . **.*. ** :		
HC110-R	ANYGRYSARVCYENEELDDVVPMTQCHNPMTLRKSCDGRRECHFVVGNDFFVHDPCP		111
Latrophilin-1	ANYGRTDDKICDADP---FQMENVQCYLPDAFKIMSQRNNRTQCVVVAGSDAFP-DPCP		116
	***** . :*: : : .**:**: : : *:.* :*.*** * ****		
HC110-R	GVKKYLEVTYLCVADVTTTT-----		131
Latrophilin-1	GTYKYLEVQYDCVPYIFVCPGTLQKVLEPTSTHESEHQSGAWCKDPLQAGDRIYVMPWIP		176
	*.***** * **. : . .		
HC110-R	-----		
Latrophilin-1	YRTDTLTEYASWEDYVAARHTTTYRLPNRVDGTGFVVYDGAFFYNKERTRNIVKYDLRTR		236
HC110-R	-----		
Latrophilin-1	IKSGETVINTANYHDTSPYRWGGKTDIDLAVDENGLWVIYATEGNNGRLVVSQLNPYTLR		296
HC110-R	-----		
Latrophilin-1	FEGTWETGYDKRSASNAFMVCGVLYVLRVSVYDDDSEAAGNRVDYAFNTNANREEPVSLA		356
		T-reich	
HC110-R	-----TTTTTTTTTT		141
Latrophilin-1	FPNPYQFVSSVDYNPRDNQLYVWNNYFVVRYSLEFGPPDPSAGPATSPPLSTTTTARPTP		416
		:****: .*	
HC110-R	TTSTTEVEDDVKEDMSAKSAPS-----TCA		167
Latrophilin-1	LTSTASPAATTPLRRAPLTTHPVGAINQLGPDLPATAPAPSTRPPAPNLHVSPELFCE		476
	***: : . . . : *		
	C-Signatur		
HC110-R	ATSRRGIEWPATISGTTVNRPCPEGTRGTSSWKCS-AEGLWSEPGPNTIECRSDWTIORQ		226
Latrophilin-1	PREVRRVQWPATQQGMLVERPCPKGTRGSIASFQCLPALGLWNPRGPDLSNCTSPWVNQVA		536
	. . * :*:*** . * *:****:**** :*: * * *. ** : * * * . *		
HC110-R	DALEETIKDQ-DASGIPELLRAMTSDTRRPMVAGDLPKLLNILDIVQDVVG---REVWAK		282
Latrophilin-1	QKIKSGENAANIASELARHTRGSIYAGDVSSSVKLMEQLLDILDAQLQALRIERESAGK		596
	: :. : ** :. . * . . : :*:*** :. : ** .*		

- 9 / 24 -

HC110-R	SSQKLVN-----QLIVNVVHNALR--AKEMWQNWPSVKRQTFATRLNGVERAMTS	331
Latrophilin-1	NYNKMHKRERTCKDYIKAVVETVDNLLRPEALESWKDMNATEQVHTATMLLDVLEEGAFL	656
	. :*: : : :*:.* * * * * *: :*: ** *: :*..	
HC110-R	SSTTVYSSENVYQPLVMTSEMSEIRTSQPSNYFLFPSMALWAGENNVDSDVPREALEM	391
Latrophilin-1	LADNVREPARFLAAKQNVVLEVTVLSTEGVQVELVFPQEYASESSIQLSANTIK----QN	712
	: .* .. :*: . . :. :*: : :*:** . . :*: : :	
HC110-R	TGLDRARVYYASFANIGEEMEPPVEISAGSEQKPTGLERRRRIVSRVAVSLVDGKVIR	451
Latrophilin-1	SRNGVVKVVFILYNNLGLFLSTENATVKLAGEAGTGGPGGASLVVNSQVIAASINKESSR	772
	: . :*: : :*: * : : ** :* . :*: : : *	
	4 C-Region	
HC110-R	LPILPKPIIITFHYPEALRRMSSPECSWWDTE-----MKWSTSGCSLQSHNSTHTVCAC	507
Latrophilin-1	VFLMDPVIFTVAHLEAKNHFNAN---CSFWNYSERSMLGYWSTQGCRLVESNKTHTTCAC	829
	: :*: * : . * : . . ***: : : ***.** * . *.**.***	
HC110-R	SHMTHFAVLMDYVGHEISSDNQLLTFLTYTGCTLSIVCLTLTFFCFVVFIKGGGDRVFI	567
Latrophilin-1	SHLTNFAVLMAHREIYQGRINELLSVITWVGIVISLVCLAICISTFCFLRGLQTDRTNI	889
	:** : . :*: :*:.* :*:***: : * : ** *	
HC110-R	HKNLCASLGIAELVFLAGIWRTEEFECGMIAGCLLYFFLSALTWMLLEGYQLYQMLVEV	627
Latrophilin-1	HKNLCINLFLAELLFLVGIDKTQYEVACPIFAGLLHYFFLAASFSLCGLVHLYLLLVEV	949
	***** . * :***:***.*** :*: :. * :*: * ******:*: ** :** :****	
HC110-R	FPASRRRFTFFLVG-YGLPAITGAAAYDPTGFGTRNHCWLRTDNLFILFFVAPAAVIL	686
Latrophilin-1	FESEYSRTKYYLGGYCFPALVVGIAAIDYRSYGTEKACWLVRDNYFIWSFIGPVSEVI	1009
	* :. * :*: :* * :*:.* * * * :*: : *****.*** * :*. :* :*	
HC110-R	LTNTMFLFMTMCIVYRHSKYIPCRHAADNGGDIRTWVKGAMGLVCLLGVTWTCGLLWIDD	746
Latrophilin-1	VVNLVFLMVTLHKMIRSSSVLKPDSRLDN--IKSWALGAIALFLGLTWAFGLLFINK	1067
	:.* :***: : * * : : :. :*: ***: : ***:** :***:*	
HC110-R	GHSIVMAYAFIANSLOGLFIFVHVLCSKEMRYDIARWCGKHGLSCISSG-----	797
Latrophilin-1	-ESVVMAYLFTTFNAFQGVFIFVHFCALQKKVHKEYS-KCLRHSYCCIRSPPGGANGSLK	1125
	.*:***** * :*:***:***** :*: : : * :* .** *	
HC110-R	-SRDTSRDLOKRGTMSPSERSGSEFIYPTSEKMHTS-----	832
Latrophilin-1	TSAMRSNTRYTGTQSRIRRMWNDTVRKQTESFMAGDINSTPTLNRGTMGNHLLTNPVL	1185
	* * . ** * * : : :* . :	

- 10 / 24 -

P-reich

HC110-R	-PRGLESSLSSAYPQQP-----LIHHYQRRPPQQPNG-----T	864
Latrophilin-1	QPRGGTSPYNTLIAESVGFNPSSPPVFNSPGSYREPKHPLGGREACGMDTLPINGNFNS	1245
	*** * . .: .: .: .: .: * *: * *	:
		PEST
HC110-R	YDYATIAYGEMVPGHMLPRMASSFPHPGVAIHYPSEFDLDSSYQPQIFHHREPPDESPPPE	924
Latrophilin-1	YSLRSGDFPPGDGGPEPPRGRNLADAAFEKMIISELVHNNLRGASGGAKGPPPEPPVPP	1305
	* . : : * ** . .: .: * : .: : : ** . * **	
HC110-R	PP-----AQGTTPSKVIRPPSSKMSDDSAISD	951
Latrophilin-1	VPGVSEDEAGGPGGADRAEIELLYKALEEPLLLPRAQSVLYQSDLDESESCAEDGATSR	1365
	* **.. .: .: * :*: * *	
HC110-R	GGSSSVLTTEVTPSGATVLRMDLGRNQPPNYWRNV-----	986
Latrophilin-1	PLSSPPGRDSLYASGANLRDPSYPDSSPEGPNALPPPPPAPPGPPEIYYTSRPPALVA	1425
	** . .: .***.: :..*: .: .:	
HC110-R	-----	
Latrophilin-1	RNPLQGYQVRRPSHEGYLAAPSLEGPGPDGDGQMLVTSL	1466

Fig. 6

- 11 / 24 -

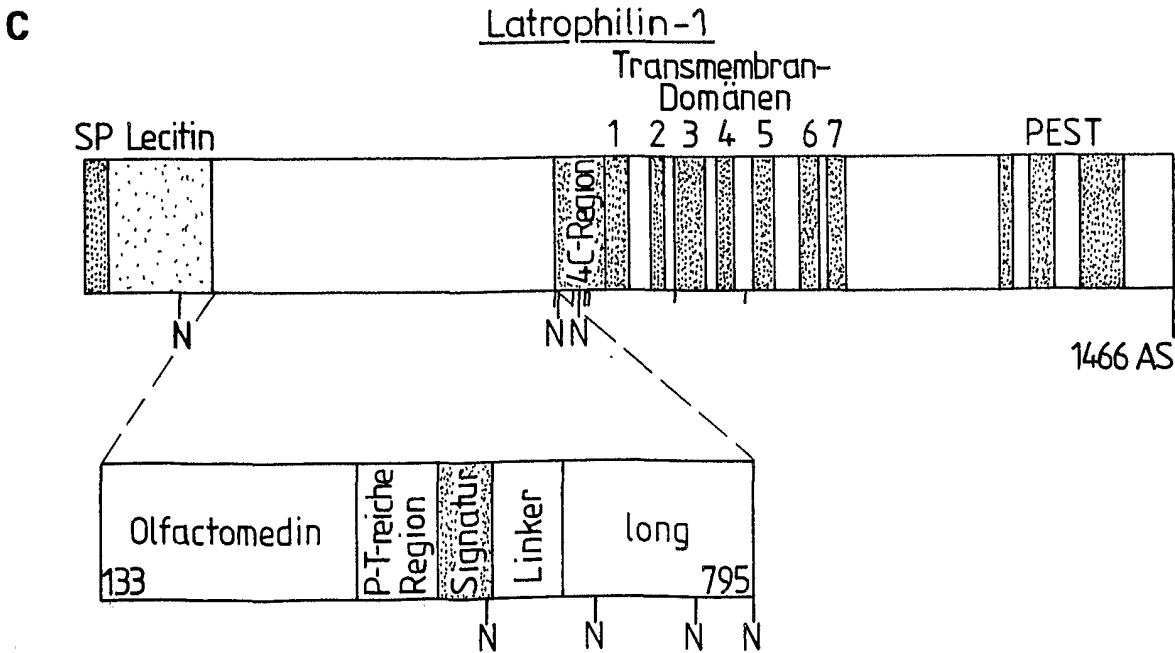
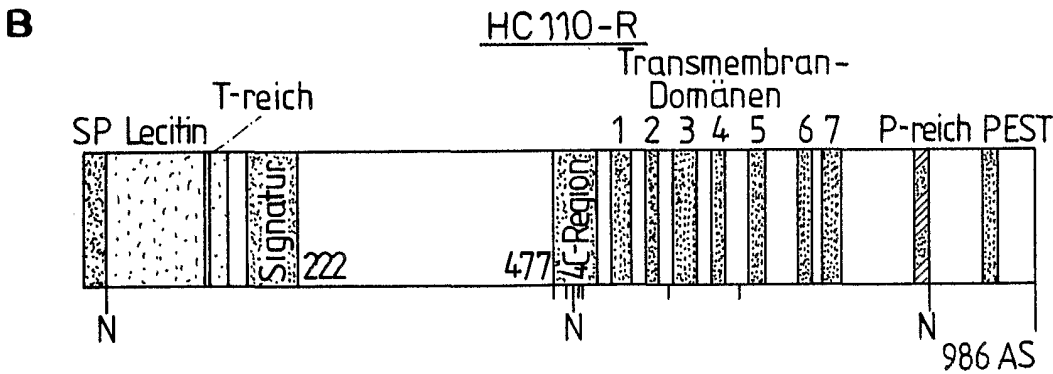
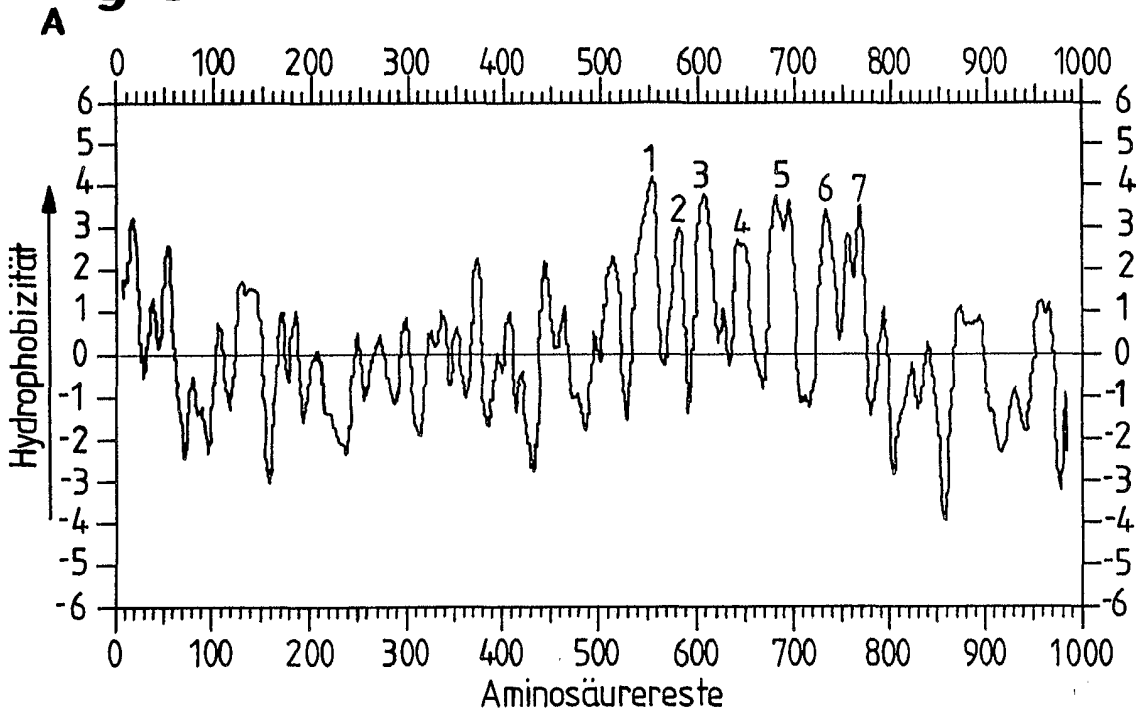
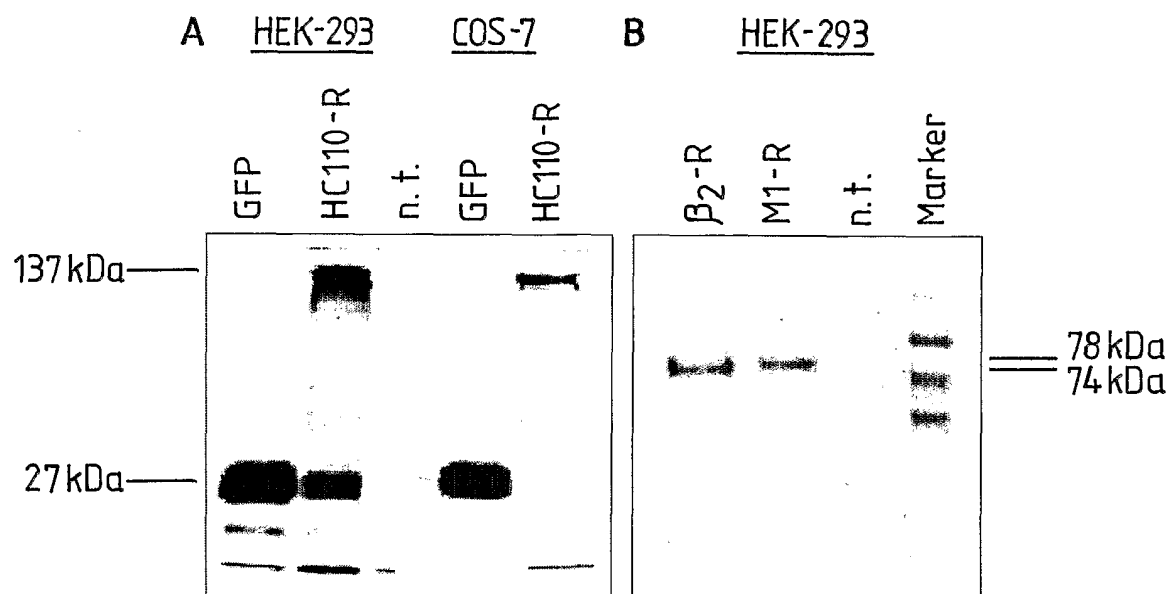
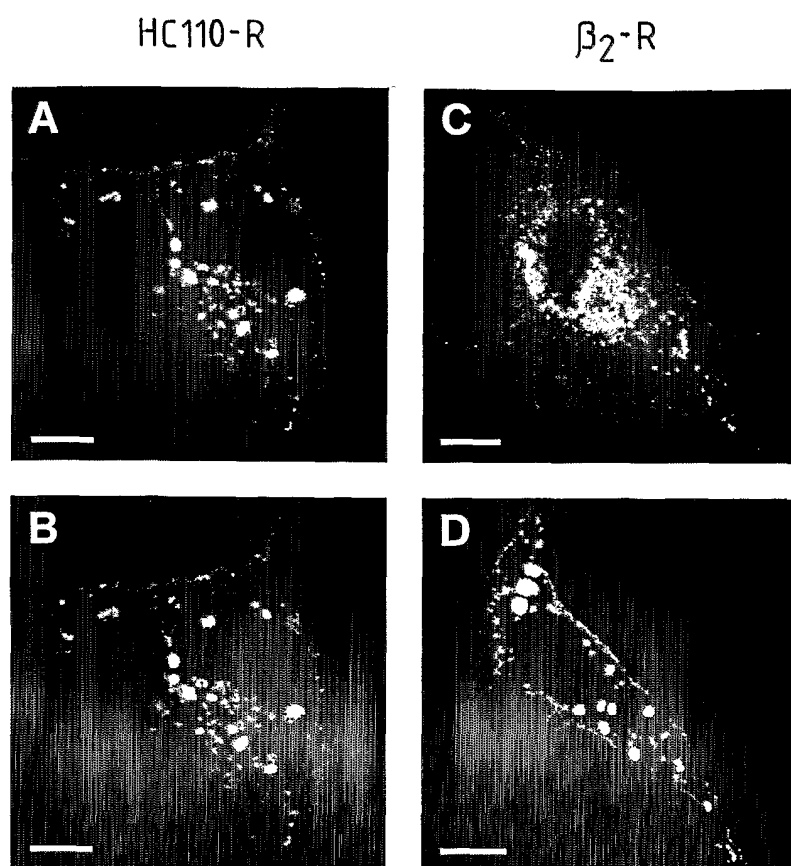


Fig. 7

- 12 / 24 -

**Fig. 8**

- 13 / 24 -

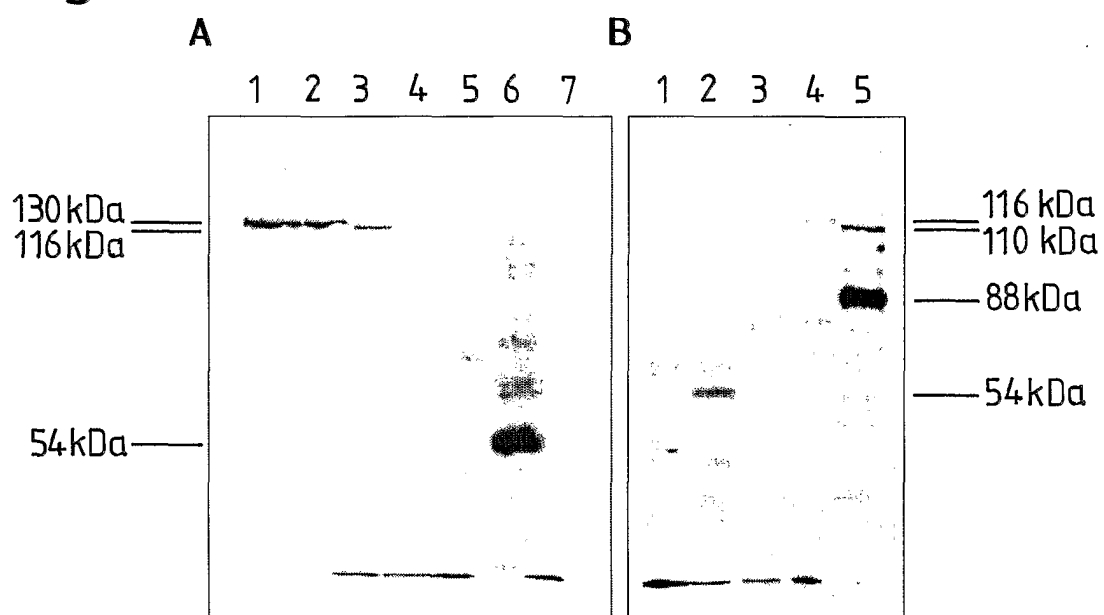
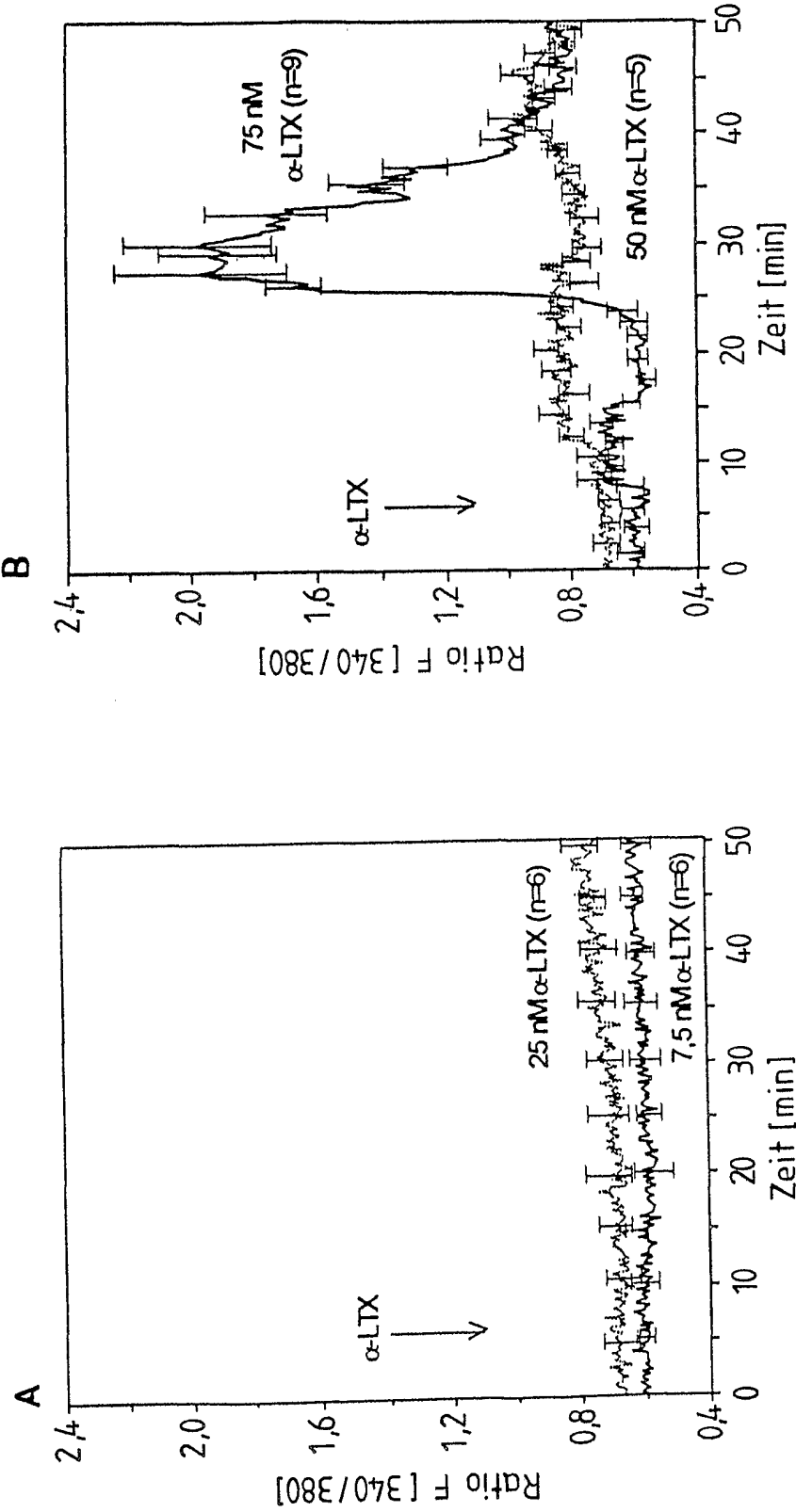
Fig. 9

Fig. 10



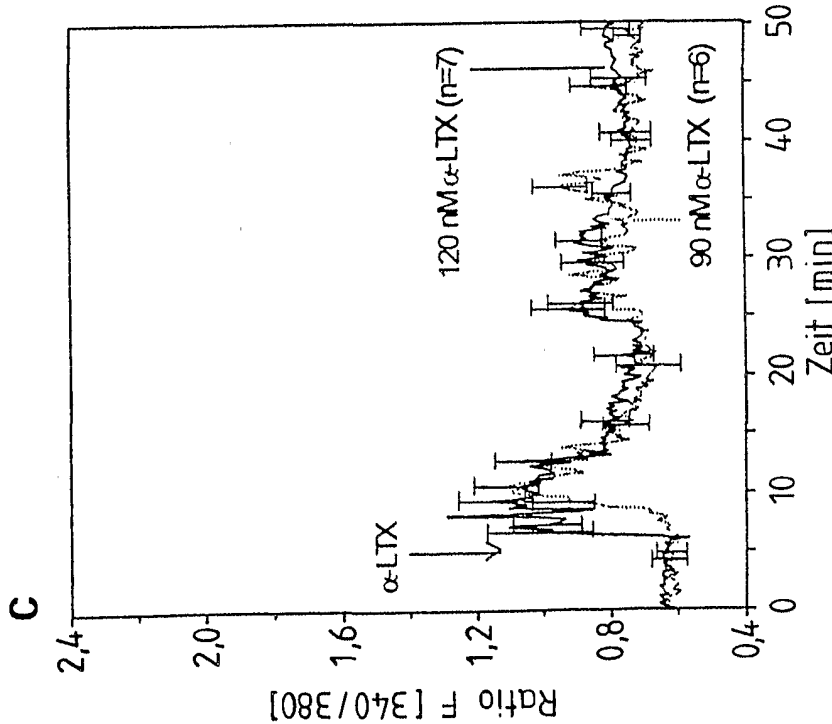
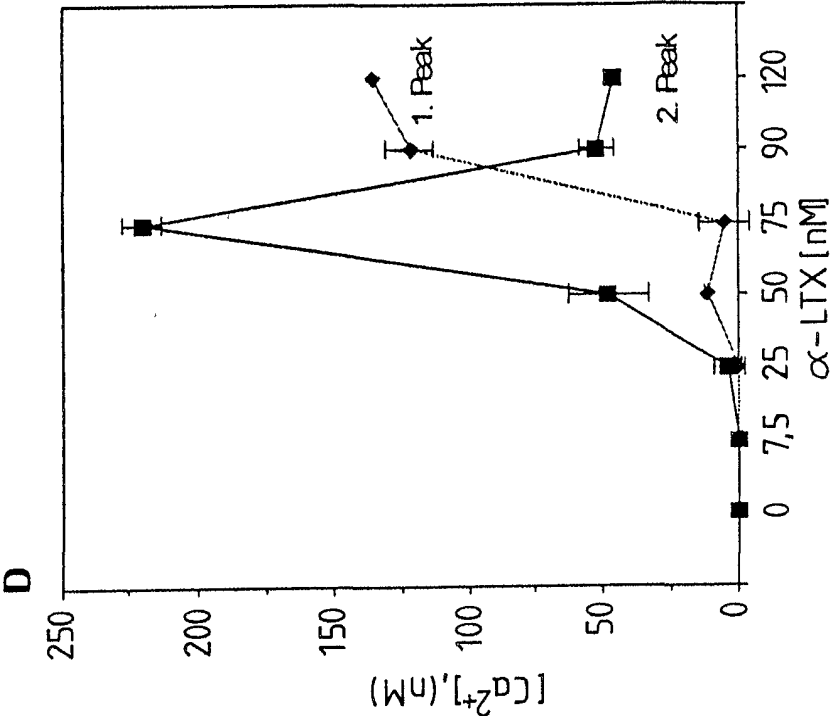
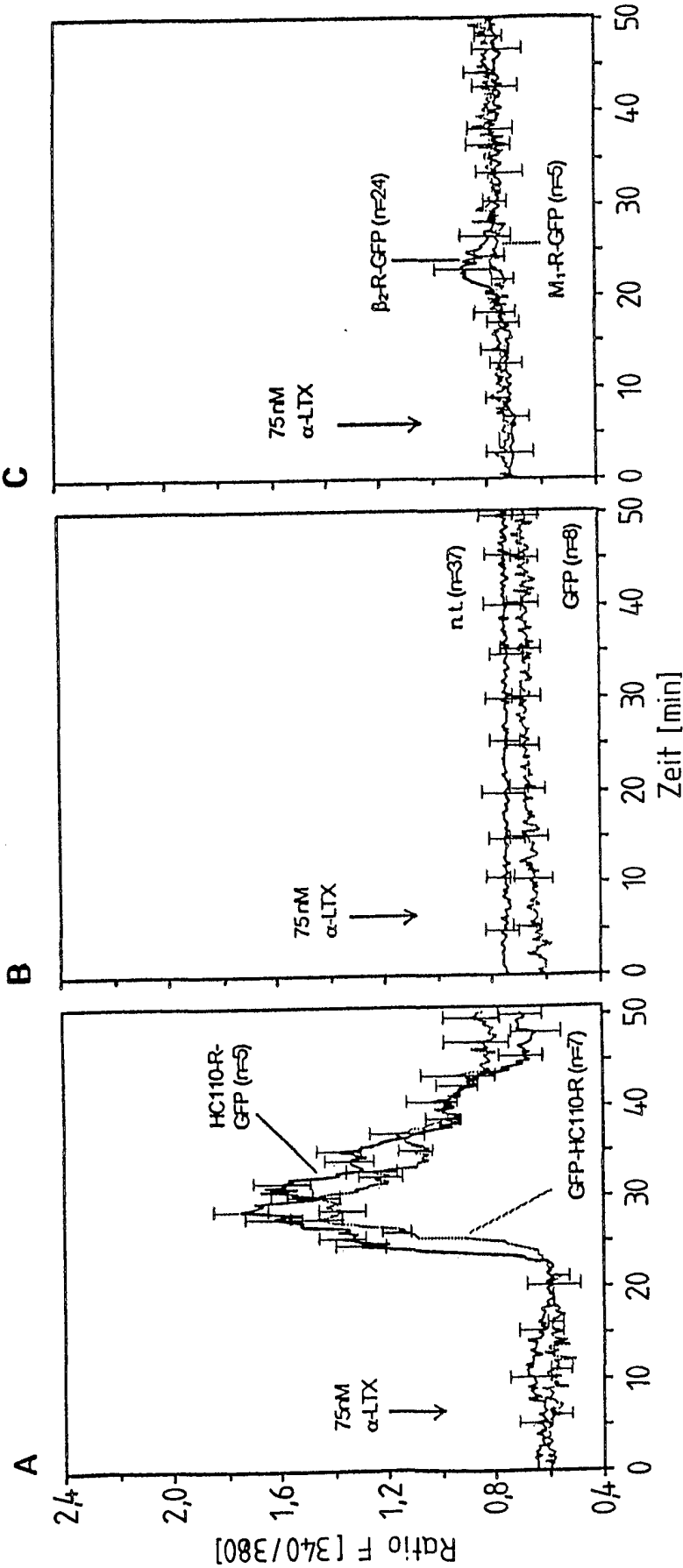
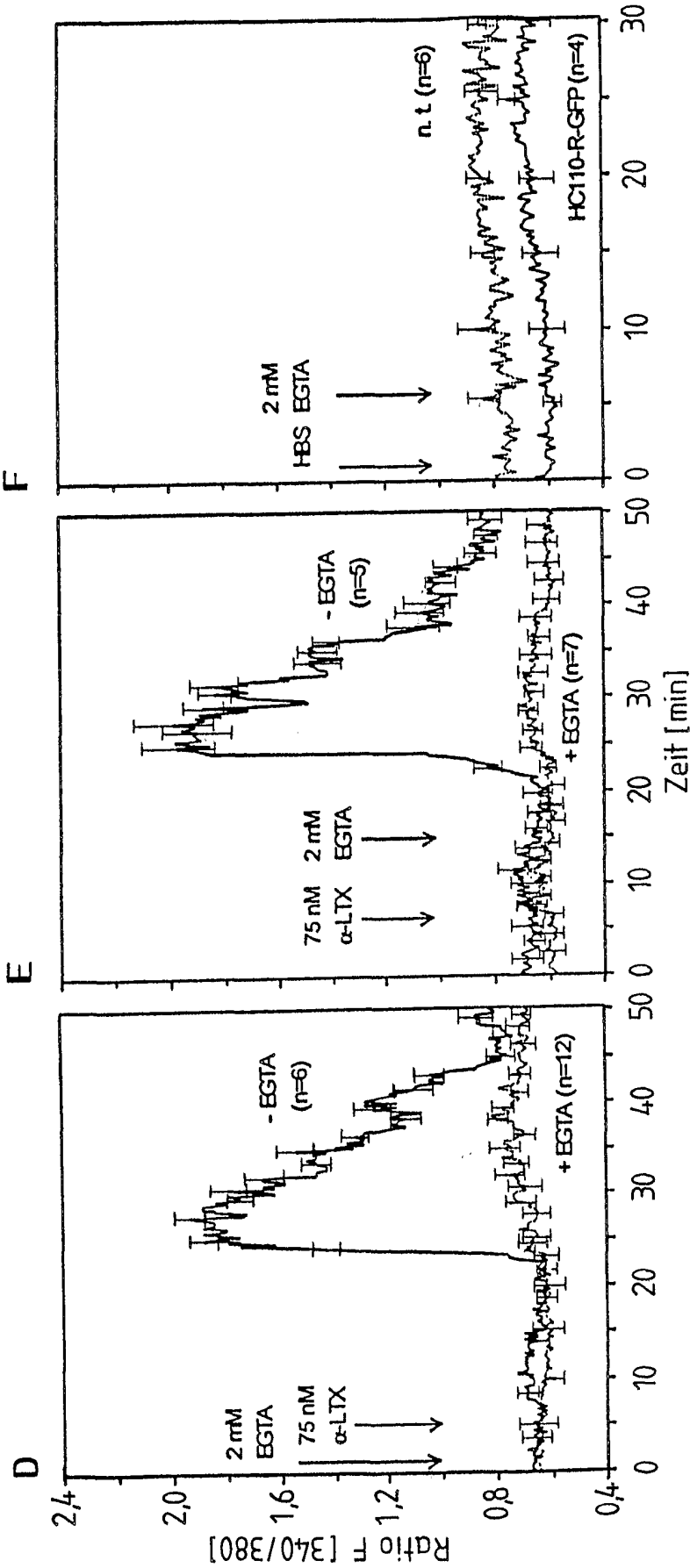
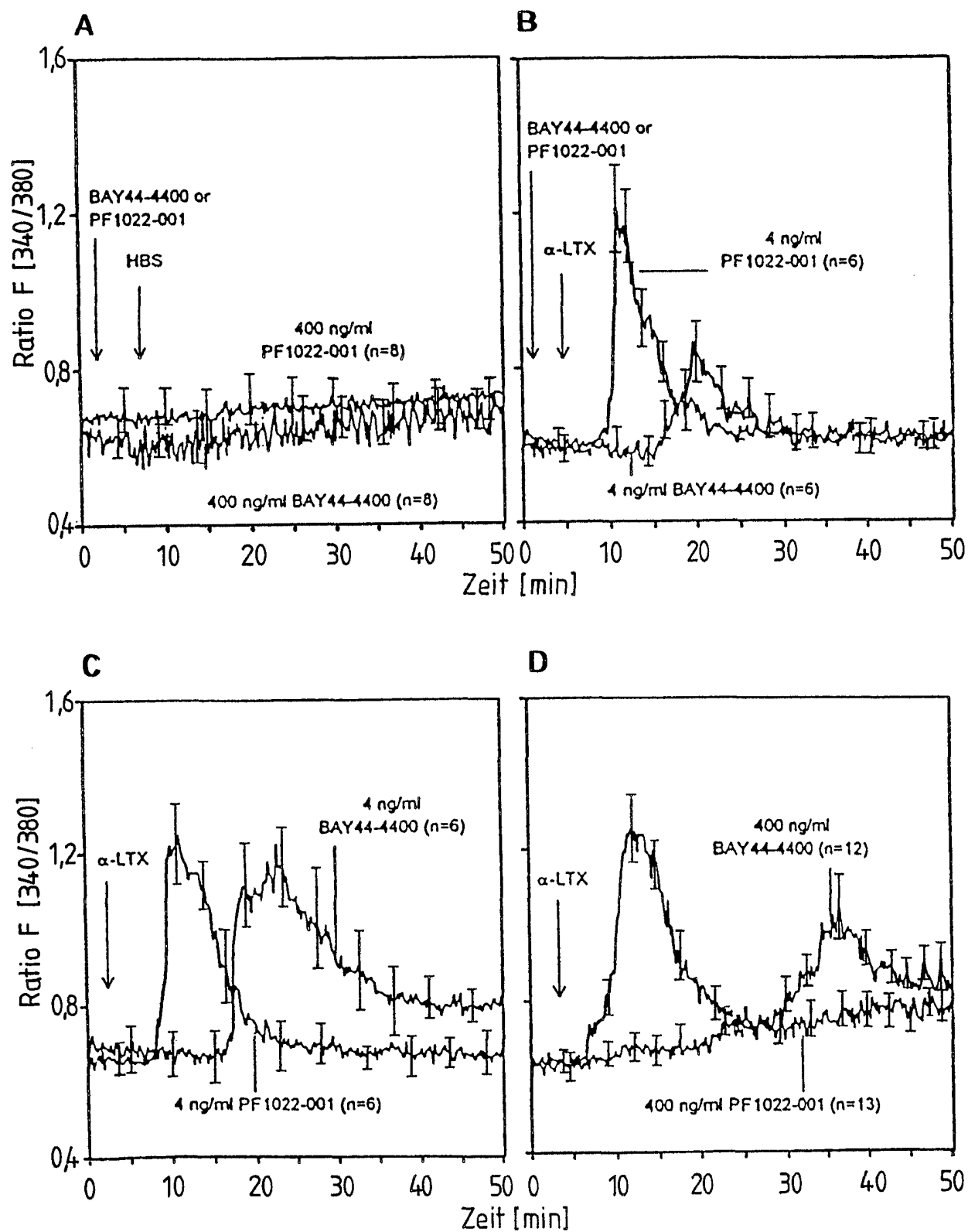


Fig.11





- 18 / 24 -

Fig. 12

- 19 / 24 -

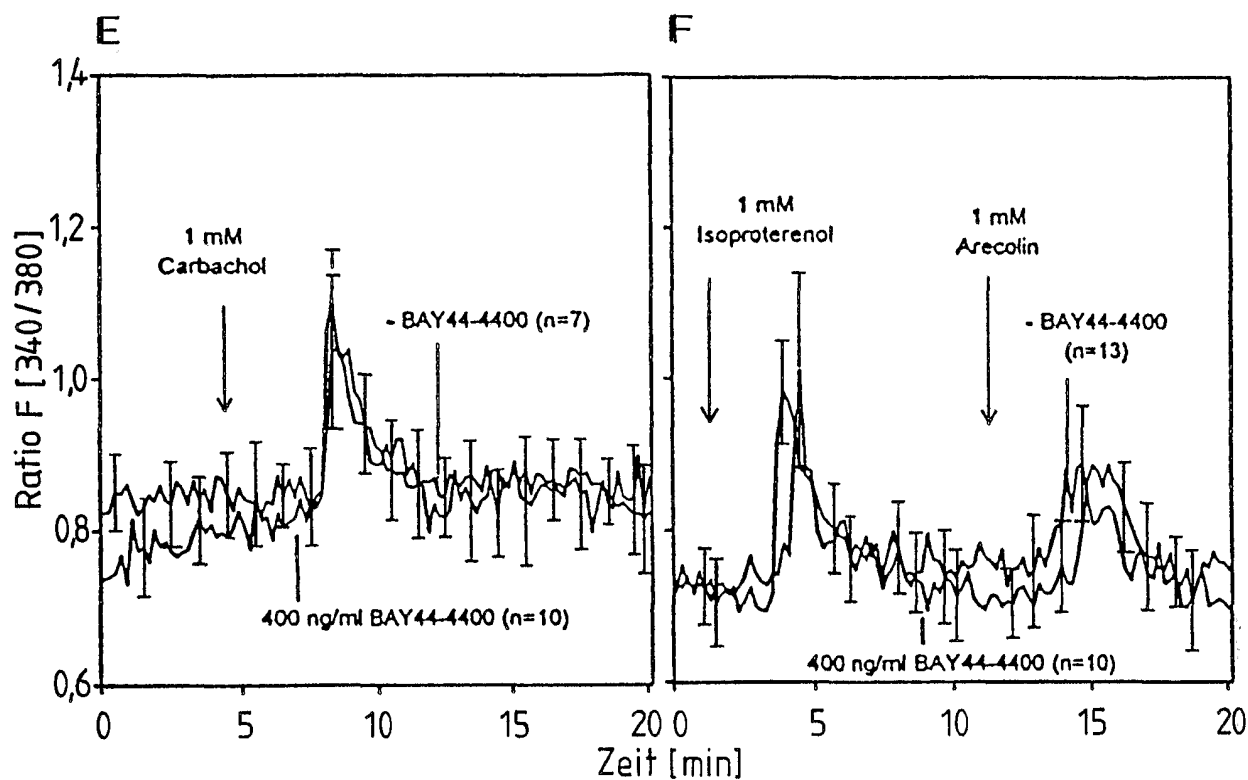
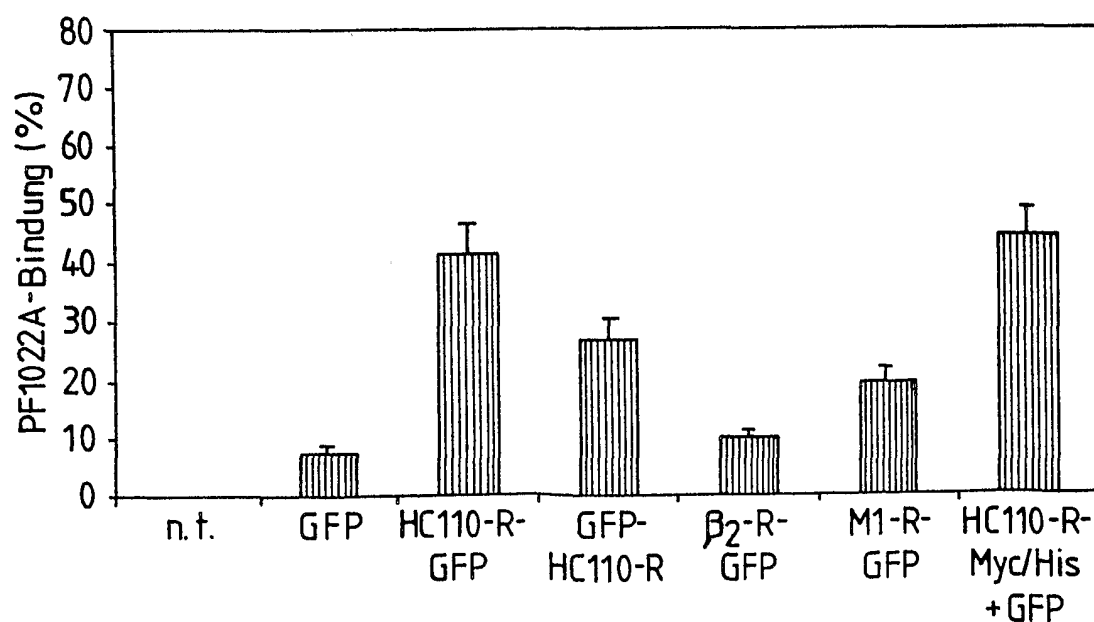
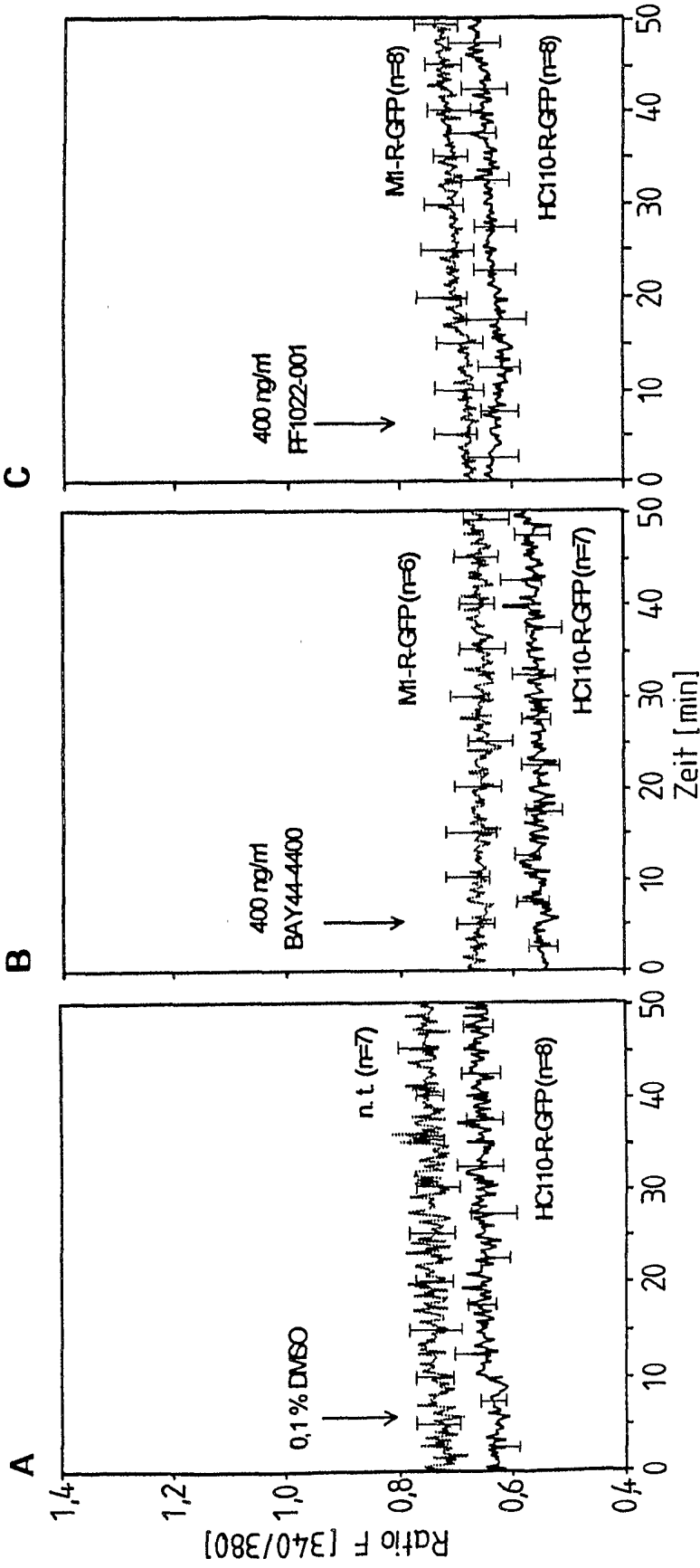
**Fig. 13**

Fig. 14



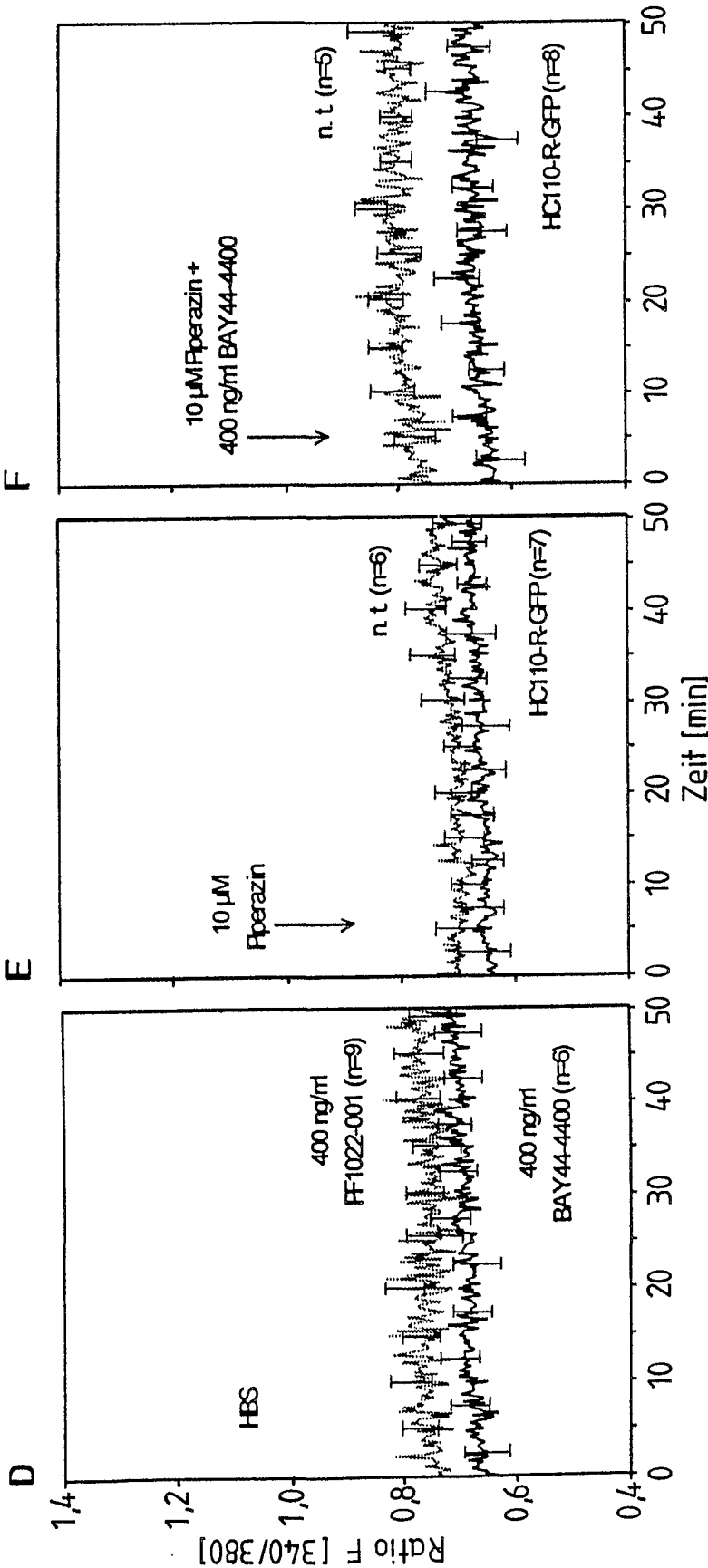


Fig.15

