

**Postsynaptische Mechanismen und  
Signaltransduktionswege der  
Modulation muskulärer Parameter  
durch die Neuropeptide  
Proctolin, DF<sub>2</sub> und Allatostatin  
in *Idotea emarginata* (Crustacea, Isopoda)**

**Dissertation**

zur Erlangung des akademischen Grades  
des Doktors der Naturwissenschaften  
an der Universität Konstanz,  
Fachbereich Biologie

vorgelegt von

**Nicole Rogalla**

Konstanz, im November 2004

1. Gutachter: Prof. Dr. W. Kutsch
2. Gutachter: Prof. Dr. C. Erxleben

---

**INHALTSVERZEICHNIS**


---

1. EINLEITUNG .....	1
1.1. Muskeln .....	1
1.1.1. Muskelkontraktion und Regulation	2
1.1.2. Motorische Steuerung der Invertebraten-Muskulatur	6
1.2. Neuromodulatoren .....	7
1.2.1. Übersicht	7
1.2.2. Wirkungen von Neuromodulatoren auf die Präsynapse	11
1.2.3. Wirkungen von Neuromodulatoren auf Membranproteine und Kanäle der Postsynapse	12
1.2.4. Signaltransduktion	13
1.3. Ziel der Arbeit .....	16
2. MATERIAL UND METHODEN .....	18
2.1. Material.....	18
2.1.1. Versuchstier	18
2.1.2. Chemikalien	19
2.1.3. Lösungen	20
2.1.4. Neuromodulatoren und Pharmaka	20
2.1.5. Geräte	21
2.1.6. Materialien	22
2.1.7. Software	22
2.2. Methoden.....	23
2.2.1. Kontraktionsmessung und Intrazelluläre Muskelableitung	23
2.2.2. Statistik	28
3. ERGEBNISSE.....	29
3.1. Die K <sup>+</sup> -induzierte Muskelkontraktur .....	29
3.2. Proctolin-Wirkung auf die Extensormuskulatur von <i>Idotea emarginata</i> .....	31
3.2.1. Proctolin verstärkt die K <sup>+</sup> -induzierte Muskelkontraktur	31
3.2.2. Proctolin rekrutiert Iberiotoxin-sensitive Kanäle	33
3.2.3. Die Potenzierung der K <sup>+</sup> -induzierten Muskelkontraktur durch Proctolin kann durch den spezifischen PKA-Inhibitor H89 nicht verhindert werden	36
3.2.4. Die Potenzierung der K <sup>+</sup> -induzierten Kontraktur wird durch die PKC vermittelt	37
3.2.5. Die Iberiotoxin-sensitiven Kanäle werden von Proctolin durch Aktivierung der PKC rekrutiert	39
3.2.6. 8-Bromo-cGMP, ein cGMP-Analogon, verringert die Proctolin-induzierte Verstärkung der Kontraktur	40

---

3.2.7. Proctolin bindet an einen G <sub>q</sub> -gekoppelten Rezeptor	41
3.2.8. Zusammenfassung	42
3.3. DF <sub>2</sub> -Wirkung auf die Extensormuskulatur von <i>Idotea emarginata</i> .....	43
3.3.1. DF <sub>2</sub> potenziert die K <sup>+</sup> -induzierte Kontraktur und verstärkt die Depolarisation des Membranpotenzials	43
3.3.2. DF <sub>2</sub> wirkt nicht auf Iberiotoxin-sensitive Kanäle	45
3.3.3. Das G-Protein des DF <sub>2</sub> -Rezeptors ist ein G <sub>S</sub> -Protein	46
3.3.4. Die Potenzierung der K <sup>+</sup> -induzierten Kontraktur durch DF <sub>2</sub> kann durch den spezifischen PKA-Inhibitor H89 nicht verhindert werden	47
3.3.5. Zusammenfassung	48
3.4. Allatostatin-Wirkung auf die Extensormuskulatur von <i>Idotea emarginata</i> ...	49
3.4.1. Allatostatin vermindert die Kontraktur	49
3.4.2. Die Verminderung der K <sup>+</sup> -induzierten Kontraktur wird nicht über die Guanylatzyklase vermittelt	50
3.4.3. Das G-Protein des Allatostatin-Rezeptors ist ein G <sub>i</sub> -Protein	51
3.4.4. Zusammenfassung	52
4. DISKUSSION.....	53
4.1. Die Neuromodulatoren Proctolin, DF <sub>2</sub> und Allatostatin .....	53
4.2. Kontraktionen sind Ca <sup>2+</sup> abhängig.....	54
4.3. Ca <sup>2+</sup> -Kanäle in der Muskelfaser von <i>Idotea</i> .....	56
4.4. Iberiotoxin-sensitive K <sup>+</sup> -Kanäle in <i>Idotea</i> .....	57
4.5. Signalkaskaden .....	59
5. ZUSAMMENFASSUNG .....	66
6. ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS .....	68
7. ABBILDUNGSVERZEICHNIS.....	70
8. LITERATURVERZEICHNIS .....	73
DANKSAGUNG .....	93

## 1. EINLEITUNG

---

### 1.1. Muskeln

Die vielfältigen Bewegungsabläufe, die der Lokomotion und dem Verhalten der Tiere in ihrer Umwelt zugrunde liegen, werden durch Muskeln realisiert. Die Aktivität der einzelnen Muskelfasern wird vom Nervensystem gesteuert. Dem Nervensystem obliegt dabei die Koordination und Feinsteuerung vollständiger Bewegungsabläufe und komplexer Verhaltensmuster durch räumlich und zeitlich definierte Muskelanregung. Die vom Nervensystem dazu ausgesandten Signale werden über chemische und elektrische Synapsen an das motorische System übertragen. Die klassische chemische Übertragung erfolgt im Bereich unter einer Millisekunde; dabei werden über die Ausschüttung inhibierender oder exzitatorischer Neurotransmitter Ionenkanäle in der postsynaptischen Membran geöffnet, und damit wird direkt die Permeabilität der Muskelmembran verändert. Neben dieser schnellen synaptischen Übertragung erfolgt über Zeiträume von einigen Zehntelsekunden bis zu mehreren Minuten eine Modulation durch parallel emittierte Neuromodulatoren, wie biogene Amine, Peptide und Aminosäuren.

Insbesondere bei Invertebraten mit ihrem gering differenzierten Nervensystem ermöglicht diese langsame synaptische Modulation von Nervenimpulsen die Ausprägung vielschichtiger und komplexer Leistungen des Muskelapparates.

Die Muskeln sind aus einzelnen Muskelfasern aufgebaut, die einkernig oder – durch den Zusammenschluss von mehreren Muskelzellen – vielkernig sein können. Jede einzelne Faser besteht aus Untereinheiten, den Myofibrillen, die in longitudinal angeordnete Einheiten, die Sarkomere, gegliedert sind.

Muskeln werden aufgrund morphologischer und funktioneller Eigenheiten in zwei Hauptgruppen unterteilt. Zum einen die quergestreifte Skelett- und Herzmuskulatur, die bei den Coelenteraten über die Arthropoden bis zu den Wirbeltieren anzutreffen ist und aus Milliarden von vielkernigen Zellen besteht; die verschiedenen Muskulaturtypen dieser Gruppe unterscheiden sich hauptsächlich in ihren Stoffwechseleigenschaften. Zum anderen die glatte Muskulatur, die aus

spindelförmigen, einkernigen Zellen zusammengesetzt und um Hohlorgane und Gefäße angeordnet ist.

Bei lichtmikroskopischer Betrachtung können bei der quergestreiften Muskulatur abwechselnd helle und dunkle Querstreifen unterschieden werden. Dabei sind die isotropen, hellen Abschnitte (so genannte I-Banden) jeweils durch die ganze Muskelfaser querende Zwischenlinien (als Z-Scheiben bezeichnet) in gleichgroße Abschnitte unterteilt. Von jeder Z-Scheibe aus erstrecken sich nach beiden Seiten zahlreiche dünne Filamente, die überwiegend aus dem Protein Aktin bestehen. Das Aktinfilament entsteht durch polymerisierte globuläre Aktin-Moleküle (G-Aktin), die eine lange Doppelhelix aus faserähnlichem Aktin (F-Aktin) bilden. In den Oberflächenrinnen der Aktinhelices liegen jeweils die fadenförmigen Moleküle des Tropomyosins. An jedem Tropomyosin ist ein Komplex globulärer Proteinmoleküle angelagert, der so genannte Troponin-Komplex. Dieser Komplex wiederholt sich etwa alle 40 nm an dem Aktinfilament. Tropomyosin und Troponin regulieren gemeinsam die mechanische Aktivität der Muskelfaser.

Zwischen den Aktinfilamenten befinden sich die dicken Filamente oder Myosinfilamente, die ihrerseits über das Protein Titin an der Z-Scheibe befestigt sind. Die einzelnen Myosin-Monomere sind lang und dünn; an den Enden befindet sich ein rundlicher zweigeteilter „Kopf“. Der Kopf enthält zwei so genannte leichte Myosinketten (mLC). Diese unterscheiden sich in verschiedenen Muskeltypen und beeinflussen die ATPase-Aktivität des Myosins.

In der glatten Muskulatur fehlt ein solcher, geordneter Aufbau der Muskelfilamente, wengleich auch hier Aktinfilamente, Myosinfilamente und regulatorische Proteine vorhanden sind. Der Troponin-Komplex fehlt bei der glatten Muskulatur, als Regulatorproteine fungieren hier Calponin und Calmodulin.

(zusammengefasst nach: Dudel *et al.*, 2001; Eckert *et al.*, 2000; Penzlin, 1991; Voet und Voet, 1992)

### **1.1.1. Muskelkontraktion und Regulation**

Bei der Muskelkontraktion gleiten Aktin- und Myosinfilamente aneinander vorbei und bewirken so eine Verkürzung der Sarkomere. Dabei sind neben den Proteinen Aktin und Myosin auch die regulatorischen Proteine Tropomyosin und Troponin wichtig.

Ebenso ist die Anwesenheit von  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ , Adenosintriphosphat (ATP) und eine ATPase-Aktivität notwendig.

Während der Muskelkontraktion der Skelettmuskulatur sind nie alle Myosin-Köpfchen gleichzeitig an Aktin gebunden; vielmehr handelt es sich um eine Art asynchronen „Ruderschlag“ der Köpfchen (Vale und Milligan, 2000). Im nicht an Aktin gebundenen Zustand hydrolysiert ein einzelnes Myosin-Köpfchen ATP zu Adenosindiphosphat (ADP) und  $\text{P}_i$ . Damit verbunden wird eine Konformationsänderung des Kopfes induziert, die diesen mit potenzieller Energie anreichert (Vale und Milligan, 2000). Bei niedriger  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration ist der Troponin-Komplex derart mit dem Aktin und Tropomyosin verbunden, dass Tropomyosin die Anheftung der Querbrückenköpfe an die Myosin-bindenden Zentren des Aktins sterisch verhindert (Ebashi *et al.*, 1980; Eckert *et al.*, 2000).

Ein über das motorische Axon eintreffendes Aktionspotenzial löst die Ausschüttung einer Transmittersubstanz in den synaptischen Spalt aus. Bei den Vertebraten wird die Substanz Acetylcholin ausgeschüttet, die an ionotrope Rezeptoren in der postsynaptischen Membran bindet. Dadurch strömen  $\text{Na}^+$ -Ionen in die Muskelzelle und spannungsabhängige  $\text{Na}^+$ -Kanäle werden aktiviert; ein Aktionspotenzial wird generiert. Spannungsabhängige, membranständige Dihydropyridin-Rezeptoren (L-Typ  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanäle) des tubulären Systems sind elektromechanisch an  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanäle (Ryanodin-Rezeptoren) des sarkoplasmatischen Retikulums (SR) gekoppelt. Durch die Depolarisation werden so  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen aus dem SR freigesetzt. (nach Hille, 2001)

Die Transmittersubstanz der Arthropoden ist Glutamat, beziehungsweise die auf den Muskel inhibitorisch wirkende  $\gamma$ (Gamma)-Aminobuttersäure (GABA). Bindet Glutamat an den postsynaptischen Rezeptor, kommt es zu einem geringen  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom über die Muskelmembran und es werden exzitatorische postsynaptische Potenziale (EPSPs) erzeugt. Nach dem Eintreffen weiterer präsynaptischer Signale wird durch Summation der EPSPs die Aktivierungsschwelle von Dihydropyridin-Rezeptoren erreicht, und extrazelluläre  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen strömen verstärkt in die Muskelfaser ein. In der Folge werden Ryanodin-Rezeptoren am SR aktiviert, und es kommt zur  $\text{Ca}^{2+}$ -induzierten  $\text{Ca}^{2+}$ -Ausschüttung aus dem SR. (zusammengefasst nach Ashley und Ridgway, 1970; Atwater *et al.*, 1974; Gainer, 1968)

In der Arthropoden- und auch in der Herzmuskulatur sind, im Gegensatz zur Skelettmuskulatur der Vertebraten, meist mehrere Aktionspotenziale am motorischen Axon notwendig, um die Freisetzung von  $\text{Ca}^{2+}$  aus intrazellulären Speichern der Muskelfaser zu induzieren.

In Folge der Aktivierung der Muskelzelle steigt die intrazelluläre  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration von ca.  $10^{-8}$  M auf über  $10^{-6}$  M. Die freigesetzten  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen binden an das Troponin C. Daraufhin werden die Troponin-Untereinheiten (Troponin C, T und I) und damit die Konformation des Troponin-Komplexes so verändert, dass das Tropomyosinmolekül die Myosinbindestellen am Aktin freigibt (Ebashi *et al.*, 1980). Durch die Aufhebung der sterischen Hinderung kann Myosin nun an Aktin binden, zumal die Aktinaffinität des Myosins hoch ist. Durch die Abspaltung der Hydrolyseprodukte  $\text{P}_i$  und anschließend ADP vom Myosin entsteht eine Kopffrotation des Myosinköpfchens (Eckert *et al.*, 2000). Es kommt also zu einer Filamentverschiebung oder - unter isometrischen Bedingungen - zu einer Verformung des Myosinköpfchens (Dudel *et al.*, 2001). Die Bindung von  $\text{Mg}^{2+}$ -ATP an das aktin gebundene Myosin löst die Querbrückenverbindung wieder. ATP kann wieder hydrolysiert werden und bei einer ausreichend hohen  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration kann der Zyklus erneut ablaufen (Eckert *et al.*, 2000).

Die Kontraktion des Vertebraten-Herzmuskels ähnelt weitgehend der des Skelettmuskels. Hier kann jedoch ein Einstrom von extrazellulärem  $\text{Ca}^{2+}$  über die sarkolemmale Membran durch spannungsgesteuerte  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanäle zu einer zusätzlichen Freisetzung von  $\text{Ca}^{2+}$  aus dem SR führen. Außerdem kann die  $\text{Ca}^{2+}$ -Permeabilität der sarkolemmalen Membran über Hormone und Neurotransmitter reguliert werden. Bindet beispielsweise Adrenalin an bestimmte Rezeptoren ( $\beta_1$ -Adrenorezeptoren) von Herzmuskelzellen, so wird die G-Proteingekoppelte Adenylatzyklase aktiviert, die ihrerseits die Umsetzung von ATP zu zyklischem Adenosinmonophosphat (cAMP) katalysiert. Dadurch steigt die intrazelluläre cAMP-Konzentration. Die Proteinkinase A (PKA) wird durch den Anstieg der cAMP-Konzentration aktiviert. Die aktivierte PKA phosphoryliert Proteine eines sarkolemmalen  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanals, mit dem Ergebnis einer höheren Öffnungswahrscheinlichkeit dieses Kanals. In der Folge strömen mehr  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen in die Muskelzelle und bewirken eine verstärkte Muskelkontraktion. Außerdem können durch die aktivierte PKA auch andere Proteine phosphoryliert werden, wie zum

Beispiel das regulatorische Troponin I am Aktinfilament und verschiedene Membranproteine des SR. Dies verändert die  $\text{Ca}^{2+}$ -Sensitivität des molekularen Muskelkontraktionsapparates und führt zu einer schnelleren Erschlaffung des Muskels (Perry, 1999). Durch die Bindung von Adrenalin an andere Rezeptoren ( $\alpha_1$ -Adrenorezeptoren) wird die Aktivität der G-Protein-gekoppelten Phospholipase C (PLC) gesteigert und dadurch mehr Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat ( $\text{PIP}_2$ ) in Diazylglyzerin (DAG) und Inositol-1,4,5-triphosphat ( $\text{IP}_3$ ) umgewandelt. Die derart erhöhte  $\text{IP}_3$ -Konzentration führt durch die Bindung von  $\text{IP}_3$  an Ryanodin-Rezeptoren des SRs zu einer erhöhten Freisetzung von  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen in das Zytoplasma und verstärkt die Kraftentwicklung. (zusammengefasst nach Voet und Voet, 1992)

Auch die Kontraktion der glatten Muskulatur wird durch  $\text{Ca}^{2+}$  ausgelöst. Die in Folge der Muskelanregung aus dem SR freigesetzten zytoplasmatischen  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen binden an Calmodulin und bilden auf diese Weise einen Komplex, der unter anderem die Myosin-leichte-Ketten-Kinase (mLC-Kinase) aktiviert. Die mLC-Kinase phosphoryliert dann ihrerseits die leichten Ketten des Myosins, wodurch der glatte Muskel schließlich kontrahiert. Die Permeabilität der sarkolemmalen Membran für  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen wird durch das vegetative Nervensystem gesteuert. Bei geringer intrazellulärer  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen-Konzentration ( $<10^{-7}$  M) werden die mLC durch die mLC-Kinase dephosphoryliert und der Muskel erschlafft.  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen dienen in diesem System als sekundärer Botenstoff, wobei ihre Wirkung über die Assoziation mit Calmodulin zum  $\text{Ca}^{2+}$ -Calmodulin-Komplex vermittelt wird. Die Kontraktion der glatten Muskulatur wird ebenfalls von Hormonen beeinflusst. Die Bindung von beispielsweise Adrenalin an einen Rezeptor in der Membran aktiviert, ähnlich wie im quergestreiften Herzmuskel, die Adenylatzyklase. Der daraus resultierende Anstieg der zytoplasmatischen cAMP-Konzentration führt über mehrere Zwischenschritte zu einer Phosphorylierung der mLC-Kinase. Die phosphorylierte mLC-Kinase bindet nur schwach  $\text{Ca}^{2+}$ -Calmodulin, was zu einer Entspannung der glatten Muskulatur führt. Der Weg, der zur Kontraktion der glatten Muskulatur führt, verläuft wesentlich langsamer als der Prozess der Skelettmuskel-Kontraktion. (zusammengefasst nach Voet und Voet, 1992)



In Skelettmuskeln der Arthropoden, die in ihrem Aufbau der Skelettmuskulatur der Vertebraten teilweise ähnlich sind, scheinen aus den beiden Regulationsmechanismen der verschiedenen Vertebraten-Muskeln Elemente zusammenzuspielen. Im Skelettmuskel von Insekten ist beispielsweise die über  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen laufende Regulation der Muskelkontraktion und der Myosin-ATPase-Aktivität sowohl von der Aktivität von Troponin und Tropomyosin abhängig (Bullard *et al.*, 1973), als auch von der Phosphorylierung der leichten Ketten des Myosins (mLC) (Winkelman und Bullard, 1980). Die mLC regulieren die Muskelkontraktion (Winkelman und Bullard, 1980; Takano-Ohmuro *et al.*, 1986). Im Unterschied dazu phosphoryliert bei den Pfeilschwanzkrebse *Limulus spec.* eine  $\text{Ca}^{2+}$ -Calmodulin-abhängige mLC-Kinase zwei von drei Isoformen der mLC, was zu einer Aktivierung der Myosin-ATPase führt (Sellers, 1981). In der viszeralen Muskulatur der Schabe wird zum Beispiel ein 20 kd-Protein (vermutlich mLC) in Folge einer Proctolin-Stimulation phosphoryliert (Lange und Nykamp, 1996). In der Flugmuskulatur von *Drosophila* wird durch die Phosphorylierung einer mLC die ATPase-Aktivität des Muskels erhöht (Takahashi *et al.*, 1990). Bei der Muskelkraftentwicklung in Arthropoden spielt aber auch die Tropomyosin/Troponin-vermittelte Regulation eine wichtige Rolle (Lehman, 1982).

### **1.1.2. Motorische Steuerung der Invertebraten-Muskulatur**

Zwischen der quergestreiften Vertebraten-Skelettmuskulatur und der Invertebraten-Muskulatur existieren – trotz der ähnlichen Struktur der Muskelfasern – unterschiedliche Innervationsmechanismen. Bei den Vertebraten wird jede Muskelfaser von genau einem Neuron innerviert, wobei ein Neuron seinerseits mehrere Fasern innervieren kann. Die Muskelfasern von Invertebraten bekommen zumeist synaptische Eingänge von mehreren Neuronen (polyneurale Innervation), wobei jedes motorische Axon mehrere Synapsen an einer Muskelfaser ausbildet (multiterminale Innervation). Bei den Wirbeltieren finden hemmende Prozesse ausschließlich auf der Ebene des Zentralnervensystems (ZNS) statt. Bei vielen Invertebraten hingegen existiert eine synaptische Hemmung, die peripher an der Muskulatur ansetzt.

(zusammengefasst nach Dudel *et al.*, 2001)

Eine große Bedeutung für die Bewegungssteuerung der Invertebraten haben Neuromodulatoren, deren Wirkung das Bewegungsrepertoire der Arthropoden erweitert. Diese chemische Modulation findet nicht nur auf neuronaler Ebene, sondern auch direkt am Effektor – der einzelnen Muskelfaser – statt.

## 1.2. Neuromodulatoren

### 1.2.1. Übersicht

Neben der klassischen synaptischen Übertragung durch Transmitter und ionotrope Rezeptoren findet man in neuromuskulären Systemen von Vertebraten und Invertebraten weitere Mechanismen der synaptischen Kommunikation. Eine Vielzahl von Signalsubstanzen, die aus Neuronen freigesetzt werden, beeinflussen die synaptischen Übertragungen zwischen Neuronen und zwischen Neuronen und Muskeln.

Klassische Neurotransmitter verändern nach Ausschüttung direkt und sehr schnell (im Bereich einiger Millisekunden) die Permeabilität der postsynaptischen Membran. Neuromodulatoren hingegen beeinflussen die Wirkung der klassischen Neurotransmitter meist über einen längeren Zeitraum und haben alleine eine geringe Wirkung (Florey, 1967; Orchard *et al.*, 1989). Neuromodulatoren wirken prä- oder postsynaptisch und beeinflussen das Nervensystem oder dessen Zielorgane. Präsynaptisch verändern sie die Menge an ausgeschütteten Neurotransmittern durch ihre Wirkung auf Vesikelproteine oder spannungsgesteuerte  $Ca^{2+}$ -Kanäle. Postsynaptisch gibt es eine Vielzahl von Wirkungsmöglichkeiten, wie zum Beispiel die Veränderung von Ruheleitfähigkeiten der Membrankanäle, die Modulation von spannungsabhängigen Membrankanälen und die Phosphorylierung von Kanal- und intrazellulären Proteinen. Auf diese Weise wird das Leistungsspektrum des Übertragungssystems erweitert, und es werden feine und komplexe Verhaltensmuster und Bewegungsabläufe ermöglicht. Neuromodulatoren wirken nicht nur zentral im ZNS, sondern auch auf neuromuskuläre Synapsen in der Peripherie (Rathmayer *et al.*, 2002b).

Aufgrund der geringeren Anzahl von Neuronen und Muskelfasern spielen naturgemäß Neuromodulatoren in Invertebraten bei der Feinsteuerung von Muskeln eine viel größere Rolle als in Vertebraten. In Vertebraten erfolgt die Feinsteuerung

von Muskeln über die differenzierte Erregung einzelner Muskelfasern durch die jeweiligen einzelnen innervierenden Neuronen.

Weit verbreitete Neuromodulatoren bei Invertebraten sind biogene Amine, wie Serotonin (5-Hydroxytryptamin), Dopamin und Octopamin, eine Vielzahl von Peptiden, z.B. FMRFamide - wie DF<sub>2</sub> - und Proctolin, sowie die Gruppe der Allatostatine (Dudel *et al.*, 2001; Rathmayer *et al.*, 2002b).

#### 1.2.1.1 Proctolin

Das myotrope Penta-Peptid Proctolin (RYLPT) konnte erstmals in der Dickdarmmuskulatur der Schabe *Periplaneta americana* identifiziert werden (Brown, 1967; Brown und Starrat, 1975) und wurde wenig später auch in Crustaceen nachgewiesen (Sullivan, 1979). Proctolin wurde im ZNS vieler Arthropoden lokalisiert (Bishop *et al.*, 1984; Brüstle *et al.*, 2001; Kingan und Titmus, 1983; Lange *et al.*, 1986; Schwarz *et al.*, 1984; Witten und O'Shea, 1985). Es ist beteiligt an der Kontraktionsregulation der Skelettmuskulatur und der glatten Muskulatur (Evans und Myers, 1986; Lange, 2002; O'Shea, 1985; Orchard *et al.*, 1989). Proctolin verstärkt in Insekten und Crustaceen die Amplituden myogener Kontraktionen (Lange und Orchard, 1984; May *et al.*, 1979). Durch die Stimulation mit Proctolin können in Insekten (Adams und O'Shea, 1983; Baines und Downer, 1992; Bartos *et al.*, 1994; Bauer, 1991; Lange *et al.*, 1986; Wegener und Nässel, 2000), aber auch in *Limulus polyphemus* (Watson und Hoshi, 1985) und in Crustaceen (Schwarz *et al.*, 1980) Kontraktionen direkt ausgelöst werden. Proctolin erhöht Nerven-evozierte Muskelkontraktionen in Insekten und Crustaceen (Adams und O'Shea, 1983; Bartos *et al.*, 1994; Bishop *et al.*, 1987; Facciponte *et al.*, 1996; Mercier und Wilkens, 1985). Die Wirkung von Proctolin verläuft sowohl über prä- als auch über postsynaptische Mechanismen (Rathmayer *et al.*, 2002b).

#### 1.2.1.2 DF<sub>2</sub>

Seit der Isolierung des Tetra-Peptids FMRFamid aus der Venusmuschel *Macrocallista nimbosa* (Price und Greenberg, 1977) wurden mehr als einhundert FMRFamid-verwandte Peptide (FaRPs) charakterisiert. Sie sind im Nervensystem der meisten Invertebraten, speziell in Arthropoden (zusammenfassend in Greenberg und Price, 1992; Orchard *et al.*, 2001; Sithigorngul *et al.*, 2002) aber auch in einigen Vertebraten verschiedener Klassen (siehe auch Oelschläger *et al.*, 1998; Askwith *et*

*al.*, 2000) nachgewiesen worden. FaRPs sind an vielschichtigen Modulationen verschiedenster Zielbereiche beteiligt. In Arthropoden können sie sowohl erregende als auch hemmende Effekte auf die Herzschlagfrequenz und auf die Kontraktionen der Skelettmuskulatur und der glatten Muskulatur (Zusammenfassung für Insekten: Orchard *et al.*, 2001; für Crustaceen: Tierney *et al.*, 1997) verursachen. Zusätzlich zu den Effekten auf die neuromuskulären Parameter in der Peripherie modulieren FaRPs auch die Aktivität von neuronalen Netzwerken, wie dem stomatogastrischen zentralen Mustergenerator der Crustaceen (Weimann *et al.*, 1993; Tierney *et al.*, 1997; Jorge-Rivera *et al.*, 1998). In Crustaceen konnten bisher 19 verschiedene FaRPs identifiziert werden (Marder *et al.*, 1987; Trimmer *et al.*, 1987; Krajniak, 1991; Mercier *et al.*, 1993; Weimann *et al.*, 1993; Sithigorngul *et al.*, 1998; Sithigorngul *et al.*, 2001; Sithigorngul *et al.*, 2002), die alle die gleiche Sequenz am C-terminalen Ende besitzen, das Tetra-Peptid XLRFamid (das X steht für Phenylalanin oder Arginin). Eines dieser nachgewiesenen XLRFamide ist das Peptid DRNFLRFamid (DF<sub>2</sub>). In *Idotea* wirkt DF<sub>2</sub> auf die Extensormuskelfaser depolarisierend und potenziert K<sup>+</sup>-induzierte Muskelkontraktionen (Weiss *et al.*, 2003). Im Flusskrebis *Procambarus clarkii* erhöht DF<sub>2</sub> die Amplitude und die Frequenz der Herzmuskelkontraktionen (Skerrett *et al.*, 1995) und die Aktivitätsfrequenz von pylorischen Neuronen (Tierney *et al.*, 1997). Außerdem wird in der abdominalen Extensormuskulatur des Flusskrebises eine Rolle von DF<sub>2</sub> bei der Anpassung der neuromuskulären Funktionen an tiefe Temperaturen postuliert (Friedrich *et al.*, 1994).

### 1.2.1.3 Allatostatine

Eine Familie kleiner Neuropeptide, die die C-terminale Penta-Peptid-Sequenz –YXFGL-NH<sub>2</sub> gemeinsam haben, wurde erstmals aus der Schabe *Diploptera punctata* isoliert (Pratt *et al.*, 1989; Pratt *et al.*, 1991; Woodhead *et al.*, 1989; Woodhead *et al.*, 1994). Da sie dort die Juvenilhormon-Synthese in der Corpora allata inhibieren, wurden sie Allatostatine genannt (Tobe und Stay, 1980). Eine Vielzahl von Peptiden mit homologem C-Terminus wurde danach in verschiedenen Insekten, wie Schaben (Bellés *et al.*, 1994; Weaver *et al.*, 1994; Yu *et al.*, 1993), Heuschrecken (Veelaert *et al.*, 1996), Grillen (Lorenz *et al.*, 1995), *Lepidoptera* (Duve *et al.*, 1997a; Duve *et al.*, 1997c) und *Diptera* (Duve *et al.*, 1993; Duve *et al.*,

1994; Duve *et al.*, 1995; Duve *et al.*, 1996; Duve und Thorpe, 1994; Veenstra *et al.*, 1997) identifiziert. Immunzytochemische Untersuchungen zeigten eine weite Verbreitung an Allatostatinen. Sie kommen in zentralen und peripheren Nervensystemen, in den Antennen und an der Eingeweidemusculatur von verschiedenen Insekten vor (zusammenfassen in Duve *et al.*, 1997a; Duve *et al.*, 1997c; Gäde *et al.*, 1997; Nässel, 1996; Stay *et al.*, 1994). Allatostatin-Gene verschiedener Insekten, wie zum Beispiel der Heuschrecke *Schistocerca gregaria* (Vanden Broeck *et al.*, 1996; Veenstra *et al.*, 1997) und der Schabe *Diploptera punctata* (Ding *et al.*, 1995; Donly *et al.*, 1993; Reichwald *et al.*, 1994), wurden kloniert und sequenziert. Allatostatine wurden auch in Crustaceen nachgewiesen (Christie *et al.*, 1995; Duve *et al.*, 1997b; Skiebe, 1999; Skiebe und Schneider, 1994). Zum Beispiel wurden aus der Krabbe *Carcinus maenas* 20 verschiedene Peptide der Allatostatin-Familie isoliert. Untereinander zeigten sie Sequenzhomologie am C-Terminus, aber keines von ihnen war mit einem einzigen der bisher bekannten Insekten-Allatostatine identisch (Duve *et al.*, 1997b). Allatostatin-immunoreaktive (AST-ir) Neurone wurden im stomatogastrischen Nervensystem in Crustaceen gefunden. In adulten Insekten und Crustaceen werden Eingeweidemuskeln, Herzmuskeln und Motoneurone der Maxillen- und Thorax-Skelettmuskulatur (z.B. in Larven von *Manduca sexta*; Davis *et al.*, 1997) von solchen AST-ir Neuronen innerviert und moduliert. In Skelettmuskeln von Heuschrecken wurden AST-ir Neurone gefunden (Kreissl *et al.*, 1995). Und auch an den dorsalen Extensormuskelfasern von *Idotea baltica* und *Idotea emarginata* wurden AST-ir Neurone nachgewiesen (Kreissl *et al.*, 1999).

Die Entdeckungen vieler verschiedener Allatostatine in derart vielfältigen Arthropoden und ihre weite Verbreitung im Nervensystem und in anderen Geweben, lassen noch andere Funktionen neben der Regulation der Juvenilhormon-Synthese vermuten. Bisher sind Allatostatine die einzigen bekannten Peptide mit inhibitorischer Wirkung auf die Skelettmuskulatur in Crustaceen. Es wurde gezeigt, dass Allatostatin die Kontraktionskraft der Dickdarmmuskulatur des Flusskrebses *Orconectes limosus* reduziert (Dirksen *et al.*, 1999), spontane Kontraktionen im Enddarm der Schabe *Leucophaea maderae* werden ebenfalls inhibiert. Andererseits zeigt sich keine inhibitorische Wirkung von Allatostatin auf die Eileitermuskulatur von *Locusta migratoria* (Veelaert *et al.*, 1995).

Frequenz und Amplitude Proctolin-induzierter und spontaner Kontraktionen des Enddarms – nicht aber des Eileiters – der Schabe *Diploptera punctata* nehmen bei steigender Allatostatin-Konzentration zunehmend ab (Lange *et al.*, 1995). Der Allatostatin-verwandte Modulator Helicostatin inhibiert in der Motte *Helicoverpa amigera* die spontanen Kontraktionen des Vorderdarms vollständig (Duve *et al.*, 1999). Durch Allatostatin nimmt in der Krabbe *Cancer borealis* die Kontraktionsamplitude der Magenmuskulatur ab, exzitatorische postsynaptische Potenziale werden reduziert (Jorge-Rivera und Marder, 1997) und die Aktivitätsfrequenz von pylorischen Neuronen wird verringert (Skiebe und Schneider, 1994).

In der Meeresassel *Idotea emarginata* wird die Kontraktionskraft der dorsalen Extensormuskelfasern durch Allatostatin reduziert (Kreissl *et al.*, 1999; Rathmayer *et al.*, 2002b).

### **1.2.2. Wirkungen von Neuromodulatoren auf die Präsynapse**

Präsynaptisch wirken Neuromodulatoren auf die Transmitterfreisetzung. So erhöhen FMRFamide die Transmitterausschüttung in den synaptischen Spalt in Krabben, Hummer und Flusskrebs (Friedrich *et al.*, 1998; Jorge-Rivera und Marder, 1996; Mercier *et al.*, 1990; Pasztor und Golas, 1993; Skerrett *et al.*, 1995; Worden *et al.*, 1995). In der Krabbe *Eriphia spinifrons* wird die Freisetzung von Transmittern durch die beiden Neuropeptide DF<sub>2</sub> und Proctolin erhöht. Dabei wirkt Proctolin über  $\omega$ -Agatoxin-sensitive P/Q-Typ Ca<sup>2+</sup>-Kanäle, DF<sub>2</sub> über  $\omega$ -Conotoxin-sensitive N-typ-Ca<sup>2+</sup>-Kanäle (Rathmayer *et al.*, 2002a). In *Aplysia* und in der Teichschnecke *Helisoma* verursachen FaRPs hingegen eine Verringerung der Transmitterausschüttung über die Reduktion des Ca<sup>2+</sup>-Ionen-Einstroms und die Desensibilisierung der sekretorischen Maschinerie des präsynaptischen Neurons gegenüber Ca<sup>2+</sup>-Ionen (Cropper *et al.*, 1994; Haydon *et al.*, 1991; Man-Son-Hing *et al.*, 1989). Auch Allatostatin reduziert die Transmitterausschüttung an der präsynaptischen Membran in *Idotea* und *Eriphia spinifrons* (Kreissl *et al.*, 1999; Rathmayer *et al.*, 2002b).

### **1.2.3. Wirkungen von Neuromodulatoren auf Membranproteine und Kanäle der Postsynapse**

Im Gegensatz zu den Wirkungen des Neuropeptids Proctolin auf die präsynaptische Membran, die bisher wenig untersucht wurden, ist über die dessen Wirkung auf postsynaptische Vorgänge in *Idotea emarginata* weit mehr bekannt. In Stomklemm-Versuchen können durch direkte Depolarisation ausgelöste Muskelkontraktionen mittels Proctolin-Applikation verstärkt werden (Erxleben *et al.*, 1995). Proctolin verstärkt sowohl Kontraktionen, die durch Depolarisation der Muskelfaser mittels hoher extrazellulärer  $K^+$ -Ionen-Konzentration generiert wurden, als auch Kontraktionen in Folge Koffein-ausgelöster  $Ca^{2+}$ -Ionen-Freisetzung aus dem sarkoplasmatischen Retikulum, den  $Ca^{2+}$ -Speichern der Muskelzellen (Bishop *et al.*, 1987; Brüstle *et al.*, 2001; Cook und Holman, 1980; Wegener und Nässel, 2000). Offenbar kann Proctolin sowohl an der sarkolemmalen Membran, als auch am kontraktilem Apparat in der Muskelzelle wirken. Das Peptid induziert eine Schließung von spannungsunabhängigen  $K^+$ -Kanälen (Erxleben *et al.*, 1995; Walther *et al.*, 1998) und erhöht die Öffnungswahrscheinlichkeit von membranständigen  $Ca^{2+}$ -Kanälen (Bishop *et al.*, 1991; Rathmayer *et al.*, 2002b). In Folge der Proctolin-Applikation wird in *Idotea* ein 30 kd-Protein am Aktinfilament phosphoryliert (Brüstle *et al.*, 2001). Dies könnte auf eine Modulation der  $Ca^{2+}$ -Sensitivität von sarkoplasmatischen Proteinen durch Proctolin hinweisen. Auf diese Weise würde, zusammen mit einer erhöhten  $Ca^{2+}$ -Ausschüttung aus dem SR (Wegener und Nässel, 2000), die Kraftentwicklung unabhängig vom Ionenfluss durch die membranständigen Ionenkanäle verstärkt.

Die Wirkungsweise von  $DF_2$  ist bisher nicht umfassend untersucht. In der tiefen Extensormuskulatur von *Procambarus clarkii* verstärkt dieses FMRFamid erregende postsynaptische Potenziale, wobei der Eingangswiderstand des Muskels unverändert bleibt (Skerrett *et al.*, 1995). In der Magenmuskulatur der Krabbe wird das Membranpotenzial von  $DF_2$  depolarisiert (Meyrand und Marder, 1991). In *Idotea* wird die Extensormuskelfaser unter der Einwirkung von  $DF_2$  depolarisiert, der Eingangswiderstand verringert sich, und der Einwärtsstrom durch den L-Typ  $Ca^{2+}$ -Kanal wird erhöht (Weiss *et al.*, 2003).

In Crustaceen hemmt Allatostatin erregende postsynaptische Ströme, was in der Folge zu einer Reduktion der Kontraktionsamplitude führt (Jorge-Rivera *et al.*, 1998; Jorge-Rivera und Marder, 1997). In der Krabbe *Cancer borealis* vermutet man eine Verringerung der Anzahl oder der Sensibilität der postsynaptischen Azetylcholin- und Glutamatrezeptoren durch Allatostatin (Jorge-Rivera und Marder, 1997). In der Meeresassel *Idotea emarginata* wird der postsynaptische spannungsabhängige  $\text{Ca}^{2+}$ -Einwärtsstrom durch Allatostatin-Einwirkung reduziert (Rathmayer *et al.*, 2002b).

#### **1.2.4. Signaltransduktion**

In jüngster Zeit hat man vermehrt untersucht, über welche Mechanismen Neuromodulatoren ihre Wirkung an der Zielzelle erreichen. So wurde, ausgehend von heptahelikalen Somatostatin/Galanin- und Opioid-Rezeptoren aus Vertebraten, mit molekularbiologischen Methoden eine Reihe von strukturell ähnlichen Rezeptoren in der Fruchtfliege *Drosophila melanogaster* nachgewiesen. Einer dieser membranständigen Rezeptoren bindet spezifisch den Neuromodulator Proctolin (Egerod *et al.*, 2003; Johnson *et al.*, 2003). Die Aktivierung membranständiger Rezeptoren durch die Bindung des jeweiligen spezifischen Liganden und die damit einhergehende Konformationsänderung des Rezeptors wandeln ein extrazelluläres in ein intrazelluläres Signal um. Das Signal wird an eine katalytische Einheit des Rezeptors an der Innenseite der Zellmembran weitergeleitet, die wiederum Proteinkinasen aktiviert und auf diese Weise intrazelluläre Antworten, wie die Mobilisierung von  $\text{Ca}^{2+}$ -Speichern oder die Aktivierung von Enzymen, auslöst. Häufig sind an Signaltransduktionen G-Proteine beteiligt, die mit Hilfe von Proteinfaktoren, den „Guaninnucleotide-releasing-Proteins“ (GNRP), aktiviert werden und so durch die Bindung von Guanosintriphosphat (GTP) an der Aktivierung anderer Proteine beteiligt sind. Es wurden bisher mehr als fünfzig verschiedene Isoformen von G-Proteinen charakterisiert, die in drei unterschiedliche Gruppen eingeteilt werden. Eine dieser Gruppen, die der heterotrimeren G-Proteine, wird vor allem durch heptahelikale Rezeptoren aktiviert. Der Proctolin-affine Rezeptor aus *Drosophila* weist sieben transmembrane Domänen auf, weshalb man vermutet, dass es sich um einen G-Protein-gekoppelten Rezeptor handelt (Egerod *et al.*, 2003).



Insbesondere die  $\alpha$ -Untereinheit der heterotrimeren G-Proteine ist für die Regulation der Aktivierung von intrazellulären sekundären Botenstoffen und der daraus folgenden physiologischen Antwort bedeutend. Durch die Bindung eines Hormons oder Neuromodulators an seinen spezifischen Rezeptor wird hier ein gebundenes Guanosindiphosphat (GDP) durch GTP ausgetauscht, was zu einer Dissoziation der  $\alpha$ -Untereinheit vom verbleibenden  $\beta\gamma$ -Komplex des heterotrimeren G-Proteins führt und eine Interaktion der freien  $\alpha$ -Untereinheit mit möglichen Zielproteinen ermöglicht.

Viele heterotrimere G-Proteine bedienen sich der Adenylatzyklase als katalytischer Einheit auf der zytosolischen Seite der Zellmembran. Dabei wird die katalytische Untereinheit C des Adenylatzyklasesystems durch aktivierende ( $G_s$ ) beziehungsweise hemmende ( $G_i$ )  $\alpha$ -Untereinheiten reguliert. Wird die Adenylatzyklase durch die stimulierende Untereinheit  $G_s\alpha$  eines G-Proteins aktiviert, kommt es zu einem Anstieg der cAMP-Konzentration. cAMP aktiviert die PKA und es werden spezifische Phosphorylierungskaskaden ausgelöst und damit das extrazellulär empfangene Signal zu intrazellulären Effektoren übertragen.

(zusammengefasst nach Löffler, 2003)

Einige der durch Proctolin auslösbaren Effekte in *Idotea* können durch cAMP-Agonisten nachgeahmt werden, und die Wirkung dieser cAMP-Agonisten kann durch PKA-Antagonisten oder den Proteinkinase-Inhibitor H-7 blockiert werden (Erxleben *et al.*, 1995; Rathmayer *et al.*, 2002b). Ein cAMP-Analagon ahmt die Proctolin-induzierte Erhöhung der  $Ca^{2+}$ -Kanal-Aktivität im Flusskrebs nach (Bishop *et al.*, 1991). Die experimentelle Erhöhung der intrazellulären cAMP-Konzentration mittels eines membrangängigen cAMP-Analogons induzierte, ebenso wie Proctolin, eine Steigerung des myogenen Rhythmus in langsamen Fasern des Schrittmacher-Bündels von Extensortibiae-Muskeln in Heuschrecken (Evans, 1984). Bisher wurde nur in diesen Fasern eine Proctolin-sensitive Adenylatzyklase nachgewiesen (Swales und Evans, 1988). In anderen Arthropoden-Muskeln wurde durch Proctolin-Applikation keine cAMP-Konzentrationserhöhung induziert (Baines und Downer, 1992; Evans und Myers, 1986; Goy *et al.*, 1984; Groome und Watson, 1989; Mazzocco-Manneval *et al.*, 1998; Philipp *et al.*, in Vorbereitung).

Eine Aktivierung der PKA durch Foskolin oder durch das cAMP-Analogon 8-Bromo-cAMP hemmt – ebenso wie Allatostatin – die Juvenilhormonsynthese (Meller *et al.*, 1985; Rankin *et al.*, 1986). In der Corpora allata der Schabe *Diploptera punctata* wurde mit verschiedenen Allatostatin-Konzentrationen und unterschiedlichen Stimulationszeiten jedoch keine Veränderung der intrazellulären cAMP-Konzentration gemessen (Cusson *et al.*, 1992). Ebenso zeigt die Applikation von Allatostatin auf die dorsale Extensormuskulatur in der Meeresassel *Idotea* keine Erhöhung oder Reduktion der intrazellulären cAMP-Konzentration (Fritsche, 2004).

Neben der Aktivierung des Adenylatzyklasesystems kann über heterodimere G-Proteine auch die PLC aktiviert werden. Dies erfolgt nach der Bindung eines Liganden an den heptahelikalen Rezeptor. Die PLC spaltet im aktiven Zustand Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat (PIP<sub>2</sub>) in IP<sub>3</sub> und DAG. DAG aktiviert die Proteinkinase C (PKC), die daraufhin die Guanylatzyklase (GC) hemmt. Durch die Hemmung der GC sinkt in der glatten Muskulatur der Vertebraten die Konzentration an zyklischem Guanosinmonophosphat (cGMP) (Jaiswal, 1992). In der Extensormuskulatur von *Idotea* kann nach der Stimulation mit Proctolin ebenfalls eine Verringerung der cGMP-Konzentration gemessen werden (Philipp *et al.*, i.V.). Nach Stimulation desselben Muskels mit Allatostatin erhöht sich hingegen die intrazelluläre cGMP-Konzentration (Fritsche, 2004). Dies steht im Gegensatz zu den Befunden von Cusson *et al.* (1992), wonach in der Schabe *Diploptera punctata* die cGMP-Veränderung durch Allatostatin nicht signifikant ist.

Ein G-Protein-gekoppelter Rezeptor, der eine hohe Affinität zu Allatostatin aufweist, wurde erstmals in *Drosophila* beschrieben (Birgül *et al.*, 1999). Ein sequenzhomologer Rezeptor wurde in der Schabe *Periplaneta americana* identifiziert (Auerswald *et al.*, 2001) und dessen Aktivierbarkeit durch Allatostatin (aus *Diploptera punctata*) konnte in Säugerzellen (CHO) nachgewiesen werden (Larsen *et al.*, 2001).

Das *Drosophila* Genom kodiert eine ganze Reihe G-Protein-gekoppelter Rezeptoren, die durch FaRPs aktiviert werden können (Cazzamali und Grimmelikhuijzen, 2002; Meeusen *et al.*, 2002). Im Flusskrebs *Procambarus clarkii* ist die PKC für die DF<sub>2</sub>-induzierte lang-anhaltende synaptische Verstärkung essentiell (Friedrich *et al.*, 1998). Die Signaltransduktionswege von DF<sub>2</sub> sind auf molekularer Ebene noch nicht näher charakterisiert.

### 1.3. Ziel der Arbeit

Die bisherigen Informationen über die Transduktionsmechanismen der muskelstimulierenden Effekte des Neuropeptids Proctolin sind widersprüchlich. Über die Wirkungsmechanismen des inhibitorischen Neuromodulators Allatostatin und des FMRFamids DF<sub>2</sub> ist bis jetzt wenig bekannt.

In dieser Arbeit werden die intrazellulären Signalwege dieser Neuromodulatoren mit Hilfe elektrophysiologischer Methoden und Kontraktionsmessungen an der Extensormuskelfaser von *Idotea emarginata* eingehender untersucht. In *Idotea* besteht der untersuchte Extensormuskel aus genau einer einzelnen Muskelfaser, was die physiologische Untersuchung an identifizierten Einzelfaser-Präparaten des gleichen physiologischen Typs ermöglicht (Rathmayer *et al.*, 2002b). Außerdem werden alle diese dorsalen Extensormuskeln von Motoneuronen innerviert, die Proctolin, Allatostatin und DF<sub>2</sub> enthalten (Brüstle *et al.*, 2001; Kreissl *et al.*, 1999; Weiss *et al.*, 2003). Insofern kann von einer physiologischen Relevanz dieser drei Neuromodulatoren im Modellorganismus ausgegangen werden.

Mit extrazellulär erhöhten K<sup>+</sup>-Ionen-Konzentrationen werden Depolarisationen und somit Kontraktionen an der Extensormuskelfaser ausgelöst und unter Verwendung spezifischer Hemmstoffe und Aktivatoren die Wirkungsmechanismen der drei Neuromodulatoren untersucht.

Dabei sollen mit typspezifischen Hemmstoffen für unterschiedliche G-Proteingekoppelte Rezeptoren die potenziellen Rezeptoren für Proctolin, DF<sub>2</sub> und Allatostatin näher charakterisiert werden. Mit Inhibitoren der Proteinkinasen A beziehungsweise C und mit einem Aktivator der Proteinkinase C wird der Frage nachgegangen, ob und wie die Neuromodulatoren Proctolin und DF<sub>2</sub> diese Kinasen beeinflussen.

Des Weiteren wird die Wirkung des Neuromodulators Allatostatin auf die Guanylatzyklase untersucht, indem das Enzym mit einem spezifischen Inhibitor blockiert wird und die Folgen für die Allatostatin-Wirkung auf die Muskelkontraktion beobachtet werden.

Neben der Untersuchung des Einflusses der Neuromodulatoren auf intrazelluläre Proteine unterschiedlicher Signalkaskaden soll auch die Beteiligung der

postsynaptischen  $K_{Ca}$ - und L-Typ  $Ca^{2+}$ -Membrankanäle an der  $K^+$ -induzierten Kontraktion weiter aufgeklärt werden.

## 2. MATERIAL UND METHODEN

---

### 2.1. Material

#### 2.1.1. Versuchstier

Als Versuchstiere dienten in allen Experimenten adulte Männchen der marinen Isopoden *Idotea emarginata* (Crustacea, Isopoda) mit Körperlängen zwischen 10 und 40 mm. Die Meeresasseln stammten ursprünglich von der Biologischen Anstalt Helgoland des Alfred-Wegener-Instituts (Bremerhaven) und wurden in der Tierforschungsanstalt der Universität Konstanz unter konstanten Bedingungen in Aquarien bei 16°C Wassertemperatur gehalten und auch gezüchtet.

Um die Versuchsergebnisse nicht durch hormonelle Phänomene zusätzlich zu beeinflussen, wurden für die Experimente nur Tiere ausgewählt, die sich erkennbar nicht in einem Häutungsstadium befanden.



**Abbildung 1:** Meeresassel *Idotea emarginata* (Foto: Dr. Berit Philipp)

**2.1.2. Chemikalien**

<b>Substanz</b>	<b>Hersteller</b>
Allatostatin (Dip-AST 7)	Sigma Aldrich
BIM-1 (Bisindolylmaleimid 1)	Calbiochem
8-Br-cGMP (8-Bromoguanosin 3',5'-zyklisches Monophosphat)	Calbiochem
CaCl <sub>2</sub> (2 x H <sub>2</sub> O)	Riedl-de Haën GmbH
D <sup>+</sup> -Glucose	Merck
DF <sub>2</sub>	Bachem AG
GP Antagonist-2A	Calbiochem
H89	Calbiochem
HEPES	MP Biomedicals
Iberitoxin	Sigma Aldrich
KCl	Acros Organics
MgCl <sub>2</sub> (6 x H <sub>2</sub> O)	Acros Organics
NaCl	Roth
NaOH	Riedl-de Haën GmbH
NF449	Calbiochem
Nifedipin	Calbiochem
ODQ	Calbiochem
Pertussis Toxin	Calbiochem
PMA (Phorbol-12-Myristate-13-Acetate)	Calbiochem
Proctolin	Sigma Aldrich

### 2.1.3. Lösungen

Für die Herstellung der folgenden Lösungen wurde destilliertes Wasser verwendet. Die Einstellung des pH-Wertes erfolgte mit 1 N NaOH.

#### 2.1.3.1 ASW (artificial sea water)

NaCl	490 mM
KCl	8 mM
CaCl <sub>2</sub>	10 mM
MgCl <sub>2</sub>	48 mM
HEPES	20 mM
D <sup>+</sup> -Glucose	30 mM
	pH 7,4

#### 2.1.3.2 30 mM KCl in ASW

NaCl	468 mM
KCl	30 mM
CaCl <sub>2</sub>	10 mM
MgCl <sub>2</sub>	48 mM
HEPES	20 mM
D <sup>+</sup> -Glucose	30 mM
	pH 7,4

### 2.1.4. Neuromodulatoren und Pharmaka

Von folgenden Substanzen wurden konzentrierte Stammlösungen hergestellt, diese aliquotiert und unmittelbar vor dem Experiment bis zur zu verwendenden Endkonzentration in ASW verdünnt. Die verwendeten Endkonzentrationen richteten sich zur Sicherstellung der Vergleichbarkeit der Ergebnisse in ihren Größenordnungen nach Literaturwerten (Literaturzitate sind im Ergebnisteil jeweils angegeben). Erst wenn der entsprechende Inhibitor oder Aktivator in der verwendeten Konzentration und bei isolierter Anwendung keinen Effekt auf die K<sup>+</sup>-induzierte Kontraktur zeigte, wurden auch andere Konzentrationen der jeweiligen Substanz getestet (siehe 3.2.4.).

Pharmakon	Lösungsmittel	Konzentration der Stammlösung	Lagerung
8-Bromo-cGMP	H <sub>2</sub> O tridest.	10 <sup>-2</sup> M	-20°C
Allatostatin	H <sub>2</sub> O tridest.	10 <sup>-3</sup> M	-20°C
BIM-1	H <sub>2</sub> O tridest.	10 <sup>-3</sup> M	+4°C

Pharmakon	Lösungsmittel	Konzentration der Stammlösung	Lagerung
DF <sub>2</sub>	H <sub>2</sub> O tridest.	10 <sup>-3</sup> M	-20°C
GP Ant-2A	H <sub>2</sub> O tridest.	10 <sup>-3</sup> M	-20°C
H89	DMSO	10 <sup>-3</sup> M	+4°C
IbTx	H <sub>2</sub> O tridest.	10 <sup>-5</sup> M	-20°C
NF449	H <sub>2</sub> O tridest.	10 <sup>-2</sup> M	-20°C
Nifedipin	DMSO	10 <sup>-1</sup> M	-20°C
ODQ	DMSO	10 <sup>-2</sup> M	-20°C
PerTx	H <sub>2</sub> O tridest.	0,1 µg/µl	+4°C
PMA	DMSO	10 <sup>-3</sup> M	-20°C
Proctolin	H <sub>2</sub> O tridest.	10 <sup>-3</sup> M	-20°C

Die Endkonzentration des Lösungsmittels DMSO lag in den physiologischen Lösungen zwischen 0,05 und 0,2 % (v/v). Bis zu einer Endkonzentration 0,2% (v/v) wurde gezeigt, dass DMSO keinen Einfluss auf die Amplitude der K<sup>+</sup>-induzierten Kontraktur hat (Weiss *et al.*, 2001).

### 2.1.5. Geräte

Analysenwaage	Mettler A163
KG3 Kraftaufnehmer	Scientific Instruments GÜth
Meßbad	Werkstätten der Universität Konstanz
Präzisionswaage	Mettler P1200
Schnittstelle DigiData 1200 Und 1320 A	Axon Instruments, Inc.
Verstärker AxoClamp 2B	Axon Instruments, Inc.
Vorverstärkerkopf HS-2Ax10MGU	Axon Instruments, Inc.
Vorverstärkerkopf HS-2Ax1LU	Axon Instruments, Inc.



**2.1.6. Materialien**

---

Elektrodinglas (GC150F-15)	Clark Electromedical Instruments
Elektrodraht	Axon Instruments, Inc.
Elektrodenhalter	Axon Instruments, Inc.
Sylgard	Dow Corning GmbH

**2.1.7. Software**

Excel 2000	Microsoft Corporation
Illustrator 9.0	Adobe Systems Incorporated
Origin 6.0	Microcal Software, Inc.
pClamp 8.0	Axon Instruments, Inc.
Photoshop 7.0	Adobe Systems Incorporated
Reference Manager 10.0	ISI Research Soft.
Word 2000	Microsoft Corporation

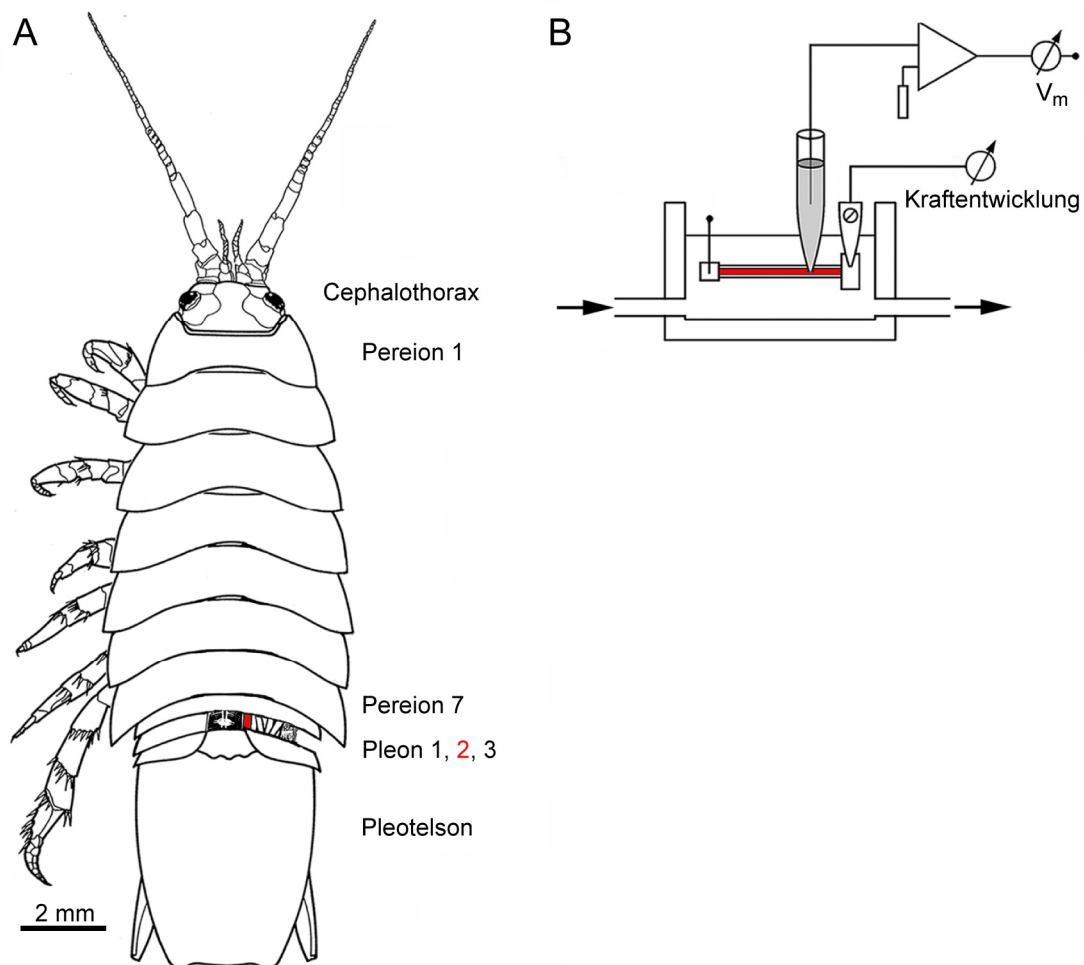
---

## 2.2. Methoden

### 2.2.1. Kontraktionsmessung und Intrazelluläre Muskelableitung

#### 2.2.1.1 Präparation

Für alle elektrophysiologischen Versuche wurde die identifizierbare Extensormuskelfaser 2 des Pleonsegments 2 verwendet (siehe Abbildung 2A; für anatomische Details siehe Kreissl *et al.*, 1999).



**Abbildung 2:** Versuchsaufbau der Kontraktionsmessungen (modifiziert, nach Weiss *et al.*, 2001) **A** Es wurde die Faser 2 des 2. Pleonsegmentes verwendet (Ansicht einer *Idotea* von dorsal) **B** Schematische Darstellung des Perfusionsbads und der verwendeten Messinstrumente.

Die Tiere wurden vor der Präparation 5 Minuten in eisgekühltem ASW sediert. In einer mit gekühltem ASW gefüllten Präparationsschale wurden die Tiere mit der

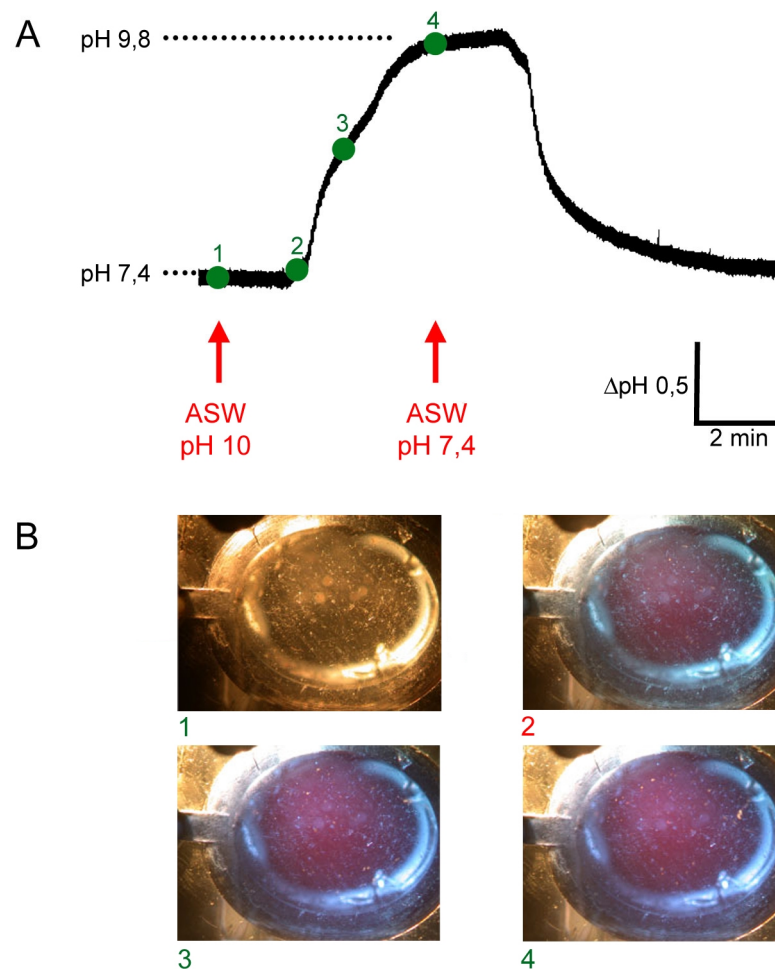
ventralen Seite nach oben fixiert. Nun wurde die Bauchdecke geöffnet, Flexormuskelfasern, Verdauungstrakt und Herz entfernt und so die Extensormuskulatur freigelegt. Durch das Entnehmen der langen Muskelfasern 5 und 6, die jeweils zwei Segmente überspannen, wurde der Zugang zu Muskelfaser 2 eröffnet. Zu diesem Zeitpunkt enthielt das Präparat noch die kurzen Fasern 1-4, von denen die Fasern 3 und 4 durchtrennt wurden. Die Muskelfasern 1 und 2 sind eng benachbart. Auf die Entfernung oder Durchtrennung der Muskelfaser 1 wurde verzichtet, um jede mögliche Schädigung der Muskelfaser 2 auszuschließen. Da die Muskelfaser 1 nur einen geringen Querschnitt aufweist, wurde die zusätzliche Kraftentwicklung in den Experimenten vernachlässigt. Mit Hilfe eines dünnen Skalpells wurde das Präparat in der Mitte längs geteilt. Nun wurde die Intersegmentalmembran zwischen dem 7. Pereionsegment und dem 1. Pleonsegment durchtrennt.

Das Versuchspräparat wurde in ein kleines Perfusionsbad (1,5 ml Kammervolumen) transferiert und auf Sylgard (Dow Corning) mit einer feinen Nadel am 1. Pleonsegment fixiert. Das posteriore Ende des Präparates wurde an einer kleinen Metallnadel befestigt. Diese Metallnadel war mit einem Kraftaufnehmer verbunden, der eine Aufzeichnung der Muskelkraft ermöglichte (Schema: siehe Abbildung 2). Schließlich wurde die Präparation auf die (zuvor an der intakten *Idotea* gemessene) *in situ*-Länge gespannt. Die durch diese Muskeldehnung hervorgerufene und am Kraftaufnehmer messbare Krafteinwirkung (Ruhekraft) wurde als „Nulllinie“ des jeweiligen Präparates definiert und die Rückkehr der gemessenen Krafteinwirkung auf diesen Wert als vollständige Relaxation definiert. Das Bad wurde kontinuierlich mit gekühltem ASW (18°C), oder den gegebenenfalls zu applizierenden Pharmakalösungen, mit einer Flussrate von 2 ml/min perfundiert.

### 2.2.1.2 Kontraktionsmessung

Anhaltende tonische Kontraktionen wurden durch extrazellulär erhöhte Kaliumkonzentrationen (30 mM) induziert. Die Muskelkraft wurde isometrisch mit einem Kraftaufnehmer gemessen. Die Messdaten wurden über eine „DigiData“-Schnittstelle an einen IBM-kompatiblen Computer und „pClamp“ Datengewinnungs-Software übertragen, digitalisiert und mit einer zeitlichen Auflösung von 10 kHz vom Computer automatisch protokolliert.

Durch die Perfusion mit 30 mM Kalium in ASW wurde die Faser depolarisiert und auf diese Weise eine Kontraktion ausgelöst, die für die Dauer der extrazellulären Kalium-Perfusion anhielt. Die Konzentration der neuen Lösung im Bad erreichte jeweils nach ca. 5 Minuten ca. 90 % des Endwertes. Danach nähert sich die Konzentration im Bad nur sehr langsam an den Maximalwert an. Der Verlauf des Konzentrationsaustausches wurde zum einen mit Hilfe von zwei Salzlösungen mit verschiedenen pH-Werten (7,4 und 10) mit einer pH-Elektrode zeitlich verfolgt und protokolliert (siehe Abbildung 3A). Zum anderen wurde die räumliche Verteilung der Austauschlösung im Bad durch die Superfusion wurde mit blauem Farbstoff (Bromphenolblau) verfolgt (Abbildung 3B), um zu überprüfen, ob die Ausbreitung ohne Verwirbelungen erfolgte.



**Abbildung 3:** Zeitlicher Ablauf und Konzentrationsverteilung der Superfusion im Bad. **A** Veränderung des pH-Wertes über die Zeit. Nach dem Wechsel der ASW-Lösung von pH 7,4 auf pH 10. **B** Ausbreitung einer Bromphenolblau-Lösung im Bad.

Für die Messungen wurden zunächst je drei Kontrollkontraktionen mit 30 mM  $\text{K}^+$  (Applikation für 5 Minuten) ausgelöst. Nach jeder Kontraktur wurde zur Relaxation der Muskelfaser 15 Minuten mit ASW gewaschen. Danach wurde eine Kontraktur in Anwesenheit des Neuromodulators und/oder der jeweiligen Pharmaka durch 5-minütige Badfusion bei gleichzeitiger Applikation von  $\text{K}^+$  und Wirkstoff induziert und diese Kontraktion aufgezeichnet. Um anschließend das Auswaschen der Wirkstoffe zu gewährleisten, wurden die Kammer und das Präparat für 30 Minuten mit ASW gespült. Um die physiologische Integrität der untersuchten Muskelfaser und die Reversibilität der Wirkstoffeinflüsse beurteilen zu können, wurden abschließend

zwei Kontrollkontraktionen, also ohne Neuromodulator und/oder Pharmakon, induziert.

Bei der dargestellten Methode handelt es sich um Langzeitversuche, die mehrere Stunden (ca. 2,5 Stunden) andauern. Aufgrund des komplexen Versuchsaufbaus und der Morphologie der Muskelfasern kann es zu Verletzungen der Membran im Laufe des Versuches kommen. Dies kann am Verlust des physiologischen Membranpotenzials festgestellt werden, das während der Experimente permanent überwacht wurde. Experimente, in deren Verlauf die untersuchte Muskelfaser offensichtliche Läsionen erlitt, flossen nicht in die Versuchsauswertung ein. Soweit nicht anders beschrieben, wurde das Maximum der Kraftamplituden der Kontraktionen und des Membranpotenzials ausgewertet, der zeitliche Verlauf der Kontraktionen wurde nicht berücksichtigt.

#### *2.2.1.3 Intrazelluläre Ableitung*

Parallel zur Kontraktionsmessung wurde bei jedem Präparat das Membranpotenzial gemessen und protokolliert. Für diese Messungen wurde ein „AxoClamp“-Verstärker verwendet. Der Verstärker war über eine „DigiData“-Schnittstelle mit einem Computer und „pClamp“-Software verbunden, die die Messdaten des Verstärkers automatisch protokollierten. Zur Spannungsmessung verwendete intrazelluläre Elektroden herkömmlicher Bauart wurden mit 3 M KCl gefüllt und hatten einen Gleichstromwiderstand zwischen 4 und 6 M $\Omega$ .

Die Stromklemm-Messungen wurden mit konstanten intrazellulären Strominjektionen von 100 ms Dauer durchgeführt. Die Glasmikroelektroden für die Strominjektion wurden, ebenso wie die Spannungsmesselektroden, mit 3 M KCl gefüllt und hatten einen Gleichstromwiderstand zwischen 2 und 4,5 M $\Omega$ .

Auch für die Auswertung der intrazellulären Ableitungen wurden jeweils die Maximalwerte der resultierenden Depolarisationen verwendet.

### **2.2.2. Statistik**

Für die statistische Auswertung der Daten wurde der Student's T-Test von heteroskedastischem (zwei Stichproben mit ungleicher Varianz) Typ verwendet (Excel). Die Signifikanzbewertung erfolgte mit einem Signifikanzniveau von 5% ( $p < 0,05$ ). Sämtliche Fehlerbalken in den Abbildungen geben die Standardabweichung (SD) an, der Stern markiert einen signifikanten Unterschied des Messwertes im Vergleich mit den Ergebnissen unter Kontrollbedingungen.

---

### 3. ERGEBNISSE

---

#### 3.1. Die K<sup>+</sup>-induzierte Muskelkontraktur

Die Extensormuskelfasern von *Idotea* haben in ASW ein durchschnittliches Ruhemembranpotenzial von  $-70,1 \pm 8,7$  mV ( $N=49$ ). Die 5-minütige Applikation von 30 mM K<sup>+</sup> in ASW depolarisiert die Muskelfaser um  $24,98 \pm 1,55$  mV ( $N=8$ ). Dadurch werden graduierte Kontrakturen mit einer Maximalamplitude von  $142,35 \pm 48,49$   $\mu$ N ( $N=8$ ) ausgelöst, die bei einem Membranpotenzial von  $63,9 \pm 9,9$  mV ( $N=42$ ) beginnen und so lange andauern, wie die extrazelluläre K<sup>+</sup>-Konzentration erhöht ist. Vor der Auslösung einer weiteren Kontraktur, relaxierte die Muskelfaser während einer 15-minütigen Waschphase vollständig.

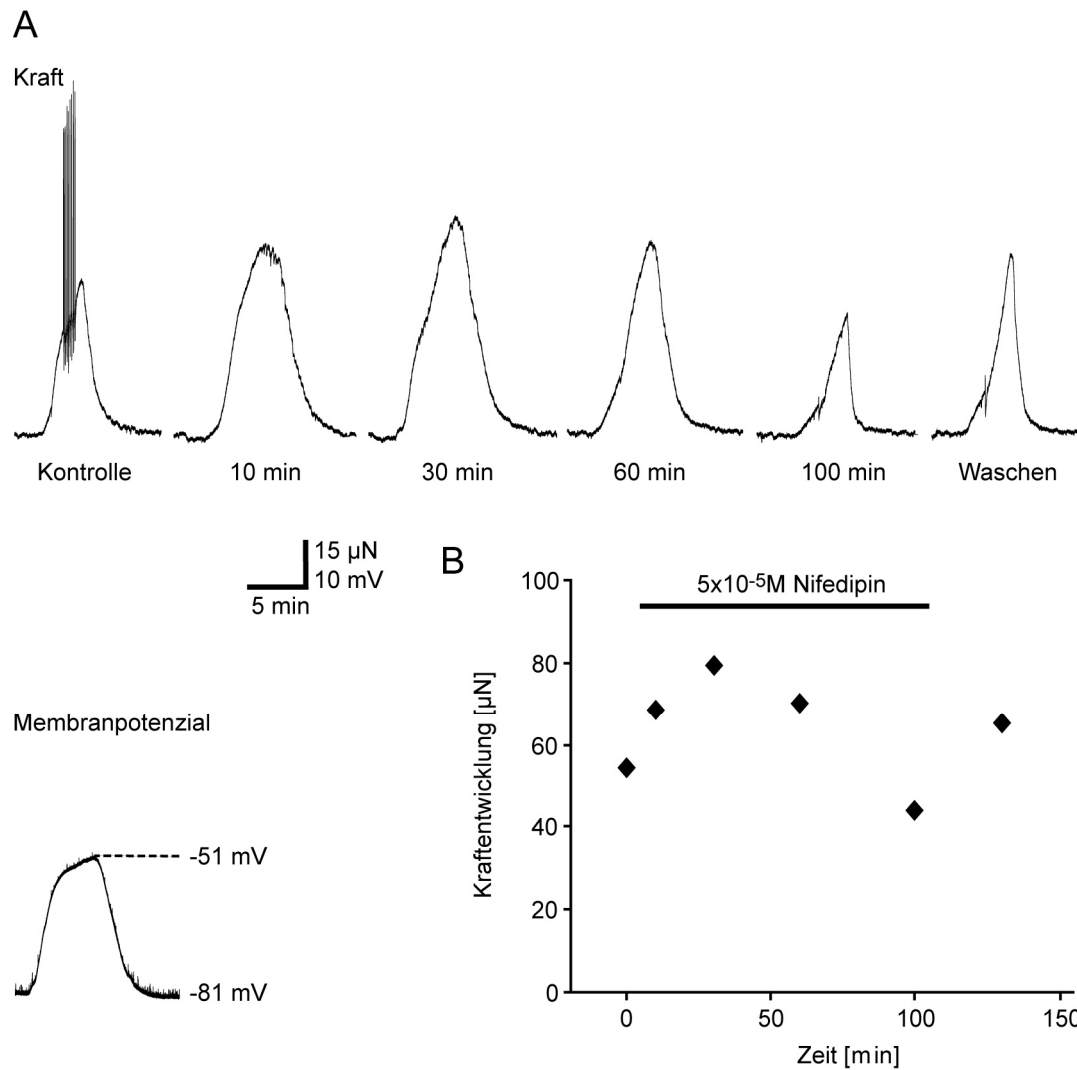
#### *Der L-Typ Ca<sup>2+</sup>-Kanal ist an der K<sup>+</sup>-induzierten Muskelkontraktur beteiligt*

In vorangegangenen Kontraktionsmessungen an Strom-geklemmten Fasern wurde in *Idotea* eine muskelkontraktionsverstärkende Wirkung von Proctolin beobachtet (Erxleben *et al.*, 1995). Einer der postsynaptischen Mechanismen der Proctolin-Wirkung ist die Erhöhung der Öffnungswahrscheinlichkeit von L-Typ Ca<sup>2+</sup>-Kanälen. In der *Idotea*-Muskelfaser werden diese L-Typ Ca<sup>2+</sup>-Kanäle durch eine strominduzierte Depolarisation über  $-40$  mV aktiviert (Rathmayer *et al.*, 2002b; Weiss *et al.*, 2001).

Zur Klärung der Frage, ob dieser L-Typ Ca<sup>2+</sup>-Kanal auch während der K<sup>+</sup>-induzierten Kontrakturen eine Leitfähigkeit aufweist, wurde der spezifische L-Typ Ca<sup>2+</sup>-Kanal-Blocker Nifedipin (Erxleben und Rathmayer, 1997; Monterrubio *et al.*, 2000) appliziert. Die Applikation von  $5 \times 10^{-5}$  M Nifedipin bewirkt nach Einwirkzeiten zwischen 10 und 60 min zunächst eine Verstärkung der Kontraktur. Nach 100 min Einwirkung von Nifedipin wird die K<sup>+</sup>-induzierte Kontraktur reduziert (Abbildung 4A). Dieser Effekt war in drei weiteren Experimenten mit 10- und 100-minütiger Einwirkzeit von Nifedipin qualitativ reproduzierbar (Daten nicht gezeigt). Nach 30-minütiger Perfusion mit ASW ohne Nifedipin relaxiert der Muskel vollständig, und die Kontraktionskraft erreicht durch K<sup>+</sup>-Induktion wieder den Wert der Kontrollmessung vor Beginn der Nifedipin-Applikation. Die maximale Depolarisation



in jeder einzelnen Kontraktur liegt bei dem in Abbildung 4 gezeigten Experiment bei -51 mV.



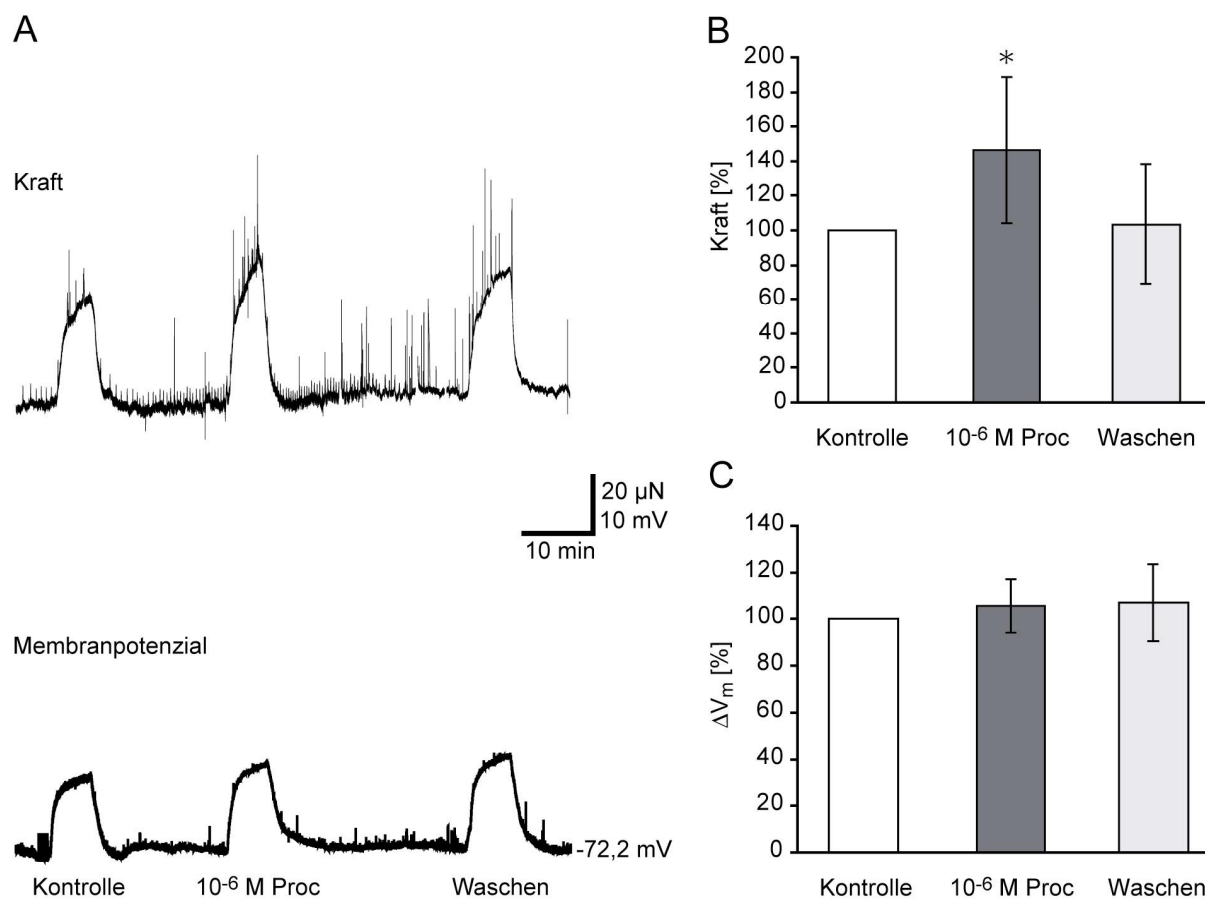
**Abbildung 4:** Der L-Typ  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanal Blocker Nifedipin bewirkt zunächst eine Verstärkung, nach 100 min Einwirkung eine Reduzierung der  $\text{K}^+$ -induzierten Kontraktur der Extensormuskeln. **A**  $\text{K}^+$ -induzierte Kontraktur: Kontrollkontraktur, unterschiedliche Einwirkzeiten (10, 30, 60 und 100 min) für Nifedipin und eine Kontrolle nach 30 min waschen mit ASW. **B** Beispiel für den gleich bleibenden Verlauf der  $\text{K}^+$ -induzierten Depolarisation in dem gezeigten Einzelexperiment. **C** Zeitlicher Verlauf der Nifedipin-Wirkung auf die  $\text{K}^+$ -induzierte Kontraktur

## 3.2. Proctolin-Wirkung auf die Extensormuskulatur von *Idotea emarginata*

### 3.2.1. Proctolin verstärkt die K<sup>+</sup>-induzierte Muskelkontraktur

In *Procambarus clarkii* können K<sup>+</sup>-induzierte Kontrakturen der Extensormuskulatur durch 10<sup>-8</sup> M Proctolin verstärkt werden (Bishop *et al.*, 1987). In dieser Arbeit wird gezeigt, dass Proctolin ebenso die K<sup>+</sup>-Kontraktur in *Idotea* verstärken kann, wobei die K<sup>+</sup>-induzierte Depolarisation nicht von Proctolin verändert wird (Abbildung 5A). Werden die Fasern danach für 30 min in ASW relaxiert, kann erneut eine K<sup>+</sup>-induzierte Kontraktur ausgelöst werden, deren Kraftamplitude wieder auf den Level der Kontraktur vor der Proctolin-Applikation zurückgeht (Abbildung 5A).

Im Durchschnitt werden die Amplituden der K<sup>+</sup>-induzierten Kontrakturen durch Proctolin (10<sup>-6</sup> M; Philipp *et al.*, i.V.) signifikant um 47% (SD±42,2%, N=8, p<0,05) verstärkt (Abbildung 5B). Die Applikation von Proctolin ohne die Erhöhung der extrazellulären K<sup>+</sup>-Konzentration hat bei den untersuchten Fasern weder Einfluss auf das Ruhemembranpotenzial (-64 bis -88 mV), noch auf die Ruhekraft (Daten nicht gezeigt). Die Depolarisation der Membran durch 30 mM K<sup>+</sup> wird durch Proctolin nicht signifikant geändert (105,6%, SD±11,4 %, N=8, p = 0,24; Abbildung 5C).



**Abbildung 5:** Proctolin (Proc) verstärkt die K<sup>+</sup>-induzierte Kontraktur isolierter Extensormuskelfasern von *Idotea*: **A** Originalaufzeichnung eines Einzelexperimentes mit gleichzeitiger Aufzeichnung von Kontraktur und Depolarisation: unter Kontrollbedingungen, in der Anwesenheit von Proctolin und nach dem Auswaschen für 30 min. Die Kontrolle repräsentiert eine von drei Kontrakturen vor der Peptid-Applikation. **B** Zusammenfassung der Kraftentwicklung von 8 normalisierten unabhängigen Einzelergebnissen; **C** Zusammenfassung der Depolarisation ( $\Delta V_m$ ) von 8 normalisierten unabhängigen Einzelergebnissen.

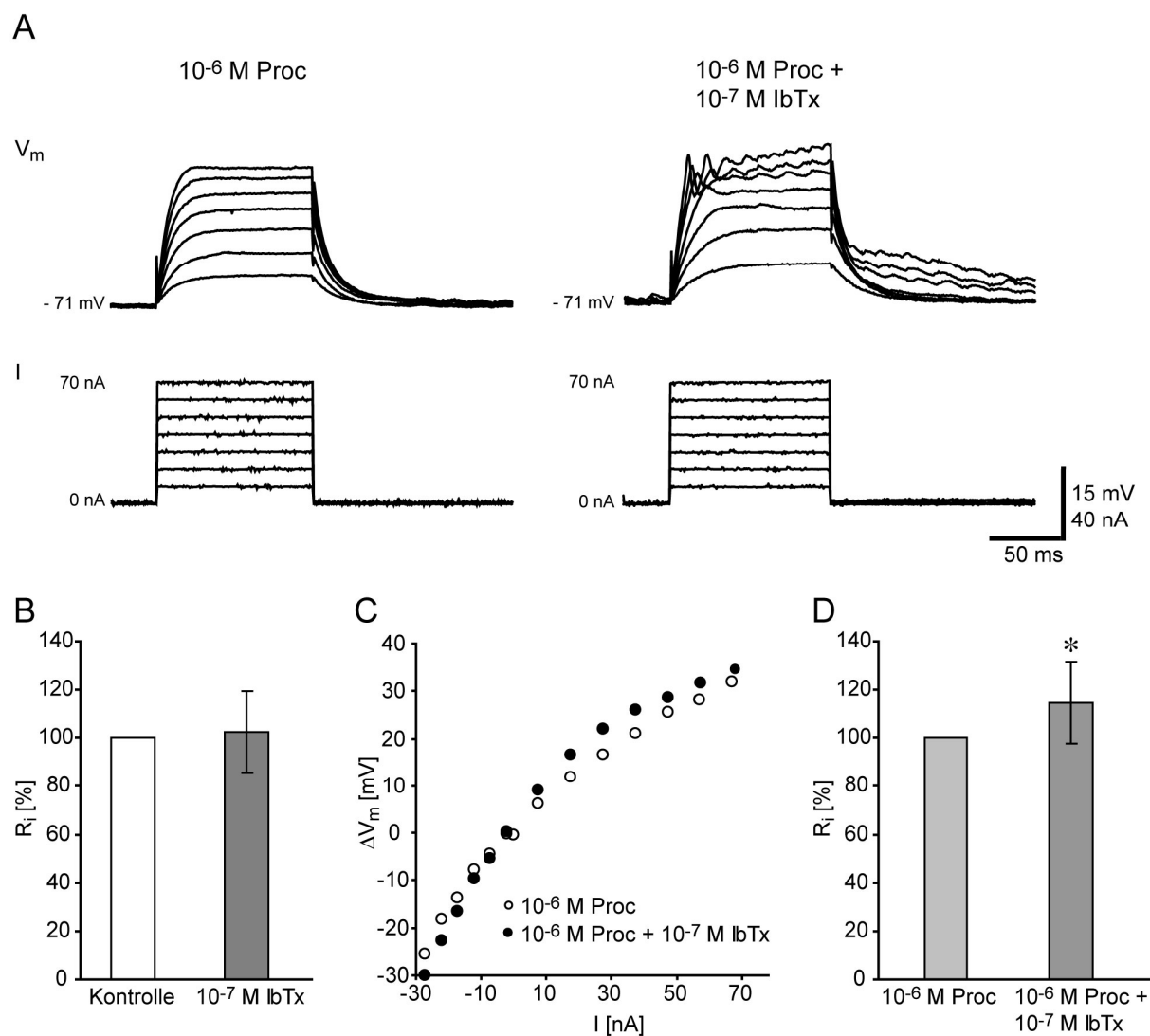
Ebenso ist die Kraftentwicklung einer 30 min nach Beendigung der Proctolin-Applikation erneut ausgelösten Kontraktur gegenüber den zu Beginn des Experiments aufgenommenen Kontrollkontrakturen nicht signifikant verändert (104%, SD +/- 34,5%, N=8, p = 0,796; Abbildung 5B).

### 3.2.2. Proctolin rekrutiert Iberiotoxin-sensitive Kanäle

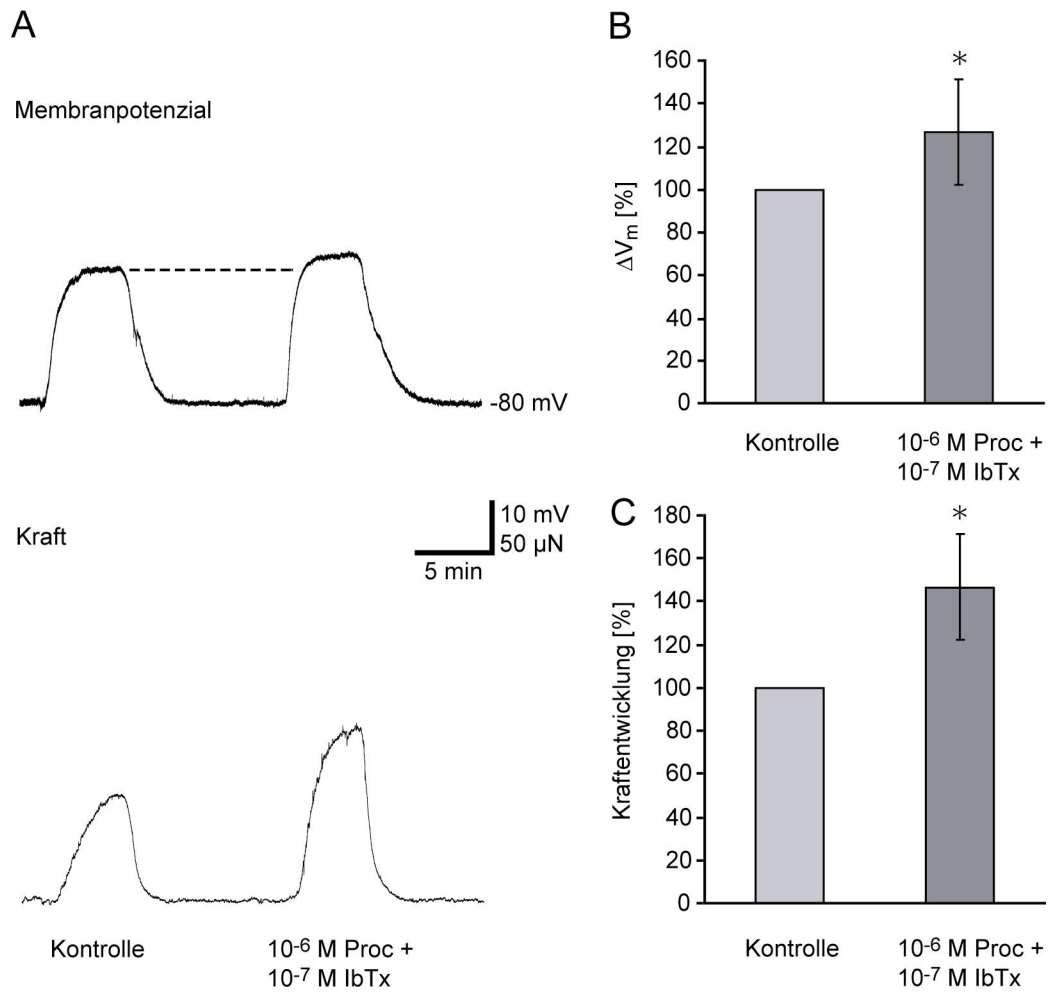
Die Amplitude der Depolarisation wird durch Proctolin in der Extensormuskelfaser von *Idotea* nicht verändert, obwohl durch den verstärkten  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom durch die L-Typ  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanäle (Erxleben und deSantis, 1998) und das Schließen von spannungsunabhängigen  $\text{K}^+$ -Kanälen (Erxleben *et al.*, 1995), eine verstärkte Depolarisation der Muskelfasermembran nach der Einwirkung von Proctolin messbar sein sollte.

Die hier gezeigten experimentellen Daten legen nahe, dass Proctolin Iberiotoxin-sensitive ( $\text{Ca}^{2+}$ -abhängige)  $\text{K}^+$ -Kanäle rekrutiert. Die erfolgende Öffnung dieser Kanäle durch die intrazellulär ansteigende  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration könnte so im Verlauf einer Kontraktur einer stärkeren Depolarisation der Zellmembran entgegenwirken. Das Blockieren  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängiger  $\text{K}^+$ -Kanäle ( $\text{K}_{\text{Ca}}$ ) mit Iberiotoxin (Garcia *et al.*, 1991;  $10^{-7}$  M) zeigt ohne gleichzeitige Applikation von Proctolin ( $10^{-6}$  M) keine signifikante Veränderung des mit der Stromklemme ermittelten Membranwiderstandes (102,4 %,  $\text{SD}\pm 16,9$  %,  $N=10$ ,  $p=0,684$ ; Abbildung 6B). Wird aber Proctolin gemeinsam mit Iberiotoxin appliziert, wird nach Injektion eines gleich großen Stromes mit der Stromklemme ein erhöhtes Depolarisationspotenzial gemessen (Abbildung 6A). Die Berechnung des Membranwiderstandes im linearen Bereich zeigt eine Erhöhung um 14,5 % ( $\text{SD}\pm 16,8$  %,  $N=10$ ,  $p=0,023$ ; Abbildung 6C,D).

Werden die Iberiotoxin-sensitiven  $\text{K}^+$ -Kanäle mit Iberiotoxin ( $10^{-7}$  M) blockiert und die Wirkung von Proctolin ( $10^{-6}$  M) auf die  $\text{K}^+$ -induzierte Kontraktur gemessen, so verstärkt sich neben der Amplitude der Kontraktur (146,6 %,  $N=4$ ,  $p=0,016$ ; Abbildung 7C) auch die  $\text{K}^+$ -induzierte Depolarisation um 27 % ( $\text{SD}\pm 24,5$  %,  $N=7$ ,  $p=0,018$ ; Abbildung 7A und B).



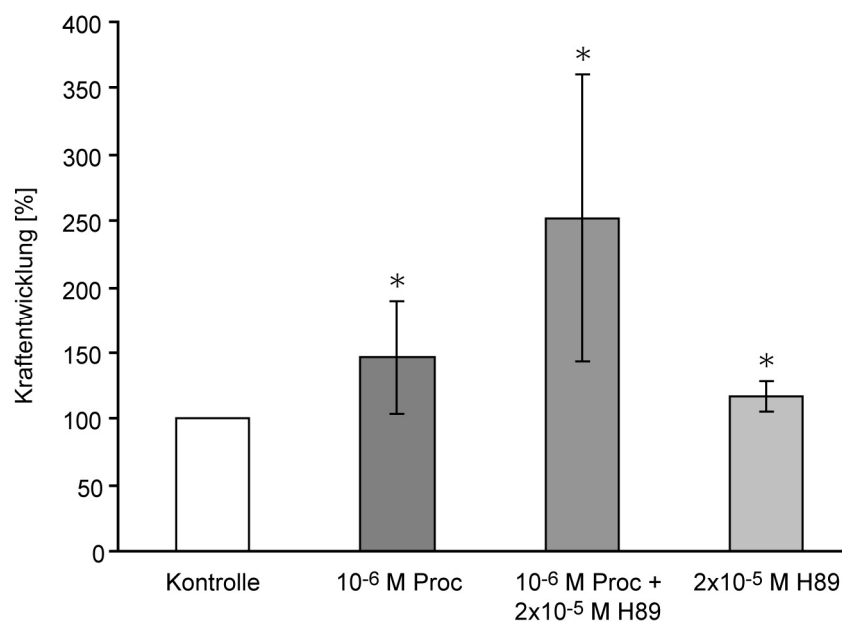
**Abbildung 6:** Iberiotoxin (IbTx) erhöht nach der Einwirkung von Proctolin (Proc) den Membranwiderstand ( $R_i$ ) der Muskelfaser von *Idotea*. **A** beispielhaftes Einzelexperiment mit Strominjektion ( $I$ ) und Spannungsantwort ( $\Delta V_m$ ) in Anwesenheit von Proctolin, vor und unter der Einwirkung von Iberiotoxin. **B** Zusammenfassung des Membranwiderstandes ( $R_i$ ) von 10 normalisierten unabhängigen Einzelergebnissen ohne Proctolin, vor und unter der Einwirkung von Iberiotoxin. **C** Strom-Spannungs-Kurve mit Proctolin vor (○) und unter (●) der Einwirkung von Iberiotoxin. **D** Zusammenfassung des Membranwiderstandes ( $R_i$ ) von 10 normalisierten unabhängigen Einzelergebnissen mit Proctolin vor und unter der Einwirkung von Iberiotoxin.



**Abbildung 7:** Proctolin (Proc) verstärkt gleichzeitig die  $K^+$ -induzierte Depolarisation ( $\Delta V_m$ ) und die Kontraktur (Kraftentwicklung) isolierter Muskelfasern nach der Einwirkung des  $K_{Ca}$ -Kanal-Blockers Iberiotoxin (IbTx). **A** Originalaufzeichnung eines Einzelexperimentes; Kontraktur und Depolarisation gleichzeitig aufgezeichnet: unter Kontrollbedingungen und in der Anwesenheit von Iberiotoxin und Proctolin; **B** Zusammenfassung der Depolarisation ( $\Delta V_m$ ) der 7 normalisierten unabhängigen Einzelexperimente. **C** Zusammenfassung der Kraftentwicklung der 4 normalisierten unabhängigen Einzelexperimente.

### 3.2.3. Die Potenzierung der $K^+$ -induzierten Muskelkontraktur durch Proctolin kann durch den spezifischen PKA-Inhibitor H89 nicht verhindert werden

H89 ist ein spezifischer Hemmstoff der PKA (Leemhuis *et al.*, 2002) Sollte die kontraktionsverstärkende Wirkung von Proctolin über die Aktivierung der PKA vermittelt werden, sollte eine Proctolin-Applikation bei gleichzeitig inhibierter PKA die Amplitude der Kontraktur nicht verstärken.



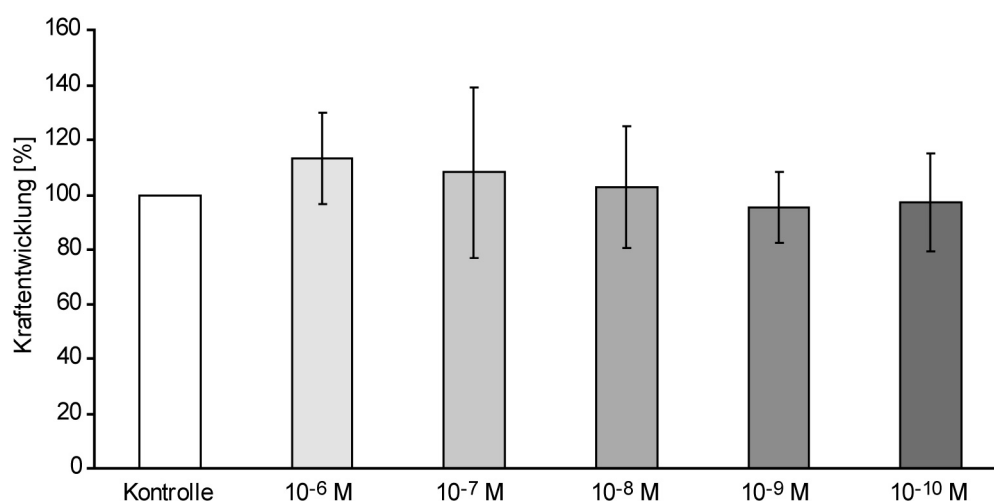
**Abbildung 8:** Der spezifische PKA-Hemmstoff H89 bewirkt eine Verstärkung des Proctolin (Proc)-Effektes auf den Extensormuskel von *Idotea* und H89 alleine verstärkt die  $K^+$ -induzierte Kontraktur: Zusammenfassung der normalisierten, unabhängigen Einzelexperimente unter Kontrollbedingungen, mit der Einwirkung von Proctolin ( $N=8$ ), mit der Einwirkung von Proctolin in Anwesenheit von H89 ( $N=4$ ) und mit H89 alleine ( $N=6$ ).

Die Hemmung der PKA in Anwesenheit von Proctolin bewirkt eine Verstärkung des Proctolin-Effektes auf die  $K^+$ -induzierte Kontraktur. Die Werte zeigen, dass H89 (Chijiwa *et al.*, 1990; Leemhuis *et al.*, 2002;  $5 \times 10^{-5}$  M) den kontrakturverstärkenden Effekt von Proctolin signifikant von 47% auf 152% erhöht ( $SD \pm 109$  %,  $N=4$ ,  $p=0,047$ ). Der PKA-Inhibitor H89 allein verstärkt die Kontraktur um 16,5 % ( $SD \pm 11,4$  %,  $N=6$ ,  $p=0,011$ ).

### 3.2.4. Die Potenzierung der $K^+$ -induzierten Kontraktur wird durch die PKC vermittelt

In *Idotea* wurde gezeigt, dass Proctolin-Applikation – unabhängig von der Aktivität des Muskels – die intrazelluläre cGMP-Konzentration der Extensormuskelfaser absenkt. Die Absenkung der cGMP-Konzentration ist abhängig von einer Aktivierung der PKC (Philipp *et al.*, i.V.). Folglich sollte eine Hemmung der PKC durch den spezifischen membrangängigen Hemmstoff BIM-1 (Philipp *et al.*, i.V.; Toullec *et al.*, 1991) dem kontrakturverstärkenden Effekt von Proctolin entgegenwirken.

Die Muskelfasern wurden für 10 min mit  $10^{-8}$  M BIM-1 (Philipp *et al.*, i.V.) des inkubiert und anschließend unter dauernder Einwirkung dieses Hemmstoffs eine  $K^+$ -Kontraktur induziert. BIM-1 veränderte in dieser Konzentration die  $K^+$ -induzierte Kontraktur nicht, daher wurde die Applikation des Hemmstoffs mit anderen Konzentrationen ( $10^{-6}$  bis  $10^{-10}$  M) wiederholt (Tabelle 1 und Abbildung 9). Die Hemmung der PKC mit dem spezifischen PKC-Hemmstoff BIM-1 wirkt sich mit allen getesteten Hemmstoffkonzentrationen nicht auf die  $K^+$ -induzierte Kontraktur aus. Die Kraftentwicklung verändert sich nicht signifikant, wenn BIM-1-Konzentrationen zwischen  $10^{-10}$  M und  $10^{-6}$  M appliziert werden. Auch die  $K^+$ -induzierte Depolarisation wird durch den PKC-Hemmstoff BIM-1 nicht signifikant verändert.



**Abbildung 9:** Die Applikation des PKC-Hemmstoffes BIM-1 beeinflusst die  $K^+$ -induzierte Kontraktur nicht. Zusammenfassung von jeweils vier normalisierten unabhängigen Einzelkontrakturen mit den BIM-1-Konzentrationen  $10^{-6}$  M,  $10^{-7}$  M,  $10^{-8}$  M,  $10^{-9}$  M und  $10^{-10}$  M.

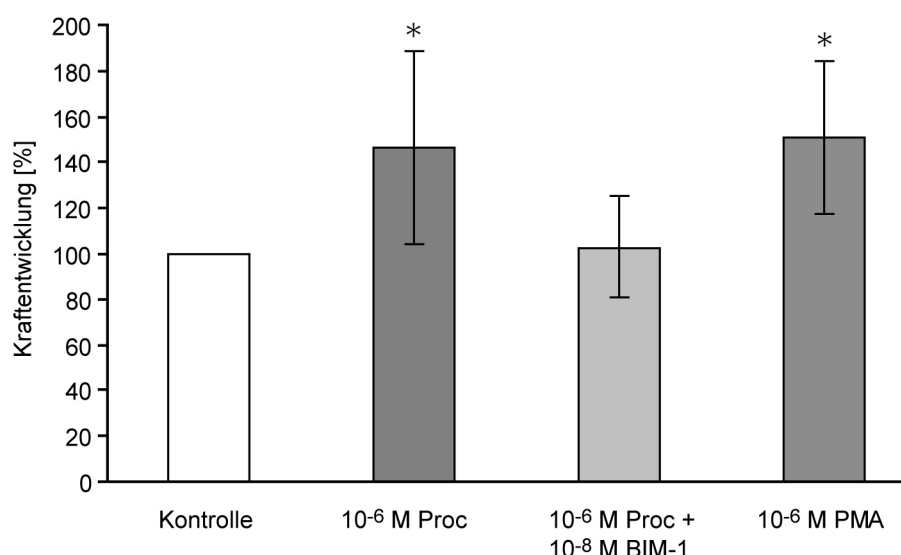


[BIM-1]	Amplitude der Depolarisation [%]	Students t-Test (p)	Amplitude der Kontraktur [%]	Students t-Test (p)
$10^{-6}$ M	108,3±3,6	0,192	113,1±16,7	0,214
$10^{-7}$ M	121,4±16,9	0,116	108,0±31,3	0,687
$10^{-8}$ M	104,7±13,3	0,705	102,8±22,4	0,842
$10^{-9}$ M	116,4±18,4	0,219	95,6±12,8	0,593
$10^{-10}$ M	122,1±26,8	0,249	97,17±17,9	0,800

**Tabelle 1:** Übersicht der normalisierten Werte der Amplituden der  $K^+$ -induzierten Depolarisationen und Kontrakturen nach Applikation von verschiedenen BIM-1-Konzentrationen.

Der Proctolin-Effekt wird verhindert, wenn die Muskelfaser zugleich mit dem PKC-Hemmstoff BIM-1 ( $10^{-8}$  M) und mit Proctolin ( $10^{-6}$  M) stimuliert wird. Die Amplitude der Kontraktur unterscheidet sich nicht signifikant (5,21 %,  $SD\pm 26,3$  %,  $N=5$ ,  $p=0,71$ ) vom Kontrollwert einer reinen  $K^+$ -induzierten Kontraktur.

Wird der kontraktionsverstärkende Effekt von Proctolin über eine Aktivierung der PKC vermittelt, sollte auch die Aktivierung von PKC durch den Phorbolster Phorbol-12-Myristate-13-Acetate (PMA) die  $K^+$ -induzierte Kontraktur verstärken. Die  $K^+$ -induzierte Kontraktur wird durch den PKC-Aktivator PMA (Friedrich *et al.*, 1998;  $10^{-6}$  M) um 51,3 % ( $SD\pm 33,31$  %,  $N=7$ ,  $p=0,009$ ) signifikant erhöht.

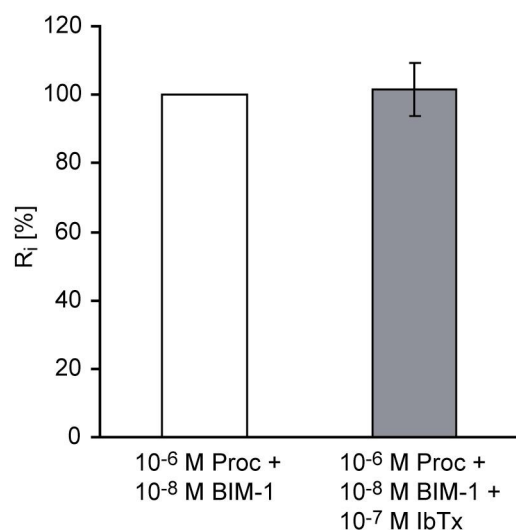


**Abbildung 10:** Die Proctolin (Proc)-induzierte Verstärkung der Muskelspannung in der Extensormuskulatur von *Idotea* wird durch den PKC-Inhibitor BIM-1 verhindert. Die Applikation von PMA ahmt den kontrakturverstärkenden Effekt von Proctolin nach: Zusammenfassung der normalisierten unabhängigen Einzelergebnisse unter Kontrollbedingungen, unter Einwirkung von Proctolin ( $N=8$ ), unter Einwirkung von Proctolin in Anwesenheit von BIM-1 ( $N=5$ ) und in Anwesenheit von PMA ( $N=7$ ).

### 3.2.5. Die Iberitoxin-sensitiven Kanäle werden von Proctolin durch Aktivierung der PKC rekrutiert

Die Muskelkontraktur-Verstärkung durch Proctolin ist abhängig von einer Aktivierung der PKC. Es liegt nahe, dass auch die Proctolin-induzierte Rekrutierung der Iberitoxin-sensitiven Kanäle über diesen Signalweg vermittelt wird. Daher sollte sich die Rekrutierung der Iberitoxin-sensitiven Kanäle durch Hemmung der PKC inhibieren lassen.

Hemmt man die PKC der Extensormuskelfaser mit dem spezifischen PKC-Hemmstoff BIM-1 ( $10^{-8}$  M), so kann kein signifikanter Unterschied ( $101,6$  %,  $SD \pm 7,8$  %,  $N=5$ ,  $p=0,666$ ) im Membranwiderstand durch das Blockieren der Iberitoxin-sensitiven Kanäle mit Iberitoxin ( $10^{-7}$  M) beobachtet werden.



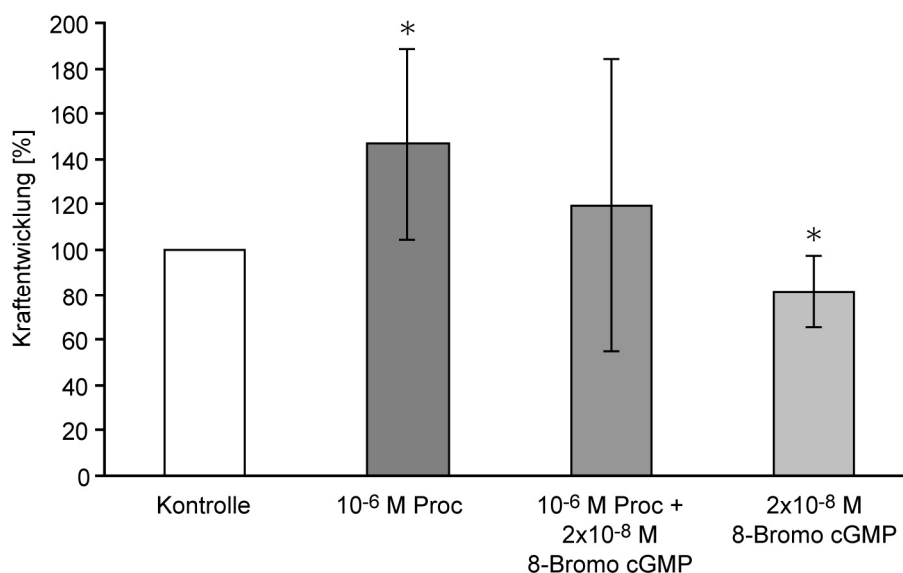
**Abbildung 11:** Die Blockierung der PKC mit BIM-1 verhindert die Rekrutierung von Iberitoxin-sensitiven Kanälen: Zusammenfassung des Membranwiderstandes ( $R_i$ ) von 5 normalisierten unabhängigen Einzelexperimenten mit Proctolin (Proc) unter Einwirkung des PKC-Hemmstoffes BIM-1 vor und mit der Applikation von Iberitoxin (IbTx).

### 3.2.6. 8-Bromo-cGMP, ein cGMP-Analagon, verringert die Proctolin-induzierte Verstärkung der Kontraktur

Philipp et al. (2004) konnten zeigen, dass die cGMP-Konzentration im Extensormuskel von *Idotea* durch die Einwirkung von Proctolin ( $10^{-6}$  M) reduziert wird. Um zu untersuchen, ob diese cGMP-Reduktion durch Proctolin eine Voraussetzung der Proctolin-induzierten Kontrakturverstärkung ist, wurde die Wirkung des membranpermeablen und Phosphodiesterase-resistenten cGMP-Analogons 8-Bromo-cGMP (Ruth et al., 1991) in Kombination mit Proctolin untersucht.

In Anwesenheit von Proctolin ( $10^{-6}$  M) und 8-Bromo-cGMP (Ruth et al., 1991;  $5 \times 10^{-8}$  M) sind die Amplituden der  $K^{+}$ -induzierten Kontraktur nicht signifikant (119,6 %,  $SD \pm 24,3$  %,  $N=8$ ,  $p=0,732$ ) unterschiedlich zu den Kontrollkontrakturen (Abbildung 12), die Applikation von 8-Bromo-cGMP wirkt dem Kontrakturverstärkenden Effekt von Proctolin entgegen.

8-Bromo-cGMP alleine reduziert die Amplituden der Kontraktur signifikant auf 81,5 % ( $SD \pm 6,1$  %,  $N=8$ ,  $p=0,019$ ; Abbildung 12).



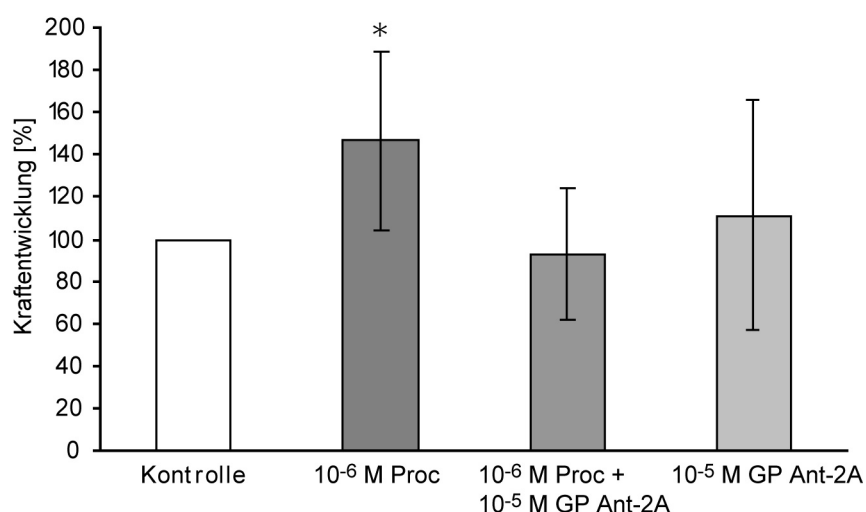
**Abbildung 12:** Die Applikation von 8-Bromo-cGMP reduziert die  $K^{+}$ -induzierte Kontraktur und wirkt dem kontrakturverstärkenden Effekt von Proctolin (Proc) entgegen: Zusammenfassung der normalisierten unabhängigen Einzelexperimente unter Kontrollbedingungen, mit der Einwirkung von Proctolin ( $N=8$ ), mit der Einwirkung von Proctolin in Anwesenheit von 8-Bromo-cGMP ( $N=8$ ) und 8-Bromo-cGMP alleine ( $N=8$ ).

### 3.2.7. Proctolin bindet an einen $G_q$ -gekoppelten Rezeptor

Johnson et al. (2003) identifizierten und charakterisierten in *Drosophila melanogaster* einen Rezeptor für den Neuromodulator Proctolin, der zu der Familie der G-Protein-gekoppelten Rezeptoren gehört. G-Proteine ( $G_i$ - oder  $G_q$ -Proteine) regulieren die Phospholipase  $C\beta$  (Löffler, 2003). Die Aktivierung dieser Phospholipase führt zu einer verstärkten Spaltung des Membranphospholipids  $PIP_2$  in  $IP_3$  und Diazylglyzerin. Letzteres kann die PKC aktivieren und somit das Signal des Rezeptors ins Zellinnere übertragen.

Um herauszufinden, über welche G-Proteine Proctolin wirken kann, wurden einzelne G-Proteine mit jeweils spezifischen Inhibitoren gehemmt und die Auswirkung auf die  $K^+$ -induzierte Kontraktur gemessen. Wird das  $G_q$ -Protein durch den spezifischen Hemmstoff GP-Antagonist 2A (Croxtton et al., 1998;  $10^{-5}$  M) gehemmt, so wird die Kontraktur im Vergleich zu Kontrolle nicht signifikant verstärkt (92,7 %,  $SD\pm 31,2$  %,  $N=5$ ,  $p=0,028$ ; Abbildung 13). Der  $G_q$ -Protein-Hemmstoff alleine zeigt keine Wirkung auf die  $K^+$ -induzierte Kontraktur (111,1 %,  $SD\pm 54,6$  %,  $N=4$ ,  $p=0,712$ ).

Pertussis Toxin, ein spezifischer Hemmstoff für  $G_i$ -Proteine hat keinen Einfluss auf die Wirkung von Proctolin ( $N=3$ ; Daten nicht gezeigt).



**Abbildung 13:** Die Proctolin (Proc)-induzierte Verstärkung der Muskelspannung in der Extensormuskulatur von *Idotea* kann durch das Blocken des  $G_q$ -Proteins verhindert werden. Zusammenfassung der Kraftentwicklung von normalisierten unabhängigen Einzelexperimenten: Kontrolle, Proctolin ( $N=8$ ), mit GP Antagonist-2A (GP Ant-2A) und Proctolin ( $N=5$ ), sowie mit GP Antagonist-2A alleine ( $N=5$ ).

### **3.2.8. Zusammenfassung**

Die Amplitude der  $K^+$ -induzierten Kontraktur in Extensormuskelfasern von *Idotea* wird durch das Neuropeptid Proctolin verstärkt. Proctolin beeinflusst jedoch nicht die Stärke der  $K^+$ -induzierten Depolarisation der Zellmembran.

Die Hemmung der PKA hat keine Auswirkung auf den kontrakturverstärkenden Effekt von Proctolin. Die Hemmung der PKC hebt den Proctolin-Effekt hingegen vollständig auf. Die alleinige Hemmung der PKC hat keinen Einfluss auf die Muskelkontraktur.

Die Applikation von Proctolin bewirkt eine Rekrutierung von Iberiotoxin-sensitiven Kanälen. Dieser Effekt kann ebenfalls durch die Inhibierung der PKC verhindert werden.

Die Erhöhung der cGMP-Konzentration durch das membrangängige 8-Bromo-cGMP wirkt der Kontrakturverstärkung durch Proctolin entgegen; auch ohne Proctolin-Stimulation verringert 8-Bromo-cGMP die Kontrakturkraft.

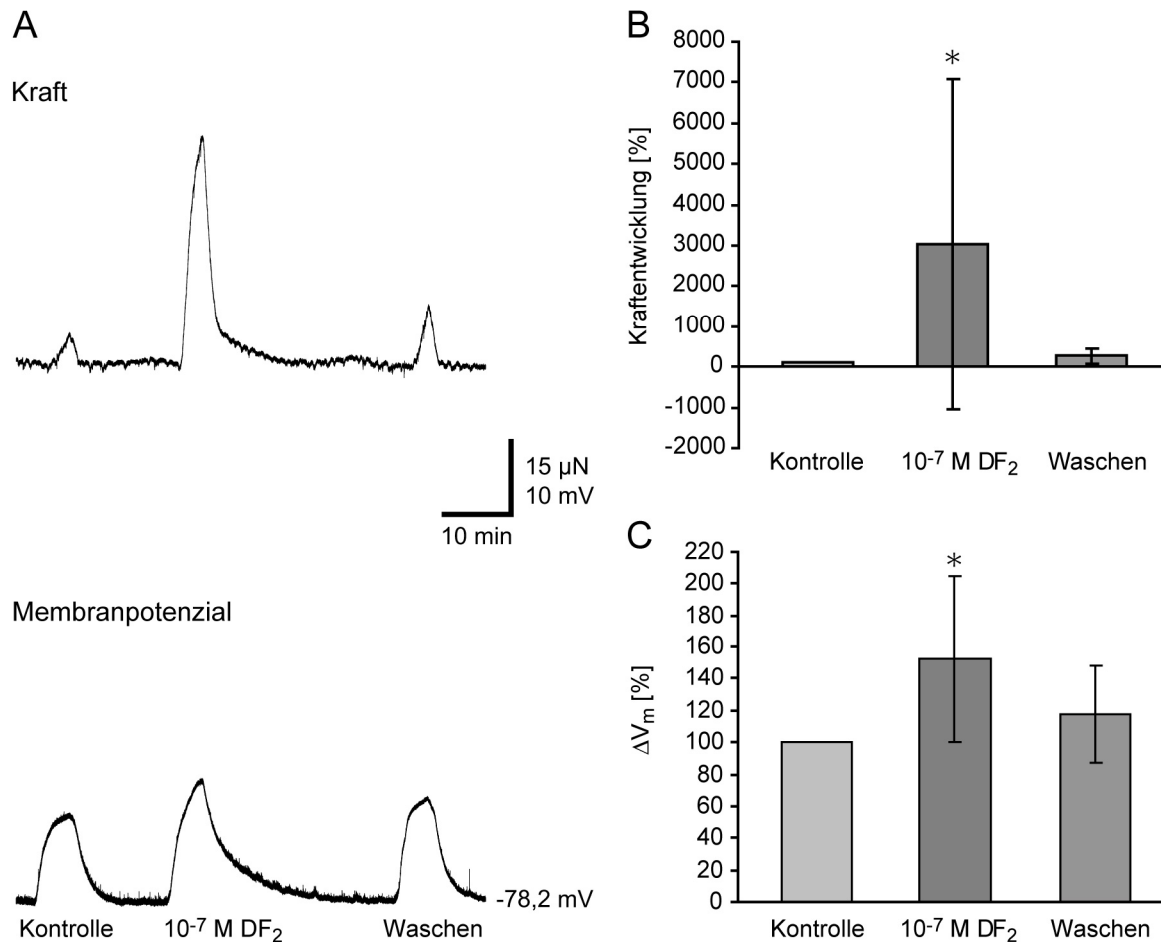
Die Kontrakturverstärkung durch Proctolin wurde mit einem  $G_q$ -Protein-Blocker unterdrückt.

### 3.3. DF<sub>2</sub>-Wirkung auf die Extensormuskulatur von *Idotea emarginata*

#### 3.3.1. DF<sub>2</sub> potenziert die K<sup>+</sup>-induzierte Kontraktur und verstärkt die Depolarisation des Membranpotenzials

Weiss et al. (2003) konnten eine Ca<sup>2+</sup>-abhängige Depolarisation der sarkolemmalen Membran des Extensormuskels von *Idotea* durch das Crustaceen-Neuropeptid DF<sub>2</sub> beobachten. Die Applikation von DF<sub>2</sub> potenzierte dort die K<sup>+</sup>-induzierte Kontraktur der Faser.

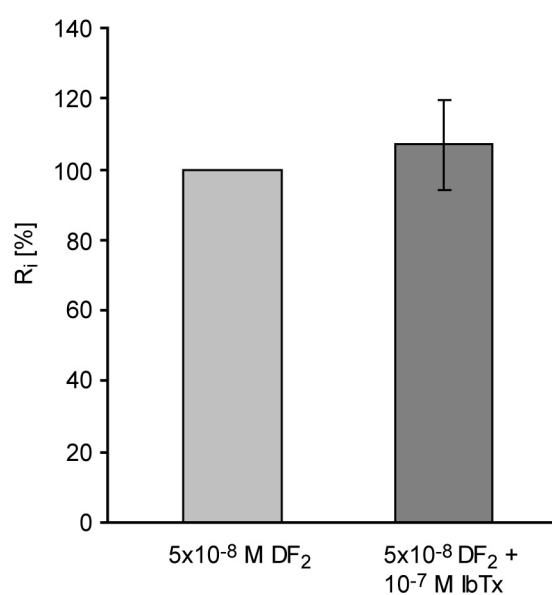
Mit K<sup>+</sup>-induzierten Kontrakturen, bei denen zeitgleich die Depolarisation und die Kontraktur der Extensormuskelfaser gemessen wurden, konnten diese Ergebnisse in *Idotea* bestätigt werden (Abbildung 14A). Die Depolarisation verstärkt sich durch die Wirkung von DF<sub>2</sub> (Weiss et al., 2003; 10<sup>-7</sup> M) um 53,3 % (SD±52,2 %, N=8, p=0,016) (Abbildung 14C), die Kontraktur wird durch DF<sub>2</sub> um das nahezu 30-fache verstärkt (2918 %, SD±4058 %, N=8, p=0,040) (Abbildung 14B). Die Kontrolle 30 min nach Beendigung der Applikation von DF<sub>2</sub> zeigt einen Rückgang beider Parameter auf Kontrollniveau (Depolarisation: 117,5 %, SD±30,2 %, N=8, p=0,168; Abbildung 14C; Kontraktur: 267 %, SD±188 %, N=8, p=0,052; Abbildung 14B).



**Abbildung 14:** DF<sub>2</sub> verstärkt die K<sup>+</sup>-induzierte Kontraktur isolierter Extensormuskelfasern von *Idotea*: **A** Originalaufzeichnung eines Einzelexperimentes; Kontraktur und Depolarisation gleichzeitig aufgezeichnet: unter Kontrollbedingungen, in der Anwesenheit von DF<sub>2</sub> und nach dem Auswaschen für 30 min. Die Kontrolle repräsentiert eine von drei Kontrakturen vor der Peptid-Applikation. **B** Zusammenfassung der Kraftentwicklung von 8 normalisierten unabhängigen Einzelergebnissen; **C** Zusammenfassung der Depolarisation ( $\Delta V_m$ ) von 8 normalisierten unabhängigen Einzelergebnissen.

### 3.3.2. $DF_2$ wirkt nicht auf Iberiotoxin-sensitive Kanäle

Während der Wirkung von  $DF_2$  wird eine verstärkte Depolarisation in den Kontraktions-Messungen beobachtet. Weiss *et al.* (2003) haben gezeigt, dass diese Depolarisation durch einen  $Ca^{2+}$ -Einstrom erzeugt wird. Im Gegensatz zu Proctolin scheint diese Depolarisation nicht durch die zusätzliche Aktivierung von Auswärtsströmen überlagert zu werden.



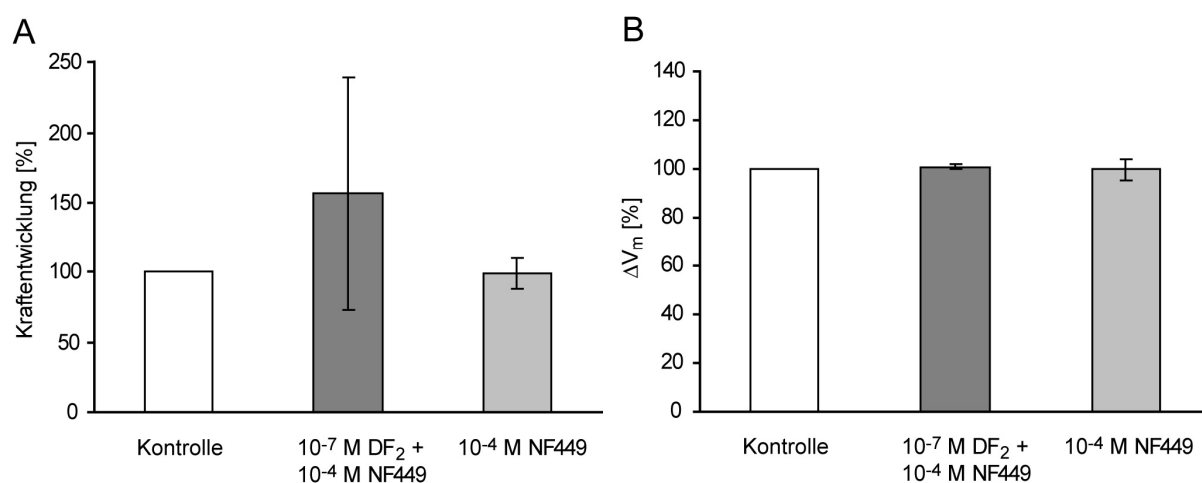
**Abbildung 15:** Iberiotoxin (IbTx) erhöht nach der Einwirkung von  $DF_2$  den Membranwiderstand ( $R_i$ ) der Muskelfaser von *Idotea* nicht: Zusammenfassung des Membranwiderstandes ( $R_i$ ) von 6 normalisierten unabhängigen Einzelergebnissen mit Proctolin vor und unter der Einwirkung von Iberiotoxin.

Die Applikation von Iberiotoxin (Garcia *et al.*, 1991;  $10^{-7}$  M) nach der Einwirkung von  $DF_2$  zeigt keine signifikante Veränderung des Membranwiderstandes (107 %,  $SD \pm 12,8$  %,  $N=6$ ,  $p=0,238$ ; Abbildung 15).



### 3.3.3. Das G-Protein des DF<sub>2</sub>-Rezeptors ist ein G<sub>s</sub>-Protein

Die G<sub>q</sub>- $\alpha$ -Untereinheit wird durch Applikation von Proctolin aktiviert (Abbildung 13). Durch Proctolin werden auch Iberiotoxin-sensitive K<sub>Ca</sub>-Kanäle rekrutiert, was unter der Einwirkung von DF<sub>2</sub> nicht der Fall ist. Daher kann für den G-Protein-gekoppelten Rezeptor des Neuromodulators DF<sub>2</sub> die G<sub>q</sub>- $\alpha$ -Untereinheit ausgeschlossen werden. Eine weitere Untereinheit der G-Protein-gekoppelten Rezeptoren mit stimulierender Wirkung ist die G<sub>s</sub>- $\alpha$ -Untereinheit. Diese soll für die Stimulierung des Adenylatzyklasesystems und die damit einhergehende Aktivierung der PKA (Löffler, 2003) verantwortlich sein. Unter Einwirkung des PKA-Hemmstoffs H89 wurde allerdings festgestellt, dass eine Aktivierung dieser Proteinkinase zu einer Verringerung der Kontraktionsamplitude führt (Abbildung 8). Wang *et al.* (1993) konnten zeigen, dass eine Aktivierung der G<sub>s</sub>- $\alpha$ -Untereinheit in der Vertebraten-Herzmuskulatur direkt L-Typ Ca<sup>2+</sup>-Kanäle aktiviert.



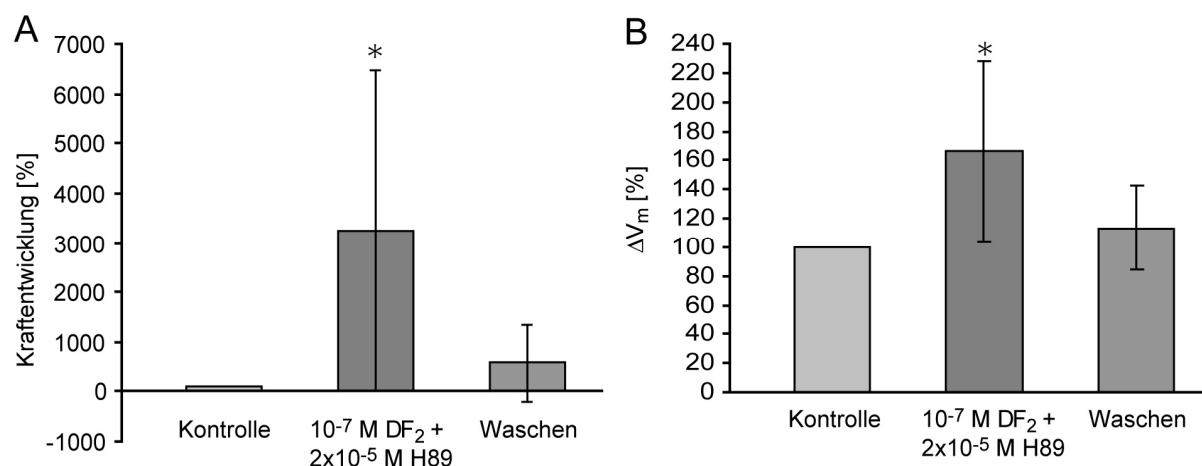
**Abbildung 16:** Die DF<sub>2</sub>-induzierte Potenzierung der Muskelkraftentwicklung und Depolarisation der Extensormuskulatur von *Idotea* kann durch das Blocken des G<sub>s</sub>-Proteins verhindert werden: **A** Zusammenfassung der Kraftentwicklung von jeweils 3 normalisierten unabhängigen Einzelexperimenten unter Kontrollbedingungen, während der Applikation von DF<sub>2</sub> und NF449 und während der Applikation von NF449 allein. **B** Zusammenfassung der Depolarisation ( $\Delta V_m$ ) von jeweils 3 normalisierten unabhängigen Einzelexperimenten unter Kontrollbedingungen, während der Applikation von DF<sub>2</sub> und NF449 und während der Applikation von NF449 allein.

Die Hemmung der  $G_s$ - $\alpha$ -Untereinheit durch den spezifischen Antagonist NF449 (Braun *et al.*, 2001;  $10^{-4}$  M), reduziert den 30-fach kontrakturverstärkenden Effekt von  $DF_2$  (vgl. Abbildung 14B) auf 156,3 % ( $SD \pm 83,0$  %,  $N=3$ ; Abbildung 16A). Die  $DF_2$ -Wirkung auf die  $K^+$ -induzierte Depolarisation wird durch die Hemmung der  $G_s$ - $\alpha$ -Untereinheit blockiert (100,9 %,  $SD \pm 1,0$  %,  $N=3$ ; Abbildung 16B und vgl. Abbildung 14C).

#### **3.3.4. Die Potenzierung der $K^+$ -induzierten Kontraktur durch $DF_2$ kann durch den spezifischen PKA-Inhibitor H89 nicht verhindert werden**

Die kontrakturverstärkende Wirkung von  $DF_2$  wird über eine  $G_s$ - $\alpha$ -Untereinheit am G-Protein-gekoppelten Rezeptor vermittelt (Abbildung 16). Viele Untersuchungen haben gezeigt, dass G-Protein-gekoppelte Rezeptoren mit einer  $G_s$ - $\alpha$ -Untereinheit das Adenylatzyklasesystem aktivieren (aus Löffler, 2003). Die Inhibierung der PKA und der daraus resultierenden Verminderung der Kontraktionskraft (Abbildung 8) macht eine Aktivierung der PKA durch die Einwirkung von  $DF_2$  jedoch unwahrscheinlich. Wang *et al.* (1993) zeigten eine direkte Wirkung der  $G_s$ - $\alpha$ -Untereinheit auf L-Typ  $Ca^{2+}$ -Kanäle in der postsynaptischen Membran der Vertebraten-Herzmuskulatur.

Mit Hilfe des membrangängigen spezifischen PKA-Hemmstoffs H89 wurde hier gezeigt, dass eine Wirkung von  $DF_2$  auf die PKA des Adenylatzyklasesystems ausgeschlossen werden kann.



**Abbildung 17:** Die DF<sub>2</sub>-induzierte Potenzierung der Muskelkraft und Depolarisation der Extensormuskulatur von *Idotea* kann durch die Hemmung der PKA nicht verhindert werden: **A** Zusammenfassung der Kraftentwicklung von jeweils 3 normalisierten unabhängigen Einzelexperimenten unter Kontrollbedingungen, während der gemeinsamen Applikation von DF<sub>2</sub> und H89 und nach 30 min Auswaschen. **B** Zusammenfassung der Depolarisation ( $\Delta V_m$ ) von jeweils 3 normalisierten unabhängigen Einzelexperimenten unter Kontrollbedingungen, während der Applikation von DF<sub>2</sub> und H89 und nach 30 min Waschen.

H89 verhindert den kontrakturverstärkenden Effekt von DF<sub>2</sub> nicht, die Potenzierung der Kraftentwicklung durch DF<sub>2</sub> erreicht in Anwesenheit von H89 die gleiche Größenordnung wie durch DF<sub>2</sub>-Applikation allein (3251%;  $SD \pm 3222$  %,  $N=7$ ,  $p=0,021$ ; Abbildung 17A und vgl. Abbildung 14B). Alleinige Applikation von H89 hat keine Wirkung auf die K<sup>+</sup>-induzierte Muskelkontraktur (vgl. Abbildung 8). Auch die Verstärkung der Depolarisation durch DF<sub>2</sub> wird mit dem PKA-Hemmstoff H89 nicht verringert. (165,9% ,  $SD \pm 62,2$  %,  $N=7$ ,  $p=0,020$ ) (Abbildung 17B).

### 3.3.5. Zusammenfassung

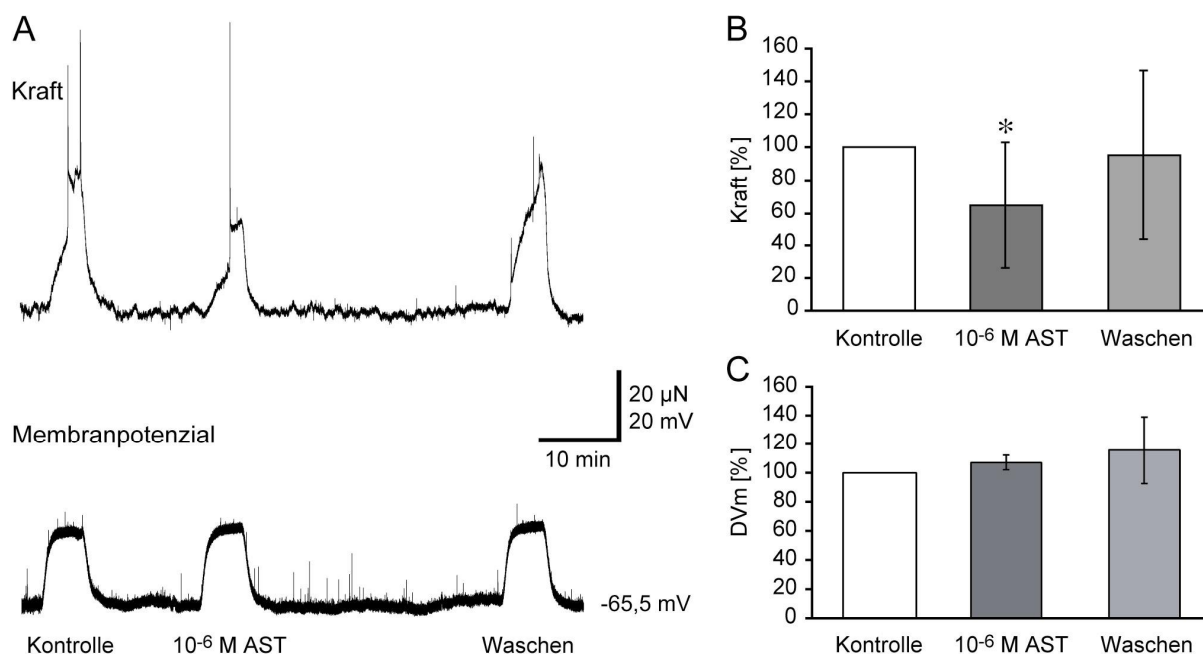
DF<sub>2</sub> verstärkt die K<sup>+</sup>-induzierte Kontraktur und erhöht dabei auch die Depolarisation. Iberiotoxin-sensitive Kanäle werden durch das Neuropeptid nicht beeinflusst. Obwohl der spezifische Hemmstoff NF449 für das Adenylatzyklase-assoziierte G<sub>s</sub>-Protein den kontrakturpotenzierenden Effekt von DF<sub>2</sub> verringert, und dessen depolarisationserhöhenden Effekt ganz reduziert, hat der PKA-Inhibitor H89 keinen Einfluss auf die DF<sub>2</sub>-Wirkung.

### 3.4. Allatostatin-Wirkung auf die Extensormuskulatur von *Idotea emarginata*

#### 3.4.1. Allatostatin vermindert die Kontraktur

In der Extensormuskulatur von *Idotea emarginata* werden graduierte Kontraktionen in spannungsgeklammten Fasern durch die Applikation von Allatostatin verringert (Kreissl *et al.*, 1999).

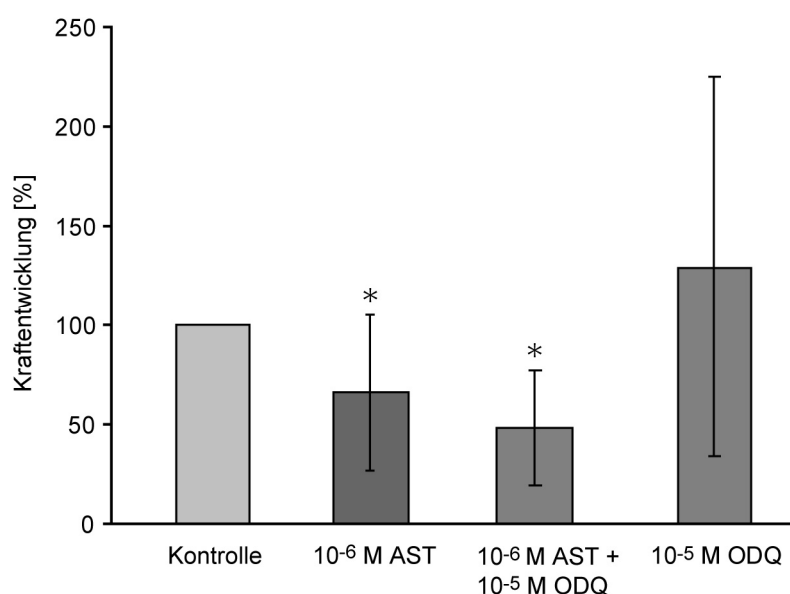
Allatostatin ( $10^{-6}$  M) vermindert auch die  $K^+$ -induzierte Kontraktur, ohne dabei die  $K^+$ -induzierte Depolarisation zu beeinflussen (Abbildung 18). Die  $K^+$ -induzierte Kraftentwicklung sinkt unter der Einwirkung von Allatostatin auf 64,6 % ( $SD \pm 41,3$  %,  $N=8$ ,  $p=0,046$ ) (Abbildung 18B). Die  $K^+$ -induzierte Depolarisation bleibt von Allatostatin unbeeinflusst ( $107,2$  %,  $SD \pm 5,1$  %,  $N=5$ ,  $p=0,062$ ) (Abbildung 18C).



**Abbildung 18:** Allatostatin (AST) vermindert die  $K^+$ -induzierte Kontraktur isolierter Extensormuskelfasern von *Idotea*: **A** Originalaufzeichnung eines Einzelexperimentes; Kontraktur und Depolarisation gleichzeitig aufgezeichnet: unter Kontrollbedingungen, in der Anwesenheit von Allatostatin und nach dem Auswaschen für 30 min. Die Kontrolle repräsentiert eine von drei Kontrakturen vor der Peptid-Applikation. **B** Zusammenfassung der Kraftentwicklung von 8 normalisierten unabhängigen Einzelergebnissen. **C** Zusammenfassung des Membranpotenzials ( $\Delta V_m$ ) von 5 normalisierten unabhängigen Einzelergebnissen.

### 3.4.2. Die Verminderung der $K^+$ -induzierten Kontraktur wird nicht über die Guanylatzyklase vermittelt

Fritsche (2004) konnte nach Applikation von Allatostatin ( $10^{-6}$  M) einen Anstieg der cGMP-Konzentration in der Muskelfaser von *Idotea* messen. Folglich wird in den Extensormuskelfasern von *Idotea* in Folge von Allatostatin-Einwirkung eine Guanylatzyklase aktiviert oder eine Phosphodiesterase gehemmt. Durch die Hemmung der Guanylatzyklase mit dem membrangängigen spezifischen Hemmstoff ODQ (Imaeda und Cunnane, 2003;  $10^{-5}$  M) wird untersucht, ob die Verringerung der  $K^+$ -induzierten Kontraktur auf einer Aktivierung der Guanylatzyklase beruht.



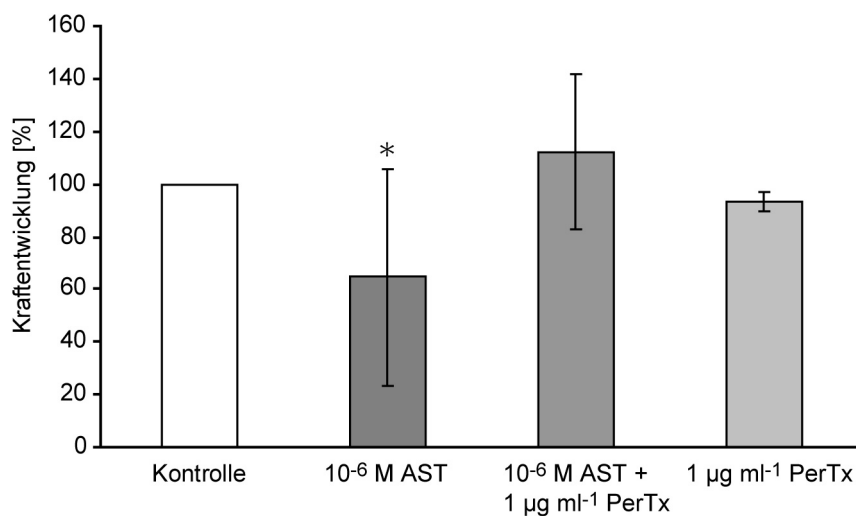
**Abbildung 19:** Die Allatostatin (AST)-induzierte Verringerung der Amplitude der  $K^+$ -induzierten Kontraktur in der Extensormuskulatur von *Idotea* kann durch die Hemmung der GC mit dem spezifischen Hemmstoff ODQ nicht verhindert werden: Zusammenfassung der Kraftentwicklung von normalisierten unabhängigen Einzelexperimenten: unter Kontrollbedingungen, mit Allatostatin ( $N=8$ ), mit Allatostatin in der Anwesenheit von ODQ ( $N=7$ ), sowie mit dem GC-Hemmstoff ODQ allein ( $N=7$ ).

In Anwesenheit von Allatostatin ( $10^{-6}$  M) und ODQ ( $10^{-5}$  M) sind die Amplituden der  $K^+$ -induzierten Kontraktur signifikant (48,2 %,  $SD \pm 29,1$  %,  $N=7$ ,  $p=0,003$ ) gegenüber den Kontrollkontrakturen verringert (Abbildung 19). Die Hemmung der GC verhindert den kontrakturverringernenden Effekt von Allatostatin nicht.

Der GC-Inhibitor ODQ ( $10^{-5}$  M) allein zeigt im Durchschnitt eine Verstärkung der  $K^+$ -induzierten Kontraktur um 29,4 % ( $SD \pm 95,4$  %,  $N=7$ ), die jedoch nicht signifikant ist (Abbildung 19).

### **3.4.3. Das G-Protein des Allatostatin-Rezeptors ist ein $G_i$ -Protein**

In *Drosophila melanogaster* wurde ein G-Protein gekoppelter Rezeptor identifiziert, der eine hohe Affinität zu Allatostatin aufweist (Birgöl *et al.*, 1999). In der Schabe *Periplaneta americana* wurde ein sequenzhomologer Rezeptor nachgewiesen (Auerswald *et al.*, 2001), der nach Expression in CHO-Säuger-Zellen mit Allatostatin aktiviert werden konnte (Larsen *et al.*, 2001). Als regulierende  $\alpha$ -Untereinheit des Allatostatin-Rezeptors kann sowohl die  $G_s$ - $\alpha$ -Untereinheit, über die die  $DF_2$ -Wirkung vermittelt wird, als auch die  $G_q$ - $\alpha$ -Untereinheit, die durch Proctolin-Applikation aktiviert wird, ausgeschlossen werden. Denn  $DF_2$  und Proctolin haben, im Gegensatz zu Allatostatin, kontrakturverstärkende Wirkung auf die Extensormuskelfaser in *Idotea*. Die hemmende Wirkung von Allatostatin lässt vermuten, dass die regulierende  $\alpha$ -Untereinheit des G-Proteins eine  $G_i$ - $\alpha$ -Untereinheit ist. Um diese Annahme zu untersuchen, wurde der Allatostatin-Effekt auf die Muskelkontraktion unter der Einwirkung des spezifischen  $G_i$ -Protein-Hemmstoffs Pertussis Toxin (Martinez *et al.*, 2003;  $1 \mu\text{g ml}^{-1}$ ) beobachtet. Der  $G_i$ -Protein-Inhibitor verhindert die AST-induzierte Verringerung der Muskelkraftentwicklung in *Idotea*.



**Abbildung 20:** Die Allatostatin (AST)-induzierte Verminderung der Muskelkraft in der Extensormuskulatur von *Idotea* kann durch das Blocken des G<sub>i</sub>-Proteins durch den spezifischen Inhibitor Pertussis Toxin (PerTx) verhindert werden. Zusammenfassung der Kraftentwicklung von normalisierten unabhängigen Einzelexperimenten: Kontrolle, Allatostatin ( $N=8$ ), mit Pertussis Toxin (PerTx) und Allatostatin (AST) ( $N=3$ ), sowie mit dem G<sub>i</sub>-Protein-Inhibitor Pertussis Toxin ( $N=3$ ) alleine.

Durch Applikation des spezifischen G<sub>i</sub>-Protein-Hemmstoffs Pertussis Toxin wurde keine signifikante (116,4 %,  $SD\pm 22,9$  %,  $N=3$ ) Veränderung der Muskelkraftentwicklung im Vergleich zur Kontrolle beobachtet (Abbildung 20). Dieser spezifische Hemmstoff verhindert den Allatostatin-Effekt, ohne bei alleiniger Applikation eine signifikante Wirkung auf die K<sup>+</sup>-induzierte Kontraktur auszuüben (93,6 %,  $SD\pm 3,7$  %,  $N=3$ ; Abbildung 20).

#### 3.4.4. Zusammenfassung

Die K<sup>+</sup>-induzierte Kontraktur von *Idotea* Extensormuskelfasern wird durch den Neuromodulator Allatostatin verringert. Dabei beeinflusst Allatostatin die K<sup>+</sup>-induzierte Depolarisation nicht. Die Hemmung der Guanylatzyklase hat keinen Einfluss auf den Allatostatin-induzierten Effekt auf die Muskelkontraktur. Die hemmende Wirkung von Allatostatin kann durch den G<sub>i</sub>-Protein-Inhibitor ODQ aufgehoben werden.

## 4. DISKUSSION

---

### 4.1. Die Neuromodulatoren Proctolin, DF<sub>2</sub> und Allatostatin

Im Nervensystem der Meeresassel *Idotea emarginata* wurden Proctolin und XLRFamide, zu denen auch DF<sub>2</sub> gehört, jeweils in einem einzelnen Paar identifizierter Motoneurone immunzytochemisch nachgewiesen (Brüstle *et al.*, 2001; Weiss *et al.*, 2003). Der inhibitorische Neuromodulator Allatostatin kann, außer im Proctolin-immunoreaktiven Neuron, in allen homonomen Motoneuronen der Pereionsegmente immunzytochemisch detektiert werden (Kreissl *et al.*, 1999).

Proctolin führt in der Extensormuskulatur von *Idotea* zu einer Verstärkung von Muskelkontraktionen. Dabei können diese durch Strominjektion in spannungsgeklemmten Fasern depolarisationsinduziert oder mit Koffein ausgelöst werden (Brüstle *et al.*, 2001; Erxleben *et al.*, 1995; Rathmayer *et al.*, 2002b). Es werden spannungsunabhängige K<sup>+</sup>-Kanäle geschlossen, und die Öffnungswahrscheinlichkeit für spannungsabhängige L-Typ Ca<sup>2+</sup>-Kanäle wird erhöht (Erxleben *et al.*, 1995). Außerdem wird intrazellulär ein 30 kd-Protein durch die Wirkung von Proctolin phosphoryliert (Brüstle *et al.*, 2001). DF<sub>2</sub> erhöht – ebenso wie Proctolin – den Ca<sup>2+</sup>-Einstrom durch die L-Typ Ca<sup>2+</sup>-Kanäle (Weiss *et al.*, 2003).

In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass auch K<sup>+</sup>-induzierte Kontraktionen durch Proctolin und DF<sub>2</sub> verstärkt werden (Abbildung 5 und Abbildung 14). Dabei bleibt die K<sup>+</sup>-induzierte Depolarisation durch Proctolin unbeeinflusst (Abbildung 5). DF<sub>2</sub> hingegen erhöht die K<sup>+</sup>-induzierte Depolarisation (Abbildung 14). Diese Befunde bestätigen die von Weiss *et al.* (2003) unabhängig gemessenen Effekte von DF<sub>2</sub> auf die Muskelkraftentwicklung und die Depolarisation in *Idotea*.

Auch in anderen Crustaceen-Präparationen konnte eine Potenzierung der K<sup>+</sup>-induzierten Kontraktur durch DF<sub>2</sub> festgestellt werden (Jorge-Rivera und Marder, 1996; Worden *et al.*, 1995). Dennoch haben FaRPs in anderen Organismen sehr variierende und häufig gegenteilige Effekte auf die Muskulatur. So reduziert YGGFMRFamid die K<sup>+</sup>-Ruheleitfähigkeit in Fasern der Extensortibiae-Muskulatur der Heuschrecke (Walther *et al.*, 1998). In anderen Muskeln dieser Art konnte für die FaRPs SchistoFLRFamid, ManducaFLRFamid und Leucomyosuppressin eine



hyperpolarisierende Wirkung nachgewiesen werden (Lange und Cheung, 1999). In Herzmuskelzellen der Süßwasserschnecke *Lymnea* aktiviert ein FMRFamid bereits im Ruhezustand der Zelle einen kobaltsensitiven Kationen-Kanal (Brezden *et al.*, 1991). Spannungsabhängige  $K^+$ -Ströme, die durch ein FMRFamid aktiviert werden, wurden in der Radula-Muskulatur von *Aplysia* nachgewiesen (Cropper *et al.*, 1994; Scott *et al.*, 1997).

Allatostatin ist bisher das einzig bekannte Peptid, das inhibitorische Effekte auf Crustaceen Skelettmuskeln zeigt. Ein hemmender Effekt konnte ebenfalls auf graduierte Kontraktionen in spannungsgeklemmten Fasern beobachtet werden (Kreissl *et al.*, 1999). Auch Kontraktionen des Enddarms im Flusskrebs *Orconectes limosus* werden durch Allatostatin reduziert (Dircksen *et al.*, 1999). Der spannungsabhängige Einwärtsstrom durch die L-Typ  $Ca^{2+}$ -Kanäle wird durch Allatostatin reduziert (Rathmayer *et al.*, 2002b). Ergänzend zu diesen Ergebnissen konnte in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden, dass Allatostatin die  $K^+$ -induzierte Kontraktur der Extensormuskulatur in *Idotea* verringert (Abbildung 18).

#### **4.2. Kontraktionen sind $Ca^{2+}$ abhängig**

Kontraktionen der Arthropoden-Muskulatur sind abhängig vom Einstrom extrazellulärer  $Ca^{2+}$ -Ionen (Ashley und Ridgway, 1970; Atwater *et al.*, 1974; Gainer, 1968) und beruhen auf der  $Ca^{2+}$ -induzierten  $Ca^{2+}$ -Ausschüttung. Erxleben und Rathmayer (1997) fanden Hinweise, dass es in Extensormuskeln von *Idotea* nur einen spannungsabhängigen  $Ca^{2+}$ -Kanal gibt. Dieser Dihydropyridin-sensitive  $Ca^{2+}$ -Kanal (L-Typ  $Ca^{2+}$ -Kanal) öffnete in Spannungsklemm-Versuchen bei einer Aktivierungsschwelle von -40 mV (Weiss *et al.*, 2001). Die Öffnungswahrscheinlichkeit für den L-Typ  $Ca^{2+}$ -Kanal wird durch Proctolin und  $DF_2$  erhöht, durch Allatostatin verringert (Bishop *et al.*, 1991; Rathmayer *et al.*, 2002b; Weiss *et al.*, 2003).

In der vorliegenden Arbeit konnte die Wirkung dieser Neuromodulatoren auf die  $K^+$ -induzierte Kontraktur dargestellt werden. In diesen Experimenten bleibt die  $K^+$ -ausgelöste Depolarisation der Extensormuskelfaser jedoch weit unter -40 mV und die Muskelkontraktur beginnt bereits bei einer Depolarisation auf -64 mV. Folgt man Erxleben und Rathmayer (1997) hinsichtlich der Existenz nur eines sarkolemmalen

Ca<sup>2+</sup>-Kanals, der bei den gemessenen Depolarisationen jedoch nicht geöffnet werden sollte, müssten die K<sup>+</sup>-induzierten Muskelkontraktionen und auch die Effekte der Neuromodulatoren unabhängig vom Einstrom an extrazellulärem Ca<sup>2+</sup> sein. Die Kraftentwicklung K<sup>+</sup>-induzierter Kontraktionen wird durch Proctolin-Applikation um 47% erhöht (Abbildung 5B). Dieser Effekt von Proctolin auf Kontraktionen, die durch Depolarisation ausgelöst wurden, konnte auch für andere Organismen gezeigt werden (Bishop *et al.*, 1987; Cook und Holman, 1980; Erxleben *et al.*, 1995).

Wird aber eine Muskelkontraktur mit Koffein, und damit nur durch die Ca<sup>2+</sup>-Ausschüttung aus dem SR ausgelöst, erreicht der Wert der Proctolin-induzierten Muskelkraftverstärkung nur 27% (Brüstle *et al.*, 2001). Mechanismen, die hier möglicherweise zugrunde liegen, sind die Proctolin-induzierte Phosphorylierung eines 30 kd-Proteins am dünnen Filament (Brüstle *et al.*, 2001) und die erhöhte Ca<sup>2+</sup>-Ausschüttung aus dem SR (Wegener und Nässel, 2000).

Dieser Unterschied in der Stärke des Proctolin-induzierten Effekts in Abhängigkeit vom kontrakturauslösenden Mechanismus lässt vermuten, dass die Verstärkung der K<sup>+</sup>-induzierten Kontraktur abhängig von membranständigen Prozessen oder Proteinen ist.

Die verstärkte Depolarisation der Muskelfibrille durch den Einfluss von DF<sub>2</sub> (Abbildung 14C) gibt einen Hinweis auf die Beteiligung von membranständigen Kanalproteinen an der durch K<sup>+</sup> ausgelösten Kontraktur. Diese DF<sub>2</sub>-induzierte Depolarisation findet man auch in der Magenmuskulatur der Garnele (Meyrand und Marder, 1991), nicht aber in *Eriphia* (Weiss *et al.*, 2003) und anderen Crustaceen (Jorge-Rivera und Marder, 1996; Mercier *et al.*, 1990; Skerrett *et al.*, 1995; Worden *et al.*, 1995). Die Depolarisation durch DF<sub>2</sub> in *Idotea* ist durch Kobaltionen blockierbar (Weiss *et al.*, 2003), die selektiv Ca<sup>2+</sup>-Kanäle inhibieren. Dieses Ergebnis lässt die Schlussfolgerung zu, dass es eine Leitfähigkeit über die Zellmembran für Ca<sup>2+</sup>-Ionen unterhalb der postulierten Aktivierungsschwelle des L-Typ Ca<sup>2+</sup>-Kanals gibt. Das Auftreten Ca<sup>2+</sup>-getragener Einwärtsströme durch Proctolin- oder FMRFamid-Applikation wurde bereits im stomatogastrischen Ganglion von Crustaceen nachgewiesen (Golowasch und Marder, 1992; Swensen und Marder, 2000).

### 4.3. Ca<sup>2+</sup>-Kanäle in der Muskelfaser von *Idotea*

Der L-Typ Ca<sup>2+</sup>-Kanal, der bisher als einziger spannungsabhängiger Ca<sup>2+</sup>-Kanal in der Membran der Extensormuskulatur von *Idotea emarginata* beschrieben wurde, ist durch den spezifischen Antagonisten Nifedipin blockierbar (Erxleben und Rathmayer, 1997). Die K<sup>+</sup>-induzierten Kontraktionen werden nach einer 100-minütigen Applikation mit Nifedipin reduziert (Abbildung 4). Das lässt auf eine Leitfähigkeit dieser Kanäle auch unter der Aktivierungsschwelle in spannungsgeklemmten Muskelfasern von -40 mV schließen lässt. Für den abdominalen Flexormuskel des Crustaceen *Atya lanipes* werden die L-Typ Ca<sup>2+</sup>-Kanäle als „leise Kanäle“ beschrieben, da ihre Aktivierung bei Potenzialen unter -40 mV mit Strom- und Spannungsklemm-Techniken nicht gemessen werden kann (Monterrubio *et al.*, 2000). Trotzdem ist ihre Aktivierung offenbar essentiell für die Ca<sup>2+</sup>-induzierte Ca<sup>2+</sup>-Ausschüttung aus dem SR und der daraus folgenden Muskelkontraktion (Monterrubio *et al.*, 2000). Die DF<sub>2</sub>-induzierte Depolarisation und auch der durch DF<sub>2</sub> ausgelöste Einstrom extrazellulärer Ca<sup>2+</sup>-Ionen sind in *Idotea* durch Nifedipin nicht blockierbar (Weiss *et al.*, 2003). Diese Beobachtungen erlauben die Annahme, dass noch andere spannungsabhängige Ca<sup>2+</sup>-Kanäle als der L-Typ Ca<sup>2+</sup>-Kanal an dem durch DF<sub>2</sub>-Applikation induzierten Effekt beteiligt sein müssen.

Die mutmaßliche Existenz eines weiteren Ca<sup>2+</sup>-Kanals in der Muskelmembran wird gestützt durch folgende zwei Befunde: im pylorischen Neuron des stomatogastrischen Ganglions der Krabbe *Cancer borealis* wird durch Proctolin ein Einwärtsstrom aktiviert, der bereits ab -70 mV eine geringe Leitfähigkeit (0,01 nA) aufweist (Swensen und Marder, 2000); im tonischen Flexormuskel des Flusskrebses *Procambarus clarkii* wird die Aktivität von zwei unterschiedlichen Ca<sup>2+</sup>-Kanälen durch Proctolin erhöht, wobei der Kanal mit der geringeren Leitfähigkeit nur nach der Applikation von Proctolin nachgewiesen werden konnte (Bishop *et al.*, 1991).

Zusammenfassend kann also angenommen werden, dass neben dem Strom durch den L-Typ Ca<sup>2+</sup>-Kanal noch weitere Ca<sup>2+</sup>-getragene Einwärtsströme in *Idotea* vorhanden sind, die mit den bisher verwendeten Methoden von Weiss *et al.* (2001) nicht nachzuweisen waren und eventuell erst durch den jeweiligen Neuromodulator aktiviert werden.

Im Verlauf der  $K^+$ -induzierten Kontraktur unter der Einwirkung von Nifedipin können ungewöhnliche „Schultern“ in den Messkurven festgestellt werden (siehe Abbildung 4). Auf dieses Phänomen wird hier nicht weiter eingegangen, da es sich um methodische Artefakte aufgrund lockerer Transducer-Verbindungen zur Muskelfaser handeln könnte. An dieser Stelle soll darauf hingewiesen werden, dass die antagonistische Wirkung von Nifedipin sowohl in *Idotea*, als auch in *Atya lanipes* erst nach einer ungewöhnlich langen Applikationszeit von 100 Minuten einsetzt (Monterrubio *et al.*, 2000). Die Kontraktur kann durch Nifedipin nicht komplett blockiert werden (Abbildung 4), was ebenfalls auf die Existenz weiterer  $Ca^{2+}$ -getragener Ströme hinweist.

#### **4.4. Iberiotoxin-sensitive $K^+$ -Kanäle in *Idotea***

Aktivieren oder verstärken Neuromodulatoren  $Ca^{2+}$ -Einwärtsströme, werden vermehrt positive Ladungen in die Muskelzelle gebracht. In der Folge würde man eine erhöhte Depolarisation der Muskelfaser erwarten. Diese Zusammenwirkung kann in *Idotea* durch die Applikation des FMRFamids  $DF_2$  beobachtet werden (Abbildung 14, Weiss *et al.*, 2003), nicht jedoch durch die Applikation von Proctolin (Abbildung 5). Auch der coxale Depressormuskel der Schabe und der tonische Flexormuskel des Flusskrebsses werden durch die Proctolin-Applikation nicht depolarisiert, obwohl eine verstärkte Kontraktur mit Proctolin induziert werden konnte (Adams und O'Shea, 1983; Bishop *et al.*, 1987). Offenbar wird der verstärkte Einwärtsstrom von  $Ca^{2+}$ -Ionen durch einen entgegengerichteten Strom kompensiert, und das Membranpotenzial der Faser wird durch Proctolin nicht beeinflusst. Im Öffnermuskel des Laufbeines von *Procambarus clarkii* beispielsweise ermöglicht ein  $Ca^{2+}$ -aktivierter  $K^+$ -Kanal ein Negativ-Feedback und kontrolliert die Depolarisation durch den  $Ca^{2+}$ -Einwärtsstrom (Araque *et al.*, 1998). Auf diese Weise werden fein graduierte Muskelkontraktionen ermöglicht.

Iberiotoxin (IbTx) ist ein spezifischer Blocker für  $Ca^{2+}$ -aktivierte  $K^+$ -Kanäle großer Leitfähigkeit (Garcia *et al.*, 1991), die daher auch als Iberiotoxin-sensitive Kanäle bezeichnet werden. In Stomklemm-Experimenten konnte festgestellt werden, dass Proctolin IbTx-sensitive  $K^+$ -Kanäle rekrutiert (Abbildung 6). Diese Kanäle werden in Folge der Applikation von Proctolin durch intrazelluläre  $Ca^{2+}$ -Ionen aktivierbar. Nach

Aktivierung und Öffnung des Kanals strömt  $K^+$  aus der Muskelfaser und wirkt damit einer Depolarisation durch den  $Ca^{2+}$ -Einstrom entgegen. Die Expression  $Ca^{2+}$ -aktivierter  $K^+$ -Kanäle wird in *Drosophila melanogaster* von zellzyklus-gesteuerten Genen beeinflusst (Jaramillo *et al.*, 2004). In solch einer zeitabhängigen Expression und der daraus resultierenden zeitlich unterschiedlichen Anzahl solcher Kanäle in der Zellmembran kann ein Grund für die Nichtidentifikation dieser Kanäle in Patchclamp-Untersuchungen an der Extensormuskulatur von *Idotea* (Erxleben und Rathmayer, 1997) vermutet werden.

In der glatten Muskulatur von Säugetieren wirken  $\alpha$ - und  $\beta$ -Untereinheiten des IbTx-sensitiven  $K^+$ -Kanals zusammen und regulieren so die Aktivität dieses Kanals (Knaus *et al.*, 1994; McManus *et al.*, 1995). Eine spezielle, im menschlichen Gehirn exprimierte,  $\beta$ -Untereinheit zum Beispiel macht die  $\alpha$ -Untereinheit (Pore) des Kanals resistent für IbTx (Meera *et al.*, 2000). Die Induktion einer Konformationsänderung an einer regulierenden  $\beta$ -Untereinheit wäre ein vorstellbarer Mechanismus, über den Proctolin den IbTx-sensitiven  $K^+$ -Kanal in einen  $Ca^{2+}$ -aktivierbaren Zustand versetzt.  $DF_2$  hat keinen Einfluss auf IbTx-sensitive  $K^+$ -Kanäle (Abbildung 15) und der verstärkte Einwärtsstrom von  $Ca^{2+}$  durch die L-Typ  $Ca^{2+}$ -Kanäle führt hier zu einer verstärkten Depolarisation der Muskelfaser (Weiss *et al.*, 2003).

In zahlreichen Crustaceenmuskeln, zum Beispiel in *Procambarus clarkii* (Bishop *et al.*, 1987), induziert die Applikation von Proctolin alleine keine Kontraktion und auch das Ruhemembranpotenzial wird nicht verändert. Eine Ausnahme ist der Öffnermuskel des Dactylus am Laufbein des Hummers, bei dem Proctolin bei Ruhemembranpotenzial, dessen Wert in dieser Arbeit nicht angegeben wird, eine Kontraktion auszulösen vermag (Schwarz *et al.*, 1980). Eine Kontraktionsauslösung durch die alleinige Applikation von Proctolin konnte auch bei Messungen am Mandibel-Schließermuskel des Insekts *Locusta migratoria* gezeigt werden (Baines und Downer, 1992). Dort vermuten die Autoren, dass die Möglichkeit, eine Proctolin-induzierte Kontraktion auszulösen, stark vom Ruhemembranpotenzial des Muskels abhängig ist. Sie stützen sich darauf, dass wenn ein Proctolin-sensitiver Muskel durch eine geringere  $K^+$ -Konzentration im Bad (von 10 mM auf 1 mM) hyperpolarisiert wurde, keine Proctolin-induzierte Kontraktion mehr ausgelöst werden konnte (Baines und Downer, 1992). Diese Beobachtung erklärt möglicherweise, warum in den meisten Crustaceen Proctolin bei

Ruhemembranpotenzial keine Kontraktionen auslöst, wohl aber bei Insekten. Das Membranpotenzial von Crustaceenmuskeln ist negativer (z.B. bei der Flexormuskulatur des Flusskrebse *Procambarus* zwischen -110 mV und -80 mV; Bishop *et al.*, 1987) als bei den meisten Insekten (z.B. im Coxa Rotator-Muskel in *Locusta migratoria* zwischen -38 mV und -47 mV; Müller *et al.*, 1991).

Die Auslösbarkeit von Kontraktionen allein durch das Neuropeptid Proctolin könnte zum einen abhängig vom langsamen  $\text{Ca}^{2+}$ -Einwärtsstrom sein, der im stomatogastrischen Ganglion (STG) der Krabbe *Cancer borealis* erst bei -70 mV durch Proctolin aktiviert wird (Swensen und Marder, 2000). Zum anderen könnte aber auch die Spannungsabhängigkeit der IbTx-sensitiven Kanäle diese Schwelle bestimmen. Im Flusskrebs *Procambarus clarkii* ist dieser IbTx-sensitive Kanal im Öffnermuskel des Laufbeines – zumindest teilweise – bei einem Membranpotenzial um -60 mV geöffnet (Araque und Buno, 1999). Eine Teilaktivierung des  $\text{Ca}^{2+}$ -aktivierten  $\text{K}^+$ -Kanals im STG des Hummers *Panulirus interruptus* wird ebenfalls unter Ruhemembranpotenzial-Bedingungen vermutet (Kloppenburg *et al.*, 1999).

#### 4.5. Signalkaskaden

Pharmakologisch wurden die Neuromodulatoren Proctolin,  $\text{DF}_2$  und Allatostatin bereits an vielen Modellorganismen untersucht und so ihre physiologischen Wirkungen charakterisiert. Weniger ist bisher bekannt über den intrazellulären Metabolismus und die intrazellulären Signalwege im Anschluss an die Applikation dieser Neuromodulatoren. Erkenntnisse brachten in jüngster Zeit unter anderem molekulare Untersuchungen am Genom der Fruchtfliege *Drosophila melanogaster* (siehe Review Isaac *et al.*, 2004). Dort konnten zum Beispiel für Proctolin einzelne Gene identifiziert werden, die jeweils ein Prepropeptid, einen Proctolin-Rezeptor und Proctolin-degradierende Peptidasen kodieren (Egerod *et al.*, 2003; Johnson *et al.*, 2003; Mazzocco *et al.*, 2003; Taylor *et al.*, 2004). In diesem Genom wurde ein Proctolin-spezifischer Rezeptor identifiziert, der Sequenzhomologie zu Somatostatin/Galanin- und Opioid-Rezeptoren bei Vertebraten aufweist (Egerod *et al.*, 2003; Johnson *et al.*, 2003). Weiterhin sind dort eine Reihe von G-Protein-gekoppelten Rezeptoren für verschiedene FaRPs codiert (Cazzamali und

Grimmelikhuijzen, 2002; Meeusen *et al.*, 2002). In einigen Mollusken-Neuronen nutzen FaRPs die G-Protein-gekoppelte Signaltransduktion zur Aktivierung von nicht-spannungsabhängigen  $K^+$ -Kanälen und der Verringerung der  $Ca^{2+}$ -Leitfähigkeit (Brezina *et al.*, 1987a; Brezina *et al.*, 1987b; Cottrell *et al.*, 1984; Green *et al.*, 1994). Für Allatostatin konnten sowohl ein Preprohormon in *Drosophila* (Lenz *et al.*, 2000b), als auch einige G-Protein-gekoppelte Rezeptoren in *Drosophila melanogaster*, *Periplaneta americana* und in der Seidenraupe *Bombyx mori* identifiziert werden (Auerswald *et al.*, 2001; Birgül *et al.*, 1999; Lenz *et al.*, 2000a; Secher *et al.*, 2001).

Die zahlreichen Hinweise auf G-Protein-gekoppelte Signaltransduktion legen als Effektor für die von Neuromodulatoren ausgelösten Signale das Adenylatzyklase-System nahe. Hinweise für die Wirkung von Allatostatin auf den sekundären Botenstoff cAMP wurden in der Corpora allata der Schabe *Diploptera punctata* gefunden: die Erhöhung von cAMP durch Foskolin oder die Applikation des cAMP-Analogons 8-Bromo-cAMP führen – wie Allatostatin – zu einer Hemmung der Juvenilhormonsynthese (Meller *et al.*, 1985; Rankin *et al.*, 1986). Bei der direkten Messung der cAMP-Konzentration wurde in der Corpora allata der Schabe jedoch keine Veränderung nach der Applikation von unterschiedlichen Allatostatin-Konzentrationen und verschiedenen Applikationszeiten gemessen (Cusson *et al.*, 1992). Auch in der Extensormuskulatur von *Idotea emarginata* verändert sich die cAMP-Konzentration unter Einwirkung von Allatostatin nicht (Fritsche, 2004).

Es gibt Studien, die cAMP als einen möglichen sekundären Botenstoff für die Proctolin-Effekte in Betracht ziehen (Bishop *et al.*, 1991; Evans, 1984; Swales und Evans, 1988). Es gibt cAMP-Agonisten, die in *Idotea* dieselben Effekte wie Proctolin auf Membranprozesse auslösen: die Applikation des membranpermeablen cAMP-Analogons db-cAMP oder von Foskolin verstärken die  $Ca^{2+}$ -Ströme und die Aktivität der  $K^+$ -Kanäle (Erxleben *et al.*, 1995). Darüber hinaus moduliert db-cAMP auch den Eingangswiderstand und die Kraftamplitude strominduzierter Kontraktionen in derselben Weise wie Proctolin (Erxleben *et al.*, 1995). Der PKA-Inhibitor Rp-cAMP reduziert den Eingangswiderstand der Faser und hat so den entgegengesetzten Effekt von Proctolin (Rathmayer *et al.*, 2002b). In direkten Konzentrationsmessungen in der Extensormuskulatur der Meeresassel kann durch Proctolin-Applikation allerdings keine Veränderung der cAMP-Konzentration nachgewiesen werden (Philipp *et al.*, i.V.). Der schnelle Abbau von cAMP durch Phosphodiesterasen (PDE)

wurde in diesen Untersuchungen durch den Inhibitor IBMX verhindert. Auch in anderen Muskeln konnte bei direkten Konzentrationsmessungen keine Proctolin-induzierte Erhöhung der cAMP-Konzentration gefunden werden (Baines und Downer, 1992; Goy *et al.*, 1984; Groome und Watson, 1989; Mazzocco-Manneval *et al.*, 1998). So bewirkt die Proctolin-Applikation auch in der Extensormuskulatur von *Schistocerca gregaria* keine Veränderung der intrazellulären cAMP-Konzentration (Evans und Myers, 1986). In Untersuchungen an *Idotea* mit dem PKA-Hemmstoff H89 wird die Kontraktion verstärkt (Abbildung 8). So könnte sich im Umkehrschluss eine Aktivierung der PKA inhibitorisch auf Kontraktionen dieser Muskeln auswirken. H89 verhindert die Proctolin-induzierte Muskelkraftverstärkung nicht, sondern potenziert den Proctolin Effekt noch (Abbildung 9). Ein Proctolin-aktivierter Einfluss anderer Proteinkinasen auf die PKA könnte Ursache dessen sein.

Auch die Untersuchung mit dem unspezifischen Proteinkinase-Inhibitor H7, der einen inhibitorischen Effekt auf die Erhöhung der  $Ca^{2+}$ -Ströme durch Proctolin hat (Rathmayer *et al.*, 2002b), lässt die Schlussfolgerung zu, dass über andere Proteinkinasen als die PKA die Proctolin-Wirkung vermittelt wird.

So könnte Proctolin über eine andere Proteinkinase wirken (z.B. PKC oder PKG), die auf denselben  $Ca^{2+}$ -Strom konvergiert. Auch bei den vergleichbaren Effekten von Proctolin und db-cAMP auf die  $K^+$ -Kanäle (Erxleben *et al.*, 1995) sind konvergierende Mechanismen verschiedener Signalkaskaden möglich.

Die Untersuchungen über den Wirkmechanismus von Proctolin lassen den Schluss zu, dass der cAMP-PKA-Weg zwar auf einige der von Proctolin beeinflussten zellulären Mechanismen konvergiert, die Proctolin-Wirkung selbst aber nicht über diese Kaskade vermittelt wird.

Mit dem spezifischen Hemmstoff GP Antagonist-2A, der die Signalweiterleitung über die G-Protein- $\alpha$ -Untereinheit  $G_q$  blockiert, wurde der verstärkende Effekt von Proctolin auf die Muskelkontraktion in der Meeresassel vollständig aufgehoben (Abbildung 13). Dieses Ergebnis lässt darauf schließen, dass die Proctolin-Wirkung über einen  $G_q$ -gekoppelten Rezeptor vermittelt wird. Ein Aktivierungsweg für  $G_q$ -Proteine ist der Phospholipase C-Weg (aus Löffler, 2003). Über diesen Signalweg wird die Proteinkinase C (PKC) aktiviert, die ihrerseits in der glatten Muskulatur der Vertebraten die Synthese von cGMP über die Guanylatzyklase hemmt (Jaiswal, 1992). Eine Aktivierung der PKC durch Proctolin wurde bereits im



Ovidukt und in der Springmuskulatur von *Locusta migratoria* (Lange und Nykamp, 1996; Walther *et al.*, 1998), im Darm von *Schistocerca gregaria* (Hinton *et al.*, 1998), im Herzmuskel von *Limulus polyphemus* und nur in Nerven-induzierten, nicht jedoch langanhaltenden, Kontraktionen im Mandibular-Schließer-Muskel von *Locusta migratoria* (Baines und Downer, 1992) gezeigt. Die Kontraktion des Hyperneural-Muskels in der Schabe ist abhängig von der extrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration, und kann sowohl durch Proctolin, als auch über eine PKC-Aktivierung induziert werden (Wegener und Nässel, 2000). In der Vertebraten-Herzmuskulatur wurde gezeigt, dass die Phosphorylierung der L-Typ  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanäle durch PKC die Öffnungswahrscheinlichkeit dieser Kanäle erhöht (Keef *et al.*, 2001).

Um diese Hinweise auf eine Aktivierung der PKC durch Proctolin zu bestätigen, wurde die PKC mit dem spezifischen Hemmstoff BIM-1 blockiert und der verbleibende Proctolin-vermittelte Effekt auf die Kontraktionen analysiert. Die Hemmung der PKC hob den Proctolin-Effekt auf die  $\text{K}^+$ -induzierte Kontraktur auf (Abbildung 10). In der Umkehrung führt eine direkte Aktivierung der PKC mit deren Aktivator PMA zu einem der Proctolin-Wirkung auf die Kraftentwicklung der Extensormuskeln von *Idotea* vergleichbaren Effekt (Abbildung 10). Auch die zuvor beschriebene Sensibilisierung der IbTx-sensitiven  $\text{K}^+$ -Kanäle durch Proctolin ist abhängig von der PKC (Abbildung 11). Die Stimulation dieser Kanäle über cAMP- und cGMP-vermittelte Signalwege wurde auch für die glatte Muskulatur von Vertebraten beschrieben (Zhou *et al.*, 2001).

Diese Befunde zusammengenommen legen die Vermutung nahe, dass Proctolin an einen G-Protein-gekoppelten Rezeptor bindet, und in der Folge über bisher unbekannte Zwischenschritte die PKC aktiviert wird. Auf diese Weise würde die Wirkung des Neuropeptids von der Außenseite der Muskelmembran in das Zellinnere vermittelt.

Die Schlussfolgerung, dass Proctolin die PKC aktiviert, wird gestützt durch die Beobachtung, dass die durch Proctolin induzierte Absenkung der intrazellulären cGMP-Konzentration von der Aktivierung der PKC abhängig ist (Philipp *et al.*, i.V.). Auch in der Muskulatur des Laufbeins der Heuschrecke verringert Proctolin die cGMP-Konzentration signifikant (Goy *et al.*, 1984), und – ähnlich wie in *Idotea* – verringert sich die cGMP-Konzentration nach der Applikation mit Proctolin ( $10^{-6}$  M) im Herzmuskel von *Limulus polyphemus* (Groome und Watson, 1989). Die

Guanylatzyklaseaktivität im Gehirn der Heuschrecke *Locusta migratoria* wurde durch den Einfluss von Proctolin auf 25% verringert (Hiripi *et al.*, 1979).

Der zur Proctolin-Wirkung physiologisch antagonistische Effekt von Allatostatin legt nahe, dass Allatostatin möglicherweise die PKC hemmt. Eine über die Hemmung der PKC vermittelte Wirkung hätte zur Voraussetzung, dass PKC in den Extensormuskeln von *Idotea* eine Grundaktivität aufweist. Dies ist nicht der Fall, da das Blockieren der PKC durch BIM-1 die Kontraktionsamplitude nicht verringert (Abbildung 9). Dennoch wurde durch Allatostatin-Applikation eine signifikante Erhöhung der intrazellulären cGMP-Konzentration erzielt (Fritsche, 2004). cGMP wird direkt durch die Guanylatzyklase (GC) synthetisiert, und möglicherweise besitzt Allatostatin eine aktivierende Wirkung auf dieses Enzym. Die Blockierung der GC mit dem spezifischen Blocker ODQ zeigt allerdings keine Veränderung am Allatostatin-Effekt (Abbildung 19). Vielmehr wird die Allatostatin-induzierte Anreicherung an cGMP durch den PDE-Hemmstoff IBMX verhindert (Fritsche, 2004). Allatostatin wirkt also entgegengesetzt zu Proctolin, indem es den Abbau von cGMP durch die PDE hemmt und so die cGMP-Konzentration erhöht. Eine Erhöhung der cGMP-Konzentration führt in der glatten Muskulatur von Vertebraten zur Relaxation der Muskulatur (Lucas *et al.*, 2000). Dies konnte auch mit dem nicht abbaubaren cGMP-Analogon 8-Bromo-cGMP gezeigt werden. Die so erreichte Erhöhung der cGMP-Konzentration verhindert den Proctolin-Effekt und führt zu einer Muskelkraft-Verringerung (Abbildung 12). In Abbildung 19 erkennt man den gegenteiligen Effekt: Hemmung der Guanylatzyklase und die damit einhergehende Verringerung der cGMP-Konzentration führt zu einer nicht signifikanten, dennoch auffälligen, Erhöhung der Kontraktionskraft (Abbildung 19).

Die Erhöhung der cGMP-Konzentration durch Allatostatin-Applikation (Fritsche, 2004) wirft die Frage auf, wie dieser intrazelluläre Effekt in die Muskelzelle vermittelt wird. Die Hemmung der  $G_i$ - $\alpha$ -Untereinheit mit dem spezifischen Hemmstoff Pertussis Toxin (PerTx) verhindert den Allatostatin-Effekt auf die Muskelkontraktion in *Idotea* (Abbildung 20). Mit diesem Hemmstoff kann auch die Aktivierung des identifizierten Allatostatin-Rezeptors (Birgül *et al.*, 1999) durch verschiedene Allatostatine gehemmt werden (Larsen *et al.*, 2001).

Obwohl die  $G_i$ - $\alpha$ -Untereinheit in vielen Untersuchungen als hemmender Regulator für den Adenylatzyklase-Signalweg beschrieben wird (Löffler, 2003), kann eine

Hemmung des Adenylatzyklase-PKA-Weges analog zum  $\beta$ -adrenergen Rezeptor (Voet und Voet, 1992) ausgeschlossen werden, da Fritsche (2004) keine Allatostatin-abhängige Veränderung an der intrazellulären cAMP-Konzentration nachweisen konnte.

Das FMRFamid DF<sub>2</sub> hat qualitativ eine gleichgerichtete Wirkung wie Proctolin. Eine Signaltransduktion über PKC kann aber für diesen Neuromodulator ausgeschlossen werden, da für die Extensormuskulatur von *Idotea* eine Rekrutierung von Iberiotoxin-sensitiven K<sub>Ca</sub>-Kanälen über die PKC gezeigt werden konnte. Durch die Applikation von DF<sub>2</sub> bleiben diese Kanäle jedoch unbeeinflusst.

Eine große Variabilität der neuromuskulären Effekte konnte sowohl für verschiedene FaRPs in einer Tierart, aber auch für ein einzelnes Peptid in unterschiedlichen Organismen beobachtet werden. Diese weitgestreuten Effekte und intrazellulären Wirkorte von FMRFamiden erschweren die Aufklärung der intrazellulären Signalwege für DF<sub>2</sub> mit physiologischen Methoden *in situ*.

Die in dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen mit NF449 haben in der Extensormuskulatur von *Idotea* ergeben, dass DF<sub>2</sub> an einen G<sub>s</sub>-Protein-gekoppelten Rezeptor bindet beziehungsweise über diesen wirkt (Abbildung 16). In vielen Fällen aktivieren G<sub>s</sub>- $\alpha$ -Untereinheiten das Adenylatzyklase-System (Löffler, 2003). Für DF<sub>2</sub> konnte eine Aktivierung dieses Signalweges hier jedoch nicht bestätigt werden, da der PKA-Hemmstoff H89 die Wirkung von DF<sub>2</sub> nicht verhindert (Abbildung 17). Außerdem würde eine Aktivierung der PKA eine Verminderung der Kontraktionskraft des Extensormuskels erwarten lassen, da die Inhibierung der PKA mit H89 einen kontrakturverstärkenden Effekt zeigte (Abbildung 8).

In der Herzmuskulatur der Vertebraten kann über die Aktivierung der G<sub>s</sub>- $\alpha$ -Untereinheit eine direkte Wirkung auf L-Typ Ca<sup>2+</sup>-Kanäle nachgewiesen werden (Wang *et al.*, 1993). Es wäre also vorstellbar, dass durch DF<sub>2</sub>-Applikation die G<sub>s</sub>- $\alpha$ -Untereinheit des FMRFamid-Rezeptors und durch Allatostatin-Applikation die G<sub>i</sub>- $\alpha$ -Untereinheit des Allatostatin-Rezeptors die L-Typ Ca<sup>2+</sup>-Kanäle direkt und antagonistisch regulieren.

Die physiologisch antagonistischen Effekte der Neuromodulatoren Proctolin und Allatostatin auf die Kontraktionsamplitude der Extensormuskulatur in *Idotea* machen

für Allatostatin über  $G_i$ -gekoppelte Rezeptoren auch einen Guanylatzyklase-unabhängigen Effekt auf Enzyme des PLC-Weges möglich.

Der physiologisch kontrakturverstärkende Effekt von Proctolin ist abhängig von der Aktivierung der  $G_q$ - $\alpha$ -Untereinheit eines G-Protein-gekoppelten Rezeptors. Sowohl die Verstärkung der Muskelkontraktur, als auch die Aktivierung von Iberitoxin-sensitiven  $K_{Ca}$ -Kanälen und die intrazelluläre Verminderung der cGMP-Konzentration durch Proctolin, sind Proteinkinase C-abhängig. Dies legt die Schlussfolgerung nahe, dass Proctolin über einen  $G_q$ -gekoppelten Rezeptor, wie für die  $G_q$ - $\alpha$ -Untereinheit in anderen Organismen häufig gezeigt (Löffler, 2003), die PKC-Aktivierung über eine Aktivierung der Phospholipase C induziert.

## 5. ZUSAMMENFASSUNG

---

Das Verständnis über die Wirkungsweise der Neuromodulatoren und ihre physiologische Rolle in Arthropoden ist durch die Identifikation und Charakterisierung von zahlreichen spezifischen Rezeptoren über Genomalysen und molekulare Techniken in jüngster Zeit enorm erweitert worden. Die zahlreichen bisher entdeckten Signalwege in der Muskelzelle öffnen ein weites Spektrum an möglichen Angriffspunkten für Neuromodulatoren.

Der Neuromodulator Proctolin verringert in der Extensormuskulatur von *Idotea emarginata* die intrazelluläre cGMP-Konzentration (Philipp *et al.*, i.V.). Daneben erhöht Proctolin den spannungsabhängigen Einstrom an extrazellulärem  $\text{Ca}^{2+}$  durch die L-Typ  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanäle, schließt spannungsabhängige  $\text{K}^+$ -Kanäle und verstärkt resultierend die Muskelkraftentwicklung (Erleben *et al.*, 1995; Erleben und deSantis, 1998).

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass Proctolin die  $\text{K}^+$ -induzierte Muskelkontraktur verstärkt, ohne dabei die  $\text{K}^+$ -induzierte Depolarisation zu beeinflussen. Der L-Typ  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanal ist an der  $\text{K}^+$ -induzierten Kontraktur beteiligt, da eine Hemmung dieses Kanals mit einem spezifischen Inhibitor die Muskelkraft in Folge der  $\text{K}^+$ -induzierten Depolarisation verändert.

Außerdem wurde festgestellt, dass die Wirkung von Proctolin über einen G-Proteingekoppelten Rezeptor mit einer  $\text{G}_q$ - $\alpha$ -Untereinheit vermittelt wird; die Hemmung dieses Rezeptors verhindert die Proctolin-induzierte Verstärkung der Muskelkraft. Über die Bindung von Proctolin an diesen Rezeptor wird offenbar die Proteinkinase C aktiviert und so werden auch  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängige, Iberiotoxin-sensitive  $\text{K}^+$ -Kanäle rekrutiert; die Blockierung der Proteinkinase C durch einen spezifischen Hemmstoff unterbindet sowohl die  $\text{K}^+$ -induzierte Muskelkraftverstärkung, als auch die Aktivierbarkeit der Iberiotoxin-sensitiven Kanäle durch  $\text{Ca}^{2+}$ .

Die Proteinkinase C hemmt im aktivierten Zustand die Guanylatzyklase und in Folge verringert sich die cGMP-Konzentration in der Muskelzelle (Jaiswal, 1992), was im Ergebnis in eine Verstärkung der Muskelkraft mündet. In dieser Arbeit wurde dies insofern bestätigt, als dass eine Verminderung der Muskelkraft durch die Erhöhung

der intrazellulären cGMP-Konzentration mit einem membrangängigen cGMP-Analogen induziert werden konnte.

Der inhibitorisch wirkende Neuromodulator Allatostatin reduziert die intrazelluläre cGMP-Konzentration in der Extensormuskulatur von *Idotea* (Fritsche, 2004).

In dieser Arbeit wird gezeigt, dass Allatostatin über einen G<sub>i</sub>-Protein-gekoppelten Rezeptor die K<sup>+</sup>-induzierte Muskelkraftentwicklung verringert, da das Blockieren dieses Rezeptors die Allatostatin-Wirkung aufhebt. Die Hemmung der Guanylatzyklase hat keinen Einfluss auf die Allatostatin-induzierte Verringerung der Muskelkontraktur. Daher kann man davon ausgehen, dass der Anstieg der intrazellulären cGMP-Konzentration (Fritsche, 2004) über eine verminderte Aktivität der Phosphodiesterase vermittelt wird.

Das FMRFamid-verwandte Peptid DF<sub>2</sub> erhöht in der Extensormuskulatur von *Idotea emarginata* den Einstrom an extrazellulärem Ca<sup>2+</sup>, verstärkt die K<sup>+</sup>-induzierte Kontraktur und induziert eine Depolarisation der Muskelfibrillenmembran (Weiss *et al.*, 2003). In den Untersuchungen dieser Arbeit konnte durch simultane Messungen von Kontraktur und Depolarisation gezeigt werden, dass durch DF<sub>2</sub> zeitgleich zur Erhöhung der K<sup>+</sup>-induzierten Kontraktion auch die K<sup>+</sup>-induzierte Depolarisation ansteigt. Im Gegensatz zu Proctolin rekrutiert DF<sub>2</sub> offenbar nicht die Iberiotoxin-sensitiven K<sup>+</sup>-Kanäle.

Die Inhibierung von G-Protein-gekoppelten Rezeptoren mit G<sub>s</sub>-α-Untereinheit unterbindet die potenzierende Wirkung von DF<sub>2</sub> auf die Muskelkontraktur; dies lässt vermuten, dass DF<sub>2</sub> über die Bindung an diese Rezeptoren seinen physiologischen Effekt vermittelt.

---

## 6. ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

---

°C	Grad Celsius
µl	Mikro-Liter
µN	Mikro-Newton
ADP	Adenosindiphosphat
AST	Allatostatin
AST-ir	Allatostatin-immunoreaktive
ASW	artificial sea water, engl.: künstliches Meerwasser
ATP	Adenosintriphosphat
ATPase	Adenosintriphosphat-Phosphatase
BIM-1	Bisindolylmaleimid 1
ca.	zirka
Ca <sup>2+</sup>	Kalzium
cAMP	zyklisches Adenosinmonophosphat
cGMP	zyklisches Guanosinmonophosphat
db-cAMP	Dibutyryl-zyklisches Adenosinmonophosphat
DAG	Diazylglyzerin
DMSO	Dimethylsulfoxid
EPSP	exzitatorisches postsynaptisches Potenzial
et al.	und andere
FaRPs	FMRFamid-verwandte Peptide
GABA	γ(gamma)-Aminobuttersäure
GDP	Guanosindiphosphat
GMRP	Guaninnucleotide-releasing-Proteins
GTP	Guanosintriphosphat
IBMX	3-Isobutyl-1-methylxanthin
IbTx	Iberiotoxin
IP <sub>3</sub>	Inositol-1,4,5-triphosphat
i.V.	in Vorbereitung
K <sup>+</sup>	Kalium
KCl	Kaliumchlorid
kd	Kilo-Dalton

l	Liter
M	Mol pro Liter
mg	Milligramm
Mg <sup>2+</sup>	Magnesium
MgCl <sub>2</sub>	Magnesiumchlorid
min	Minute
mLC	leichte Myosinketten
mm	Millimeter
mV	Millivolt
NaCl	Natriumchlorid
PDE	Phosphodiesterase
PerTx	Pertussis Toxin
P <sub>i</sub>	Phosphat
PIP <sub>2</sub>	Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat
PK	Proteinkinase (PKA, PKC, PKG)
PL	Phospholipase (PLC, PLD)
PMA	Phorbol-12-Myristate-13-Acetate
Proc	Proctolin
Rp-cAMP	zyklisches Adenosinmonophosphothioat
SR	sarkoplasmatisches Retikulum
STG	stomatogastrisches Ganglion
vgl.	vergleiche
z.B.	zum Beispiel
ZNS	Zentral-Nervensystem



---

## 7. ABBILDUNGSVERZEICHNIS

---

- Abbildung 1:** Meeresassel *Idotea emarginata* (Foto: Dr. Berit Philipp)..... 18
- Abbildung 2:** Versuchsaufbau der Kontraktionsmessungen (modifiziert, nach Weiss *et al.*, 2001) **A** Es wurde die Faser 2 des 2. Pleonsegmentes verwendet (Ansicht einer *Idotea* von dorsal) **B** Schematische Darstellung des Perfusionsbads und der verwendeten Messinstrumente..... 23
- Abbildung 3:** Zeitlicher Ablauf und Konzentrationsverteilung der Superfusion im Bad. **A** Veränderung des pH-Wertes über die Zeit. Nach dem Wechsel der ASW-Lösung von pH 7,4 auf pH 10. **B** Ausbreitung einer Bromphenolblau-Lösung im Bad..... 26
- Abbildung 4:** Der L-Typ  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanal Blocker Nifedipin bewirkt zunächst eine Verstärkung, nach 100 min Einwirkung eine Reduzierung der  $\text{K}^{+}$ -induzierten Kontraktur der Extensormuskeln. **A**  $\text{K}^{+}$ -induzierte Kontraktur: Kontrollkontraktur, unterschiedliche Einwirkzeiten (10, 30, 60 und 100 min) für Nifedipin und eine Kontrolle nach 30 min waschen mit ASW. **B** Beispiel für den gleich bleibenden Verlauf der  $\text{K}^{+}$ -induzierten Depolarisation in dem gezeigten Einzelexperiment. **C** Zeitlicher Verlauf der Nifedipin-Wirkung auf die  $\text{K}^{+}$ -induzierte Kontraktur..... 30
- Abbildung 5:** Proctolin (Proc) verstärkt die  $\text{K}^{+}$ -induzierte Kontraktur isolierter Extensormuskelfasern von *Idotea*: **A** Originalaufzeichnung eines Einzelexperimentes mit gleichzeitiger Aufzeichnung von Kontraktur und Depolarisation: unter Kontrollbedingungen, in der Anwesenheit von Proctolin und nach dem Auswaschen für 30 min. Die Kontrolle repräsentiert eine von drei Kontrakturen vor der Peptid-Applikation. **B** Zusammenfassung der Kraftentwicklung von 8 normalisierten unabhängigen Einzelergebnissen; **C** Zusammenfassung der Depolarisation ( $\Delta V_m$ ) von 8 normalisierten unabhängigen Einzelergebnissen..... 32
- Abbildung 6:** Iberiotoxin (IbTx) erhöht nach der Einwirkung von Proctolin (Proc) den Membranwiderstand ( $R_i$ ) der Muskelfaser von *Idotea*. **A** beispielhaftes Einzelexperiment mit Strominjektion (I) und Spannungsantwort ( $\Delta V_m$ ) in Anwesenheit von Proctolin, vor und unter der Einwirkung von Iberiotoxin. **B** Zusammenfassung des Membranwiderstandes ( $R_i$ ) von 10 normalisierten unabhängigen Einzelergebnissen ohne Proctolin, vor und unter der Einwirkung von Iberiotoxin. **C** Strom-Spannungs-Kurve mit Proctolin vor (○) und unter (●) der Einwirkung von Iberiotoxin. **D** Zusammenfassung des Membranwiderstandes ( $R_i$ ) von 10 normalisierten unabhängigen Einzelergebnissen mit Proctolin vor und unter der Einwirkung von Iberiotoxin.. 34
- Abbildung 7:** Proctolin (Proc) verstärkt gleichzeitig die  $\text{K}^{+}$ -induzierte Depolarisation ( $\Delta V_m$ ) und die Kontraktur (Kraftentwicklung) isolierter Muskelfasern nach der Einwirkung des  $\text{K}_{\text{Ca}}$ -Kanal-Blockers Iberiotoxin (IbTx). **A** Originalaufzeichnung eines Einzelexperimentes; Kontraktur und Depolarisation gleichzeitig aufgezeichnet: unter Kontrollbedingungen und in der Anwesenheit von Iberiotoxin und Proctolin; **B** Zusammenfassung der Depolarisation ( $\Delta V_m$ ) der 7 normalisierten unabhängigen Einzelexperimente. **C** Zusammenfassung der Kraftentwicklung der 4 normalisierten unabhängigen Einzelexperimente..... 35
-

- Abbildung 8:** Der spezifische PKA-Hemmstoff H89 bewirkt eine Verstärkung des Proctolin (Proc)-Effektes auf den Extensormuskel von *Idotea* und H89 alleine verstärkt die K<sup>+</sup>-induzierte Kontraktur: Zusammenfassung der normalisierten, unabhängigen Einzelerperimente unter Kontrollbedingungen, mit der Einwirkung von Proctolin (N=8), mit der Einwirkung von Proctolin in Anwesenheit von H89 (N=4) und mit H89 alleine (N=6). ..... 36
- Abbildung 9:** Die Applikation des PKC-Hemmstoffes BIM-1 beeinflusst die K<sup>+</sup>-induzierte Kontraktur nicht. Zusammenfassung von jeweils vier normalisierten unabhängigen Einzelkontrakturen mit den BIM-1-Konzentrationen 10<sup>-6</sup> M, 10<sup>-7</sup> M, 10<sup>-8</sup> M, 10<sup>-9</sup> M und 10<sup>-10</sup> M. .... 37
- Abbildung 10:** Die Proctolin (Proc)-induzierte Verstärkung der Muskel-spannung in der Extensormuskulatur von *Idotea* wird durch den PKC-Inhibitor BIM-1 verhindert. Die Applikation von PMA ahmt den kontrakturverstärkenden Effekt von Proctolin nach: Zusammenfassung der normalisierten unabhängigen Einzelerperimente unter Kontrollbedingungen, unter Einwirkung von Proctolin (N=8), unter Einwirkung von Proctolin in Anwesenheit von BIM-1 (N=5) und in Anwesenheit von PMA (N=7)..... 38
- Abbildung 11:** Die Blockierung der PKC mit BIM-1 verhindert die Rekrutierung von Iberiotoxin-sensitiven Kanälen: Zusammenfassung des Membranwiderstandes (R<sub>i</sub>) von 5 normalisierten unabhängigen Einzel-experimenten mit Proctolin (Proc) unter Einwirkung des PKC-Hemmstoffes BIM-1 vor und mit der Applikation von Iberiotoxin (IbTx)..... 39
- Abbildung 12:** Die Applikation von 8-Bromo-cGMP reduziert die K<sup>+</sup>-induzierte Kontraktur und wirkt dem kontrakturverstärkenden Effekt von Proctolin (Proc) entgegen: Zusammenfassung der normalisierten unabhängigen Einzelerperimente unter Kontrollbedingungen, mit der Einwirkung von Proctolin (N=8), mit der Einwirkung von Proctolin in Anwesenheit von 8-Bromo-cGMP (N=8) und 8-Bromo-cGMP alleine (N=8). .... 40
- Abbildung 13:** Die Proctolin (Proc)-induzierte Verstärkung der Muskel-spannung in der Extensormuskulatur von *Idotea* kann durch das Blocken des G<sub>q</sub>-Proteins verhindert werden. Zusammenfassung der Kraftentwicklung von normalisierten unabhängigen Einzelerperimenten: Kontrolle, Proctolin (N=8), mit GP Antagonist-2A (GP Ant-2A) und Proctolin (N=5), sowie mit GP Antagonist-2A alleine (N=5). ..... 41
- Abbildung 14:** DF<sub>2</sub> verstärkt die K<sup>+</sup>-induzierte Kontraktur isolierter Extensormuskelfasern von *Idotea*: A Originalaufzeichnung eines Einzelerperimentes; Kontraktur und Depolarisation gleichzeitig aufgezeichnet: unter Kontrollbedingungen, in der Anwesenheit von DF<sub>2</sub> und nach dem Auswaschen für 30 min. Die Kontrolle repräsentiert eine von drei Kontrakturen vor der Peptid-Applikation. B Zusammenfassung der Kraftentwicklung von 8 normalisierten unabhängigen Einzelergebnissen; C Zusammenfassung der Depolarisation (ΔV<sub>m</sub>) von 8 normalisierten unabhängigen Einzelergebnissen... 44

- Abbildung 15:** Iberiotoxin (IbTx) erhöht nach der Einwirkung von DF<sub>2</sub> den Membranwiderstand (R<sub>i</sub>) der Muskelfaser von *Idotea* nicht: Zusammenfassung des Membranwiderstandes (R<sub>i</sub>) von 6 normalisierten unabhängigen Einzelergebnissen mit Proctolin vor und unter der Einwirkung von Iberiotoxin..... 45
- Abbildung 16:** Die DF<sub>2</sub>-induzierte Potenzierung der Muskelkraftentwicklung und Depolarisation der Extensormuskulatur von *Idotea* kann durch das Blocken des G<sub>s</sub>-Proteins verhindert werden: **A** Zusammenfassung der Kraftentwicklung von jeweils 3 normalisierten unabhängigen Einzelerperimenten unter Kontrollbedingungen, während der Applikation von DF<sub>2</sub> und NF449 und während der Applikation von NF449 allein. **B** Zusammenfassung der Depolarisation ( $\Delta V_m$ ) von jeweils 3 normalisierten unabhängigen Einzelerperimenten unter Kontrollbedingungen, während der Applikation von DF<sub>2</sub> und NF449 und während der Applikation von NF449 allein..... 46
- Abbildung 17:** Die DF<sub>2</sub>-induzierte Potenzierung der Muskelkraft und Depolarisation der Extensormuskulatur von *Idotea* kann durch die Hemmung der PKA nicht verhindert werden: **A** Zusammenfassung der Kraftentwicklung von jeweils 3 normalisierten unabhängigen Einzelerperimenten unter Kontrollbedingungen, während der gemeinsamen Applikation von DF<sub>2</sub> und H89 und nach 30 min Auswaschen. **B** Zusammenfassung der Depolarisation ( $\Delta V_m$ ) von jeweils 3 normalisierten unabhängigen Einzelerperimenten unter Kontrollbedingungen, während der Applikation von DF<sub>2</sub> und H89 und nach 30 min Waschen..... 48
- Abbildung 18:** Allatostatin (AST) vermindert die K<sup>+</sup>-induzierte Kontraktur isolierter Extensormuskelfasern von *Idotea*: **A** Originalaufzeichnung eines Einzelerperimentes; Kontraktur und Depolarisation gleichzeitig aufgezeichnet: unter Kontrollbedingungen, in der Anwesenheit von Allatostatin und nach dem Auswaschen für 30 min. Die Kontrolle repräsentiert eine von drei Kontrakturen vor der Peptid-Applikation. **B** Zusammenfassung der Kraftentwicklung von 8 normalisierten unabhängigen Einzelergebnissen. **C** Zusammenfassung des Membranpotenzials ( $\Delta V_m$ ) von 5 normalisierten unabhängigen Einzelergebnissen. .... 49
- Abbildung 19:** Die Allatostatin (AST)-induzierte Verringerung der Amplitude der K<sup>+</sup>-induzierten Kontraktur in der Extensormuskulatur von *Idotea* kann durch die Hemmung der GC mit dem spezifischen Hemmstoff ODQ nicht verhindert werden: Zusammenfassung der Kraftentwicklung von normalisierten unabhängigen Einzel-experimenten: unter Kontrollbedingungen, mit Allatostatin (N=8), mit Allatostatin in der Anwesenheit von ODQ (N=7), sowie mit dem GC-Hemmstoff ODQ allein (N=7)..... 50
- Abbildung 20:** Die Allatostatin (AST)-induzierte Verminderung der Muskelkraft in der Extensormuskulatur von *Idotea* kann durch das Blocken des G<sub>i</sub>-Proteins durch den spezifischen Inhibitor Pertussis Toxin (PerTx) verhindert werden. Zusammenfassung der Kraftentwicklung von normalisierten unabhängigen Einzelerperimenten: Kontrolle, Allatostatin (N=8), mit Pertussis Toxin (PerTx) und Allatostatin (AST) (N=3), sowie mit dem G<sub>i</sub>-Protein-Inhibitor Pertussis Toxin (N=3) alleine. .... 52

---

## 8. LITERATURVERZEICHNIS

---

- Adams, M. E. and O'Shea, M. (1983). Peptide cotransmitter at a neuromuscular junction. *Science* **221**, 286-289.
- Araque, A. and Buno, W. (1999). Fast BK-type channel mediates the Ca(2+)-activated K(+) current in crayfish muscle. *J.Neurophysiol.* **82**, 1655-1661.
- Araque, A., Marchand, A., and Buno, W. (1998). Voltage-gated and Ca<sup>2+</sup>-activated conductances mediating and controlling graded electrical activity in crayfish muscle. *J.Neurophysiol.* **79**, 2338-2344.
- Ashley, C. C. and Ridgway, E. B. (1970). On the relationships between membrane potential, calcium transient and tension in single barnacle muscle fibres. *J.Physiol.* **209**, 105-130.
- Askwith, C. C., Cheng, C., Ikuma, M., Benson, C., Price, M. P., and Welsh, M. J. (2000). Neuropeptide FF and FMRFamide potentiate acid-evoked currents from sensory neurons and proton-gated DEG/ENaC channels. *Neuron* **26**, 133-141.
- Atwater, I., Rojas, E., and Vergara, J. (1974). Calcium influxes and tension development in perfused single barnacle muscle fibres under membrane potential control. *J.Physiol.* **243**, 523-551.
- Auerswald, L., Birgul, N., Gade, G., Kreienkamp, H. J., and Richter, D. (2001). Structural, functional, and evolutionary characterization of novel members of the allatostatin receptor family from insects. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* **282**, 904-909.
- Baines, R. A. and Downer, R. G. H. (1992). Comparative studies on the mode of action of proctolin and phorbol-12,13-dibutyrate in their ability to contract the locust mandibular closer muscle. *Arch.Insect Biochem.Physiol.* **20**, 215-229.
- Bartos, M., Allgauer, C., Eckert, M., and Honegger, H. W. (1994). The antennal motor system of crickets: proctolin in slow and fast motoneurons as revealed by double labelling. *Eur.J.Neurosci.* **6**, 825-836.

- 
- Bauer, C. K. (1991). Modulatory action of proctolin in the locust (*Locusta migratoria*) antennal motor system. *J.Insect Physiol.* **37**, 663-673.
- Bellés, X., Maestro, J.-L., Piulachs, M.-D., Johnsen, A. H., Duve, H., and Thorpe, A. (1994). Allatostatic neuropeptides from the cockroach *Blattella germanica* (L.) (Dictyoptera, Blattellidae). Identification, immunolocalization and activity. *Regul.Pept.* **53**, 237-247.
- Birgül, N., Weise, C., Kreienkamp, H. J., and Richter, D. (1999). Reverse physiology in drosophila: identification of a novel allatostatin-like neuropeptide and its cognate receptor structurally related to the mammalian somatostatin/galanin/opioid receptor family. *EMBO J.* **18**, 5892-5900.
- Bishop, C. A., Krouse, M. E., and Wine, J. J. (1991). Peptide cotransmitter potentiates calcium channel activity in crayfish skeletal muscle. *J.Neurosci.* **11**, 269-276.
- Bishop, C. A., Wine, J. J., Nagy, F., and O'Shea, M. R. (1987). Physiological consequences of a peptide cotransmitter in a crayfish nerve-muscle preparation. *J.Neurosci.* **7**, 1769-1779.
- Bishop, C. A., Wine, J. J., and O'Shea, M. (1984). Neuropeptide proctolin in postural motoneurons of the crayfish. *J.Neurosci.* **4**, 2001-2009.
- Braun, K., Rettinger, J., Ganso, M., Kassack, M., Hildebrandt, C., Ullmann, H., Nickel, P., Schmalzing, G., and Lambrecht, G. (2001). NF449: a subnanomolar potency antagonist at recombinant rat P2X1 receptors. *Naunyn Schmiedebergs Arch.Pharmacol.* **364**, 285-290.
- Brezden, B. L., Benjamin, P. R., and Gardner, D. L. (1991). The peptide FMRFamide activates a divalent cation-conducting channel in heart muscle cells of the snail *Lymnea stagnalis*. *J.Physiol.(Lond.)* **443**, 727-738.
- Brezina, V., Eckert, R., and Erxleben, C. (1987a). Modulation of potassium conductances by an endogenous neuropeptide in neurons of *Aplysia californica*. *J.Physiol.(Lond.)* **382**, 267-290.
-

- Brezina, V., Eckert, R., and Erxleben, C. (1987b). Suppression of calcium current by an endogenous neuropeptide in neurons of *Aplysia californica*. *J.Physiol.(Lond.)* **388**, 565-595.
- Brown, B. E. (1967). Neuromuscular transmitter substance in insect visceral muscle. *Science* **155**, 595-597.
- Brown, B. E. and Starrat, A. N. (1975). Isolation of proctolin, a myotropic peptide, from *Periplaneta americana*. *J.Insect Physiol.* **21**, 1879-1881.
- Brüstle, B., Kreissl, S., Mykles, D. L., and Rathmayer, W. (2001). The neuropeptide proctolin induces phosphorylation of a 30 kDa protein associated with the thin filament in crustacean muscle. *J.Exp.Biol.* **204**, 2627-2635.
- Bullard, B., Dabrowska, R., and Winkelman, L. (1973). The contractile and regulatory proteins of insect flight muscle. *Biochem.J.* **135**, 277-286.
- Cazzamali, G. and Grimmelikhuijzen, C. J. (2002). Molecular cloning and functional expression of the first insect FMRFamide receptor. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **99**, 12073-12078.
- Chijiwa, T., Mishima, A., Hagiwara, M., Sano, M., Hayashi, K., Inoue, T., Naito, K., Toshioka, T., and Hidaka, H. (1990). Inhibition of forskolin-induced neurite outgrowth and protein phosphorylation by a newly synthesized selective inhibitor of cyclic AMP-dependent protein kinase, N-[2-(p-bromocinnamylamino)ethyl]-5-isoquinolinesulfonamide (H-89), of PC12D pheochromocytoma cells. *J.Biol.Chem.* **265**, 5267-5272.
- Christie, A. E., Skiebe, P., and Marder, E. (1995). Matrix of neuromodulators in neurosecretory structures of the crab *Cancer borealis*. *J.Exp.Biol.* **198**, 2431-2439.
- Cook, B. J. and Holman, G. M. (1980). Activation of potassium depolarized visceral muscles by proctolin and caffeine in the cockroach *Leucophaea maderae*. *Comp Biochem.Physiol.C.* **67C**, 115-120.

- Cottrell, G. A., Davies, N. W., and Green, K. A. (1984). Multiple actions of a molluscan cardioexcitatory neuropeptide and related peptides on identified *Helix* neurons. *J.Physiol.(Lond.)* **356**, 315-333.
- Cropper, E. C., Brezina, V., Vilim, F. S., Harish, O., Price, D. A., Rosen, S., Kupfermann, I., and Weiss, K. R. (1994). FRF peptides in the ARC neuromuscular system of *Aplysia*: purification and physiological actions. *J.Neurophysiol.* **72**, 2181-2195.
- Croxton, T. L., Lande, B., and Hirshman, C. A. (1998). Role of G proteins in agonist-induced Ca<sup>2+</sup> sensitization of tracheal smooth muscle. *Am.J.Physiol.* **275**, L748-L755.
- Cusson, M., Yagi, K. J., Guan, X. C., and Tobe, S. S. (1992). Assessment of the role of cyclic nucleotides in allatostatin-induced inhibition of juvenile hormone biosynthesis in *Diploptera punctata*. *Mol.Cell Endocrinol.* **89**, 121-125.
- Davis, N. T., Veenstra, J. A., Feyereisen, R., and Hildebrand, J. G. (1997). Allatostatin-like-immunoreactive neurons of the tobacco hornworm, *Manduca sexta*, and isolation and identification of a new neuropeptide related to cockroach allatostatins. *J.Comp.Neurol.* **385**, 265-284.
- Ding, Q., Donly, B. C., Tobe, S. S., and Bendena, W. G. (1995). Comparison of the allatostatin neuropeptide precursors in the distantly related cockroaches *Periplaneta americana* and *Diploptera punctata*. *Eur.J.Biochem.* **234**, 737-746.
- Dircksen, H., Skiebe, P., Abel, B., Agricola, H., Buchner, K., Muren, J. E., and Nassel, D. R. (1999). Structure, distribution, and biological activity of novel members of the allatostatin family in the crayfish *Orconectes limosus*. *Peptides* **20**, 695-712.
- Donly, B. C., Ding, Q., Tobe, S. S., and Bendena, W. G. (1993). Molecular cloning of the gene for the allatostatin family of neuropeptides from the cockroach *Diploptera punctata*. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **90**, 8807-8811.

- Dudel, J., Menzel, R., and Schmidt, R. F. (2001). Neurowissenschaft. Springer Verlag: Berlin.
- Duve, H., East, P. D., and Thorpe, A. (1999). Regulation of lepidopteran foregut movement by allatostatins and allatotropin from the frontal ganglion. *J.Comp Neurol.* **413**, 405-416.
- Duve, H., Johnsen, A. H., Maestro, J. L., Scott, A. G., Crook, N., Winstanley, D., and Thorpe, A. (1997a). Identification, tissue localisation and physiological effect in vitro of a neuroendocrine peptide identical to a dipteran Leu-callatostatin in the codling moth *Cydia pomonella* (Tortricidae: Lepidoptera). *Cell Tissue Res.* **289**, 73-83.
- Duve, H., Johnsen, A. H., Maestro, J. L., Scott, A. G., East, P. D., and Thorpe, A. (1996). Identification of the dipteran Leu-callatostatin peptide family: The pattern of precursor processing revealed by isolation studies in *Calliphora vomitoria*. *Regul.Pept.* **67**, 11-19.
- Duve, H., Johnsen, A. H., Maestro, J. L., Scott, A. G., Jaros, P. P., and Thorpe, A. (1997b). Isolation and identification of multiple neuropeptides of the allatostatin superfamily in the shore crab *Carcinus maenas*. *Eur.J.Biochem.* **250**, 727-734.
- Duve, H., Johnsen, A. H., Maestro, J. L., Scott, A. G., Winstanley, D., Davey, M., East, P. D., and Thorpe, A. (1997c). Lepidopteran peptides of the allatostatin superfamily. *Peptides* **18**, 1301-1309.
- Duve, H., Johnsen, A. H., Scott, A. G., East, P., and Thorpe, A. (1994). [Hyp<sup>3</sup>]Met-callatostatin. Identification and biological properties of a novel neuropeptide from the blowfly *Calliphora vomitoria*. *J.Biol.Chem.* **269**, 21059-21066.
- Duve, H., Johnsen, A. H., Scott, A. G., and Thorpe, A. (1995). Isolation, identification and functional significance of [Hyp<sup>2</sup>]Met-callatostatin and des Gly-Pro Met-callatostatin, two further post-translational modifications of the blowfly neuropeptide Met-callatostatin. *Regul.Pept.* **57**, 237-245.



- Duve, H., Johnsen, A. H., Scott, A. G., Yu, C. G., Yagi, K. J., Tobe, S. S., and Thorpe, A. (1993). Callatostatins: neuropeptides from the blowfly *Calliphora vomitoria* with sequence homology to cockroach allatostatins. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **90**, 2456-2460.
- Duve, H. and Thorpe, A. (1994). Distribution and functional significance of Leu-callatostatins in the blowfly *Calliphora vomitoria*. *Cell Tissue Res.* **276**, 367-379.
- Ebashi, S., Maruyama, K., and Endo, M. (1980). *Muscle Contraction: Its Regulatory Mechanisms*. Springer Verlag: New York.
- Eckert, R., Randall, D., Burggren, W., and French, K. (2000). *Tierphysiologie*. 3. Auflage, Georg Thieme Verlag: Stuttgart, New York.
- Egerod, K., Reynisson, E., Hauser, F., Williamson, M., Cazzamali, G., and Grimmelikhuijzen, C. J. (2003). Molecular identification of the first insect proctolin receptor. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* **306**, 437-442.
- Erxleben, C. F. and deSantis, A. (1998). Properties of the calcium current in crustacean muscle and modulation by proctolin through activation of second messenger pathways. 26.Göttingen Neurobiol.Conf. **205**. Georg Thieme Verlag: Stuttgart.
- Erxleben, C. F., deSantis, A., and Rathmayer, W. (1995). Effects of proctolin on contractions, membrane resistance, and non-voltage-dependent sarcolemmal ion channels in crustacean muscle fibers. *J.Neurosci.* **15**, 4356-4369.
- Erxleben, C. F. and Rathmayer, W. (1997). A dihydropyridine-sensitive voltage-dependent calcium channel in the sarcolemmal membrane of crustacean muscle. *J.Gen.Physiol* **109**, 313-326.
- Evans, P. D. (1984). Studies on the mode of action of octopamine, 5-hydroxytryptamine and proctolin on a myogenic rhythm in the locust. *J.Exp.Biol.* **110**, 231-251.
- Evans, P. D. and Myers, C. M. (1986). Peptidergic and aminergic modulation of insect skeletal muscle. *J.Exp.Biol.* **124**, 143-176.

- Facciponte, G., Miksys, S., and Lange, A. B. (1996). The association of proctolin with a ventral abdominal muscle of *Locusta migratoria*. *J.Comp Physiol A* **178**, 269-278.
- Florey, E. (1967). Neurotransmitters and modulators in the animal kingdom. *Fed.Proc.* **26**, 1164-1178.
- Friedrich, R. W., Molnar, G. F., Schiebe, M., and Mercier, A. J. (1998). Protein kinase C is required for long-lasting synaptic enhancement by the neuropeptide DRNFLRFamide in crayfish. *J.Neurophysiol.* **79**, 1127-1131.
- Friedrich, R. W., Quigley, P. A., Srivastava, M., Skerrett, M., and Mercier, A. J. (1994). Temperature dependence of synaptic modulation by a FMRFamide-related neuropeptide in crayfish. *Neurosci.Lett.* **169**, 56-58.
- Fritsche, D. (2004). Untersuchungen zur Wirkungsweise von Neuromodulatoren auf intrazelluläre Signalwege in Crustaceen. Diplomarbeit an der Universität Konstanz.
- Gäde, G., Hoffmann, K. H., and Spring, J. H. (1997). Hormonal regulation in insects: Facts, gaps, and future directions. *Physiol.Rev.* **77**, 963-1032.
- Gainer, H. (1968). The role of calcium in excitation-contraction coupling of lobster muscle. *J.Gen.Physiol.* **52**, 88-110.
- Garcia, M. L., Galvez, A., Garcia-Calvo, M., King, V. F., Vazquez, J., and Kaczorowski, G. J. (1991). Use of toxins to study potassium channels. *J.Bioenerg.Biomembr.* **23**, 615-646.
- Golowasch, J. and Marder, E. (1992). Proctolin activates an inward current whose voltage dependence is modified by extracellular  $Ca^{2+}$ . *J.Neurosci.* **12**, 810-817.
- Goy, M. F., Schwarz, T. L., and Kravitz, E. A. (1984). Serotonin-induced protein phosphorylation in a lobster neuromuscular preparation. *J.Neurosci.* **4**, 611-626.

- Green, K. A., Falconer, S. W., and Cottrell, G. A. (1994). The neuropeptide Phe-Met-Arg-Phe-NH<sub>2</sub> (FMRFamide) directly gates two ion channels in an identified Helix neurone. *Pflugers Arch.* **428**, 232-240.
- Greenberg, M. J. and Price, D. A. (1992). Relationships among the FMRFamide-like peptides. *Prog.Brain Res.* **92**, 25-37.
- Groome, J. R. and Watson, W. H. (1989). Second-messenger systems underlying amine and peptide actions on cardiac muscle in the horseshoe crab *Limulus polyphemus*. *J.Exp.Biol.* **145**, 419-437.
- Haydon, P. G., Man-Son-Hing, H., Doyle, R. T., and Zoran, M. (1991). FMRFamide modulation of secretory machinery underlying presynaptic inhibition of synaptic transmission requires a pertussis toxin-sensitive G-protein. *J.Neurosci.* **11**, 3851-3860.
- Hille, B. (2001). Ion channels of excitable membranes. 3. Auflage, Sinauer Assoc.: Sunderland, Mass.
- Hinton, J. M., Nejad, M., Issberner, J. P., Hancock, J. T., and Osborne, R. H. (1998). Muscarinic acetylcholine and proctolin receptors in the foregut of the locust *Schistocerca gregaria*: role of inositol phosphates, protein kinase C and calcium in second messenger effects. *Insect Biochem.Mol.Biol.* **28**, 331-343.
- Hiripi, L., Rozsa, K. S., and Miller, T. A. (1979). The effect of proctolin on the adenylate and guanylate cyclases in the *Locusta* brain at various developmental stages. *Experientia* **35**, 1287-1288.
- Imaeda, K. and Cunnane, T. C. (2003). Electrophysiological properties of inhibitory junction potential in murine lower oesophageal sphincter. *J.Smooth Muscle Res.* **39**, 119-133.
- Isaac, R. E., Taylor, C. A., Hamasaka, Y., Nassel, D. R., and Shirras, A. D. (2004). Proctolin in the post-genomic era: new insights and challenges. *Invert.Neurosci.* **2**, 51-64.

- 
- Jaiswal, R. K. (1992). Endothelin inhibits the atrial natriuretic factor stimulated cGMP production by activating the protein kinase C in rat aortic smooth muscle cells. *Biochem.Biophys.Res.Comm.* **182**, 395-402.
- Jaramillo, A. M., Zheng, X., Zhou, Y., Amado, D. A., Sheldon, A., Sehgal, A., and Levitan, I. B. (2004). Pattern of distribution and cycling of SLOB, Slowpoke channel binding protein, in *Drosophila*. *BMC.Neurosci.* **5**, 3.
- Johnson, E. C., Garczynski, S. F., Park, D., Crim, J. W., Nassel, D. R., and Taghert, P. H. (2003). Identification and characterization of a G protein-coupled receptor for the neuropeptide proctolin in *Drosophilamelanogaster*. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **100**, 6198-6203.
- Jorge-Rivera, J. C. and Marder, E. (1996). TNRNFLRFamide and SDRNFLRFamide modulate muscles of the stomatogastric system of the crab *Cancer borealis*. *J.Comp Physiol [A]* **179**, 741-751.
- Jorge-Rivera, J. C. and Marder, E. (1997). Allatostatin decreases stomatogastric neuromuscular transmission in the crab *Cancer borealis*. *J.Exp.Biol.* **200 ( Pt 23)**, 2937-2946.
- Jorge-Rivera, J. C., Sen, K., Birmingham, J. T., Abbott, L. F., and Marder, E. (1998). Temporal dynamics of convergent modulation at a crustacean neuromuscular junction. *J.Neurophysiol.* **80**, 2559-2570.
- Keef, K. D., Hume, J. R., and Zhong, J. (2001). Regulation of cardiac and smooth muscle Ca(2+) channels (Ca(V)1.2a,b) by protein kinases. *Am.J.Physiol.Cell Physiol.* **281**, C1743-C1756.
- Kingan, T. and Titmus, M. (1983). Radioimmunologic detection of proctolin in arthropods. *Comp.Biochem.Physiol C.* **74**, 75-78.
- Kloppenburg, P., Levini, R. M., and Harris-Warrick, R. M. (1999). Dopamine modulates two potassium currents and inhibits the intrinsic firing properties of an identified motor neuron in a central pattern generator network. *J.Neurophysiol.* **81**, 29-38.

- Knaus, H. G., Folander, K., Garcia-Calvo, M., Garcia, M. L., Kaczorowski, G. J., Smith, M., and Swanson, R. (1994). Primary sequence and immunological characterization of beta-subunit of high conductance Ca(2+)-activated K<sup>+</sup> channel from smooth muscle. *J.Biol.Chem.* **269**, 17274-17278.
- Krajniak, K. G. (1991). The identification and structure-activity relations of a cardioactive FMRFamide-related peptide from the Blue crab, *Callinectes sapidus*. *Peptides* **12**, 1295-1302.
- Kreissl, S., Uber, A., and Rathmayer, W. (1995). Embryonic development of allatostatin-like immunoreactivity in neuromuscular systems of *Locusta migratoria*. *23.Göttingen Neurobiol.Conf.* **205**. Georg Thieme Verlag: Stuttgart.
- Kreissl, S., Weiss, T., Djokaj, S., Balezina, O., and Rathmayer, W. (1999). Allatostatin modulates skeletal muscle performance in crustaceans through pre- and postsynaptic effects. *Eur.J.Neurosci.* **11**, 2519-2530.
- Lange, A. B. (2002). A review of the involvement of proctolin as a cotransmitter and local neurohormone in the oviduct of the locust, *Locusta migratoria*. *Peptides* **23**, 2063-2070.
- Lange, A. B., Bendena, W. G., and Tobe, S. S. (1995). The effect of the thirteen Dip-allatostatins on myogenic and induced contractions of the cockroach (*Diploptera punctata*) hindgut. *J.Insect Physiol.* **41**, 581-588.
- Lange, A. B. and Cheung, I. L. (1999). The modulation of skeletal muscle contraction by FMRF-related peptides of the locust. *Peptides* **20**, 1411-1418.
- Lange, A. B. and Nykamp, D. A. (1996). Signal transduction pathways regulating the contraction of an insect visceral muscle. *Arch.Insect Biochem.Physiol.* **33**, 183-196.
- Lange, A. B. and Orchard, I. (1984). Dorsal unpaired median neurons, and ventral bilaterally paired neurons, project to a visceral muscle in an insect. *J.Neurobiol.* **15**, 441-453.

- Lange, A. B., Orchard, I., and Adams, M. E. (1986). Peptidergic innervation of insect reproductive tissue: the association of proctolin with oviduct visceral musculature. *J.Comp Neurol.* **254**, 279-286.
- Larsen, M. J., Burton, K. J., Zantello, M. R., Smith, V. G., Lowery, D. L., and Kubiak, T. M. (2001). Type A allatostatins from *Drosophila melanogaster* and *Diptera punctata* activate two *Drosophila* allatostatin receptors, DAR-1 and DAR-2, expressed in CHO cells. *Biochem.Biophys.Res.Comm.* **286**, 895-901.
- Leemhuis, J., Boutillier, S., Schmidt, G., and Meyer, D. K. (2002). The protein kinase A inhibitor H89 acts on cell morphology by inhibiting Rho kinase. *J.Pharmacol.Exp.Ther.* **300**, 1000-1007.
- Lehman, W. (1982). The location and periodicity of a troponin-T-like protein in the myofibril of the horseshoe crab *Limulus polyphemus*. *J.Mol.Biol.* **154**, 385-391.
- Lenz, C., Williamson, M., and Grimmelikhuijzen, C. J. (2000a). Molecular cloning and genomic organization of a second probable allatostatin receptor from *Drosophila melanogaster*. *Biochem.Biophys.Res.Comm.* **273**, 571-577.
- Lenz, C., Williamson, M., and Grimmelikhuijzen, C. J. (2000b). Molecular cloning and genomic organization of an allatostatin preprohormone from *Drosophila melanogaster*. *Biochem.Biophys.Res.Comm.* **273**, 1126-1131.
- Löffler, G. (2003). *Biochemie und Pathobiochemie*. 7.Auflage, Springer Verlag: Berlin, Heidelberg.
- Lorenz, M. W., Kellner, R., and Hoffmann, K. H. (1995). Identification of two allatostatins from the cricket, *Gryllus bimaculatus* de Geer (Ensifera, Gryllidae): Additional members of a family of neuropeptides inhibiting juvenile hormone biosynthesis. *Regul.Pept.* **57**, 227-236.
- Lucas, K. A., Pitari, G. M., Kazerounian, S., Ruiz-Stewart, I., Park, J., Schulz, S., Chepenik, K. P., and Waldman, S. A. (2000). Guanylyl cyclases and signaling by cyclic GMP. *Pharmacol.Rev.* **52**, 375-414.

- Man-Son-Hing, H., Zoran, M. J., Lukowiak, K., and Haydon, P. G. (1989). A neuromodulator of synaptic transmission acts on the secretory apparatus as well as on ion channels. *Nature* **341**, 237-239.
- Marder, E., Calabrese, R. L., Nusbaum, M. P., and Trimmer, B. A. (1987). Distribution and partial characterization of FMRFamide-like peptides in the stomatogastric nervous system of the rock crab, *Cancer borealis*, and the spiny lobster, *Panulirus interruptus*. *J.Comp.Neurol.* **259**, 150-163.
- Martinez, C., Sanchez, M., Hidalgo, A., and de Boto, M. J. (2003). Mechanisms of diethylstilbestrol-induced relaxation in rat aorta smooth muscle. *Vascul.Pharmacol.* **40**, 197-204.
- May, T. E., Brown, B. E., and Clements, A. N. (1979). Experimental studies upon a bundle of tonic fibres in the locust extensor tibialis muscle. *J.Insect Physiol.* **25**, 169-181.
- Mazzocco, C., Fukasawa, K. M., Auguste, P., and Puiroux, J. (2003). Characterization of a functionally expressed dipeptidyl aminopeptidase III from *Drosophila melanogaster*. *Eur.J.Biochem.* **270**, 3074-3082.
- Mazzocco-Manneval, C., Kuczer, M., Konopinska, D., Fournier, B., Loughton, B. G., and Puiroux, J. (1998). Pharmacological studies of proctolin receptors on foregut and hindgut of *Blaberus craniifer*. *Peptides* **19**, 1641-1651.
- McManus, O. B., Helms, L. M., Pallanck, L., Ganetzky, B., Swanson, R., and Leonard, R. J. (1995). Functional role of the beta subunit of high conductance calcium-activated potassium channels. *Neuron* **14**, 645-650.
- Meera, P., Wallner, M., and Toro, L. (2000). A neuronal beta subunit (KCNMB4) makes the large conductance, voltage- and Ca<sup>2+</sup>-activated K<sup>+</sup> channel resistant to charybdotoxin and iberiotoxin. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **97**, 5562-5567.

- Meeusen, T., Mertens, I., Clynen, E., Baggerman, G., Nichols, R., Nachman, R. J., Huybrechts, R., De Loof, A., and Schoofs, L. (2002). Identification in *Drosophila melanogaster* of the invertebrate G protein-coupled FMRFamide receptor. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **99**, 15363-15368.
- Meller, V. H., Aucoin, R. R., Tobe, S. S., and Feyereisen, R. (1985). Evidence for an inhibitory role of cyclic AMP in the control of juvenile hormone biosynthesis by cockroach corpora allata. *Mol.Cell Endocrinol.* **43**, 155-163.
- Mercier, A. J., Orchard, I., TeBrugge, V., and Skerrett, M. (1993). Isolation of two FMRFamide-related peptides from crayfish pericardial organs. *Peptides* **14**, 137-143.
- Mercier, A. J., Schiebe, M., and Atwood, H. L. (1990). Pericardial peptides enhance synaptic transmission and tension in phasic extensor muscles of crayfish. *Neurosci.Lett.* **111**, 92-98.
- Mercier, A. J. and Wilkens, J. L. (1985). Modulatory effect of proctolin on a crab ventilatory muscle. *J.Neurobiol.* **16**, 401-408.
- Meyrand, P. and Marder, E. (1991). Matching neural and muscle oscillators: control by FMRFamide-like peptides. *J.Neurosci.* **11**, 1150-1161.
- Monterrubio, J., Lizardi, L., and Zuazaga, C. (2000). Silent Calcium Channels in Skeletal Muscle Fibers of the Crustacean *Atya lanipes*. *J.Membrane Biol.* **173**, 9-17.
- Müller, A. R., Wolf, H., Galler, S., and Rathmayer, W. (1991). Correlation of electrophysiological, histochemical, and mechanical properties of the coxa rotator muscle of the locust, *Locusta migratoria*. *J.Comp.Physiol.B* **162**, 5-15.
- Nässel, D. R. (1996). Neuropeptides, amines and amino acids in an elementary insect ganglion: Functional and chemical anatomy of the unfused abdominal ganglion. *Prog.Neurobiol.* **48**, 325-331.



- 
- O'Shea, M. (1985). Are skeletal motoneurons in arthropods peptidergic? In: Model Neural Networks and Behaviour (ed. A. I. Selverston), pp. 401-413 Plenum Press: New York.
- Oelschläger, H. A., Helpert, C., and Northcutt, R. G. (1998). Coexistence of FMRF<sub>AMIDE</sub>-like and LHRH-like immunoreactivity in the terminal nerve and forebrain of the big brown bat, *Eptesicus fuscus*. Brain Behav.Evol. **52**, 139-147.
- Orchard, I., Belanger, J. H., and Lange, A. B. (1989). Proctolin: a review with emphasis on insects. J.Neurobiol. **20**, 470-496.
- Orchard, I., Lange, A. B., and Bendena, W. G. (2001). FMRFamide-related peptides: a multifunctional family of structurally related neuropeptides in insects. Adv.Insect Physiol. **28**, 267-329.
- Pasztor, V. M. and Golas, L. B. (1993). The modulatory effects of serotonin, neuropeptide F1 and proctolin on the receptor muscles of the lobster abdominal stretch receptor and their exoskeletal muscle homologues. J.Exp.Biol. **174**, 363-374.
- Penzlin, H. (1991). Lehrbuch der Tierphysiologie. 5. Auflage, Gustav Fischer Verlag: Jena.
- Perry, S. V. (1999). Troponin I: inhibitor or facilitator. Mol.Cell Biochem. **190**, 9-32.
- Philipp, B., Rogalla, N., and Kreissl, S. The neuropeptide proctolin potentiates contractions and reduces cGMP-concentration via a PKC-dependent pathway. (in Vorbereitung).
- Pratt, G. E., Farnsworth, D. E., Fok, K. F., Siegel, N. R., McCormack, A. L., Shabanowitz, J., Hunt, D. F., and Feyereisen, R. (1991). Identity of a second type of allatostatin from cockroach brains: an octadecapeptide amide with a tyrosine-rich address sequence. Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A **88**, 2412-2416.
- Pratt, G. E., Farnsworth, D. E., Siegel, N. R., Fok, K. F., and Feyereisen, R. (1989). Identification of an allatostatin from adult *Diploptera punctata*. Biochem.Biophys.Res.Comm. **163**, 1243-1247.
-

- 
- Price, D. A. and Greenberg, M. J. (1977). Structure of a molluscan cardioexcitatory neuropeptide. *Science* **197**, 670-671.
- Rankin, S. M., Stay, B., Aucoin, R. R., and Tobe, S. S. (1986). In vitro Inhibition of Juvenile Hormone Synthesis by Corpora Allata of the Viviparous Cockroach, *Diploptera punctata*. *J.Insect Physiol.* **32**, 151-156.
- Rathmayer, W., Djokaj, S., Gaydukov, A., and Kreissl, S. (2002a). The neuromuscular junctions of the slow and the fast excitatory axon in the closer of the crab *Eriphia spinifrons* are endowed with different Ca<sup>2+</sup> channel types and allow neuron-specific modulation of transmitter release by two neuropeptides. *J.Neurosci.* **22**, 708-717.
- Rathmayer, W., Erxleben, C., Djokaj, S., Gaydukov, A., Kreissl, S., and Weiss, T. (2002b). Antagonistic modulation of neuromuscular parameters in crustaceans by the peptides proctolin and allatostatin, contained in identified motor neurons. In: *The Crustacean Nervous System / Konrad Wiese (ed.)* 2-19 Springer Verlag: Berlin, Heidelberg, New York.
- Reichwald, K., Unnithan, G. C., Davis, N. T., Agricola, H., and Feyereisen, R. (1994). Expression of the allatostatin gene in endocrine cells of the cockroach midgut. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* **91**, 11894-11898.
- Ruth, P., Landgraf, W., Keilbach, A., May, B., Egleme, C., and Hofmann, F. (1991). The activation of expressed cGMP-dependent protein kinase isozymes I alpha and I beta is determined by the different amino-termini. *Eur.J.Biochem.* **202**, 1339-1344.
- Schwarz, T. L., Harris-Warrick, R. M., Glusman, S., and Kravitz, E. A. (1980). A peptide action in a lobster neuromuscular preparation. *J.Neurobiol.* **11**, 623-628.
- Schwarz, T. L., Lee, G. M., Siwicki, K. K., Standaert, D. G., and Kravitz, E. A. (1984). Proctolin in the lobster: the distribution, release, and chemical characterization of a likely neurohormone. *J.Neurosci.* **4**, 1300-1311.

- 
- Scott, M. L., Brezina, V., and Weiss, K. R. (1997). Ion currents and mechanisms of modulation in the radula opener muscle of *Aplysia*. *J.Neurophysiol.* **78**, 2372-2387.
- Secher, T., Lenz, C., Cazzamali, G., Sorensen, G., Williamson, M., Hansen, G. N., Svane, P., and Grimmelikhuijzen, C. J. (2001). Molecular cloning of a functional allatostatin gut/brain receptor and an allatostatin preprohormone from the silkworm *Bombyx mori*. *J.Biol.Chem.* **276**, 47052-47060.
- Sellers, J. R. (1981). Phosphorylation-dependent regulation of *Limulus* myosin. *J.Biol.Chem.* **256**, 9274-9278.
- Sithigorngul, P., Pupuem, J., Krungkasem, C., Longyant, S., Chaivisuthangkura, P., Sithigorngul, W., and Petsom, A. (2002). Seven novel FMRFamide-like neuropeptide sequences from the eyestalk of the giant tiger prawn *Penaeus monodon*. *Comp.Biochem.Physiol.[B]* **131**, 325-337.
- Sithigorngul, P., Saraithongkum, W., Jaideechoey, S., Longyant, S., and Sithigorngul, W. (1998). Novel FMRFamide-like neuropeptides from the eyestalk of the giant freshwater prawn *Macrobrachium rosenbergii*. *Comp.Biochem.Physiol.[B]* **120**, 587-595.
- Sithigorngul, P., Saraithongkum, W., Longyant, S., Panchan, N., Sithigorngul, W., and Petsom, A. (2001). Three more novel FMRFamide-like neuropeptide sequences from the eyestalk of the giant freshwater prawn *Macrobrachium rosenbergii*. *Peptides* **22**, 191-197.
- Skerrett, M., Peaire, A., Quigley, P., and Mercier, A. (1995). Physiological effects of two FMRFamide-related peptides from the crayfish *Procambarus clarkii*. *J.Exp.Biol.* **198**, 109-116.
- Skiebe, P. (1999). Allatostatin-like immunoreactivity in the stomatogastric nervous system and the pericardial organs of the crab *Cancer pagurus*, the lobster *Homarus americanus*, and the crayfish *Cherax destructor* and *Procambarus clarkii*. *J.Comp.Neurol.* **403**, 85-105.
-

- Skiebe, P. and Schneider, H. (1994). Allatostatin peptides in the crab stomatogastric nervous system: Inhibition of the pyloric motor pattern and distribution of allatostatin-like immunoreactivity. *J.Exp.Biol.* **194**, 195-208.
- Stay, B., Tobe, S. S., and Bendena, W. G. (1994). Allatostatins: identification, primary structures, functions and distributions. *Adv.Insect Physiol.* **25**, 267-337.
- Sullivan, R. E. (1979). A proctolin-like peptide in crab pericardial organs. *J.Exp.Biol.* **210**, 543-555.
- Swales, L. S. and Evans, P. D. (1988). Histochemical localization of octopamine- and proctolin- sensitive adenylate cyclase activity in a locust skeletal muscle. *Histochemistry* **90**, 233-239.
- Swensen, A. M. and Marder, E. (2000). Multiple peptides converge to activate the same voltage-dependent current in a central pattern-generating circuit. *J.Neurosci.* **15**, 6752-6759.
- Takahashi, S., Takano-Ohmuro, H., and Maruyama, K. (1990). Regulation of *Drosophila* myosin ATPase activity by phosphorylation of myosin light chains. I. Wild type fly. *Comp.Biochem.Physiol.* **95B**, 179-181.
- Takano-Ohmuro, H., Tanikawa, M., and Maruyama, K. (1986). Phosphorylation of cricket myosin light chain and Mg<sup>2+</sup>-activated actomyosin ATPase activity. *Zool.Sci.* **3**, 715-717.
- Taylor, C. A., Winther, A. M., Siviter, R. J., Shirras, A. D., Isaac, R. E., and Nassel, D. R. (2004). Identification of a proctolin preprohormone gene (Proct) of *Drosophila melanogaster*: expression and predicted prohormone processing. *J.Neurobiol.* **58**, 379-391.
- Tierney, A. J., Blanck, J., and Mercier, A. J. (1997). FMRFamide-like peptides in the crayfish (*Procambarus clarkii*) stomatogastric nervous system: Distribution and effects on the pyloric motor pattern. *J.Exp.Biol.* **200**, 3221-3233.

- Tobe, S. S. and Stay, B. (1980). Control of juvenile hormone biosynthesis during the reproductive cycle of a viviparous cockroach. III. Effects of denervation and age on compensation with unilateral allatectomy and supernumerary corpora allata. *Gen.Comp Endocrinol.* **40**, 89-98.
- Toullec, D., Pianetti, P., Coste, H., Bellevergue, P., Grand-Perret, T., Ajakane, M., Baudet, V., Boissin, P., Boursier, E., Loriolle, F., Duhamel, L., Charon, D., and Kirilovsky, J. (1991). The Bisindolylmaleimide GF 109203X Is a Potent and Selective Inhibitor of Protein Kinase C\*. *J.Biol.Chem.* **266**, 15771-15781.
- Trimmer, B. A., Kobierski, L. A., and Kravitz, E. A. (1987). Purification and characterization of FMRFamide-like immunoreactive substances from the lobster nervous system: isolation and sequence analysis of two closely related peptides. *J.Comp.Neurol.* **266**, 16-26.
- Vale, R. D. and Milligan, R. A. (2000). The way things move: looking under the hood of molecular motor proteins. *Science* **288**, 88-95.
- Vanden Broeck, J., Veelaert, D., Bendena, W. G., Tobe, S. S., and De Loof, A. (1996). Molecular cloning of the precursor cDNA for schistostatins, locust allatostatin-like peptides with myoinhibiting properties. *Mol.Cell Endocrinol.* **122**, 191-198.
- Veelaert, D., Devreese, B., Schoofs, L., Van Beeumen, J., Vanden Broeck, J., Tobe, S. S., and De Loof, A. (1996). Isolation and characterization of eight myoinhibiting peptides from the desert locust, *Schistocerca gregaria*: new members of the cockroach allatostatin family. *Mol.Cell Endocrinol.* **122**, 183-190.
- Veelaert, D., Schoofs, L., Tobe, S. S., Yu, C. G., Vullings, H. G., Couillaud, F., and De Loof, A. (1995). Immunological evidence for an allatostatin-like neuropeptide in the central nervous system of *Schistocerca gregaria*, *Locusta migratoria* and *Neobellieria bullata*. *Cell Tissue Res.* **279**, 601-611.
- Veenstra, J. A., Noriega, F. G., Graf, R., and Feyereisen, R. (1997). Identification of three allatostatins and their cDNA from the mosquito *Aedes aegypti*. *Peptides* **18**, 937-942.

- Voet, D. and Voet, J. G. (1992). Biochemie. VCH: Weinheim, New York, Basel, Cambridge.
- Walther, C., Zittlau, K. E., Murck, H., and Voigt, K. (1998). Resting membrane properties of locust muscle and their modulation I. Actions of the neuropeptides YGGFMRFamide and proctolin. *J.Neurophysiol.* **80**, 771-784.
- Wang, Y., Townsend, C., and Rosenberg, R. L. (1993). Regulation of cardiac L-type Ca channels in planar lipid bilayers by G proteins and protein phosphorylation. *Am.J.Physiol.* **264**, C1473-1479.
- Watson, W. H. and Hoshi, T. (1985). Proctolin induces rhythmic contractions and spikes in *Limulus* heart muscle. *Am.J.Physiol.* **249**, R490-R495.
- Weaver, R. J., Freeman, Z. A., Pickering, M. G., and Edwards, J. P. (1994). Identification of two allatostatins from the CNS of the cockroach *Periplaneta americana*: Novel members of a family of neuropeptide inhibitors of insect juvenile hormone biosynthesis. *Comp.Biochem.Physiol.[C]* **107C**, 119-127.
- Wegener, C. and Nässel, D. R. (2000). Peptide-induced Ca(2+) movements in a tonic insect muscle: effects of proctolin and periviscerokinin-2. *J.Neurophysiol.* **84**, 3056-3066.
- Weimann, J. M., Marder, E., Evans, B., and Calabrese, R. L. (1993). The effects of SDRNFLRFamide and TNRNFLRFamide on the motor patterns of the stomatogastric ganglion of the crab *Cancer borealis*. *J.Exp.Biol.* **181**, 1-26.
- Weiss, T., Erxleben, C., and Rathmayer, W. (2001). Voltage-clamp analysis of membrane currents and excitation-contraction coupling in a crustacean muscle. *J.Muscle Res.Cell Motil.* **22**, 329-344.
- Weiss, T., Kreissl, S., and Rathmayer, W. (2003). Localization of a FMRFamide-related peptide in efferent neurons and analysis of neuromuscular effects of DRNFLRFamide (DF2) in the crustacean *Idotea emarginata*. *Eur.J.Neurosci.* **17**, 239-248.

- Winkelman, L. and Bullard, B. (1980). Phosphorylation of a locust myosin light chain and its effect on calcium regulation. *J.Muscle Res.Cell Motil.* **1**, 221-222.
- Witten, J. L. and O'Shea, M. (1985). Peptidergic innervation of insect skeletal muscle: immunochemical observations. *J.Comp Neurol.* **242**, 93-101.
- Woodhead, A. P., Khan, M. A., Stay, B., and Tobe, S. S. (1994). Two new allatostatins from the brains of *Diploptera punctata*. *Insect Biochem.Mol.Biol.* **24**, 257-263.
- Woodhead, A. P., Stay, B., Seidel, S. L., Khan, M. A., and Tobe, S. S. (1989). Primary structure of four allatostatins: neuropeptide inhibitors of juvenile hormone synthesis. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **86**, 5997-601.
- Worden, M. K., Kravitz, E. A., and Goy, M. F. (1995). Peptide F1, an N-terminally extended analog of FMRFamide, enhances contractile activity in multiple target tissues in lobster. *J.Exp.Biol.* **198 ( Pt 1)**, 97-108.
- Yu, C. G., Stay, B., Joshi, S., and Tobe, S. S. (1993). Allatostatin content of brain, corpora allata and haemolymph at different developmental stages of the cockroach, *Diploptera punctata*: quantitation by ELISA and bioassay. *J.Insect Physiol.* **39**, 111-122.
- Zhou, X. B., Arntz, C., Kamm, S., Motejlek, K., Sausbier, U., Wang, G. X., Ruth, P., and Korth, M. (2001). A molecular switch for specific stimulation of the BKCa channel by cGMP and cAMP kinase. *J.Biol.Chem.* **276**, 43239-43245.

## DANKSAGUNG

---

Herrn Prof. Dr. W. Rathmayer möchte ich für den wissenschaftlichen Anstoß zu dieser Arbeit danken; sicher hat sein Geist diese Arbeit beeinflusst.

Herrn Prof. Dr. W. Kutsch danke ich vielmals für seine unkomplizierte „Übernahme“ meiner Betreuung und seine Bereitschaft, sich in das Thema einzuarbeiten und die Arbeit zu begutachten.

Herrn Prof. C. Erxleben gilt mein Dank für die spontane Bereitschaft, als Zweitgutachter diese Arbeit zu bewerten.

Ein ganz großer Dank geht an Sabine Kreissl für die Betreuung, die wissenschaftliche – aber auch persönliche – Einführung in die „Welt der Wissenschaft“ und das Korrekturlesen dieser Arbeit; durch ihr ungebremstes Engagement motivierte sie mich weiterzumachen.

Natürlich sage ich auch allen ehemaligen und gegenwärtigen Mitgliedern der Arbeitsgruppe herzlichen Dank. Es war eine besondere Atmosphäre, die den Laboralltag angenehm und anregend gemacht hat. Christine Dittrich, Stefan Djokai, Daniel Fritsche, Boris Kaiser, Sabine Kreissl, Tobias Müller, Berit Phillip, Birgit Rapp, Gabi Rixe, Dietrich Ruhrmann, Torsten Weiss, danke Euch allen! Mein Besonderer Dank geht an Tobias für die klasse Teamarbeit in allen Computerproblemen, an Christine für unzählige Raucherpausen, bei denen man die Arbeit kurz vergessen konnte, an Berit für das Korrekturlesen dieser Arbeit und an Torsten, der mir die Tür zur Elektrophysiologie einen Spalt geöffnet hat.

Ferner richtet sich mein Dank an alle Vertiefungskursstudenten und Praktikanten, die mit engagierter Mithilfe und regem Interesse neue Gedankenimpulse mitgebracht haben.

Herrn Prof. Dr. Ron Harris-Warrick und seinem Labor an der Cornell Universität in Ithaca, New York, möchte ich für die interessante und lehrreiche Praktikumszeit zu Beginn meiner Doktorarbeit danken. Danke auch an alle Freunde, die ich während dieser Zeit gewinnen konnte. Und an Matthias Gruhn, der mich in Ithaca aufgenommen hat, und mich auch anschließend mit Rat und Hilfe als toller Freund begleitet hat.

All meinen Freunden danke ich für eine schöne und abwechslungsreiche Zeit.

Meine Familie, besonders meine Eltern Silvia und Peter, haben mich bis zum heutigen Tage unterstützt und mich bis hierher getragen – Danke! Opa, schade, dass ich Dir das fertige Werk nicht mehr zeigen kann.

Für Deine Geduld, Deine Unterstützung, Deine Kritik, Deine Aufmunterungen und für so vieles mehr... Danke, Thorsten!