

Promo – Makro

`dr_main.tex`

JANA THAMM

Maua, den 2. April 2001

**Untersuchungen zur
Pea-CAH-I-like Immunreaktivität
im Nervensystem von Schaben**

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades
doctor rerum naturalium (Dr. rer. nat.)

vorgelegt dem Rat der Biologisch-Pharmazeutischen Fakultät
der Friedrich-Schiller-Universität Jena.

von Diplom-Biologin Jana Thamm
geboren am 14. 07. 1967 in Glauchau.

Gutachter

1. ...
2. ...
3. ...

Tag der Doktorprüfung:

Tag der öffentlichen Verteidigung:

Teil I

EINLEITUNG

1 Einführung

Die Familie der **AKH/RPCH-Peptide** gehört mit nunmehr 35 Mitgliedern (Gäde 1996, Gäde 1997a, Gäde 1997b, Siegert 1999, Gäde und Kellner 1999) zu den größten Peptidfamilien der Arthropoden. Die Familie wurde nach ihren ersten beiden Familienmitgliedern, dem adipokinetischen Hormon (AKH, jetzt Lom-AKH-I) der Wanderheuschrecke *Locusta migratoria* (Stone *et al.* 1976, Siegert *et al.* 1985) und dem *red pigment concentrating hormone* (RPCH, jetzt Pab-RPCH) der Garnele *Pandalus borealis* (Fernelund und Josefsson 1972), benannt.

Bis auf Pab-RPCH stammen alle Peptide aus Insekten. Pab-RPCH scheint bei Krebstieren konserviert zu sein, denn es wurde in unveränderter Primärstruktur aus dem X-Organ-Sinusdrüsen-Komplex verschiedener Dekapoden isoliert (Gaus *et al.* 1990). Das Peptid ist offensichtlich an der hormonalen Kontrolle des Farbwechsels bei Krebsen beteiligt. Funktionen als Neurotransmitter oder -modulator wurden diskutiert (Mangerich *et al.* 1986, Nusbaum und Marder *et al.* 1988, Sherff *et al.* 1991).

Die AKH/RPCH-Peptide der Insekten besitzen sehr variable Primärstrukturen. Alle Peptide dieser Familie sind Oligopeptide mit acht, neun oder zehn Aminosäuren, die beidseitig durch einen N-terminalen Pyroglutamatrest und ein C-terminales Säureamid gegen den Abbau durch Exopeptidasen geschützt sind. Sie enthalten mindestens zwei aromatische Aminosäuren. Position 8 wird stets durch Tryptophan besetzt. Eine zweite aromatische Aminosäure steht immer an Position 4. Nur drei AKH/RPCH-Peptide von Käfern (Gäde 1997a, 1997b) enthalten an dieser Stelle Tyrosin, alle anderen Familienmitglieder besitzen dort Phenylalanin. Stark konserviert ist auch Position 9. Mit Ausnahme von Lom-HrTH (Siegert 1999) befindet sich dort in allen Nona- und Dekapeptiden ein Glycinrest. Bei der Synthese der Oktapeptide liefert er die Amidgruppe für posttranslationale Amidierung des Tryptophanrestes (Bradbury *et al.* 1982). An allen anderen Positionen können verschiedene Aminosäuren stehen, deren Austausch jedoch meist durch Punktmutation(en) erklärbar ist (Gäde 1994). Die AKH/RPCH-Peptide sind bis auf fünf Peptide mit einem Asparaginsäurerest in Position 7 ungeladen (Gäde *et al.* 1990, Schaffer *et al.* 1990, Gäde 1991, Gäde 1997a, Gäde 1997b). Posttranslationale Modifikationen neben der Bildung der N- und C-Termini sind selten (Gäde 1992, Gäde und Janssens 1994, Veenstra und Hagedorn 1995). Zusammenfassend läßt sich folgendes allgemeines Schema für die Primärstrukturen der AKH/RPCH-Peptide angeben (siehe Tabelle 1, verändert nach Gäde 1997):

Obwohl die AKH/RPCH-Peptide bei sehr vielen Insektenarten sequenziert worden sind, wurden ihre physiologischen Aktionen nur bei wenigen Arten ausführlich untersucht. Die "klassische" Funktion der AKH/RPCH-Peptide ist ihre Rolle bei der Regulation des Energiemetabolismus. Es konnte gezeigt werden, daß AKH/RPCH-Peptide die Mobilisierung sowohl von Lipiden als auch von Kohlenhydraten (Trehalose) und der Aminosäure Prolin aus dem Fettkörper beim Flug auslösen. Bei Insekten ohne (ausgeprägtes) Flugverhalten wird angenommen, daß die AKH/RPCH-Peptide für die Homöostase der betreffenden Substrate in den Arten verantwortlich sind. Biotests, die die Erhöhung des Blutzucker-, Blutfett- oder

Tabelle 1: Strukturmerkmale von Peptiden der AKH/RPCH-Familie. Die Zahlen in den Klammern geben an, wie oft die jeweiligen Aminosäurereste in den Positionen gefunden wurden. AKH/RPCH-Peptide treten als Okta-, Nona- oder Dekapeptide auf. Der C-Terminus der Peptide ist durch ein Säureamid geschützt.

Position									
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
							-[amid]	-[amid]	-amid
pGLu(35)	Leu(19)	Asn(24)	Phe(32)	Thr(17)	Pro(28)	Asn(13)	Trp(35)	Gly(13)	Thr(5)
	Val(11)	Thr(11)	Tyr(3)	Ser(18)	Ser(2)	Gly(10)			Asn(4)
	Ile(2)				Thr(3)	Ser(6)			Ser(2)
	Phe(2)				Ala(1)	Asp(4)			Tyr(1)
	Tyr(1)					Trp(1)			
						Val(1)			
					Arg(1)*			Ser(1)*	Pro(1)*

Die letzte Zeile zeigt ungewöhnliche Aminosäurepositionen * von Lom-HrTH (Siegert 1999). Für die Bildung des C-Terminus vermutet der Autor abweichende molekulare Mechanismen.

Prolinspiegels nachweisen, sind deshalb fast ausnahmslos zur Isolierung und Charakterisierung von AKH/RPCH-Peptiden eingesetzt worden. Interessant ist, daß identische Peptide bei verschiedenen Arten auch unterschiedliche Substrate mobilisieren (z. B. wirken die adipokinetischen Peptide Scg-AKH-II und Mas-AKH bei Hymenopteren hypertrehalosaemisch (Lorenz *et al.* 1998)). Bienen der europäischen Rasse der Honigbiene, *Apis mellifera carnica*, sind bisher die einzige Insekten, bei denen kein AKH/RPCH-Peptid gefunden werden konnte (Lorenz *et al.* 1999b). Viele Insektenarten besitzen zwei AKH/RPCH-Peptide. Ein Modell, das Vorkommen und Zusammenspiel mehrerer AKH/RPCH-Peptide erklärt, wurde jedoch bisher nur für *Locusta migratoria* entwickelt (Oudejans 1996, Vroemen *et al.* 1998a, 1998b, van der Horst *et al.* 1997).

Darüberhinaus ergaben sich aus der Verwendung von AKH/RPCH-Peptiden in verschiedenen Biotestsystemen und bei *in vivo*-Versuchen zahlreiche Hinweise auf weitere Aktionen dieser Peptide bei verschiedenen Tierarten. Diese betreffen ebenfalls den Stoffwechsel (Proteinsynthese, Fettsäuresynthese oder die Synthese des Cytohäms in den Mitochondrien), die Aktivität von visceralen oder Skelettmuskeln (Kurzübersichten bei Gäde 1997 und Gäde *et al.* 1997b) und möglicherweise sogar die Auslösung motorischer Aktivität (Socha *et al.* 1999).

Die AKH/RPCH-Peptide der Insekten wurden fast ausschließlich direkt aus den Corpora cardiaca isoliert. Die Corpora cardiaca liegen zusammen mit den Corpora allata als sogenannter Retrocerebralkomplex dicht hinter dem Gehirn, mit dem sie durch mehrere Nerven verbunden sind. Über diese Nerven projizieren neurosekretorische Zellen aus dem Gehirn in den aglandulären Teil der Corpora cardiaca, der das Neurohämälorgan des Gehirns darstellt.

Die AKH/RPCH-Peptide werden im glandulären Abschnitt der Drüse synthetisiert. Mit molekularbiologischen Methoden konnte bei verschiedenen Insektenarten die Biosynthese der AKH/RPCH-Peptide in den glandulären (intrinsischen) Zellen der Corpora cardiaca demonstriert werden (Bogerd *et al.* 1995, Schulz-Aellen *et al.* 1989, Fisher-Lougheed *et al.* 1993, Noyes und Schaffer 1990, Bradfield und Keeley 1989, Noyes *et al.* 1995, Lewis *et al.* 1997). Die Untersuchungen bestätigten die Ergebnisse früherer Arbeiten, die sowohl die adipokinische Aktivität in der sekretorischen Granula der glandulären Zellen (Stone und Mordue 1979) als auch AKH/RPCH-like Immunreaktivität mit verschiedenen Antiseren in den glandulären Zellen lokalisiert hatten (Schooneveld *et al.* 1983, 1986, Diederer *et al.* 1987, Clottens *et al.* 1989).

Immuncytochemische Untersuchungen zeigten darüberhinaus AKH/RPCH-like Immunreaktivität auch im Nervensystem vieler Insektenarten (Schooneveld *et al.* 1983, 1985). Immunmarkierungen mit C- bzw. N-Terminus-spezifischen Antiseren machten jedoch deutlich, daß im Nervensystem andere Antigene als in den glandulären Zellen der Corpora cardiaca gefärbt wurden (Schooneveld *et al.* 1987). Im Gegensatz dazu stehen die Arbeiten von Moshitzky *et al.* (1987a, 1987b), die nicht nur das Vorkommen, sondern auch die Synthese von Lom-AKH-I im Gehirn von *Locusta migratoria* darstellten. Hinweise auf Funktionen der AKH/RPCH-Peptide innerhalb des Nervensystems ergaben u. a. Untersuchungen beim Tabakswürmer *Manduca sexta*, bei dem durch die Injektion von Mas-AKH in das Mesothorakalganglion die Aktivität bestimmter Muskeln der Flugmuskulatur signifikant gesteigert werden konnte (Milde *et al.* 1995). Lom-AKH-immunreaktive Neurone sowie eine Membranfraktion, die Mas-AKH spezifisch bindet, wurden in diesem Ganglion gezeigt (Ziegler *et al.* 1995).

Aus den Corpora cardiaca der Schabe **Periplaneta americana** wurden zwei Peptide der AKH/RPCH-Familie isoliert. Die Primärstrukturen von **Pea-CAH-I** und **Pea-CAH-II** (siehe Tabelle 2) wurden 1984 zeitgleich von mehreren Arbeitsgruppen aufgeklärt.

Tabelle 2: Primärstrukturen von Pea-CAH-I und Pea-CAH-II

Pea-CAH-I	pGlu	Val	Asn	Phe	Ser	Pro	Asn	Trp-amid
Pea-CAH-II	pGlu	Leu	Thr	Phe	Thr	Pro	Asn	Trp-amid

Baumann und Penzlin (1984) sequenzierten das bereits von Unger (1957) beschriebene Neurohormon D aus den Corpora cardiaca von *Periplaneta americana*, das die Diastole des Herzens verstärkt und bei Überdosis einen diastolischen Herzblock auslöst. O'Shea *et al.* (1984) isolierten und identifizierten Pea-CAH-I und das eng verwandte Schwesterpeptid Pea-CAH-II aus den Corpora cardiaca von *Periplaneta americana* unter den Bezeichnungen

Myotropin I und II (MI und MII), weil die Peptide den Tonus und die Frequenz der Spontanaktivität verschiedener Muskeln am Beinpräparat von *Schistocerca nitens* steigerten. Bei Untersuchungen zum Energiestoffwechsel und zur Herztätigkeit sequenzierten Scarborough *et al.* (1984) zwei aktive Faktoren, die sie entsprechend ihrer Herkunft aus den Corpora cardiaca der Amerikanischen Schabe Periplanetin CC-1 und CC-2 nannten. Mit verbesserten Isolationsmethoden klärten Siebert und Mordue (1986) die Primärstruktur zweier hyperglycämischer Peptide HGH-I und -II aus den Corpora cardiaca von *Periplaneta americana* auf, die ebenfalls mit Pea-CAH-I und -II identisch sind. Der nach der Nomenklatur von Raina und Gäde (1988) vergebene Name Pea-CAH-I, der auf die zuerst beschriebene herzbeschleunigende Wirkung des Peptids hinweist (*Periplaneta americana cardioaccelerating hormone I*) soll hier Verwendung finden.

In den Folgejahren wurden Pea-CAH-I und Pea-CAH-II auch bei anderen Insektenarten gefunden. Die Corpora cardiaca der Schabe *Blatta orientalis* (Gäde und Rinehart 1990) und des Kartoffelkäfers *Leptinotarsa decemlineata* (Gäde und Kellner 1989) enthalten ebenfalls Pea-CAH-I und -II. Bei den zwei Termitenarten *Trinervitermes trinervoides* und *Mastotermes darwiniensis* (Liebrich *et al.* 1995) wurde Pea-CAH-I nachgewiesen.

Bei *Periplaneta americana* konnten sowohl der hypertrehalosämische (Gäde 1985, 1992) als auch der cardioakzeleratorische (Baumann *et al.* 1990) Effekt von Pea-CAH-I *in vivo* gezeigt werden. Neuere Arbeiten gehen jedoch nicht mehr von einer umfassenden Kontrolle der Herztätigkeit durch Pea-CAH-I (Gersch *et al.* 1982), sondern eher von einer multifaktoriellen Steuerung der Herztätigkeit durch verschiedene Peptide aus (Predel *et al.* 1994, Elia *et al.* 1995). Untersuchungen zum Trehalosestoffwechsel im Fettkörper (Ali und Steele 1997, Steele und Ireland 1999, Gäde und Hayes 1995) sowie in der Thorakal- bzw. Flugmuskulatur an (Khan und Steele 1992, Kono *et al.* 1994, Jahagirdar *et al.* 1989) unterstreichen dagegen, daß Pea-CAH-I und -II tatsächlich als hyperglycämische Faktoren beim Flug oder bei der Flucht der Schabe wirken könnten.

Es ist unklar, ob Pea-CAH-I auch im Nervensystem der Amerikanischen Schabe vorkommt. Frühe Arbeiten (Gersch 1974, Richter 1977) kommen aus verschiedenen Gründen zu dem Ergebnis, daß die herzaktiven Faktoren in einigen Teilen des Nervensystems (Gehirn, Herznervensystem, Terminalganglion) mit Pea-CAH-I identisch sein könnten. Damit in Einklang stehen die Angaben von O'Shea *et al.* (1984), die aus dem HPLC-Retentionszeitvergleich mit den zuvor isolierten und sequenzierten nativen Peptiden schließen, daß sich Pea-CAH-I und -II auch im Gehirn bzw. Pea-CAH-I im Bauchmark und im Vorderdarm befinden. Ein polyklonales Anti-Pea-CAH-I-Serum unbekannter Spezifität markierte außer den glandulären Zellen auch Neurone in der Pars intercerebralis und in den optischen Loben des Gehirns sowie in den Abdominalganglien und Fasern in den Segmentalgefäßen des Herzens (Adams 1985, 1990). Der Autor fand auch Pea-CAH-I-ähnliche Immunreaktivität in präsynaptischen Nervenendigungen, die die Vorderdarmmuskulatur innervieren und schlägt deshalb eine Rolle als Neurotransmitter für Pea-CAH-I vor. Für das

Vorkommen von Pea-CAH-I in den Abdominalganglien sprechen auch elektrophysiologische Untersuchungen, die im 5. freien Abdominalganglion und im Terminalganglion von *Periplaneta americana* die Beeinflussung der spontanen Spike-Aktivität von DUM-Neuronen durch Pea-CAH-I zeigen (Wicher *et al.* 1994, Wicher und Penzlin 1994, Heine und Wicher 1998, Wicher 2000). Eine Reihe anderer Arbeiten deuten jedoch an, daß Pea-CAH-I und -II nur in den glandulären Zellen der Corpora cardiaca lokalisiert sind. Mit Antiseren gegen verschiedene Fraktionen eines Extraktes aus Retrocerebralkomplexen konnte bereits Eckert (1977) Hinweise auf die chemische Verschiedenartigkeit von Neurosekreten aus dem Gehirn und den Produkten der intrinsischen Zellen erarbeiten. Es gelang der Nachweis eines für die Corpora cardiaca spezifischen Antigens, das ausschließlich im glandulären Teil lokalisiert ist. Gleichzeitig scheinen Antigene mit ähnlicher Struktur im Gehirn und im cerebralen Speicher zu existieren, denn Antiseren gegen andere Fraktionen markierten gleichzeitig den glandulären und den neurohämalen Teil der Drüse sowie die Pars intercerebralis. Diese Ergebnisse wurden durch Immunfärbungen mit regionenspezifischen Antiseren gegen Lom-AKH-I bestätigt. Während das N-Terminus-spezifische Antiserum bei *Periplaneta americana* die glandulären Zellen der Corpora cardiaca markierte, wurden Neurone im Gehirn und Fasern in den Corpora cardiaca nur durch das gegen den C-Terminus gerichtete Antiserum gefärbt (Schooneveld *et al.* 1986). Auch Siegert und Mordue (1992) wiesen durch Trennung und separate Aufarbeitung von Speicher- und Drüsenteil chromatographisch nach, daß Pea-CAH-I/-II nur im glandulären Teil der Corpora cardiaca vorkommen. Untersuchungen von Baumann *et al.* (1984a) zur Isolation herzaktiver Faktoren aus dem Bauchmark von *Periplaneta americana* deuteten ebenfalls an, daß diese nicht mit Neurohormon D identisch sind.

Immunmarkierungen mit einem polyklonalen Antiserum gegen Pea-CAH-I deuteten ebenfalls an, daß im Nervensystem der Amerikanischen Schabe möglicherweise Pea-CAH-I-ähnliche Peptide vorkommen könnten. Das Antiserum markierte bei *Periplaneta americana* nicht nur die glandulären Zellen der Corpora cardiaca, sondern auch den neurohämalen Teil der Drüse sowie Neurone und Fasern im Nervensystem. Pea-CAH-I-like Immunfärbungen im Nervensystem von Insekten, die kein Pea-CAH-I oder -II in ihren Corpora cardiaca synthetisieren, bekräftigten die Vermutung, daß das Antiserum mit Antigenen aus dem Nervensystem kreuzreagieren könnte (Eckert *et al.* 1996).

Das Anliegen der vorliegenden Arbeit war, die Kreuzreaktivität des Antiserums zur Suche und Isolierung Pea-CAH-I-ähnlicher Peptide aus dem Nervensystem von Schaben auszunutzen. Dazu sollte mit dem Antiserum ein kompetitiver Anti-Pea-CAH-I-Enzymimmunoassay aufgebaut und als eine Art "Biotest" verwendet werden. Auswahlkriterium war hierbei nicht eine Pea-CAH-I-ähnliche physiologische Wirkung dieser Peptide, sondern eine mögliche strukturelle Ähnlichkeit, repräsentiert durch die Kreuzreaktivität mit dem Anti-Pea-CAH-I-Serum. Voraussetzung für die Charakterisierung der Pea-CAH-I-like Immunreaktivität im Nervensystem von *Periplaneta americana* und anderen Schaben war jedoch zunächst die genaue Untersuchung der Antiserumspezifität.

Teil II

MATERIAL und METHODEN

2 Tiermaterial

Als Versuchstiere fanden Imagines beiderlei Geschlechts verschiedener Insektenspezies Verwendung. Tiere der Schabenarten *Periplaneta americana*, *Periplaneta brunnea*, *Blattella germanica*, *Blatta orientalis* und *Nauphoeta cinerea* entstammten hauseigenen Zuchten. Sie wurden unter einen konstanten Hell-Dunkel-Zyklus von jeweils 12 h bei einer Temperatur von 28-30 °C und 50-60 % relativer Luftfeuchtigkeit gehalten. Als Futter dienten Rattenpellets, Obst und Wasser.

Vertreter der Grillenart *Gryllus bimaculatus* wurden von der institutseigenen Zucht des 1. Zoologischen Instituts der Georg-August-Universität Göttingen zur Verfügung gestellt.

Die Wüstenheuschrecken *Schistocerca gregaria* wurden bei fauna topics Zoobedarf, Zucht- und Handels GmbH, Marbach/N.-Rielingshausen erworben.

3 Anti-Pea-CAH-I-Serum

Zur Durchführung der Enzymimmunoassays und zur Immuncytochemie wurde ein polyklonales Kaninchen-Anti-Pea-CAH-I Serum benutzt, das durch Immunisierung mit einem Glutaraldehydkonjugat aus Thyreoglobulin und dem synthetischen Analogon des-pGlu¹-Pea-CAH-I gewonnen wurde. Die Herstellung wurde bereits in Eckert *et al.* (1996) beschrieben. Angaben zu Lagerung und Verdünnung befinden sich im Abschnitt 7.1. Es wird im folgenden auch kurz als Antiserum bezeichnet.

4 Peptide

Alle Peptide (siehe Tabelle 3) wurden für die Portionierung in Methanol/Wasser 1:1 (v/v) gelöst, anschließend in einer Vakuumzentrifuge (Heto-Holten, Allerød, Dänemark) zur Trockene eingengt und bis zu ihrer Verwendung bei -20 °C gelagert. Die Stoffmengen kommerziell erworbener Peptide wurden beim Portionieren entsprechend den Herstellerangaben zu Peptidgehalt und Reinheit korrigiert. Reinheit und Stoffmenge aller Verbindungen, besonders der synthetischen Analoga und der aus nativem Material gewonnenen Peptide (siehe Tabelle 3), wurden außerdem durch Umkehrphasen-HPLC (C18-Säule) abgesichert. Die Bezeichnung der Peptide richtet sich, sofern möglich, nach der Nomenklatur von Raina und Gäde (1988).

5 Konjugate

Für die Charakterisierung des Anti-Pea-CAH-I-Serums wurde die Kopplung von Tryptophan und Tryptophanamid an ein Trägerprotein notwendig. Die Aminosäure und ihr Säureamid wurden mittels Glutaraldehyd an Rinderserumalbumin (BSA, bovine serum

Tabelle 3: Übersicht der verwendeten Peptide.

Name(n) des Peptids	Herkunft, ggf. Produktnummer
Pea-CAH-I (Neurohormon D, Myotropin I, Periplanetin CC-1)	Peninsula*, 8834
Pea-CAH-II (Myotropin II, Periplanetin CC-2)	Peninsula*, 8835
<u>synthetische Analoga von Pea-CAH-I</u>	
Pro ¹ -Pea-CAH-I	1)
des-pGlu ¹ -Pea-CAH-I	2)
des ¹⁻⁴ -Pea-CAH-I	1)
des ¹⁻⁵ -Pea-CAH-I	1)
des ¹⁻⁶ -Pea-CAH-I	1)
Tem-HrTH	2)
Emp-AKH	2)
Pht-HrTH	2)
Mem-CC	2)
Cam-HrTH	2)
Lia-AKH	2)
Rom-CC	2)
Bld-HrTH	2)
Taa-HoTH	2)
Mas-AKH	2)
Grb-AKH	2)
Ani-AKH	2)
des-pGlu ¹ -Ani-AKH	2)
des-pGlu ¹ -Psi-AKH	2)
Pab-RPCH	Bachem*, H 6750
Lom-AKH-II	Bachem*, H 5610
Scg-AKH-II	Bachem*, H 5615
APGWa	Sigma*, A 0813
PPGLWa	3)
Leucokinin I	Bachem*, H 6835
Leucokinin III	Bachem*, H 9240
Pea-MIP	4)

- 1) Diese Peptide wurden von Herrn Dr. G. Greiner, Institut für Biochemie und Biophysik der Friedrich-Schiller-Universität Jena synthetisiert.
- 2) Prof. G. Gäde, Zoology Department, Univ. of Cape Town, RSA stellte uns diese Peptide zur Verfügung.
- 3) PPGLWa wurde uns von Dr. T. Leitz, Zoologisches Institut II, Ruprecht-Karls-Universität Heidelberg überlassen.
- 4) Pea-MIP wurde als Auftragssynthese durch das Agricultural Biotechnology Center, Institute for Biochemistry and Protein Research, Gödöllő, Szent-Györgyi Albert u. 4, Ungarn hergestellt.

Bachem* Bachem-Biochemica GmbH, Heidelberg, BRD

Peninsula* Peninsula Laboratories, Belmont, USA

Sigma* Sigma-Aldrich GmbH, Deisenhofen, BRD

Tabelle 4: Wesentliche Chemikalien zur Konjugatherstellung.

Name	Hersteller, ggf. Produktnummer
L-Tryptophan	Raanal*, 20126
L-Tryptophanamid	
L-Tryptophanamide-Hydrochloride	Sigma*, T 0629
Rinderserumalbumin	
Albumin bovine, rein, Mr 67000	Serva*, 11930
Glutaraldehyd	
Glutaraldehyde 25 % in water	Serva*, 23114
Natriummetabisulfit (Na ₂ S ₂ O ₅)	FOC*

FOC*	Fabryka Odczymikom Chemicznych, Gliwice, Polen
Raanal*	Raanal, Budapest, Ungarn
Serva*	Serva-Feinbiochemica GmbH, Heidelberg, BRD
Sigma*	Sigma-Aldrich GmbH, Deisenhofen, BRD

albumin) gebunden. Das molare Kopplungsverhältnis betrug 100:1:1000 für Trp/Trpamid:BSA:Glutaraldehyd. Dazu wurden 0,84 mg Tryptophan bzw. Tryptophanamid und jeweils 2,34 mg BSA zusammen in 4 ml Phosphatpuffer 0,2 M; pH 7,4 gelöst und tropfenweise zu 4 ml 0,1 % wässriger Glutaraldehydlösung gegeben. Das Gemisch verblieb über Nacht bei Raumtemperatur. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 80 mg Natriummetabisulfit, gelöst in 0,8 ml Aq. dest. abgestoppt. Die Dialyse der Konjugate erfolgte über 2 Tage bei 4 °C gegen insgesamt 3 l PBS pH 7,4 (siehe Abschnitt 7.2). Die Proben wurden anschließend portioniert und bei -20 °C eingefroren. Zur Kontrolle der Antikörperbindung an BSA oder Glutaraldehyd wurde gleichzeitig mit Glutaraldehyd vernetztes BSA hergestellt. Es wurden hierfür 2,34 mg BSA in 4 ml Phosphatpuffer 0,2 M; pH 7,4 und 4 ml 0,1 % wässrige Glutaraldehydlösung zur Reaktion gebracht. Die wichtigsten Chemikalien wurden in Tabelle 4 zusammengefaßt.

6 Herstellung von Gewebeextrakten

6.1 Präparation der Organe

Die Entnahme der Organe wurde unter dem Mikroskop zügig, ohne gleichzeitiges Spülen mit Ringerlösung vorgenommen, um eventuelle Substanzverluste gering zu halten. Unmittelbar danach wurden die Organe in einem Blockschälchen, das durch ein Peltier-Element (Eigenbau der Werkstatt der Zoologischen Institute) gekühlt wurde, tiefgefroren. Folgende Aspekte der Organpräparation sind besonders erwähnenswert:

1. Bei der Entnahme von Gehirnen wurde besonders auf die saubere Abtrennung der

Corpora cardiaca geachtet. Die Nervi corporis cardiaci I und II wurden so dicht wie möglich am Hirn abgeschnitten. Bei gleichzeitiger Präparation von Hirn und Corpora cardiaca/Corpora allata-Komplexen wurde für die Entnahme des Gehirns bzw. des RCK gesondertes Präparationsbesteck benutzt, um eine Übertragung von Material aus den Corpora cardiaca zu vermeiden.

2. Alle Nerven wurden bei der Präparation von Ganglien dicht am Ganglion durchtrennt.
3. Zur Entnahme des abdominalen Bauchmarks wurden die Konnektive anterior des 1. freien Abdominalganglions sowie die Cercalnerven durchtrennt und die Ganglienkette nach lateral parallel geführten Schnitten durch leichten Zug aus dem Tier gelöst.
4. Für die Herstellung von Herzgewebeeextrakten wurde nur der abdominale Teil des Herzschlauches mit den anhaftenden lateralen Herznerven genutzt. Die Präparation erfolgte nach Liedtke (1991).

6.2 Gewebeeextraktion

Als Extraktionsmittel wurde ein Gemisch aus Methanol : Wasser : Trifluoressigsäure (TFA) im Verhältnis 90 : 9 : 1 benutzt. Nach der Präparation wurden die Organe aus den Blockschälchen in Eppendorfgefäße mit tiefgekühltem Extraktionsmittel überführt. Die Menge des Extraktionsmittels richtete sich nach Größe und Anzahl der Organe, war aber bei Parallelbestimmungen stets einheitlich. Die Proben wurden mit einem Ultraschallhomogenisator (Bandelin Sonopuls HD 200, Bandelin electronics, Berlin, BRD) zerkleinert und 5 min bei 4 °C und 14000 rpm (Kühlzentrifuge Hermle Z 360 K, Top-Labortechnik GmbH, Wehingen, BRD) zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen, das Pellet in Extraktionsmittel resuspendiert und zwei weiteren Extraktionszyklen unterzogen. Die vereinigten Überstände wurden in der Vakuumzentrifuge (Heto-Holten A/S, Allerød, Dänemark) zur Trockene gebracht. Die trockenen Rohextrakte wurden bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C gelagert.

6.3 Festphasenreinigung der Gewebeeextrakte

Ein zusätzlicher Aufarbeitungsschritt war notwendig, um die Meßbarkeit der Gewebeeextrakte im Enzymimmunoassay zu gewährleisten. Die Rohextrakte wurden deshalb einer Festphasenreinigung an einer Chromabond C18ec/1 ml/100 mg - Säule unterzogen. Die Säule wurde dazu zunächst mit 2 ml Methanol konditioniert und mit 2 ml 0,1 % aq. TFA equilibriert. Die trockenen Rohextrakte wurden durch kurze Ultraschallbehandlung (Bandelin Sonopuls HD 200, Bandelin electronics, Berlin, BRD) in 500 µl PBS, pH 7,4 (siehe Abschnitt 7.2) gelöst und 10 min bei 4 °C und 14000 rpm (Kühlzentrifuge Hermle Z 360 K, Top-Labortechnik GmbH, Wehingen, BRD) zentrifugiert. Nach der Probenaufgabe wurde die Säule mit Aq. dest. /0,1 % TFA gespült, bis keine Absorption bei 280 nm (Ultrospec III Spektralphotometer, Pharmacia Biosystems GmbH, Freiburg, BRD) mehr nachweisbar war. Anschließend wurde

mit 60 % Acetonitril in 0,1 % aq. TFA bis zum Erreichen des Leerwertes bei 280 nm eluiert. Das Eluat wurde in 500 μ l Fraktionen aufgefangen, vereinigt und in der Vakuumentrifuge (Heto-Holten A/S, Allerød, Dänemark) eingetrocknet und bei -20 °C gelagert.

7 Enzymimmunoassays

7.1 Wichtige Chemikalien für die Enzymimmunoassays

Die Primärsereen wurden unverdünnt oder in einem Verhältnis von 1/100 (Antiserum) bzw. 1/1000 (Normalserum) in PBS, pH 7,4 (siehe Abschnitt 7.2) enthaltend 2,5 mg BSA pro ml bei -20 °C aufbewahrt. Poly-L-Lysin wurde in Aq. dest. in einer Konzentration von 10 μ g/ μ l gelöst, aliquotiert und bei -20 °C eingefroren. Wegen seiner schlechten Löslichkeit in wässrigen Medien wurde TMB portionsweise (5 mg/ml) in DMSO gelöst und in gebrauchsfertigen Mengen bei 4 °C aufgehoben. Alle anderen Substanzen wurden entsprechend den Herstellervorschriften gelagert. Einen Überblick über die Chemikalien gibt Tabelle 5.

7.2 Pufferlösungen

Folgende Pufferlösungen wurden für die verschiedenen Enzymimmunoassays verwendet:

1. PBS (phosphate buffered saline): Phosphatpuffer, pH 7,4; 0,01 M enthaltend 0,9 % NaCl (w/v)
2. TBS (Tris buffered saline): Tris-HCL-Puffer, pH 7,4; 0,1 M enthaltend 0,8 % NaCl (w/v)
3. Beschichtungspuffer: Carbonatpuffer, 0,05 M; pH 9,6
4. Blockierungspuffer: TBS, enthaltend 1, % (w/v) Gelatine
5. EIA-Waschpuffer: TBS, enthaltend 0,05 % (v/v) Tween 20
6. EIA-Puffer: TBS, enthaltend 0,1 (v/v) Tween 20
7. Puffer für Enzymsubstrate (siehe Tabelle 5):
 - (a) pNPP: Diethanolaminpuffer (1 M; pH 9,8; enthaltend 0,5 mM MgCl₂)
 - (b) TMB : Zitronensäure-Phosphatpuffer, 0,05 M; pH 5,5
 - (c) OPD : Zitronensäure-Phosphatpuffer, 0,05 M; pH 5,0

7.3 Geräte

Die Absorptionmessung der Reaktionsprodukte erfolgte mit einem Mikrotiterplattenphotometer SLT-Reader ATTC 340 (SLT-Labinstruments, Crailsheim, Deutschland) oder Maxline Microplate Reader EmaxTM (Molecular Devices, Graefelfing, Deutschland). Zum Schütteln

Tabelle 5: Verwendete Chemikalien für die Enzymimmunoassays.

Name	Hersteller, ggf. Produktnummer
<u>Primärseren</u>	
Anti-Pea-CAH-I-Serum	siehe Abschnitt 3
Kaninchennormalserum	Dr. M. Eckert*
<u>Sekundärantikörper und Konjugate</u>	
Alkalische Phosphatase gekoppelter Ziege-anti-Kaninchen-Ak Immunopure Goat Anti-Rabbit IgG, (H+L), Alkaline Phosphatase Conjugated	Pierce*, 31340
Meerrettich-Peroxidase gekoppelter Ziege-anti-Kaninchen-Ak Immunopure Goat Anti-Rabbit IgG, (H+L), Peroxidase Conjugated	Pierce*, 31460
Biotin gekoppelter Esel-Anti-Kaninchen-Ak Anti-rabbit Ig, biotinylated species-specific whole antibody (from donkey)	Amersham*, RPM 1004
Avidin gekoppelte alkalische Phosphatase Alkaline phosphatase conjugated avidin	Dako*, D 365
<u>Enzymsubstrate</u>	
p-Nitrophenylphosphat (pNPP) p-Nitrophenyl Phosphate tablets	Sigma*, N 9389
Tetramethylbenzidin (TMB) 3/3'-,5/5' Tetramethylbenzidine	Sigma*, T 2885
o-Phenylendiamin (OPD) o-Phenylendiamine (OPD) Dihydrochloride	Sigma*, P 1526
<u>Weitere wichtige Reagenzien</u>	
L-Tryptophan	siehe Tabelle 4
L-Tryptophanamid	siehe Tabelle 4
Rinderserumalbumin	siehe Tabelle 4
Poly-L-Lysin, MW 464000 D Poly-L-Lysine, Hydrobromide	Sigma*, P 1524
Glutaraldehyd	siehe Tabelle 4
Glycin, p.A.	Serva*, 23390
Gelatine Gelatin, EIA-grade	Biorad*, 170-6437
Tween 20	Serva*, 37470
Dimethylsulfoxid (DMSO) Dimethyl Sulfoxide (DMSO)	Sigma*, D 5879
Wasserstoffperoxid 30 % Hydrogen peroxide	Apoteksbolaget*

M. Eckert*	Institut für Allgemeine Zoologie und Tierphysiologie der FSU Jena
Apoteksbolaget*	Apoteksbolaget, Göteborg, Schweden
Amersham*	Amersham-International, UK
Bachem*	Bachem-Biochemica GmbH, Heidelberg, BRD
Biorad*	Biorad Laboratories, München, BRD
Dako*	Dako A/S, Glostrup, Dänemark
Pierce*	Pierce, Rockford, USA
Serva*	Serva-Feinbiochemica GmbH, Heidelberg, BRD
Sigma*	Sigma-Aldrich GmbH, Deisenhofen, BRD

der Mikrotiterplatten wurde das Gerät KL 2 (E. Bühler Laborgerätebau, Bodelshausen, BRD) benutzt. Alle Waschschritte wurden mit Hilfe einer Multipette (Eppendorf, Hamburg, BRD) durchgeführt.

7.4 Durchführung der Anti-Pea-CAH-I-Enzymimmunoassays

7.4.1 Allgemeines

Unabhängig von der Methode des jeweiligen Enzymimmunoassays gilt folgendes:

1. Als Mikrotiterplatten für alle Versuche dienten MaxiSorp F96 Immuno Plates mit Zertifikat (Nunc, Wiesbaden, Deutschland, Produktnummer 439454). Ihre Eignung wurde während der Assayetablierung getestet (siehe Ergebnisse in Kapitel 11.1.1).
2. Alle Inkubationsschritte auf der Mikrotiterplatte wurden in einer feuchten Kammer durchgeführt.
3. Sofern nicht anders genannt, wurden stets $100\ \mu\text{l}$ pro Kavität pipettiert.
4. Für Waschprozeduren mit EIA-Waschpuffer wurden stets $3 \times 300\ \mu\text{l}$ Puffer verwendet.

7.4.2 Competitive Anti-Pea-CAH-I-Enzymimmunoassays

7.4.2.1 Competitive Anti-Pea-CAH-I-Enzymimmunoassays mit alkalischer Phosphatase als Markerenzym Diese Assayvarianten wurden zur Bestimmung der Spezifität des Anti-Pea-CAH-I Serums (Kreuzreaktivitätstests siehe 12.1) eingesetzt. Als Standard diente eine 1/10 Verdünnungsreihe des Peptides Pea-CAH-I von 10^{-9} bis 10^{-16} mol. Die Testantigene wurden über den gleichen Bereich verdünnt, jedoch je nach Verfügbarkeit ausgehend von der 10- bis 100fachen Stoffmenge. Leerwerte wurden mit Kaninchennormalserum in der gleichen Konzentration wie das Anti-Pea-CAH-I-Serum ermittelt. Die Maximalbindung des Antikörpers konnte aus den Kurvenparametern der Standardkurve (siehe Abschnitt 7.5) berechnet werden. Standards, Leerwerte und Proben wurden als Triplikate aufgetragen und gemessen. Auf jeder Mikrotiterplatte wurde eine Standardkurve mitgeführt.

Protokoll A

1. Tag

1. Präinkubationsansätze
 - (a) Lösen der entsprechend vorportionierten Standards und Proben in EIA-Puffer.
 - (b) Ansetzen der Verdünnungsreihen in EIA-Puffer.

-
- (c) Zugabe doppelt konzentrierten Anti-Pea-CAH-I-Serums (1/2500 in EIA-Puffer), die Volumina der verdünnten Standards/Proben und des Antiserums müssen gleich sein. Die Endverdünnung des Antiserums liegt demzufolge bei 1/5000.
 - (d) Verdünnen des Normalserums auf 1/5000 in EIA-Puffer.
2. Inkubation von Standards, Proben und Leerwert bei 4 °C über Nacht.
 3. Beschichten der Mikrotiterplatte mit Pro¹-Pea-CAH-I (2 µg/ml) und Inkubation bei 4 °C über Nacht.

2. Tag

Die Inkubationsschritte bis zum Waschen der Mikrotiterplatte vor der Enzym-Substratreaktion wurden 1 h bei 37 °C ausgeführt. Alle Lösungen und der Waschpuffer wurden entsprechend vorgewärmt.

1. Waschen der Mikrotiterplatte mit $3 \times 300 \mu\text{l}$ TBS.
2. Blockieren freier Bindungsstellen auf der Mikrotiterplatte mit Blockierungspuffer, 250 µl/Kavität.
3. Waschen der Mikrotiterplatte.
4. Auftragen und Inkubation von Standards, Proben und Leerwert.
5. Waschen der Mikrotiterplatte.
6. Zugabe von Avidin gekoppeltem Anti-Kaninchen-IgG (1/500 in EIA-Puffer) zur Mikrotiterplatte.
7. Waschen der Mikrotiterplatte.
8. Inkubation der Mikrotiterplatte mit biotinylierter alkalischer Phosphatase (1/500 in EIA-Puffer)
9. Waschen der Mikrotiterplatte mit Waschpuffer. Der Puffer hatte Raumtemperatur.
10. Durchführen der Enzym-Substrat-Reaktion mit 1 mg/ml pNPP in Diethanolaminpuffer bei Zimmertemperatur.
11. Abstoppen der Reaktion durch Zugabe von 5 N Natronlauge (NaOH) nach 30 min.
12. Messen der Absorption des Reaktionsproduktes bei 405 nm.

Der Einsatz eines Konjugats aus Anti-Kaninchen-IgG und alkalischer Phosphatase trug wesentlich zur zeitlichen Straffung, Kosten- und Materialeinsparung bei. Diese Methode wurde

auch für einen Teil der quantitativen Bestimmungen der Pea-CAH-I-like Immunreaktivität genutzt.

Es ergaben sich folgende Veränderungen gegenüber Protokoll A:

Protokoll B

1. Tag

1. Präinkubationsansätze
 - (c) Anti-Pea-CAH-I-Serum und Kaninchennormalserum wurden in einer Endkonzentration von 1/15000 eingesetzt.
3. Beschichten der Mikrotiterplatte mit $1\ \mu\text{g}/\text{ml}$ Pro¹-Pea-CAH-I

2. Tag

1. – 5. siehe Protokoll A
6. Zugabe von alkalischer Phosphatase gekoppeltem Anti-Kaninchen-IgG (1/1000 in EIA-Puffer) zur Mikrotiterplatte.
7. Waschen der Mikrotiterplatte mit Waschpuffer. Der Puffer hatte Raumtemperatur.
8. Durchführen der Enzym-Substrat-Reaktion mit 1 mg/ml pNPP in Diethanolaminpuffer bei Zimmertemperatur.
9. Abstoppen der Reaktion durch Zugabe von 5 N Natronlauge (NaOH) nach 20 min.
10. Messen der Absorption des Reaktionsproduktes bei 405 nm.

7.4.2.2 Kompetitiver Enzymimmunoassay mit Meerrettichperoxidase als Markerenzym Dieses Verfahren wurde zur Quantifizierung von Pea-CAH-I-like Immunreaktivität und zu ihrem Nachweis in chromatographisch aufgetrennten Gewebeextrakten eingesetzt (siehe 13.1 und 13.3), da es sich durch eine höhere Empfindlichkeit auszeichnete (siehe 11.1.1). Als Standard diente eine 1/10 Verdünnungsreihe des Peptides Pea-CAH-I von 10^{-10} bis 10^{-16} mol. Leerwerte wurden mit Kaninchennormalserum in der gleichen Konzentration wie das Anti-Pea-CAH-I-Serum ermittelt. Die Maximalbindung des Antikörpers konnte aus den Kurvenparametern der Standardkurve (siehe Abschnitt 7.5) berechnet werden. Standards wurden als Triplikate, Leerwerte als Duplikate aufgetragen und gemessen. Auf jeder Mikrotiterplatte wurde eine Standardkurve mitgeführt. Die Messung der Proben wurde entsprechend des Probenumfangs, Substanzgehaltes und Anliegen des Versuchs variiert (siehe 13.1 und 13.3).

Protokoll C1. Tag

1. Ansetzen der Reaktionsgemische von Primärseren und gelösten Antigenen (Standards, Proben) sowie der Leerwerte.
 - (a) Lösen der entsprechend vorportionierten Standards und Proben in EIA-Puffer.
 - (b) Ansetzen der Verdünnungsreihen in EIA-Puffer.
 - (c) Zugabe doppelt konzentrierten Anti-Pea-CAH-I-Serums (1/40000 in EIA-Puffer), die Volumina der verdünnten Standards/Proben und des Antiserums müssen gleich sein. Die Endverdünnung des Antiserums liegt demzufolge bei 1/80000.
 - (d) Verdünnen des Normalserums auf 1/80000 in EIA-Puffer.
2. Beschichten der Mikrotiterplatte mit 0,1 µg/ml Pro¹-Pea-CAH-I 2 h bei 37 °C.
3. Waschen der Mikrotiterplatte mit 37 °C warmem Waschpuffer.
4. Blockieren freier Bindungsstellen auf der Mikrotiterplatte 1 h bei 37 °C mit Blockpuffer, 250 µl/Kavität.
5. Waschen der Mikrotiterplatte.
6. Auftragen von Standards, Proben und Leerwert auf die Mikrotiterplatte und Inkubation bei 4 °C über Nacht.

2. Tag

Alle folgenden Arbeitsschritte wurden bei Raumtemperatur und mit zimmerwarmen Lösungen durchgeführt.

1. Waschen der Mikrotiterplatte.
2. Zugabe von Meerrettichperoxidase gekoppeltem Anti-Kaninchen-IgG ((a) 1/5000 oder (b*) 1/3000 in EIA-Puffer) zur Mikrotiterplatte. Inkubation des Sekundäantikörpers 2 h auf dem Schüttler (Frequenz ca. 100-150 min⁻¹).
3. Waschen der Mikrotiterplatte.
4. Durchführen der Enzym-Substrat-Reaktion auf dem Schüttler (siehe oben) mit
 - (a) TMB, 0,1 mg/ml in TMB-Substratpuffer, enthaltend 0,08 % H₂O₂ bzw.
 - (b) OPD, 0,83 mg/ml in OPD-Substratpuffer, enthaltend 0,08 % H₂O₂.

5. Abstoppen der Reaktion durch Zugabe von 2 M Schwefelsäure (H_2SO_4) nach 20 - 40 min.
 6. Messen der Absorption des Reaktionsproduktes bei
 - (a) 450 nm
bzw.
 - (b) 490 nm.
- *) Trotz Einsatz des Lösungsvermittlers DMSO (vgl. 7.1) traten fortwährend Probleme bei der Lösung von TMB in Substratpuffer auf, die die Farbentwicklung beeinträchtigten. Das Verfahren wurde deshalb unter Anpassung der Konzentration des Enzymkonjugats auf die Verwendung von OPD umgestellt.

7.4.3 Nichtcompetitiver Anti-Pea-CAH-I-Enzymimmunoassay mit alkalischer Phosphatase als Markerenzym

Dieser Typ des Enzymimmunoassays diene ebenfalls zur Charakterisierung der Spezifität des Anti-Pea-CAH-I-Serums. Das zu detektierende Antigen wurde dabei passiv an die Mikrotiterplatte adsorbiert oder kovalent an die Festphase gebunden. Zur Kontrolle der unspezifischen Bindung wurde Kaninchennormalserum benutzt.

Protokoll D
Beschichtung der Mikrotiterplatte durch passive Adsorption

1. Tag

1. Beschichten der Mikrotiterplatte:
 - (a) Peptide: 0,5; 1,0; 2,0 $\mu\text{g}/\text{ml}$
 - (b) Tryptophan/Tryptophanamid: 5,0; 10,0; 20,0 $\mu\text{g}/\text{ml}$
 - (c) Konjugate: 0,1; 0,5; 1,0; 5,0; 10,0 $\mu\text{g}/\text{ml}$in Beschichtungspuffer.
2. Inkubation der Mikrotiterplatte bei 4°C über Nacht.

2. Tag

Die Inkubationsschritte bis zum Waschen der Mikrotiterplatte vor der Enzym-Substratreaktion wurden 1 h bei 37°C ausgeführt. Alle Lösungen und der Waschpuffer wurden entsprechend vorgewärmt.

1. Waschen der Mikrotiterplatte mit $3 \times 300 \mu\text{l}$ TBS.

2. Blockieren freier Bindungsstellen auf der Mikrotiterplatte mit Blockierungspuffer, $250 \mu\text{l}$ /Kavität.
3. Waschen der Mikrotiterplatte.
4. Auftragen von Anti-Pea-CAH-I-Serum und Kaninchennormalserum 1/15000 verdünnt in EIA-Puffer.
5. Waschen der Mikrotiterplatte.
6. Zugabe von alkalischer Phosphatase gekoppeltem Anti-Kaninchen-IgG (1/1000 in EIA-Puffer) zur Mikrotiterplatte.
7. Waschen der Mikrotiterplatte mit Waschpuffer. Der Puffer hatte Raumtemperatur.
8. Durchführen der Enzym-Substrat-Reaktion mit 1 mg/ml pNPP in Diethanolaminpuffer bei Zimmertemperatur.
9. Abstoppen der Reaktion durch Zugabe von 5 N Natronlauge (NaOH).
10. Messen der Absorption des Reaktionsproduktes bei 405 nm.

Protokoll E

Beschichtung der Mikrotiterplatte durch Kopplung der Antigene
an Glutaraldehyd aktiviertes Poly-L-Lysin

Das Verfahren wurde in Anlehnung an die Arbeiten von Ball *et al.* (1994) sowie Fujiwara und Kitagawa (1993) entwickelt.

1.Tag

Die Schritte 1. – 4. wurden bei Raumtemperatur durchgeführt, die Temperatur der verwendeten Lösungen wurde entsprechend angeglichen.

1. Beschichtung der Mikrotiterplatte mit Poly-L-Lysin $1 \mu\text{g}/\text{ml}$ in Beschichtungspuffer.
2. Waschen der Mikrotiterplatte mit $3 \times 200 \mu\text{l}$.
3. Auftragen von Glutaraldehyd, 1% (v/v) in PBS.
4. Waschen siehe 2.
5. Kopplung der Antigene (Konzentrationen entsprechend Protokoll D) bei 4°C über Nacht.

2.Tag

1. Waschen der Mikrotiterplatte mit $3 \times 300 \mu\text{l}$ PBS.

2. Blockieren freier Aldehydgruppen mit 1 M Glycin (250 μl /Kavität) in PBS 1 h Raumtemperatur.
3. Waschen der Mikrotiterplatte mit $3 \times 300 \mu\text{l}$ TBS (37°C).
4. Blockieren freier Bindungsstellen auf der Mikrotiterplatte mit Blockierungspuffer, 250 μl /Kavität, 1 h (37°C).
5. Waschen der Mikrotiterplatte mit 37°C warmem Waschlösungspuffer.
6. Auftragen von Anti-Pea-CAH-I-Serum und Kaninchennormalserum 1/15000 verdünnt in EIA-Puffer, Inkubation der Mikrotiterplatte 1 h bei 37°C.
7. Waschen der Mikrotiterplatte mit 37°C warmem Waschlösungspuffer.
8. Zugabe von alkalischer Phosphatase gekoppeltem Anti-Kaninchen-IgG (1/1000 in EIA-Puffer) zur Mikrotiterplatte, Inkubation 1 h bei 37°C.
9. Waschen der Mikrotiterplatte mit Waschlösungspuffer. Der Puffer hatte Raumtemperatur.
10. Durchführen der Enzym-Substrat-Reaktion mit 1 mg/ml pNPP in Diethanolaminpuffer bei Zimmertemperatur.
11. Abstoppen der Reaktion durch Zugabe von 5 N Natronlauge (NaOH).
12. Messen der Absorption des Reaktionsproduktes bei 405 nm.

7.5 Auswertung der gewonnenen Daten

Die aus den Messungen ermittelten Absorptionswerte konnten mit Hilfe der Gerätesoftware der Mikrotiterplattenphotometer weiterbearbeitet werden. Es standen die Programme 'EasyFit' (SLT-Reader ATTC 340) und 'SOFTmaxTM' (Maxline Reader EmaxTM) zur Verfügung. Die Programme lieferten Mittelwerte, Standardabweichungen und Variationskoeffizienten von Mehrfachbestimmungen sowie Modelle zur Anpassung von Standardkurven. Unbekannte Probenkonzentrationen konnten anhand der Standardkurve errechnet werden.

7.5.1 Berechnung der Standardkurven für die kompetitiven Enzymimmunoassays

Zur Anpassung einer Kurve an die Absorptionswerte der Standardverdünnungen standen wegen des sigmoidalen Kurvenverlaufs das 4-Parameter- (Healy 1972) und das logit-log-Verfahren (Rodbard und Cooper 1970) zur Wahl. Beide Anpassungsverfahren folgen der Gleichung:

$$y = \frac{A - D}{1 + \left(\frac{x}{C}\right)^B} + D \quad (7.1)$$

Die Parameter beschreiben dabei folgende Eigenschaften der Kurve:

- A* y -Wert der oberen Asymptote (entspricht kleinen x -Werten)
- B* Anstieg der Kurve im Wendepunkt
- C* x -Wert des Wendepunktes der Kurve
- D* y -Wert der unteren Asymptote (entspricht großen x -Werten)

Der Unterschied zwischen 4-Parameter- und logit-log-Fit ergibt sich dabei aus der Kalkulation von *A* und *D*. Bei letzterem werden dazu die zum niedrigsten bzw. höchsten x -Wert gehörigen y -Werte benutzt und davon ausgehend *B* und *C* bestimmt. Das 4-Parameter-Verfahren beginnt mit einem logit-log-Fit und findet dann durch Iteration präzisere Werte für *A* und *D*.

Deshalb wurde für alle Kurvenanpassungen das 4-Parameter-Verfahren verwendet. Als Wert für die Maximalbindung des Antikörpers wurde *A* angenommen.

7.5.2 Quantitative Angaben zur Kreuzreaktivität

Als Maß für die Kreuzreaktivität des Anti-Pea-CAH-I-Serums mit verschiedenen Peptiden bzw. Peptidkonjugaten wurde das sogenannte Kreuzreaktivitätsverhältnis (*KRV*) gebildet (Boureme *et al.* 1987). Dabei wurden die Stoffmengen von Testantigen und mitgeführtem Standard (Pea-CAH-I) an den Wendepunkten der Kurven (= Stoffmengen, die für eine 50%ige Hemmung der Antikörperbindung nötig sind) verglichen. Die Lage der beiden Kurven wurde hierfür auf $A = 1$ normiert, indem alle Absorptionswerte der jeweiligen Kurve durch den aus der Kurvenanpassung erhaltenen Wert für die Lage der oberen Asymptote dividiert wurden. Es ergibt sich also folgende Gleichung:

$$z = \frac{C'_{(Testantigen)}}{C'_{(Pea-CAH-I)}} \quad (7.2)$$

mit $C' = x$ -Wert des Wendepunktes *C* nach Normierung.

Die Darstellung erfolgte in der Form

$$\text{KRV} = 1 : z$$

wobei $1 = C'_{(Pea-CAH-I)}$ gilt.

7.5.3 Angaben zur Immunreaktivität in aufgetrennten Gewebeextrakten

Material aus HPLC-Fractionen wurden als Verdünnungsreihen gegen die übliche Standardkurve von Pea-CAH-I im Bereich von 10^{-10} bis 10^{-16} mol getestet. Zur Darstellung der Pea-CAH-I-like Immunreaktivität in den Fractionen wurde die *Hemmung der Antikörperbindung* im kompetitiven Enzymimmunoassay (Lehman *et al.* 1993) verwendet. Die erhaltenen optischen Dichten der Proben wurden mit den Parametern *A* und *D* der Funktionsgleichung der Standardkurve verrechnet. Dabei gilt:

$A - D$... maximal zu erreichende optische Dichte, entspricht 0% Hemmung der Antikörperbindung

D ... minimal zu erreichende optische Dichte, entspricht 100% Hemmung der Antikörperbindung

7.5.4 Statistische Verfahren

Zur Auswertung der quantitativen Bestimmungen sowie für die Darstellung der analytischen Qualitätsparameter der kompetitiven Enzymimmunoassays wurden folgende statistische Größen berechnet:

- arithmetischer Mittelwert \bar{x}

$$\bar{x} = \frac{\sum_{i=1}^n x_i}{n} \quad (7.3)$$

- Standardabweichung der Stichprobe s

$$s = \pm \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n x^2 - \frac{(\sum x)^2}{n}}{n-1}} \quad (7.4)$$

- Standardfehler des Mittelwertes $s_{\bar{x}}$

$$s_{\bar{x}} = \frac{s}{\sqrt{n}} \quad (7.5)$$

- Variationskoeffizient der Standardabweichung VK

$$VK = \frac{100\% \times s}{\bar{x}} \quad (7.6)$$

Dabei gilt:

x_i ... Stichprobenwerte

n ... Stichprobenumfang

8 Immuncytochemie

Zur Ermittlung der Kreuzreaktivität des Anti-Pea-CAH-I-Serums wurden Immunmarkierungen mit und ohne Flüssigphasepräabsorptionen des Antiserums mit verschiedenen Antigenen eingesetzt. Die Immunfärbungen wurden nach folgendem Schema durchgeführt.

Herstellung von Paraffinschnitten

1. Präparation der Gewebe unter Spülen mit Insektenringer (7,5 g NaCl; 0,1 g NaHCO₃; 0,2 g KCl; 0,2 g CaCl₂ auf 1 l Aq. dest.).
2. Fixierung nach Boer (1980) mit einem Gemisch aus 15,0 ml gesättigter Pikrinsäure, 5,0 ml Glutaraldehyd (siehe Tabelle 4), 0,2 ml Eisessig für 3 h bei 4 °C.
3. Entfernen des Fixierungsmittels und Dehydrieren der Gewebe über eine Alkoholreihe (45 min 70 % Ethanol, 30 min 96 % Ethanol, 2 × 15 min 100 % Ethanol, 2 × 15 min Benzol).
4. Überführen der Präparate in Histoplast (Serva-Feinbiochemica GmbH, Heidelberg, BRD) durch Inkubation in (a) einem Benzol-Histoplast-Gemisch (1/1; 30 min, 40 °C) und (b) in Histoplast (über Nacht bei 60 °C).
5. Einbetten der Präparate in Histoplast.
6. Herstellung von Mikrotomschnitten (8 µm), Strecken der Schnitte und Aufkleben auf Objektträger mittels Eiweiß-Glycerin.

Immunmarkierung

Hierbei handelte es sich um eine indirekte Immunfärbung unter Verwendung eines löslichen Peroxidase-Antiperoxidase-Komplexes (PAP) nach Sternberger (1970).

1. Entparaffinieren und Rehydrieren der Schnitte über Xylol und eine Alkoholreihe (15 min Xylol, jeweils 5 bis 10 min 100 % Ethanol 1, 100 % Ethanol 2, 96 % Ethanol, 70 % Ethanol), Spülen in PBS pH 7,4 (0,01 M Phosphatpuffer enthaltend 0,9 % (w/v) NaCl).
2. Blockieren unspezifischer Bindungen durch Ziegennormalserum (1/10 in PBS pH 7,4 (siehe oben), 15 min), Spülen in PBS-Tween 80 (100 ml PBS pH 7,4 + 1 Tropfen Tween 80 (Serva-Feinbiochemica GmbH, Heidelberg, BRD, Produktnummer 37475)).
3. Inkubation der Schnitte mit Anti-Pea-CAH-I-Serum (1/3000 in PBS-BSA (PBS pH 7,4 enthaltend 0,25 % (w/v) BSA, siehe Tabelle 4)) über Nacht oder:
Inkubation der Schnitte mit dem präabsorbierten Antiserum (siehe unten) für die Spezifitätstests.

4. Waschen 3×5 min mit PBS-Tween 80.
5. Auftragen des Ziege-anti-Kaninchen-Serums (1/20 in PBS-BSA), 1 h.
6. Waschen siehe 4.
7. Inkubation der Schnitte mit dem PAP-Komplex (1/400 in Tris-BSA (Tris-HCl-Puffer, 0,05 M; pH 7,6; enthaltend 0,25 % (w/v) BSA)), 1 h.
8. Waschen 2×5 min mit PBS-Tween 80, 1×5 min mit PBS.
9. Durchführen der DAB-Reaktion (0,1 % DAB (3,3'-Diaminobenzidin-Tetrahydrochlorid, Sigma-Aldrich GmbH, Deisenhofen, BRD) und 0,16 % H_2O_2 (siehe 5) in Tris-HCl-Puffer), Abstoppen mit Aq. dest.
10. Hochführen der Schnitte über eine Alkoholreihe (jeweils kurz 70 % Ethanol, 96 % Ethanol, 100 % Ethanol 1, 100 % Ethanol 2, 100 % Ethanol 3, Xylol).
11. Eindeckeln der Objektträger mit Entellan.

Tabelle 6: Überblick über die Flüssigphasepräabsorptionen.

Präabsorption des verdünnten AS mit:		markiertes Gewebe	Tierart
Substanz	Konz. [nmol/ml]		
GA-vernetztes BSA	10; 50; 100	Gehirn-RCK	<i>Periplaneta americana</i>
BSA-Trp-Konj.	10; 50; 100	Gehirn-RCK	<i>Periplaneta americana</i>
BSA-Trpa-Konj.	10; 50; 100	Gehirn-RCK	<i>Periplaneta americana</i>
Pea-MIP	10; 50; 100	Gehirn-RCK	<i>Periplaneta americana</i>
Lom-AKH-II	50; 100	Gehirn-RCK	<i>Periplaneta americana</i>
Scg-AKH-II	50; 100	Gehirn-RCK	<i>Periplaneta americana</i>
Pea-MIP	20; 40	4. und 5. freies AG	<i>Periplaneta americana</i>
Pea-MIP	20; 40	Gehirn-RCK	<i>Nauphoeta cinerea</i>
APGWa	200; 450	Gehirn-RCK	<i>Periplaneta brunnea</i>
APGWa	200; 450	Gehirn-RCK	<i>Blattella germanica</i>
APGWa	200; 450	Gehirn-RCK	<i>Blatta orientalis</i>
Scg-AKH-I	50	Gehirn-RCK	<i>Schistocerca gregaria</i>

Für die Flüssigphasepräabsorptionen wurden die trockenen Peptide in der halben Menge PBS pH 7,4 (siehe Protokoll Immunmarkierung) mittels Ultraschall gelöst und zum identischen Volumen doppelt konzentrierten Anti-Pea-CAH-I-Serums (1/1500 in PBS-BSA) gegeben. Die Konjugate und das mit Glutaraldehyd vernetzte BSA wurden mit Anti-Pea-CAH-I-Serum (1/100 in PBS-BSA) versetzt und mit PBS-BSA verdünnt, so daß alle Reaktionspartner in der gewünschten Konzentration vorlagen. Die Gemische wurden über Nacht bei 4 °C in

Eppendorfbechern unter Rotation inkubiert. Vor Verwendung wurde das Gemisch abzentrifugiert und analog zum nicht präabsorbierten Antiserum eingesetzt. Einen Überblick über die Flüssigphasepräabsorptionen des Antiserums mit verschiedenen Antigenen gibt Tabelle 6.

Die lichtmikroskopische Auswertung erfolgte mit dem Mikroskop AH3-RFCA (Olympus, Hamburg, BRD) mit integrierter Belichtungsautomatik und Kameraaufsatz. Für die Fotografien wurde Filmmaterial 100 ASA (ORWO Wolfen, BRD) verwendet.

9 HPLC

Die HPLC (high performance liquid chromatography) wurde zur Fraktionierung von Gewebeeextrakten und zur Isolierung von Peaks mit Pea-CAH-I-like Immunreaktivität eingesetzt. Alle Arbeiten wurden an einem Gynkotek-System (Gynkotek, Germering, Deutschland) ausgerüstet mit einem Dioden-Array Detektor (UVD 320, 200-355 nm), einer Gynkotec High Precision Pump M 480 und einem automatischen Probengeber GINA 160 durch Dipl. Chem. J. Rapus (Institut für Allgemeine Zoologie und Tierphysiologie der FSU Jena) durchgeführt. Die Proben wurden mittels Ultraschall in Laufmittel B (siehe unten) gelöst und 10 min bei 12000 rpm und 4 °C (Eppendorf Centrifuge 5403, Eppendorf, Hamburg, BRD) abzentrifugiert. Die Auftrennung erfolgte an RP-C18-Säulen (Gewebeeextrakte: 250 × 4,6 mm; 5 µm ODS-Hypersil Gynkochrom, Nachreinigung von Fraktionen; 250 × 4,6 mm; 5 µm Inertsil ODS 2). Es wurde dabei entweder ein (a) linearer AB Gradient von 10 auf 90 % B in 40 min (1,2 % B/min) eingesetzt oder es wurde (b) 10 min isokratisch bei 10 % B getrennt und erst dann der Gradient gestartet (vgl. Tab. 7). Als Laufmittel A diente 0,1 % aq. TFA und als Laufmittel B 60 % Acetonitril in 0,1 % aq. TFA. Das Eluat wurde peakorientiert per Hand geschnitten. Die Fraktionen wurden in der Vakuumzentrifuge (Heto-Holten A/S, Allerød, Dänemark) eingetrocknet und bei -20 °C aufbewahrt. Die Auswertung erfolgte über Retentionszeitvergleich und über Spektrenanalyse mittels Spektrenplot und Spektrenbibliothek.

10 Massenspektrometrie

Zur weiteren Charakterisierung von Pea-CAH-I-ähnlichem immunreaktiven Material aus den aufgereinigten HPLC-Fractionen wurde die MALDI-TOF (matrix-assisted laser desorption ionization time of flight) Massenspektrometrie eingesetzt. Alle Versuche wurden in Zusammenarbeit mit Dr. R. Predel an einem Gerät des Typs Kompact MALDI II Delayed Extraction (Kratos Analytical, Manchester, UK), ausgestattet mit einem Nitrogenlaser (337 nm), durchgeführt. Als Matrix diente eine gesättigte methanolische Lösung von α -cyano-4-Hydroxy-Zimtsäure (Hewlett-Packard, Böblingen, BRD). Das aufgereinigte Material aus den immunreaktiven HPLC-Fractionen wurde im Laufmittelgemisch AB, enthaltend 58 % B (siehe Abschnitt 9) in einer Konzentration von ca. 1 - 10 pmol/µl gelöst. Die Proben wurden im Sandwich-Verfahren (0,3 µl Matrix; 0,5 µl Probe; 0,3 µl Matrix) aufgetragen, 30 sec mit Aq.

Tabelle 7: Übersicht über HPLC-Trennungen.

Lfd. Nr.	HPLC zur . . .	Elutionsverfahren
1	Kontrolle auf Pea-CAH-I/II in Gewebeextrakten	a
2	Fraktionierung eines GE aus 108 RCK (<i>P. a.</i>)	b
3	Trennung von Fraktionen aus 2	a
4	Fraktionierung eines GE aus 250 5. AG (<i>P. a.</i>)	b
5	Fraktionierung eines GE aus 500 5. AG (<i>P. a.</i>)	a
6	Fraktionierung eines GE aus 500 Gehirnen (<i>N. c.</i>)	b
7	Fraktionierung eines GE aus 500 Gehirnen (<i>N. c.</i>)	a
8	Fraktionierung eines GE aus 100 RCK (<i>N. c.</i>)	a
9	Fraktionierung eines GE aus 500 RCK (<i>N. c.</i>)	a
10	Aufreinigung von Pea-MIP aus 5,7,9	a

dest. gewaschen und anschließend luftgetrocknet. Die Massenspektren wurden im positiven Modus aufgenommen. Von den geladenen Ionen wurden die Durchschnittsmassen (averaged masses) ermittelt.

Teil III

ERGEBNISSE

11 Anti-Pea-CAH-I-Enzymimmunoassays

11.1 Etablierung der Enzymimmunoassays

11.1.1 Competitive Enzymimmunoassays

Drei verschiedene Protokolle für einen kompetitiven, antigenorientierten Anti-Pea-CAH-I-Enzymimmunoassay wurden entwickelt. Beim kompetitiven Enzymimmunoassay konkurrieren gelöstes (Probe oder Standard) und immobilisiertes Antigen um eine Anzahl Antikörperbindungsstellen, die geringer ist als die Gesamtzahl der Antigene. Das gelöste, zu bestimmende, Antigen verhindert entsprechend seiner Konzentration und Affinität die Bindung des Antikörpers an das Festphasenantigen. Die entscheidendsten Schritte bei der Entwicklung der kompetitiven Anti-Pea-CAH-I-Enzymimmunoassays werden im folgenden kurz beschrieben.

Es bestand die Möglichkeit, als Festphasenantigen Pea-CAH-I, des-pGlu¹-Pea-CAH-I oder Pro¹-Pea-CAH-I zu nutzen. Pro¹-Pea-CAH-I wurde verwendet, weil es sich gut immobilisieren ließ (siehe Abschnitt 12.2) und in ausreichender Menge zur Verfügung stand.

Mikrotiterplatten der Typen Polysorp und Maxisorp (Nunc, Wiesbaden, BRD) sowie Elisa-Platten, KO, 96K der Firma Greiner- Labortechnik (Frickenhausen, BRD) standen zur Auswahl. Auf diesen Mikrotiterplatten wurden Konzentrationsreihen von Pro¹-Pea-CAH-I in Carbonatpuffer, 0,05 M, pH 9,6; 0,01 M PBS pH 7,4 und Tris-HCl-Puffer, 0,01 M, pH 8,5 wurden getestet. Homogenität der Beschichtung und Höhe der Absorptionen wurden bewertet. Als am besten geeignet erwiesen sich Maxisorp-Mikrotiterplatten und als Beschichtungspuffer Carbonatpuffer, 0,05 M, pH 9,6 (vgl. Tabelle 8).

Tabelle 8: Beschichtung der Mikrotiterplatten mit verschiedenen Konzentrationen von Pro¹-Pea-CAH-I, gelöst in Carbonatpuffer, 0,05 M, pH 9,6 und Detektion mit Anti-Pea-CAH-I-Serum (1/3000) entsprechend Protokoll A, vgl. Abschnitt 7.4.2.1. Der Variationskoeffizient wurde aus $n = 3$ Bestimmungen gebildet.

Pro ¹ -Pea-CAH-I [$\mu\text{g}/\text{ml}$]	optische Dichte \pm Variationskoeffizient [%]		
	Greiner	Maxisorp	Polysorp
0,1	0,767 \pm 31,2	1,234 \pm 17,0	0,144 \pm 7,2
0,5	2,055 \pm 12,0	2,360 \pm 3,7	0,187 \pm 4,3
1,0	2,253 \pm 17,4	2,395 \pm 3,45	0,187 \pm 29,7
5,0	2,222 \pm 7,7	2,640 \pm 2,0	0,153 \pm 2,1

Die Gebrauchsverdünnungen von Pro¹-Pea-CAH-I und Anti-Pea-CAH-I Serum wurden nach dem Verfahren von Tijssen (1985) ermittelt. Verschiedene Konzentrationen von Antigen und Primärserum wurden gegeneinander titriert. Die Kombinationen, die nach 30 - 60 min Substratinkubation optische Dichten zwischen 0,8 und 1,3 erzielten, wurden mit einer

Verdünnungsreihe von Pea-CAH-I inkubiert. Aus diesem Pool wurde diejenige Standardkurve ausgewählt, die den jeweiligen Anforderungen an Stabilität, Reproduzierbarkeit und Empfindlichkeit am besten entsprach. Einen Überblick über die wichtigsten Kenngrößen der drei kompetitiven Enzymimmunoassays gibt Tabelle 9. Antikörper- und Enzymkonjugate der jeweiligen Detektionssysteme wurden während dieser Prozedur im Überschuß eingesetzt. In weiteren Arbeitsschritten wurden ihre Konzentrationen und Inkubationszeiten angepaßt. Ziel dieser Optimierung war es, die Bindung des Primärantikörpers an das immobilisierte Antigen ohne Detektionsverluste bei ökonomischem Einsatz der Immunochemikalien wiederzugeben.

Für die quantitativen Bestimmungen und für die Untersuchung der Pea-CAH-I-like Immunreaktivität in aufgetrennten Gewebeextrakten war die methodische Empfindlichkeit des Anti-Pea-CAH-I-Enzymimmunoassays nach Protokoll A nicht ausreichend. Ansatzpunkt für die Verbesserung der methodischen Empfindlichkeit ist das Gleichgewicht zwischen Primärantikörper, immobilisiertem und gelöstem Antigen. Je geringer die Konzentrationen von gebundenem Antigen und Primärserum, desto geringer ist auch die Menge löslichen Antigens, die zur Hemmung der Antikörperbindung an das Festphasenantigen notwendig ist. Gleichzeitig steigen damit auch die Anforderungen an das Detektionssystem, die Bindung nur weniger Primärantikörper darzustellen.

Durch die Verwendung eines Konjugats aus alkalischer Phosphatase und Anti-Kaninchen-Antikörper konnten die Verdünnungen von Pro¹-Pea-CAH-I auf 1,0 µg/ml und die des Anti-Pea-CAH-I-Serums auf 1/15000 erhöht werden (Protokoll B). Die methodische Empfindlichkeit verbesserte sich ungefähr achtfach.

Eine entscheidende Verbesserung der methodischen Empfindlichkeit wurde erst durch die Entwicklung des Anti-Pea-CAH-I-Enzymimmunoassays nach Protokoll C erreicht. Durch die Modifizierung des Verfahrens nach Tijssen (1985) und die Verwendung von Meerrettich-Peroxidase als Markerenzym konnten die Konzentrationen von Pro¹-Pea-CAH-I und Anti-Pea-CAH-I-Serum weiter gesenkt werden. Bisher wurde das Peptid zur Beschichtung über Nacht bei 4 °C und der Antikörper 1 h bei 37 °C inkubiert. Tests mit verschiedenen Inkubationsmethoden zeigten, daß sich bei sehr großen Verdünnungen der Reaktionspartner die höchsten Absorptionswerte bei einer Beschichtungsdauer von 2 h bei 37 °C und Antikörperinkubation über Nacht bei 4 °C ergaben. Außerdem wurde entgegen der üblichen Verfahrensweise die Enzym-Substrat-Reaktion erst nach 2 h abgestoppt, so daß auch bei geringen Konzentrationen von Peptid und Antiserum ausreichend hohe Absorptionswerte gemessen werden konnten. Die lange Inkubationsdauer war jedoch nicht praktikabel, da Randeffekte (Nunc Bulletin Nr.1 (1985); Oliver *et al.* 1981; Burt *et al.* 1979) auftraten, die die Genauigkeit der Meßergebnisse beeinträchtigten. Durch die Umstellung von alkalischer Phosphatase auf Meerrettichperoxidase konnte die Inkubationsdauer wieder auf 30 min gesenkt werden, da sowohl die molare Umsatzrate (dreifach) als auch die Signalstärke der Reaktionsprodukte (zehnfach) höher sind als bei alkalischer Phosphatase (Porstmann und Porstmann 1991, Wild und Davies 1994). Als HRP-Substrat diente zunächst TMB, da es nicht mutagen ist und bei der

Tabelle 9: Die drei verschiedenen Anti-Pea-CAH-I-Enzymimmunoassays im Überblick. Die Werte für B und C wurden aus den Parametern von jeweils sieben Standardkurven gemittelt.

	Enzymimmunoassay		
	Prot. A	Prot. B	Prot. C
Ag^1 [pmol/ μ l]	2,0	1,0	0,1
Ak^2	1/5000	1/15000	1/80000
B^3	0,553	0,652	0,656
C [pmol] ⁴	53,5	6,87	0,175
MB [pmol]	1,0 - 100,0	1,0 - 50,0	0,01 - 1,0
Detek- tions- system	biotinyl. a-Kan-Ak/ Av-AP/ PNPP	AP gek. a-Kan-Ak/ PNPP	HRP gek. a-Kan-Ak/ OPD (TMB) ⁵

- 1) immobilisiertes Pro¹-Pea-CAH-I
- 2) Anti-Pea-CAH-I-Serum
- 3) B bezeichnet den Anstieg im Wendepunkt der Standardkurve, je größer B ist, desto steiler verläuft die Kurve.
- 4) C gibt die Konzentration von Pea-CAH-I im Wendepunkt der Standardkurve an und entspricht so der Stoffmenge, die für die Hemmung der Maximalbindung um 50% notwendig ist
 C gilt als Richtwert für den Vergleich der Empfindlichkeiten
- 5) siehe Abschnitt 7.4.2.2

Umsetzung sehr hohe Absorptionswerte bei minimalem Hintergrund liefert. Probleme mit der Löslichkeit (siehe Abschnitt 7.4.2) begrenzten jedoch diese Vorteile, so daß später OPD eingesetzt wurde. Die methodische Empfindlichkeit des Anti-Pea-CAH-I-Enzymimmunoassays nach Protokoll C konnte gegenüber Protokoll A ca. 300fach erhöht werden.

11.1.2 Direkter Enzymimmunoassay

Der direkte Anti-Pea-CAH-I-Enzymimmunoassay wurde aus dem kompetitiven Verfahren abgeleitet. Verschiedene Antigenkonzentrationen wurden passiv (siehe Abschnitt 11.1.1) oder kovalent beschichtet und unter Verwendung der bereits ermittelten Konzentrationen für Primärantikörper und Konjugate detektiert. Die kovalente Bindung der Antigene an die Mikrotiterplatte durch Glutaraldehydkopplung an immobilisiertes Poly-L-Lysin sollte weitgehend die Bedingungen bei der Glutaraldehydfixierung der Peptide im Gewebe nachvollziehen. Ausgehend von den Beschichtungsprotokollen von Ball *et al.* (1994) sowie Fujiwara und Kitagawa (1993), wurden die Verdünnungen von Poly-L-Lysin und Glutaraldehyd den konkreten Bedingungen angepaßt. Optimale Peptidbeschichtung wurde bei der Verwendung

von $1,0\mu\text{g/ml}$ Poly-L-Lysin und $1,0\%$ (v/v) Glutaraldehyd erreicht.

11.2 Analytische Qualitätsparameter der Enzymimmunoassays

11.2.1 Richtigkeit

Die Richtigkeit (Accuracy) beschreibt die Übereinstimmung des Meßwertes mit der wahren Konzentration des Analyten in der Probe. Die Richtigkeit einer Messung wird von der Spezifität des Antiserums sowie von systematischen und zufälligen experimentellen Fehlern beeinflusst. Zur Einschätzung der Richtigkeit werden die Überprüfung der Meßergebnisse mit einer unabhängigen Meßmethode (Porstmann und Kiessig 1992, Kiessig *et al.* 1994, Singer *et al.* 1987), Experimente zur Wiederfindung (Recovery) definierter Mengen Standards in der Probe (Nickoloff 1986) sowie Parallelitätstests (Sobeck 1987) vorgeschlagen.

Mit der HPLC als unabhängige Meßmethode wurde der Gehalt von Pea-CAH-I und -II von drei aliquotierten Gewebeextrakten aus Retrocerebralkomplexen männlicher Schaben (*Periplaneta americana*) mit den Meßergebnissen der kompetitiven Enzymimmunoassays (siehe Abschnitt 7.4.2, Protokolle B und C) verglichen. Die Untersuchung zeigt eine gute Übereinstimmung der Ergebnisse der HPLC-Bestimmung mit denen der Enzymimmunoassays sowie der Enzymimmunoassays untereinander.

Tabelle 10: Bestimmung von Pea-CAH-I und -II mit der HPLC und Messung der Pea-CAH-I-like Immunreaktivität mit verschiedenen Varianten des kompetitiven Anti-Pea-CAH-I-Enzymimmunoassays. Die Angaben erfolgen in pmol/RCK. Die mit den Enzymimmunoassays erzielten Ergebnisse sind die Mittelwerte \bar{x} aus $n = 4$ Messungen mit der zugehörigen Standardabweichung des Mittelwertes $s_{\bar{x}}$.

Probe	HPLC	EIA (Prot. B)	EIA (Prot. C)
1	94,0	$88,8 \pm 3,3$	$71,1 \pm 5,1$
2	97,2	$102,0 \pm 4,1$	$90,3 \pm 4,6$
3	92,45	$86,3 \pm 2,6$	$81,45 \pm 8,8$

Die Wiederfindung von Pea-CAH-I wurde bei der quantitativen Erfassung der Pea-CAH-I-like Immunreaktivität durch Zugabe des synthetischen Peptids während der verschiedenen Aufarbeitungsschritte hin bis zur eigentlichen Messung kontrolliert (siehe Abschnitt 13.1, Tabelle 17).

Die Parallelität von Standard- und Probenverdünnungskurve gibt Aussage darüber, ob der Antikörper die Probe in der gleichen Weise bindet wie den Standard und testet so die Gültigkeit des Meßsystems (Nickoloff 1986). Alle Gewebeextrakte wurden deshalb vor der eigentli-

chen Quantifizierung der Pea-CAH-I-like Immunreaktivität als Verdünnungsreihen getestet. Störende Verbindungen im Extrakt wurden durch eine Erweiterung der Reinigungsprozedur entfernt und die Parallelisierung der Kurven erreicht (siehe Abschnitt 13.1).

11.2.2 Präzision

Das Meßergebnis mit dem zugehörigen Variationskoeffizienten zeigt die Präzision einer Messung (Nickoloff 1986), stellt also das Maß dar, mit dem eine Reihe von Meßwerten mit dem Mittelwert übereinstimmen (Midgley *et al.* 1969). Die Präzision wird stets für einzelne Antigenkonzentrationen und nicht für die gesamte Standardkurve angegeben, da sie stark vom wechselnden Anstieg der sigmoidalen Standardkurve abhängig ist. Zur Beschreibung der Präzision werden der Intraassayfehler (Präzision einer Qualitätskontrollprobe innerhalb eines Enzymimmunoassays) und der Interassayfehler (Präzision einer Qualitätskontrollprobe über mehrere Enzymimmunoassays) verwendet. Der Intraassayfehler wurde aus jeweils sechs, der Interassayfehler aus sieben Einzelwerten ermittelt. Die Meßpunkte liegen im linearen Teil der betreffenden Standardkurven.

Tabelle 11: Intra- und Interassayfehler bestimmt mit dem kompetitiven Anti-Pea-CAH-I-Enzymimmunoassay, Protokoll A.

Probe [pmol]	Intraassayfehler [pmol] $\pm VK$	Interassayfehler [pmol] $\pm VK$
1,0	0,95 $\pm 13,7\%$	0,99 $\pm 12,2\%$
5,0	5,1 $\pm 10,2\%$	4,6 $\pm 17,2\%$
10,0	11,0 $\pm 9,8\%$	12,4 $\pm 12,5\%$
50,0	48,2 $\pm 9,9\%$	47,4 $\pm 8,7\%$
100,0	98,5 $\pm 6,9\%$	97,3 $\pm 20,5\%$

Tabelle 12: Intra- und Interassayfehler bestimmt mit dem kompetitiven Anti-Pea-CAH-I-Enzymimmunoassay, Protokoll B.

Probe [pmol]	Intraassayfehler [pmol] $\pm VK$	Interassayfehler [pmol] $\pm VK$
1,0	1,37 $\pm 5,0\%$	1,24 $\pm 20,9\%$
5,0	5,18 $\pm 8,3\%$	5,1 $\pm 8,9\%$
10,0	10,31 $\pm 5,6\%$	10,24 $\pm 4,0\%$
50,0	43,8 $\pm 4,6\%$	46,3 $\pm 11,3\%$

Tabelle 13: Intra- und Interassayfehler bestimmt mit dem kompetitiven Anti-Pea-CAH-I-Enzymimmunoassay, Protokoll C.

Probe [pmol]	Intraassayfehler [pmol] $\pm VK$	Interassayfehler [pmol] $\pm VK$
0,01	0,012 $\pm 14,9\%$	0,0099 $\pm 37,2\%$
0,05	0,048 $\pm 5,0\%$	0,05 $\pm 12,0\%$
0,1	0,099 $\pm 9,1\%$	0,101 $\pm 9,2\%$
0,5	0,48 $\pm 10,5\%$	0,49 $\pm 9,1\%$
1,0	1,06 $\pm 10,2\%$	1,04 $\pm 18,8\%$

11.2.3 Empfindlichkeit

Bei der Empfindlichkeit eines Enzymimmunoassays ist zwischen der methodischen (Detektionslimit) und der analytischen Sensitivität (Kiessig *et al.* 1994) zu unterscheiden. Die analytische Empfindlichkeit beschreibt die Verlässlichkeit, mit der kleinste Konzentrationsunterschiede statistisch sicher bestimmt werden können. Sie ist abhängig von der Präzision und vom Anstieg der Standardkurve. Für die vorliegende Arbeit besitzt sie keine Bedeutung, da keine Konzentrationsunterschiede gemessen wurden. Die methodische Empfindlichkeit ist die kleinste Antigenmenge, die statistisch sicher von Null unterschieden werden kann. Sie berechnet sich nach der Formel

$$\text{methodische Empfindlichkeit} = \bar{x} \pm 2,8 \times s_x$$

Beim kompetitiven Enzymimmunoassay entspricht \bar{x} dem Wert der Maximalbindung und beim direkten Enzymimmunoassay dem Leerwert. Eine andere Möglichkeit besteht darin, das Detektionslimit willkürlich auf einen Wert festzulegen (Sobeck 1987). Von dieser Variante wurde bei der Auswertung der Enzymimmunoassays zur Bestimmung von Pea-CAH-I-like Immunreaktivität in den HPLC-Fractionen verschiedener Gewebeextrakte Gebrauch gemacht. Das Detektionslimit wurde auf 15% Hemmung festgelegt. Dieser Wert liegt etwa bei 0,01 pmol und damit an der unteren Grenze des linearen Meßbereichs dieser Assayvariante (Protokoll C, siehe Abschnitt 7.4.2). Die Verwendung dieses Verfahrens erscheint beim kompetitiven Enzymimmunoassay sinnvoller, da so Meßwerte mit unzureichender Präzision aus dem gekrümmten Kurventeil entfallen. Beim Aufbau der verschiedenen kompetitiven Anti-Pea-CAH-I-Enzymimmunoassays wurde die Verbesserung der Empfindlichkeit mit Hilfe des Parameters C aus der Gleichung der 4-Parameter-Funktion (siehe Abschnitt 7.5.1) eingeschätzt. C gibt die Konzentration von Pea-CAH-I im Wendepunkt der Standardkurve an und entspricht so der Stoffmenge, die für die Hemmung der Maximalbindung um 50% notwendig ist.

12 Spezifität des Anti-Pea-CAH-I-Serums

12.1 Charakterisierung der Antiserumspezifität mit dem kompetitiven Anti-Pea-CAH-I-Enzymimmunoassay

Der Einsatz synthetischer Analoga von Pea-CAH-I, von Peptiden der AKH/RPCH-Familie, von strukturell ähnlichen Peptiden und von Tryptophan, Tryptophanamid sowie ihren BSA-Konjugaten als konkurrierende Antigene im kompetitiven Anti-Pea-CAH-I-Enzymimmunoassay ermöglichte die Identifizierung und Charakterisierung der Epitope sowie die quantitative Einschätzung der Kreuzreaktivität des Antiserums durch Angabe des Kreuzreaktivitätsverhältnisses (KRV) für heterologe Antigene. Es beschreibt, um welchen Faktor (z) die Stoffmenge des Testantigens im Vergleich zur Stoffmenge von Pea-CAH-I größer sein muß, um eine 50%ige Hemmung der Antikörperbindung im Enzymimmunoassay zu erzielen. Tabelle 14 zeigt die Primärstrukturen zusammen mit den KRV der getesteten Antigene sowie die Anzahl der Bestimmungen (n) und den Interassayfehler (VK) von z und die maximal eingesetzten Stoffmengen der Verbindungen.

Teilsequenzen von Pea-CAH-I dienen dazu, die Lage des Epitops festzustellen. Es befindet sich im C-Terminus des Peptids. Des¹⁻⁴-Pea-CAH-I (Ser-Pro-Asn-Trpa) wird annähernd genauso gut erkannt (1 : 2,0) wie Pea-CAH-I. Die Verkürzung dieser Sequenz führt offensichtlich zum Absinken der Kreuzreaktivität. Das KRV von des¹⁻⁵-Pea-CAH-I (Pro-Asn-Trpa) ist um etwa eine Zehnerpotenz (1 : 28,8) schlechter, während das KRV von des¹⁻⁶-Pea-CAH-I (Asn-Trpa) nur noch bei 1 : 827,2 liegt (vgl. Abbildung 1, links).

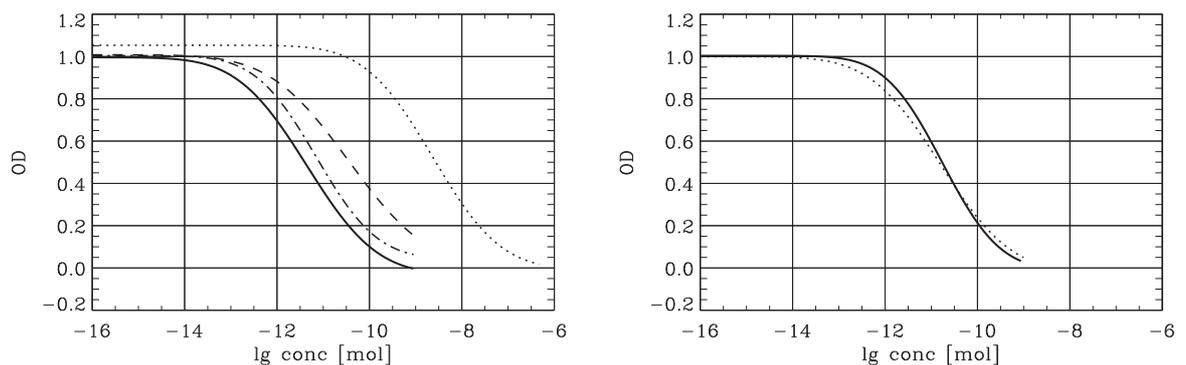


Abbildung 1: Verdrängungskurven ausgewählter konkurrierender Antigene im kompetitiven Anti-Pea-CAH-I-Enzymimmunoassay. — Pea-CAH-I links: Teilsequenzen von Pea-CAH-I: - · - · des¹⁻⁴-Pea-CAH-I (Ser-Pro-Asn-Trpa), - - - des¹⁻⁵-Pea-CAH-I (Pro-Asn-Trpa), · · · des¹⁻⁶-Pea-CAH-I (Asn-Trpa) rechts: — Pea-CAH-I und · · · Pea-CAH-II

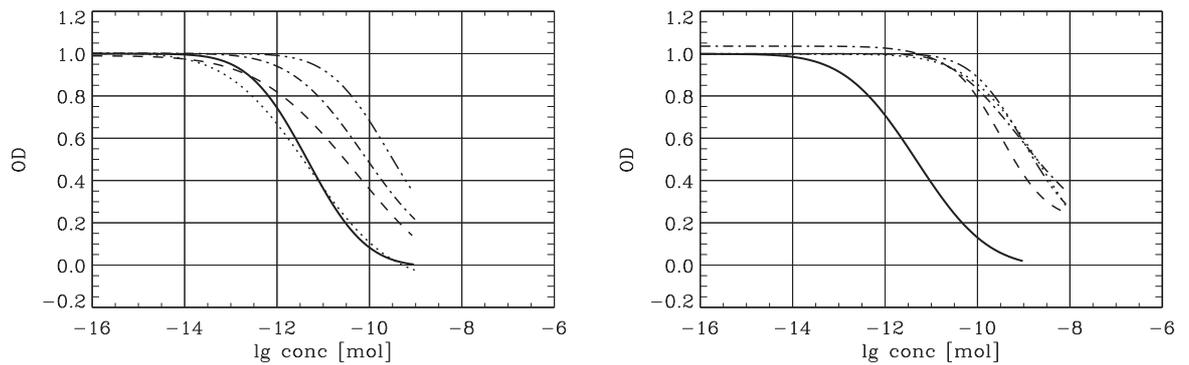


Abbildung 2: Verdrängungskurven ausgewählter konkurrierender Antigene im kompetitiven Anti-Pea-CAH-I-Enzymimmunoassay. — Pea-CAH-I links: Pro-X-Trpa-Peptide: \cdots Mem-CC (-Pro-Asp-Trpa), $---$ Lia-AKH (-Pro-Ser-Trpa), $-\cdot-\cdot-$ Pab-RPCH (-Pro-Gly-Trpa), $-\cdots-\cdots$ APGWa (-Pro-Gly-Trpa) rechts: X-X-Wa-Peptide: $---$ Lom-AKH-II (-Ala-Gly-Trpa), \cdots PPGLWa (-Gly-Leu-Trpa), $-\cdot-\cdot-$ Grb-AKH (-Thr-Gly-Trpa), $-\cdots-\cdots$ Pea-MIP-I (-Gly-Gly-Trpa)

Mitglieder der AKH/RPCH-Familie und andere strukturell ähnliche Peptide wurden nach ihrer C-terminalen Aminosäurefolge zu verschiedenen Gruppen zusammengefaßt.

- Peptide mit dem C-Terminus Pro-Asn-Trpa (-P-N-Wa-Peptide)

Alle Peptide, deren C-terminale Aminosäuresequenz aus -Pro-Asn-Trpa gebildet wird, sind trotz verschiedener Aminosäurereste in der Position N-terminal von Prolin voll kreuzreaktiv. Als Teil eines längeren Peptids (mindestens eines Tetrapeptids, siehe oben) ist die die Aminosäurefolge -Pro-Asn-Trpa offensichtlich ausreichend für die maximale Kreuzreaktivität mit dem Anti-Pea-CAH-I-Serum zu sein. Veränderungen im N-Terminus (z. B. bei Pea-CAH-II) haben keine Wirkung auf die Kreuzreaktivität (vgl. Abbildung 1, rechts).

- Peptide mit dem C-Terminus Pro-X-Trpa (-P-X-Wa-Peptide)

Bei diesen Peptiden stehen in der vorletzten Position die Aminosäuren Asparaginsäure, Serin oder Glycin. Die Größe der *KRV* ändert sich dabei in Abhängigkeit von der Aminosäure. Ohne Einfluß auf die Kreuzreaktivität bleibt der Austausch von Asparagin durch Asparaginsäure. Stehen jedoch Serin oder Glycin zwischen Prolin und Tryptophanamid erhöht sich die Stoffmenge für eine 50 %ige Hemmung der Antikörperbindung um mehr als das Zehnfache (vgl. Abbildung 2, links).

- Peptide mit dem C-Terminus X-X-Trpa (-X-X-Wa-Peptide)

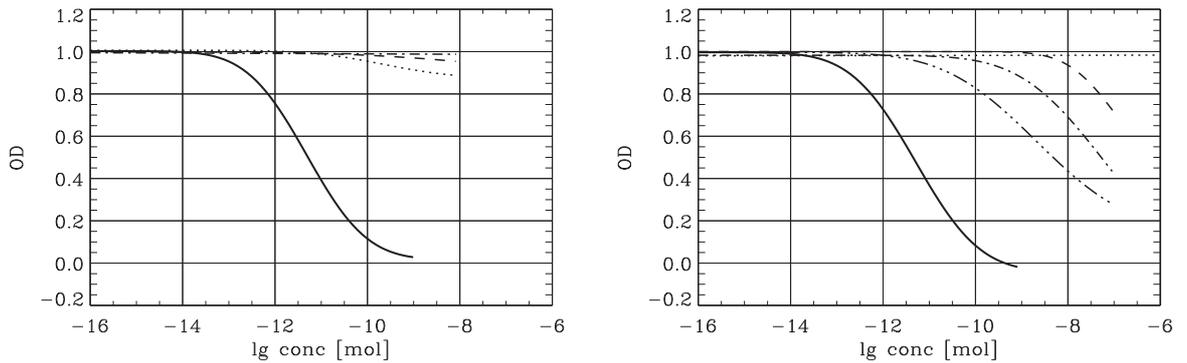


Abbildung 3: Verdrängungskurven ausgewählter konkurrierender Antigene im kompetitiven Anti-Pea-CAH-I-Enzymimmunoassay. — Pea-CAH-I links: C-terminal verlängerte Peptide: \cdots Cam-HrTH (-Pro-Asn-Trp-Gly-Thra), $---$ Bld-HrTH (-Pro-Gly-Trp-Gly-Thra), $- \cdot - \cdot$ Leucokinin-III (-Asn-Ser-Trp-Gly) rechts: $- \cdot \cdot - \cdot \cdot$ Trpa-Konj., $- \cdot - \cdot$ Trp-Konj., $---$ Trpa, \cdots Trp

Der C-Terminus dieser Peptide gleicht nur noch in der letzten Position dem oben beschriebenen Tripeptid. Der Austausch von zwei Aminosäuren führt zu einem weiteren Absinken der Kreuzreaktivität, z nimmt dabei die Größe dreistelliger Zahlen ein. Die Kreuzreaktivität dieser Peptide ist offensichtlich nur noch von Tryptophanamid abhängig, denn die beiden Stellen N-terminal von Tryptophanamid sind bei den getesteten Peptiden variabel besetzt. Wie das *KRV* von PPGLWa, einem synthetischen Analogon von Metamorphosin A (Leitz *et al.* 1994) zeigt, verbessern Prolinreste in anderen Positionen als in der im Tripeptid die Erkennung durch das Anti-Pea-CAH-I-Serum nicht (vgl. Abb. 2, rechts).

- C-terminal verlängerte Peptide

Für keines dieser Peptide konnte ein *KRV* im Enzymimmunoassay ermittelt werden. Die C-terminale Verlängerung der Peptide und die damit verbundene Umwandlung von Tryptophanamid in Tryptophan führen zum Verlust der Kreuzreaktivität mit dem Anti-Pea-CAH-I-Serum. Die Aminosäuren in den beiden Positionen vor Tryptophan spielen dabei keine Rolle (vgl. Abbildung 3, links).

Konjugate von Tryptophan und Tryptophanamid sowie die freies Tryptophan bzw. Tryptophanamid wurden getestet, um den Einfluß der Amidgruppe auf die Kreuzreaktivität mit dem Anti-Pea-CAH-I-Serum darzustellen (vgl. Abbildung 3, rechts). Der Parameter z nimmt für das Tryptophanamidkonjugat eine dreistellige Größe an und ist damit ungefähr mit der Kreuzreaktivität der -X-X-Wa-Peptide vergleichbar. Im Unterschied dazu wurde gekoppeltes Tryptophan nochmals zehnfach schlechter als das Säureamidkonjugat erkannt. Tryptophan ist nicht, Tryptophanamid äußerst schwach kreuzreaktiv (1 : 19955).

Tabelle 14: Kreuzreaktivitätstests. Aminosäurereste, die sich bezogen auf die entsprechende Position von Pea-CAH-I unterscheiden, wurden in **fetter Schrift** dargestellt.

Name des Testantigens	Aminosäuresequenz ¹⁾										KRV 1 : z	VK(z) [%]	n	maximal getestete Stoffmenge [mol]
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10				
des ¹⁻⁶ -Pea-CAH-I							N	Wa			1 : 827,2		1	5 × 10 ⁻⁷
des ¹⁻⁵ -Pea-CAH-I						P	N	Wa			1 : 28,8	18,6	3	10 ⁻⁹
des ¹⁻⁴ -Pea-CAH-I					S	P	N	Wa			1 : 2,0	15,4	3	10 ⁻⁹
des-pGlu ¹ - Pea-CAH-I		V	N	F	S	P	N	Wa			1 : 6,4		1	10 ⁻⁹
Pro ¹ -Pea-CAH-I	P	V	N	F	S	P	N	Wa			1 : 2,2	12,8	2	10 ⁻⁹
Pea-CAH-I	pE	V	N	F	S	P	N	Wa			1 : 1			
Tem-HrTH	pE	L	N	F	S	P	N	Wa			1 : 1,19		1	10 ⁻⁹
Emp-AKH	pE	V	N	F	T	P	N	Wa			1 : 0,39		1	10 ⁻⁹
Pea-CAH-II	pE	L	T	F	T	P	N	Wa			1 : 1,46	11,4	3	10 ⁻⁹
Pht-HrTH	pE	L	T	F	S	P	D	Wa			1 : 1,67		1	10 ⁻⁹
Mem-CC	pE	L	N	Y	S	P	D	Wa			1 : 0,88		1	10 ⁻⁹
Ani-AKH	pE	V	N	F	S	P	S	Wa			1 : 17,3		1	10 ⁻⁹
Lia-AKH	pE	V	N	F	T	P	S	Wa			1 : 17,6	11,9	2	10 ⁻⁸
Pab-RPCH	pE	L	N	F	S	P	G	Wa			1 : 13,3	4,4	3	10 ⁻⁹
des-pGlu ¹ - Psi-AKH		V	N	F	T	P	G	Wa			1 : 44,96	9,6	3	10 ⁻⁸
APGWa					A	P	G	Wa			1 : 60,4	18,9	3	10 ⁻⁸
Grb-AKH	pE	V	N	F	S	T	G	Wa			1 : 427,9	43,1	3	10 ⁻⁸
Scg-AKH-II	pE	L	N	F	S	T	G	Wa			1 : 137,9	14,6	3	10 ⁻⁸
Lom-AKH-II	pE	L	N	F	S	A	G	Wa			1 : 145,3	0,5	3	10 ⁻⁸
Pea-MIP ²	X	X	X	X	X	G	G	Wa			1 : 403,5	13,5	3	10 ⁻⁸
PPGLWa				P	P	G	L	Wa			1 : 350,1	21,5	3	10 ⁻⁸
Cam-HrTH	pE	L	T	F	T	P	N	W	G	Ta	-	-	2	10 ⁻⁸
Rom-CC-I	pE	V	N	F	T	P	S	W	G	Ta	-	-	1	10 ⁻⁹
Bld-HrTH	pE	V	N	F	S	P	G	W	G	Ta	-	-	3	10 ⁻⁸
Taa-HoTH	pE	L	T	F	T	P	G	W	G	Ya	-	-	1	10 ⁻⁸
Mas-AKH	pE	L	T	F	T	S	S	W	Ga		-	-	1	10 ⁻⁹
Leucokinin-I		D	P	A	F	N	S	W	Ga		-	-	2	10 ⁻⁸
Leucokinin-III		D	Q	G	F	N	S	W	Ga		-	-	2	10 ⁻⁸
Trp											-	-	2	10 ⁻⁶
Trpa											1 : 19955	17,1	4	10 ⁻⁷
BSA-Trp-K.											1 : 9658		1	10 ⁻⁷
BSA-Trpa-K.											1 : 964,4	8,8	2	10 ⁻⁷
BSA-GA											-		1	10 ⁻⁷

- 1) Aus Gründen der Übersichtlichkeit wurden alle Peptidsequenzen in ihrer mit Tryptophan(amid) besetzten Position in Übereinstimmung gebracht.
- 2) Pea-MIP wurde aus *Periplaneta americana* isoliert, die Primärstruktur wird in Predel *et al.* (2001) veröffentlicht.

Glutaraldehyd vernetztes BSA wurde benutzt, um auszuschließen, daß das Anti-Pea-CAH-I-Serum Antikörper enthält, die gegen Glutaraldehyd gerichtet sind. Dies konnte bestätigt werden.

Die Verdrängungskurven im kompetitiven Anti-Pea-CAH-I-Enzymimmunoassay zeigen einen der Kreuzreaktivität-Typ-1 (Schmid *et al.* 1993) entsprechenden Verlauf. Die Kurven von Standard und Testantigen laufen dabei annähernd parallel. Je geringer die Kreuzreaktivität des Antiserums zum konkurrierenden Antigen ist, desto größer ist die Rechtsverschiebung der Testkurve. Ist die Verbindung nicht kreuzreaktiv, bewegt sich der Graph im Bereich der oberen Asymptote. In den Abbildungen 1, 2 und 3 sind einige Kurvenverläufe beispielhaft dargestellt.

12.2 Untersuchungen zur Spezifität des Anti-Pea-CAH-I-Serums mit dem nichtkompetitiven Enzymimmunoassay

Das Ziel der nichtkompetitiven Enzymimmunoassays war es, die Kreuzreaktivität des Anti-Pea-CAH-I-Serums gegenüber immobilisierten Antigenen unter definierten Bedingungen zu untersuchen. Besonderes Augenmerk galt dabei der Antikörperbindung an Antigene mit gegenüber Pea-CAH-I verändertem oder verlängertem C-Terminus. Dazu wurden Vertreter der verschiedenen Gruppen heterologer Antigene auf die Mikrotiterplatte aufgetragen und ihre Absorptionen untereinander sowie mit dem jeweils mitgeführten Standard (Pea-CAH-I) verglichen. Die Beschichtung erfolgte nach zwei Methoden. Neben der passiven Adsorption (Bindung der Antigene durch van der Waals Kräfte und Wasserstoffbrückenbindung an die feste Phase, Nunc Bulletin Nr. 6, 1988) wurde eine Glutaraldehydkopplung verwendet. Die Mikrotiterplatten wurden mit Poly-L-Lysin beschichtet und mit Glutaraldehyd aktiviert. Dieses Verfahren wurde ausgewählt, um Bedingungen ähnlich einer immunocytochemischen Markierung an glutaraldehydfixiertem Gewebe zu schaffen. Die Immobilisierung N-terminal geblockter Peptide an der mit Glutaraldehyd aktivierten Proteinschicht war von besonderem Interesse. Deshalb wurden auch alle N-terminal geblockten Peptide nach diesem Verfahren beschichtet.

Zur Detektierbarkeit von **N-terminal geblockten Okta- und Dekapeptiden** als festphasengebundene Antigene im nichtkompetitiven Enzymimmunoassay konnten folgende Aussagen erarbeitet werden:

1. Peptide mit dem C-Terminus -Pro-Asn-Trpa (-P-N-Wa-Peptide) werden so gut wie Pea-CAH-I erkannt, die Primärstruktur des N-Terminus beeinflusst dabei offensichtlich die Bindung des Peptids an die Mikrotiterplatte und kann so die Signalstärke etwas verändern. Dies gilt für beide Beschichtungsverfahren (vgl. Abbildungen 4 und 5).
2. Peptide mit einem Aminosäureaustausch in der Position N-terminal von Tryptophanamid (-P-X-Wa-Peptide) werden nicht einheitlich detektiert. Der Wechsel von Asparagin zu Asparaginsäure (Pht-HrTH) (vgl. Abbildung 6) verändert die Antikörperbin-

dung nicht. Die Aminosäurefolgen -Pro-Ser-Trpa (Lia-AKH) oder -Pro-Gly-Trpa (Pab-RPCH) werden schlechter als Pea-CAH-I erkannt, die optischen Dichten liegen jedoch weit über dem Leerwert (vgl. Abbildung 4). Dies gilt ebenfalls unabhängig vom Beschichtungsverfahren.

3. C-terminal verlängerte Peptide sind unabhängig vom Beschichtungsverfahren im nicht-competitiven Anti-Pea-CAH-I-Enzymimmunoassay nicht kreuzreaktiv, die Absorptionen liegen im Bereich der Leerwerte (vgl. Abbildung 6).
4. Peptide mit dem C-Terminus -X-X-Trpa (-X-X-Wa-Peptide) werden nicht oder nur äußerst schwach als festphasengebundene Antigene erkannt. Im Gegensatz zu verlängerten Peptiden lassen die optischen Dichten Konzentrationsabhängigkeit erkennen, bewegen sich aber dennoch kaum über die Leerwerte hinaus (vgl. Abbildungen 6 und 5).

Die **Länge der Peptide** ist offenbar ebenfalls von Bedeutung für ihre Erkennung als immobilisierte Antigene im nichtcompetitiven Enzymimmunoassay. Die Teilsequenzen des¹⁻⁵-Pea-CAH-I (C-terminales Tripeptid) und des¹⁻⁴-Pea-CAH-I (C-terminales Tetrapeptid) werden schlechter erkannt als das vollständige Peptid Pea-CAH-I. Die optischen Dichten sind bei Immobilisierung des C-terminalen Tripeptides deutlich geringer als die des C-terminalen Tetrapeptides. Dieser Effekt wurde für beide Beschichtungsverfahren festgestellt. Wird das -P-X-Wa-Tetrapeptid APGWa passiv an die Mikrotiterplatte adsorbiert, liegen die Absorptionen im mittleren Bereich, der für N-terminal geblockte -P-X-Wa-Peptide charakteristisch ist. Nach der Kopplung an Glutaraldehyd aktiviertes Poly-L-Lysin wird es durch das Anti-Pea-CAH-I-Serum jedoch fast nicht mehr erkannt. Das Pentapeptid PPGLWa wird nach beiden Beschichtungsverfahren nicht detektiert (vgl. Abbildung 4). Die Länge der immobilisierten Peptide hat offensichtlich einen stärkeren Einfluss auf die Kreuzreaktivität mit dem Anti-Pea-CAH-I-Serum als ihr freier N-Terminus (siehe unten).

Hepta- und Oktapeptide mit freiem N-Terminus zeigen unabhängig vom Beschichtungsverfahren eine sehr starke Kreuzreaktivität im nichtcompetitiven Anti-Pea-CAH-I-Enzymimmunoassay. Die Absorptionen aller getesteten synthetischen Analoga, sowohl -P-N-Wa- als auch -P-X-Wa-Peptide, lagen weit über den optischen Dichten von Pea-CAH-I und -II (vgl. Abbildung 5). Pea-MIP, ein ungeblocktes -X-X-Wa-Nonapeptid, kreuzreagierte im Gegensatz zu den N-terminal geblockten -X-X-Wa-Peptiden mit dem Anti-Pea-CAH-I-Serum. Die optischen Dichten lagen deutlich über den Leerwerten, jedoch unter denen von Pea-CAH-I (vgl. Abbildung 7). Leukokinin-III, das bezüglich der Primärstruktur seines C-Terminus den C-terminal verlängerten Peptiden zugeordnet werden kann, wird ebenso wie die entsprechenden N-terminal geblockten Peptide nicht detektiert (vgl. Abbildung 6).

Zur Untersuchung der Kreuzreaktivität des Anti-Pea-CAH-I-Serums mit dem Tryptophanamidrest wurden auch **Tryptophan, Tryptophanamid und ihre BSA-Konjugate** als gebundene Antigene im nichtcompetitiven Enzymimmunoassay getestet. Die Aminosäure und ihr Säureamid wurden unabhängig von der Art der Beschichtung nicht er-

kannt (vgl. Abbildung 8). Die Beschichtung der Mikrotiterplatte mit den Konjugaten zeigte, daß das Anti-Pea-CAH-I-Serum mit dem Tryptophanamidkonjugat eindeutig kreuzreagiert. Die optischen Dichten des Tryptophankonjugats und des zur Kontrolle mitgeführten glutaraldehydvernetzten BSA erreichen erst bei höheren Konzentrationen den Leerwert. (vgl. Abbildung 9).

Die Immobilisierung von Pea-CAH-I und verschiedenen heterologen Antigenen im nicht-competitiven Anti-Pea-CAH-I-Enzymimmunoassay bestätigte, daß die Antikörper des Antiserums gegen den C-Terminus von Pea-CAH-I gerichtet sind und daß die Kreuzreaktivität des Antiserums gegenüber Peptiden sinkt, je mehr sich die Primärstruktur ihres C-Terminus von der Aminosäurefolge -Pro-Asn-Trpa unterscheidet. C-terminal verlängerte Peptide werden auch als immobilisierte Antigene nicht erkannt. Struktur und der Länge des Amino-Terminus haben Einfluß auf die Immobilisierung der Peptide und können so die Kreuzreaktivität der Peptide im nichtcompetitiven Enzymimmunoassay verändern.

Die Kreuzreaktivität der N-terminal geblockten -P-N-Wa- und -P-X-Wa-Peptide nach ihrer Immobilisierung an einer mit Glutaraldehyd aktivierten Poly-L-Lysin-Schicht im nicht-competitiven Anti-Pea-CAH-I-Enzymimmunoassay zeigte, daß diese Peptide auch ohne freie Aminogruppen an einer solchen Oberfläche gebunden werden können. Das Weglassen von Glutaraldehyd bei der Beschichtung mit Pea-CAH-I bestätigte, daß der Anlagerung des Peptids andere Mechanismen zugrunde liegen und Glutaraldehyd dabei eine untergeordnete Rolle spielt. Die Absorptionen erreichten fast die Werte, die mit dem vollständigen Kopplungsprotokoll erzielt wurden. Ein ähnliches Resultat ergab sich auch bei der Beschichtung von des-pGlu¹-Pea-CAH-I. Obwohl bei diesem Peptid eine freie Aminogruppe zur Kopplung an Glutaraldehyd vorhanden ist, geht der überwiegende Teil der Verbindung auf anderem Wege die Beziehung zur festen Phase ein (vgl. Abbildung 10).

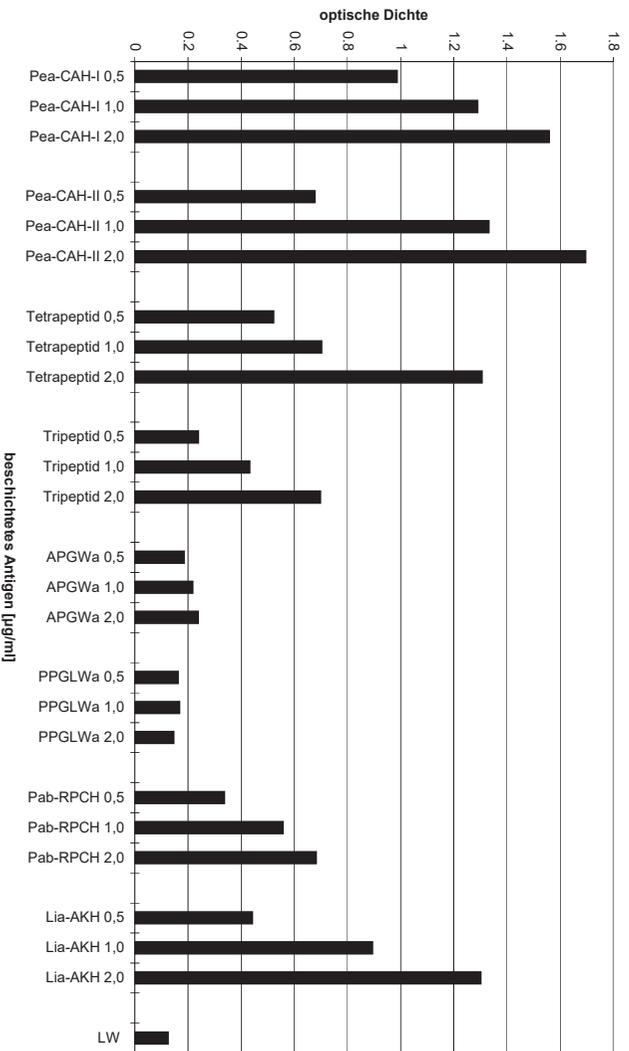
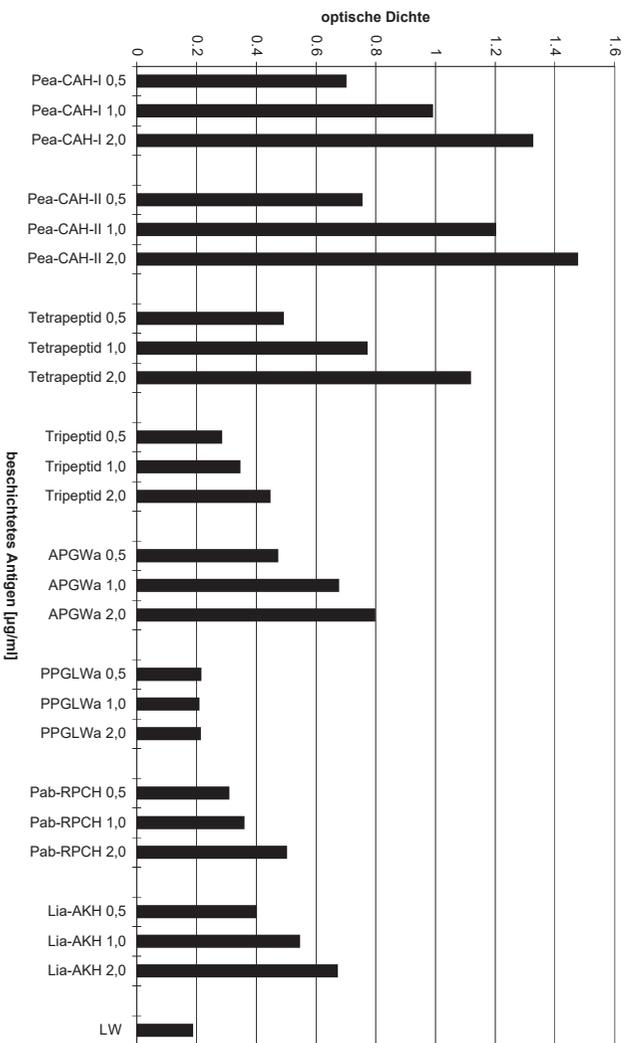


Abbildung 4: Beschichtung einer MTP mit Pea-CAH-I und II, kurzen Peptiden (des^{1-4} -Pea-CAH-I = Tetrapeptid, des^{1-5} -Pea-CAH-I = Tripeptid, APGWa und PPGLWa) und den -P-X-Wa-Peptiden Lia-AKH und Pab-RPCH. oben: passive Adsorption, unten: PLL-GA-Kopplung

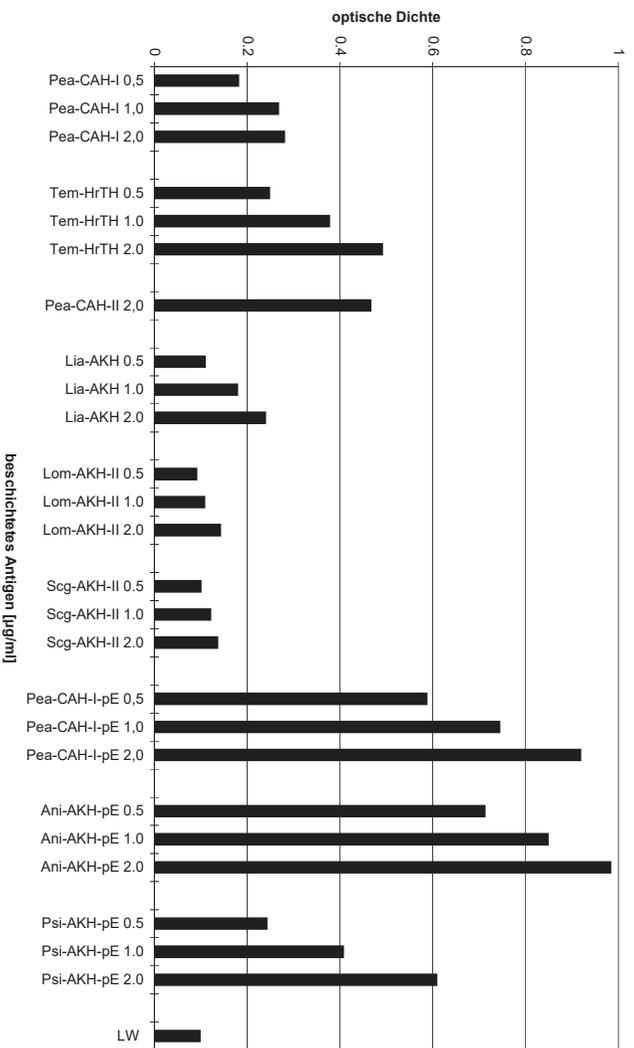
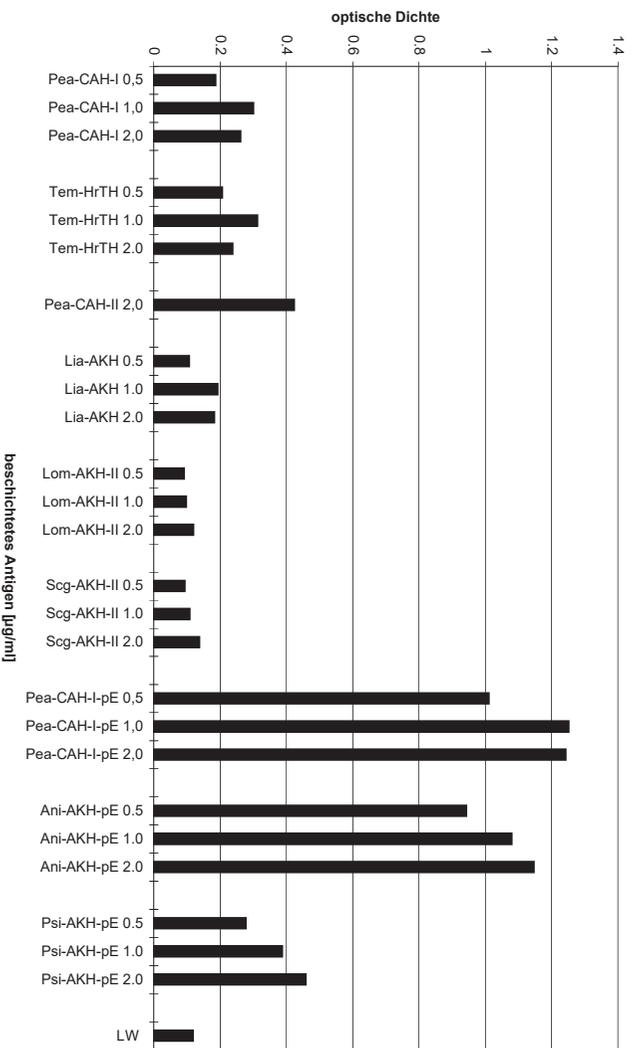


Abbildung 5: Beschichtung einer MTP mit verschiedenen -P-N^ε-Wa-Peptiden (Pea-CAH-I und -II, Tem-HrTH), mit Lia-AKH (-P-X-Wa-Peptid) und mit den -X-X-Wa-Peptiden Lom-AKH-II und Scg-AKH-II sowie den N-terminal ungelockten synthetischen Peptiden des-pGlu¹-Pea-CAH-I (-P-N^ε-Wa-P), des-pGlu¹-Ani-AKH, des-pGlu¹-Psi-AKH (beide -P-X-Wa-Peptide). Aus Platzgründen wurde die Formulierung des-pGlu¹ durch -pE ersetzt und hinter den Namen des jeweiligen Peptids gestellt. oben: passive Adsorption unten: PLL-GA-Kopplung

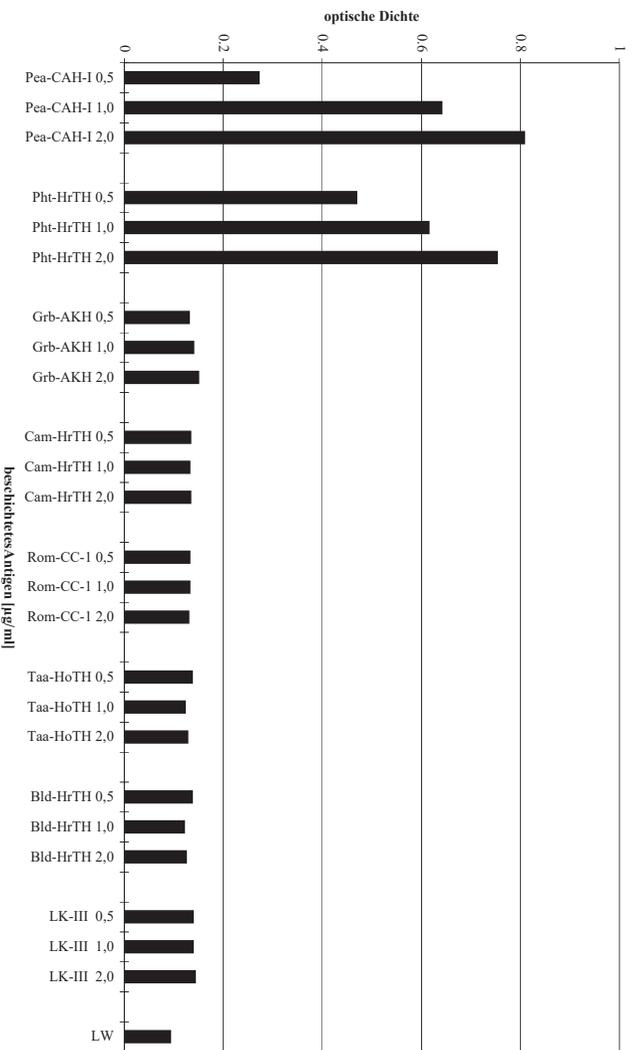
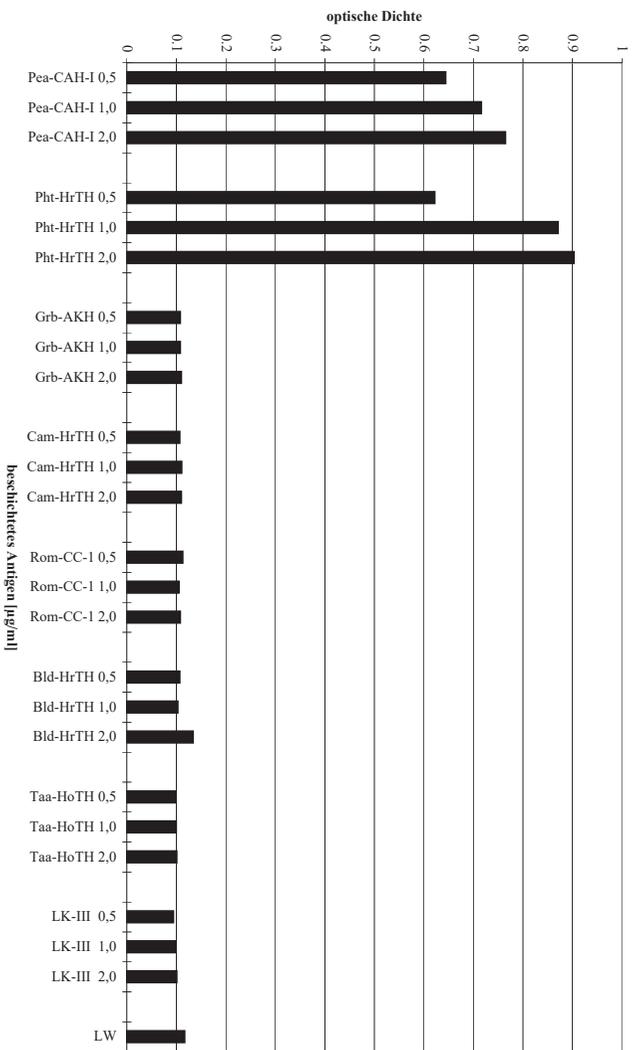


Abbildung 6: Beschichtung einer MTP mit Pea-CAH-I, mit Pht-HTH (-P-X(D)-Wa-Peptid), mit Grb-AKH (-X-X-Wa-P) und mit den C-terminal verlängerten Peptiden Cam-HrTH, Rom-CC-I, Bld-HrTH, Taa-HoTH (N-terminal geblockt) und dem N-terminal freien -X-X-Wa-Peptid Leukokinin-III (LK-III). oben: passive Adsorption unten: PLL-GA-Kopplung

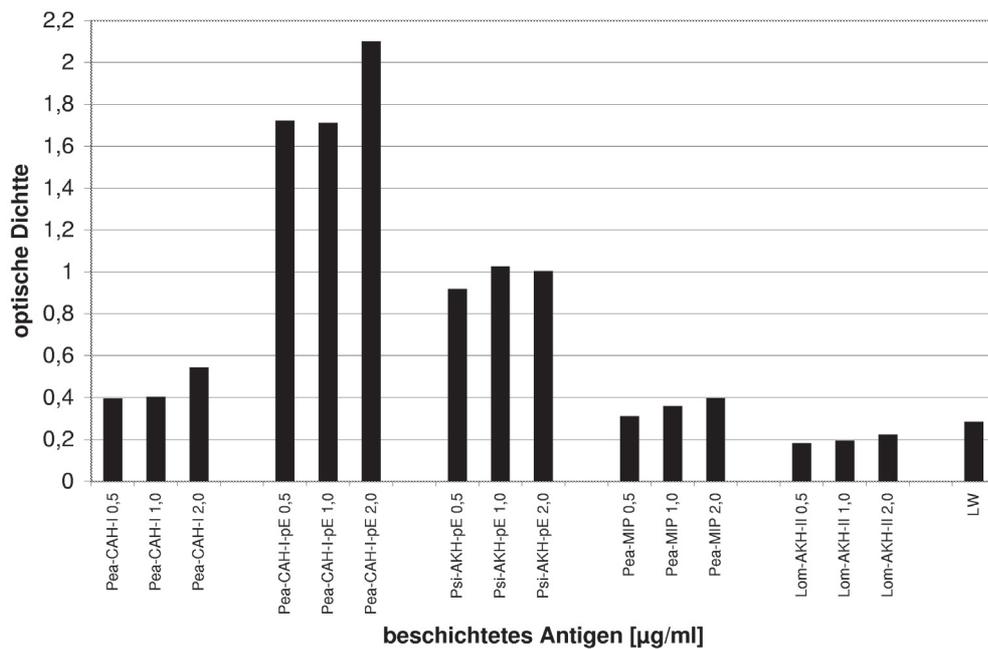
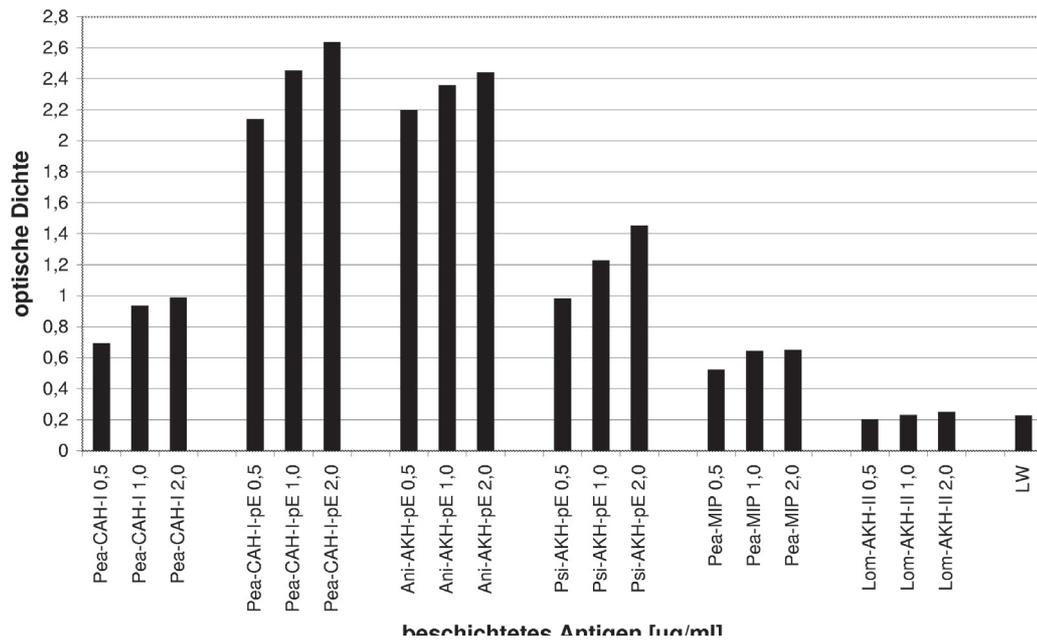


Abbildung 7: Beschichtung einer MTP mit Pea-CAH-I und verschiedenen N-terminal ungeblockten synthetischen Peptiden des-pGlu¹-Pea-CAH-I (-P-N-Wa-Peptid), des-pGlu¹-Ani-AKH, des-pGlu¹-Psi-AKH (beide -P-X-Wa-Peptide) sowie mit den -X-X-Wa-Peptiden Pea-MIP (N-terminal frei) und Lom-AKH-II (N-terminal geblockt). Aus Platzgründen wurde die Formulierung *des-pGlu¹* durch *-pE* ersetzt und hinter den Namen des jeweiligen Peptids gestellt. oben: passive Adsorption unten: PLL-GA-Kopplung

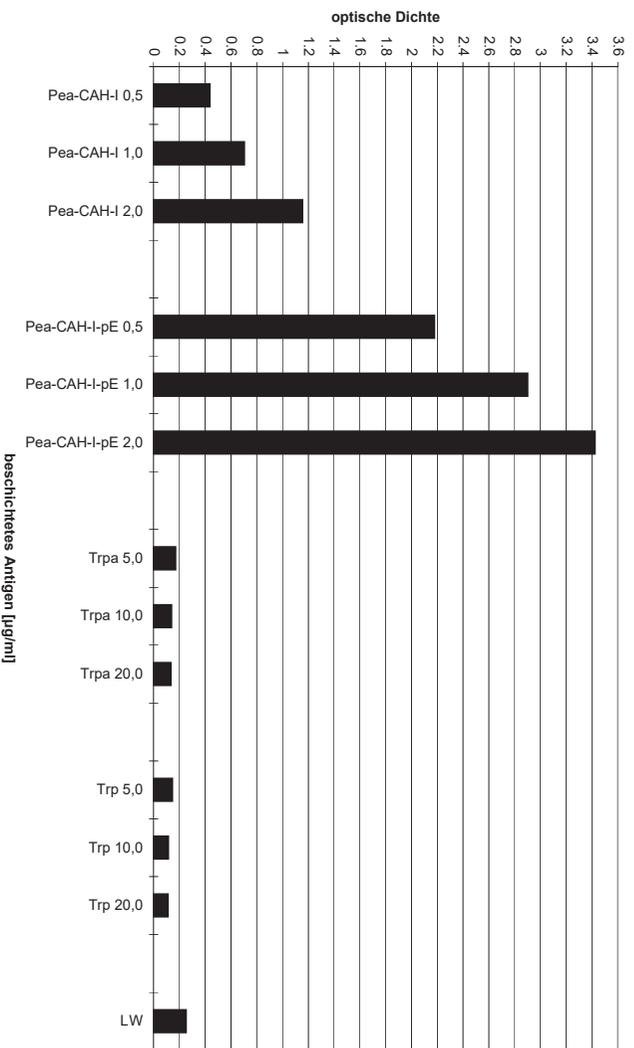
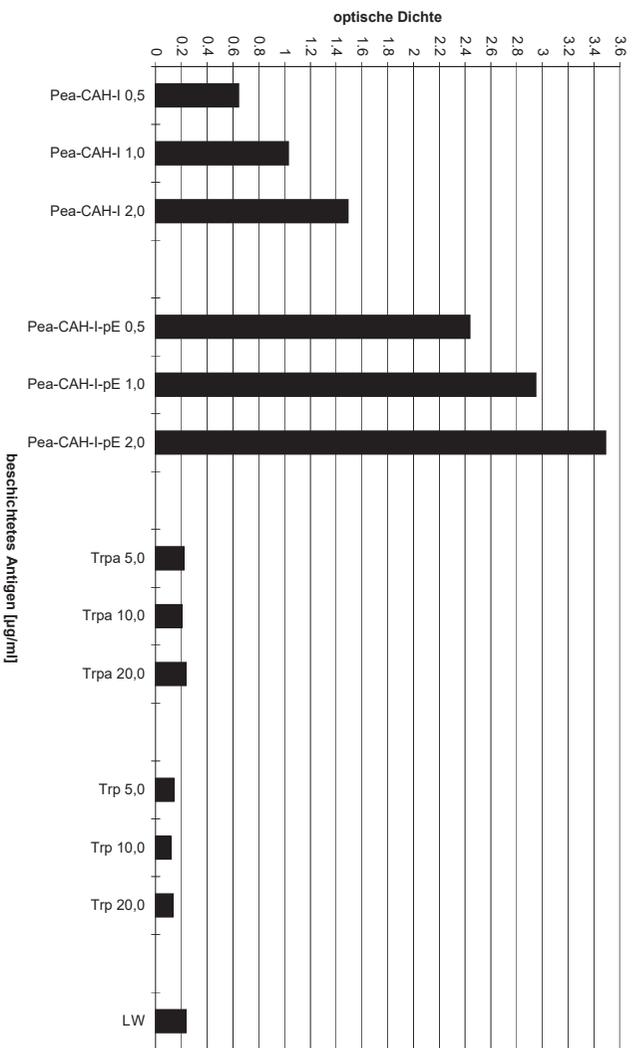


Abbildung 8: Beschichtung einer MTP mit Pea-CAH-I und dem N-terminal ungelockten synthetischen Peptid des-pGlu¹-Pea-CAH-I sowie Tryptophan und Tryptophanamid. Aus Platzgründen wurde die Formulierung des-pGlu¹ durch -pE ersetzt und hinter den Namen des Peptids gestellt. oben: passive Adsorption unten: PLL-GA-Kopplung

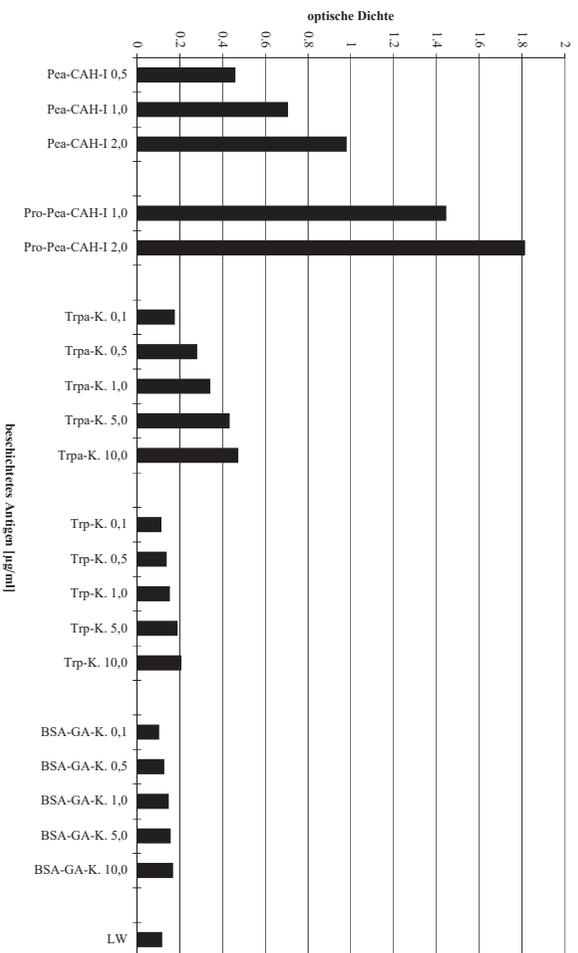


Abbildung 9: Beschichtung einer MTP mit Pea-CAH-I, dem N-terminal ungeblockten synthetischen Peptid Pro¹-Pea-CAH-I (-P-N-Wa-Peptid) und den BSA-GA-Konjugaten von Tryptophan und Tryptophanamid sowie GA-vernetztem BSA.

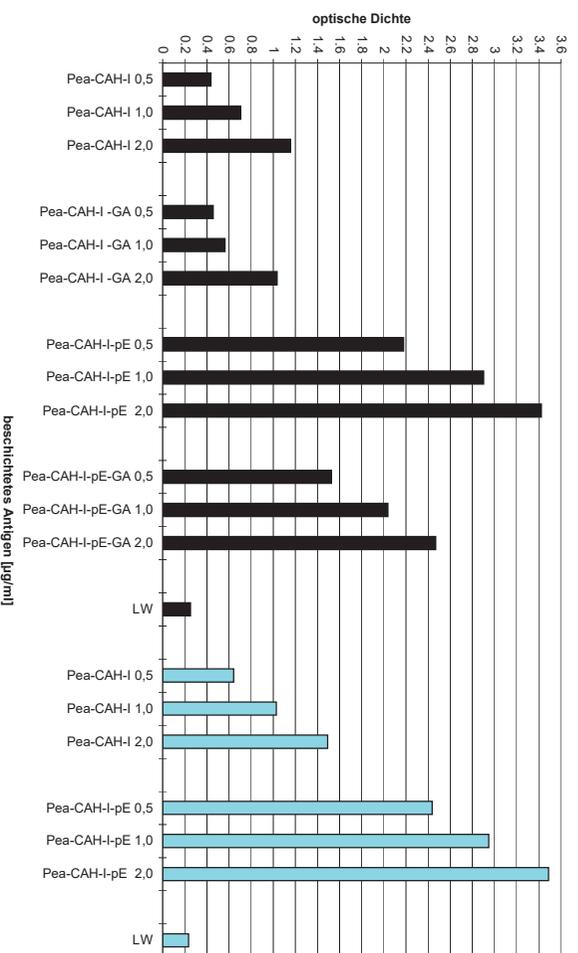


Abbildung 10: Beschichtung einer MTP mit Pea-CAH-I und dem N-terminal ungeblockten synthetischen Peptid des-pGlu¹-Pea-CAH-I in beiden Beschichtungsvarianten (schwarz: PLL-GA-Kopplung; grau: passive Adsorption). Aus Platzgründen wurde die Formulierung des-pGlu¹ durch -pE ersetzt und hinter den Namen des jeweiligen Peptids gestellt. Wurde bei der Beschichtung Glutaraldehyd weggelassen, erscheint zusätzlich hinter dem Peptidnamen -GA.

12.3 Immuncytochemische Untersuchungen zur Spezifität des Anti-Pea-CAH-I-Serums

Im Mittelpunkt dieser Arbeiten stand die Kreuzreaktivität des Anti-Pea-CAH-I-Serums mit -X-X-Wa-Peptiden. Ausgangspunkt für die Untersuchungen war die Annahme, daß das Anti-Pea-CAH-I-Serum im Gewebe keine Antigene mit einem C-terminalen Tryptophanamidrest markiert. Vorangegangene Flüssigphasepräabsorptionen des Antiserums mit verschiedenen Peptiden (Eckert *et al.* 1996) hatten gezeigt, daß die Intensität der Pea-CAH-I-like Immunfärbung nur durch -P-N-Wa- und -P-X-Wa-Peptide vermindert wird. In Einklang damit wurden die glandulären Zellen der Corpora cardiaca von *Schistocerca gregaria* (AKH-Peptide: Lom-AKH-I (verlängerter C-Terminus), Stone *et al.* 1978, Scg-AKH-II (-X-X-Wa-Peptid), Siegert *et al.* 1985, Gäde *et al.* 1986) mit dem Anti-Pea-CAH-I-Serum nicht angefärbt. Die Präinkubation des Anti-Pea-CAH-I-Serums mit Pea-MIP (-X-X-Wa-Peptid) verursachte jedoch eine Abschwächung der Färbung der glandulären Zellen und das fast völlige Verschwinden der Markierung im Gehirn und im neurosekretorischen Speicher der Corpora cardiaca. Da dieses Ergebnis nicht mit den bisherigen Resultaten in Übereinstimmung zu bringen war, wurde das Antiserum noch einmal mit verschiedenen -X-X-Wa-Peptiden sowie den Konjugaten von Tryptophan und Tryptophanamid und mit Glutaraldehyd-vernetztem BSA präabsorbiert und Immunfärbungen an Gehirn-Retrocerebralkomplexen von *Periplaneta americana* durchgeführt. Einen Überblick über diese Markierungen vermittelt Tabelle 15.

Die Präinkubation des Anti-Pea-CAH-I-Serums mit den -X-X-Wa-Peptiden und dem Tryptophanamidkonjugat führte mit steigenden Antigenkonzentrationen zu einem Rückgang der Färbung. Dies betraf bei geringen Antigenmengen zunächst nur die Markierungen im Gehirn und im neurosekretorischem Speicher der Corpora cardiaca. Die Immunmarkierung der glandulären Zellen der Corpora cardiaca wurde erst bei hohen Antigenkonzentrationen etwas vermindert. Am deutlichsten wurde die Pea-CAH-I-like Immunmarkierung durch die Präinkubation mit Pea-MIP reduziert. Verglichen mit den -X-X-Wa-Peptiden hatte die Präabsorption des Antiserums mit dem Tryptophanamidkonjugat einen geringeren Einfluß auf die Färbungsintensität. (vgl. Abbildungen 12 und 13). Die Pea-CAH-I-like Immunreaktivität im Gehirn und in den Corpora cardiaca von *Periplaneta americana* wurde durch die Präinkubation mit Glutaraldehyd vernetztem BSA nicht und durch das Tryptophankonjugat nur sehr wenig beeinflusst. Lediglich 100 nmol Tryptophankonjugat verminderten die Immunmarkierung im Gehirn ein wenig.

Die Markierung von Antigenen mit einem C-terminalen Tryptophanamidrest im Gehirn und in den Corpora cardiaca von *Periplaneta americana* konnte durch die Flüssigphasepräabsorption des Anti-Pea-CAH-I-Serums mit den verschiedenen -X-X-Wa-Peptiden und dem Tryptophanamidkonjugat eindeutig gezeigt werden.

Immunfärbungen an Gehirn-Retrocerebralkomplexen von *Schistocerca gregaria* und *Gryllus bimaculatus* wurden angefertigt, um die Markierbarkeit von N-terminal geblockten -X-X-Wa-Peptiden an Gewebeschnitten zu untersuchen (vgl. Abbildungen 14, 15 und 16). Die

Tabelle 15: Immunmarkierungen mit dem präabsorbierten Anti-Pea-CAH-I Serum an Gehirn-Retrocerebralkomplexen von *Periplaneta americana*.

Name des Antigens	Stoffmenge pro ml verdünntes Antiserum								
	10* bzw. 20 nmol			50 nmol			100 nmol		
	GZ	NSS	Hi	GZ	NSS	Hi	GZ	NSS	Hi
Pea-MIP	++	+	+	++	+	–			
Lom-AKH-II	+++	+++	++	+++	+	–	++	+	–
Scg-AKH-II	+++	+++	++	+++	+	–	++	+	–
Trpa-K.*	+++	+++	+++	+++	+++	++	++	++	+
Trp-K.*	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++
BSA-GA*	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++

+++ Stärke der Färbung entspricht der mitgeführten Kontrolle

++ schwächer als Kontrolle markiert

+ sehr schwach gefärbt

– keine Immunmarkierung

* Bei den Konjugaten wurden nur 10 nmol pro ml verdünntes Antiserum verwendet.

GZ glanduläre Zellen der Corpora cardiaca

Hi Gehirn

NSS neurosekretorischer Speicher der Corpora cardiaca

glandulären Zellen der Corpora cardiaca beider Arten ließen sich mit dem Antiserum nicht anfärben. Das Ergebnis früherer Untersuchungen (siehe oben) konnte damit bestätigt werden. Immunmarkierungen wurden im Gehirn und im neurosekretorischen Speicher der Corpora cardiaca beobachtet. Diese blieben bei *Schistocerca gregaria* aus, wenn das Anti-Pea-CAH-I-Serum mit Scg-AKH-II (-X-X-Wa-Peptid) präabsorbiert wurde (der entsprechende Test wurde an Schnitten von *Gryllus bimaculatus* nicht durchgeführt). Im Gehirn und im Neurohämalteil der Corpora cardiaca werden also offensichtlich Verbindungen mit einem C-terminalen Tryptophanamidrest angefärbt.

Abbildung 11: Immunmarkierung mit dem Anti-Pea-CAH-I-Serum an Sagittalschnitten von Gehirn (oben, 150x) und Corpora cardiaca (unten, 150x) von *Periplaneta americana*. Besonders stark wird der glanduläre Teil der Corpora cardiaca angefärbt. Die Kerne der intrinsischen Zellen (GZ) werden nicht markiert. Der neurosekretorische Speicher (NSS) zeichnet sich durch eine Vielzahl gefärbter Faseranschnitte aus. Typisch für eine Anti-Pea-CAH-I-Markierung im Gehirn ist das Streifenmuster von α - und β -Lobus des Pilzkörpers (hier β -Lobus, bL). Deutlich zu sehen sind auch gefärbte Fasern in verschiedenen Neuropilbereichen des Protocerebrums (z. B. Pars lateralis, PL) sowie Zellen (Pfeil). Im Deutocerebrum werden die glomerulären Neuropile des Antennallobus (AL) markiert.

Abbildung 12: Immunfärbungen an den Corpora cardiaca von *Periplaneta americana* (alle 150x) nach Präabsorption des Anti-Pea-CAH-I-Serums mit 50 nmol Pea-MIP (oben, Frontalschnitt), 100 nmol Scg-AKH-II (Mitte, Sagittalschnitt) sowie 100 nmol Trpa-Konjugat (unten, Sagittalschnitt). Der neurosekretorische Speicher wird nach Präabsorption mit den Peptiden kaum noch markiert, auch der glanduläre Teil erscheint aufgehellt. Durch die Präabsorption des Antiserums mit dem Trpa-Konjugat wird die Immunfärbung sowohl im glandulären als auch im aglandulären Teil der Drüse nicht so stark vermindert. GZ-glanduläre Zellen, NSS-neurosekretorischer Speicher, NR-Nervus recurrens, D-Darm

Abbildung 13: Gehirnmarkierungen bei *Periplaneta americana* (alle 75x) nach Präabsorption des Anti-Pea-CAH-I-Serums mit 50 nmol Pea-MIP (oben, Frontalschnitt), 100 nmol Scg-AKH-II (unten links, Sagittalschnitt) sowie 100 nmol Trpa-Konjugat (unten rechts, Sagittalschnitt). Wird das Antiserum mit den -X-X-Wa-Peptiden präinkubiert, ist keine Immunmarkierung mehr zu verzeichnen. Nach der Präabsorption des Antiserums mit dem Trpa-Konjugat sind noch schwache Fasermarkierungen u.a. im lateralen Neuropil des Protocerebrums (Pfeile) zu erkennen. bL- β -Lobus, AL-Antennallobus

Abbildung 14: Pea-CAH-I-like Immunreaktivität in den Corpora cardiaca von *Schistocerca gregaria* (alle 150x). Während die glandulären Zellen nicht angefärbt werden, ist eine Markierung im neurosekretorischen Speicher zu beobachten (oben, Horizontalschnitt). Diese bleibt nach Präinkubation des Antiserums mit Scg-AKH-II aus (unten, Horizontalschnitt). GZ-glanduläre Zellen, NSS-neurosekretorischer Speicher, Hi-Gehirn

Abbildung 15: Pea-CAH-I-like Immunreaktivität im Gehirn von *Schistocerca gregaria*. Das Antiserum färbt sowohl Zellen als auch Fasern an. Besonders auffällig ist hier die Markierung des Zentralkörpers (*) (oben, Horizontalschnitt, 56x). Nach Präabsorption des Antiserums mit Scg-AKH-II bleibt das Gehirn ungefärbt (unten, Horizontalschnitt, 45x).

Abbildung 16: Bei *Gryllus bimaculatus* bleiben die glandulären Zellen der Corpora cardiaca bei einer Markierung mit dem Anti-Pea-CAH-I-Serum ebenfalls ungefärbt (unten, Horizontalschnitt, 232x). Im Gehirn dagegen werden Fasern und Zellen markiert (Pfeile) (oben, Horizontalschnitt, 74x).

13 Die Identifizierung von Pea-CAH-I-ähnlichen Peptiden

13.1 Quantitative Bestimmung der Pea-CAH-I-like Immunreaktivität

Mit dem kompetitiven Anti-Pea-CAH-I-Enzymimmunoassay war es möglich, Pea-CAH-I-like Immunreaktivität zu quantifizieren. Die Untersuchungen zur Serumspezifität (siehe Abschnitt 12) hatten jedoch ergeben, daß das Antiserum nicht nur Verbindungen mit dem C-Terminus -Pro-Asn-Trpa erkennt, sondern auch mit der Sequenz -Pro-X-Trpa oder nur mit dem Tryptophanamidrest kreuzreagiert. Bedingt durch diese Kreuzreaktivität des Antiserums kann die Bestimmung der Pea-CAH-I-like Immunreaktivität deshalb keinesfalls als Gehaltsbestimmung von Pea-CAH-I gelten.

Für die Messung der Pea-CAH-I-like Immunreaktivität waren zwei Aspekte von Bedeutung. Zum einen stellte sich die Frage, ob sich die mit dem Enzymimmunoassay bestimmten Werte überhaupt auf das Vorhandensein von Pea-CAH-I oder -II zurückführen ließen und zum anderen war es notwendig, die Meßbarkeit der Rohextrakte im Sinne der Richtigkeit (siehe Abschnitt 11.2) herzustellen.

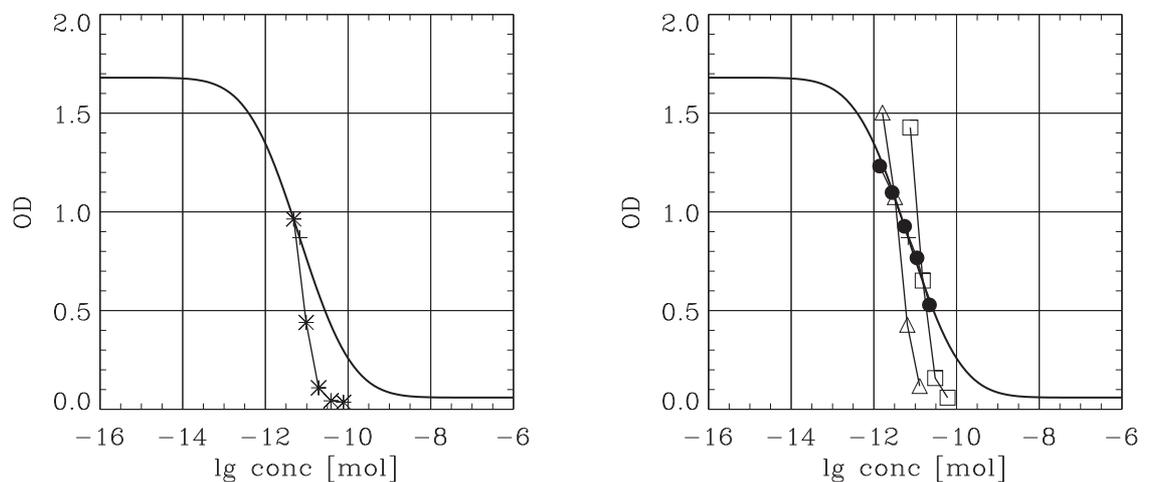


Abbildung 17: Einfluß der Festphasenreinigung auf den Anstieg der Testkurven im kompetitiven Anti-Pea-CAH-I-Enzymimmunoassay links: Messung eines Rohextraktes aus 110 Gehirnen weibl. von *Periplaneta americana* rechts: Messung eines C18ec-Eluats aus 110 Gehirnen weibl. von *Periplaneta americana* (Vollkreise), zum Vergleich wurden auch die Spülfraction (leere Quadrate) und der bei der Probenaufgabe ungebundene Teil des Rohextraktes gemessen (leere Dreiecke). Die Symbole repräsentieren die Meßpunkte von jeweils 18; 9; 4,5; 2,25 und 1,125 Hirnen/Kavität (von rechts nach links).

Letztere erfordert die Parallelität von Standard- und Testkurve. Diese entstand aber nur bei der Messung von Verdünnungsreihen aus Rohextrakten von Retrocerebralkomplexen von *Periplaneta americana*. Die Konzentrationsreihen aller anderen Organextrakte wiesen einen deutlich steileren Anstieg als die Standardkurve auf. Durch einen weiteren Reinigungsschritt an einer C18ec-Festphasensäule wurde jedoch die Parallelisierung der Kurven erreicht. Bei dem beobachteten Phänomen handelte es sich vermutlich um einen sogenannten Matrixeffekt, das heißt die Antikörper wurden durch unspezifisch reagierende Substanzen aus dem Organaufschluß gebunden. Abbildung 17 demonstriert die Wirkung der Festphasenreinigung auf die Lage der Testkurve am Beispiel von zwei Hirnextrakten von *Periplaneta americana*.

Tabelle 16 zeigt, wieviel Pea-CAH-I-like Immunreaktivität in den Geweben ermittelt werden konnte.

Für eine exakte Quantifizierung ist es notwendig, mögliche Verluste während der Aufarbeitung und der Meßprozedur zu bilanzieren. Wiederfindungsexperimente wurden für Gehirn und Retrocerebralkomplex von *Periplaneta americana* durchgeführt. Dabei wurde die Wiederfindung bei verschiedenen Arbeitsschritten untersucht. Zur Beschreibung der Verluste über die Gesamtprozedur wurde Pea-CAH-I vor dem Homogenisieren im Extraktionsmittel gelöst zu den Organen gegeben. Für die Bestimmung der Wiederfindungsrate an der C18ec-Säule wurde der Rohextrakt halbiert und ein Teil mit Pea-CAH-I versetzt. Die Inkubation der gelösten Antigene mit dem Anti-Pea-CAH-I Serum während des Enzymimmunoassays ist sehr zeitintensiv. Um zu prüfen, ob hier noch Verluste auftreten, wurden Proben beim Ansatz der Reaktionsgemische mit Pea-CAH-I gespikt.

Tabelle 16: Quantifizierung der Pea-CAH-I-like Immunreaktivität.

Organ	IR [pmol]	$s_{\bar{x}}$ [%]	n
<i>Periplaneta americana</i>			
Gehirn weibl.	1,370	15,2	3
Gehirn männl.	1,340	17,1	3
RCK weibl.	165,000	3,3	4
RCK männl.	144,900	2,2	4
SOG weibl.	0,090	4,4	6
1. – 3. TG weibl.	0,260	8,3	8
1. – 6. freies AG weibl.	0,314	8,5	8
Herz männl.	0,037	14,0	6
<i>Nauphoeta cinerea</i>			
Gehirn männl./weibl.	0,338	7,6	9
RCK männl./weibl.	0,054	8,7	7

Tabelle 17 gibt einen Überblick über die Wiederfindungsraten von Pea-CAH-I bei Aufar-

Tabelle 17: Wiederfindungsraten von Pea-CAH-I im Aufarbeitungs- und Meßprotokoll von Gehirn und RCK von *Periplaneta americana*.

Gewebe	Arbeitsschritt	WFR	σ [%]	n
RCK männl.	Gesamtprozeß	76,5	12,1	8
	C18	98,1	5,8	2
	EIA (Ak-Ink.)	109,2	7,2	5
Gehirn weibl.	Gesamtprozeß	76,2	14,8	6
	C18	81,95	3,5	2
	EIA (Ak-Ink.)	98,1	6,5	2

beitung und Messung von Gehirn- und RCK-Extrakten von *Periplaneta americana*.

Die Gesamtwiederfindungsraten beider Organe unterscheiden sich kaum. Bei der Aufarbeitung der RCK geht offensichtlich der größte Teil während der Ultraschallbehandlung verloren. Verluste bei der Aufarbeitung von Gehirnen entstehen eher während der C18ec-Reinigung und nicht bei der Homogenisierung der Organe. Der hohe Fettanteil im Rohextrakt der Gehirne zieht eine lange Spülprozedur bei der C18ec-Reinigung nach sich, in deren Verlauf möglicherweise verstärkt Substanzverluste aufgetreten sind.

13.2 Immuncytochemische Differenzierung der Pea-CAH-I-like Immunreaktivität

Flüssigphasepräabsorptionen des Anti-Pea-CAH-I-Serums gestatteten Rückschlüsse auf die Struktur der markierten Pea-CAH-I-ähnlichen Verbindungen, da durch die Präinkubation des Antiserums mit -X-X-Wa-Peptiden oder -P-X-Wa-Peptiden die Immunmarkierung von Antigenen mit dem C-Terminus -Pro-Asn-Trpa nicht verhindert wird. Bei *Periplaneta americana* konnte so gezeigt werden, daß im Gehirn und im neurosekretorischen Speicher der Corpora cardiaca keine Antigene mit diesem C-Terminus vorkommen (siehe auch Abschnitt 12.3). Die Pea-CAH-I-like Immunmarkierung im Bauchmark der Amerikanischen Schabe (Eckert *et al.* 1997) konnte durch die Präabsorption des Antiserums mit dem -X-X-Wa-Peptid Pea-MIP ebenfalls unterdrückt werden. Bereits die Präinkubation des Antiserums mit 20 nmol des Peptids führten zum Ausfall der Immunfärbung im 4. und 5. freien Abdominalganglion (vgl. Abbildung 18).

Immunmarkierungen mit dem Antiserum an Gehirn-Retrocerebralkomplexen von *Periplaneta brunnea*, *Blatta orientalis* und *Blattella germanica* wurden durchgeführt (vgl. Abbildungen 19 und 20). Bei allen drei Schabenarten wurden das Gehirn und der neurosekretorische Speicher der Corpora cardiaca angefärbt. Im Gegensatz zu *Blatta orientalis* (Pea-CAH-I und -II, Gäde und Rinehart 1990) und *Periplaneta brunnea* (AKH/RPCH-Peptide unbekannt) blieben die glandulären Zellen der Corpora cardiaca von *Blattella germanica* unmarkiert, da

sie das C-terminal verlängerte Bld-HrTH (Gäde und Rinehart 1990, Veenstra und Camps 1990) enthalten (siehe auch Abschnitte 12.1 und 12.2). Durch die Präabsorption des Antiserums mit dem -P-X-Wa-Peptid APG_{Wa} wurde die Immunmarkierung im Gehirn und im neurosekretorischen Speicher der Corpora cardiaca bei allen drei Schabenarten ausgeschaltet. Bei *Blatta orientalis* und *Periplaneta brunnea* wurde die Färbung im glandulären Teil der Corpora cardiaca etwas abgeschwächt. Weitere Untersuchungen wurden bei *Nauphoeta cinerea* durchgeführt. Bei Immunmarkierungen mit dem Anti-Pea-CAH-I-Serum blieben die glandulären Zellen der Corpora cardiaca (Bld-HrTH, Gäde und Rinehart 1986) ungefärbt. Das Gehirn und der neurohämale Teil der Corpora cardiaca zeigten jedoch Pea-CAH-I-like Immunreaktivität. Nach der Präabsorption des Antiserums mit Pea-MIP war diese nicht mehr nachweisbar (vgl. Abbildung 21).

Die Präabsorption des Anti-Pea-CAH-I-Serums mit -P-X-Wa- und -X-X-Wa-Peptiden verhinderte Immunmarkierungen in den Nervensystemen aller untersuchten Schabenarten. Das zeigt, daß die Pea-CAH-I-like Immunreaktivität in diesen Geweben höchstwahrscheinlich nicht auf Pea-CAH-I oder andere -P-N-Wa-Peptide zurückzuführen ist.

Abbildung 18: Das Anti-Pea-CAH-I-Serum markiert bei *Periplaneta americana* Neurone in der dorsalen Mittellinie der Abdominalganglien (Eckert *et al.* 1997). Die Immunmarkierung der Neurone (links) im 4. (oben) und 5. (unten) Abdominalganglion (alles Querschnitte, 146x) verschwindet bereits nach Präinkubation (rechts) des Anti-Pea-CAH-I-Serums mit 20 nmol Pea-MIP. Die Immunfärbung des 4. AG zeigt bei schräger Schnittführung Anschnitte des 1. und 2. (mit unmarkiertem Zellkern) Neurons, die des 5. AG einen Schnitt durch das 1. große Neuron (von frontal nach caudal gezählt).

Abbildung 19: Markierung der Corpora cardiaca von *Periplaneta brunnea* (oben, 150x), *Blatta orientalis* (Mitte, 150x) und *Blattella germanica* (unten, 245x) mit dem Anti-Pea-CAH-I-Serum (links) und (rechts) nach Präabsorption des Antiserums mit 450 nmol APGWa (Sagittalschnitte, *B. germanica* rechts Horizontalschnitt, 225x). Die Corpora cardiaca von *B. germanica* sind unmarkiert, Sehfarbstoff hat sich über den Schnitt verteilt. GZ-glanduläre Zellen, NSS-neurosekretorischer Speicher, Hi-Gehirn, D-Darm

Abbildung 20: Markierung der Gehirne von *Periplaneta brunnea* (oben, 56x), *Blatta orientalis* (Mitte, 75x) und *Blattella germanica* (unten, 82x) mit dem Anti-Pea-CAH-I-Serum (links). Besonders auffällig ist die Immunfärbung des Zentralkörpers (*). Nach Präabsorption des Antiserums mit 200 nmol APGWa (rechts) ist keine Immunfärbung mehr zu beobachten (alles Horizontalschnitte).

Abbildung 21: Immunmarkierung (oben) an Gehirn (links, 69x) und Corpora cardiaca (rechts, 264x) von *Nauphoeta cinerea*. Die glandulären Zellen (Pfeile) liegen einzeln verstreut im neurosekretorischen Teil der Corpora cardiaca. Nach Pääabsorption des Anti-Pea-CAH-I-Serums (unten) mit 40 nmol Pea-MIP verschwindet die Immunfärbung im Gehirn (links, 74x) und im neurosekretorischem Speicher der Corpora cardiaca (rechts, 264x). Alles Sagittalschnitte.

13.3 Untersuchung von fraktionierten Gewebeextrakten mit dem Anti-Pea-CAH-I-Enzymimmunoassay

Die Fähigkeit des Anti-Pea-CAH-I-Serums, neben Pea-CAH-I auch andere -P-N-Wa-Peptide und Verbindungen mit verändertem C-Terminus, zumindest aber mit einem C-terminalen Tryptophanamidrest zu erkennen, sollte genutzt werden, um weitere Pea-CAH-I-ähnliche Peptide zu finden. Ziel dieser Arbeit war es, immunreaktives Material für eine spätere Strukturaufklärung zu isolieren. Die methodische Grundlage hierzu bildeten die Anti-Pea-CAH-I-Enzymimmunoassays. Mittels HPLC aufgetrennte Gewebeextrakte wurden nach immunreaktivem Material in den Fraktionen durchsucht. Zur Verfügung standen dabei sowohl das competitive als auch das direkte Verfahren. Erste Versuche wurden mit dem direkten Anti-Pea-CAH-I-Enzymimmunoassay durchgeführt (Thamm *et al.* 1997). Nach der Umstellung des kompetitiven Enzymimmunoassays auf Meerrettichperoxidase als Markerenzym konnte das Detektionslimit hier jedoch so stark gesenkt werden, daß der geringe Materialverbrauch diese Methode favorisierte. Gleichzeitig wurde damit auch der Schwachpunkt des nichtkompetitiven Verfahrens, die Fixierbarkeit der Antigene unter Erhaltung ihrer Antigenität als Voraussetzung für ihre Detektion, umgangen (siehe Abschnitt 12.2). Die Fraktionen wurden jeweils als Verdünnungsreihe gegen eine Standardkurve von Pea-CAH-I getestet. Zeichen für eine Reaktion zwischen Antikörper und gelöstem Antigen ist im kompetitiven Enzymimmunoassay eine Schwächung der Farbreaktion ausgelöst durch die Hemmung der Antikörperbindung an das immobilisierte Antigen. Diese Hemmung wurde hier als Hinweis auf kreuzreagierendes Material in den Fraktionen gewertet. Je höher die Hemmung, desto stärker die Pea-CAH-I-like Immunreaktivität. Die Spezifität der Antigen-Antikörper-Reaktion wurde anhand der Konzentrationsabhängigkeit der gemessenen Immunreaktivität der Fraktionen eingeschätzt.

Als Ausgangsmaterial für die Untersuchungen dienten Gewebeextrakte von Retrocerebralkomplexen und 5. Abdominalganglien von *Periplaneta americana* sowie von Gehirnen und Retrocerebralkomplexen von *Nauphoeta cinerea*. Immuncytochemische Tests an diesen Organen hatten auf die Existenz Pea-CAH-I-ähnlicher Verbindungen hingewiesen (siehe Abschnitte 12.3 und 13.2). Die chromatographische Auftrennung der Gewebeextrakte mittels HPLC sowie die Analyse der Absorptionsspektren wurden von Herrn Dipl. Chem. J. Rapus (Institut für Allgemeine Zoologie und Tierphysiologie der FSU Jena) durchgeführt.

13.3.1 Isolierung immunreaktiver Substanzen aus dem Retrocerebralkomplex von *Periplaneta americana*

Ein Extrakt aus den Retrocerebralkomplexen von 350 weiblichen Tieren wurde geteilt und ein Aliquot entsprechend 108 Organen mit der HPLC aufgetrennt. Das Eluat wurde zwischen 3.19 bis 50.00 min in 49 Fraktionen gesammelt (vgl. Abbildung 22 oben). Aus jeder Fraktion wurde ein Teil entsprechend 20 RCK entnommen und als Verdünnungsreihe entsprechend 8,4; 4,2; 2,1 und 1,05 RCK/Kavität getestet. Abbildung 22 (unten) zeigt die

Verteilung der Pea-CAH-I-like Immunreaktivität in den Fraktionen. Fraktion 30 enthält Pea-CAH-I und Fraktion 36 Pea-CAH-II. Die Immunreaktivität ist hier erwartungsgemäß am höchsten. Diese beiden Fraktionen liegen innerhalb eines Bereichs, der insgesamt durch eine starke Immunreaktivität gekennzeichnet ist. Die Fraktionen 27 bis 42 enthalten Material, das die Antikörperbindung im kompetitiven Enzymimmunoassay in hohem Maße und konzentrationsabhängig hemmt. Bis auf die Fraktionen 32, 34, 40 und 41 liegt die Hemmung bei Verwendung von nur 1,05 RCK-Äquivalenten/Kavität noch über 50 %. Diese Ergebnisse deuteten auf eine spezifische Antikörperbindung sowie hohe Kreuzreaktivität bzw. ausreichend große Substanzmengen hin.

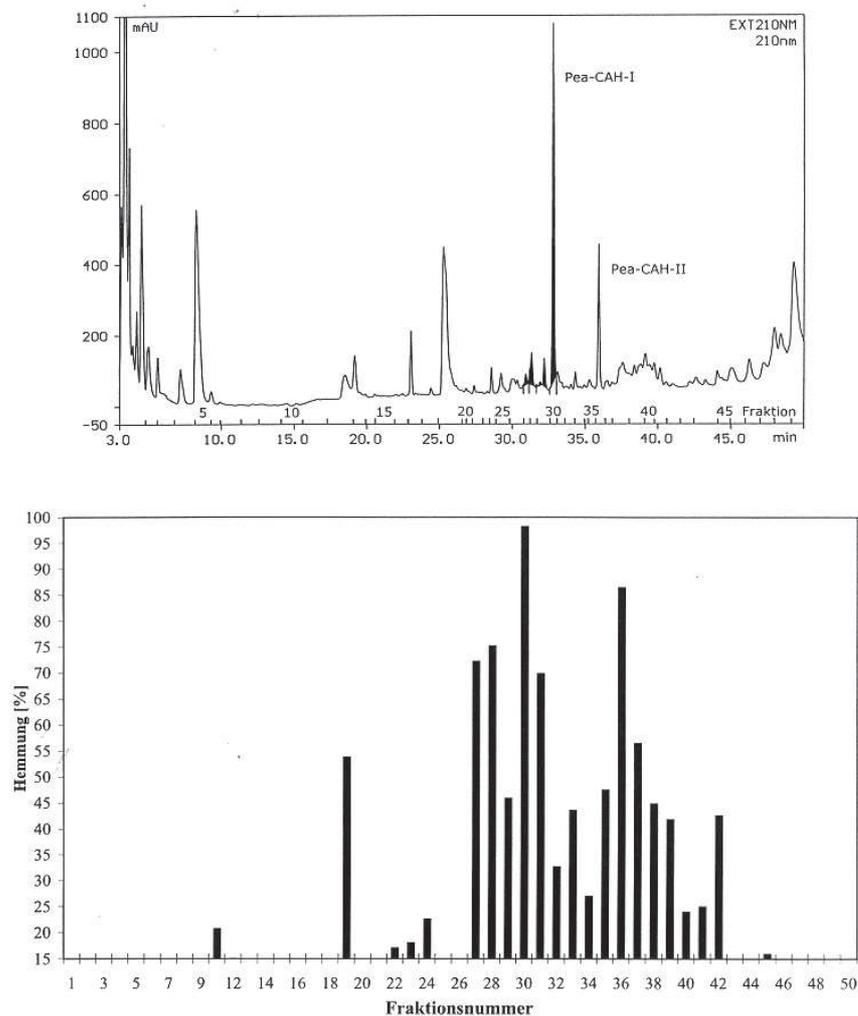


Abbildung 22: Fraktionierung eines Gewebeextraktes von 350 Retrocerebralkomplexen von *Periplaneta americana* mit der HPLC (oben) und Pea-CAH-I-like Immunreaktivität in den Fraktionen (unten). F27 bis F30 wurden im Chromatogramm schwarz gekennzeichnet. Dargestellt wurde die Immunreaktivität von 1,05 RCK-Äquiv./Kav.

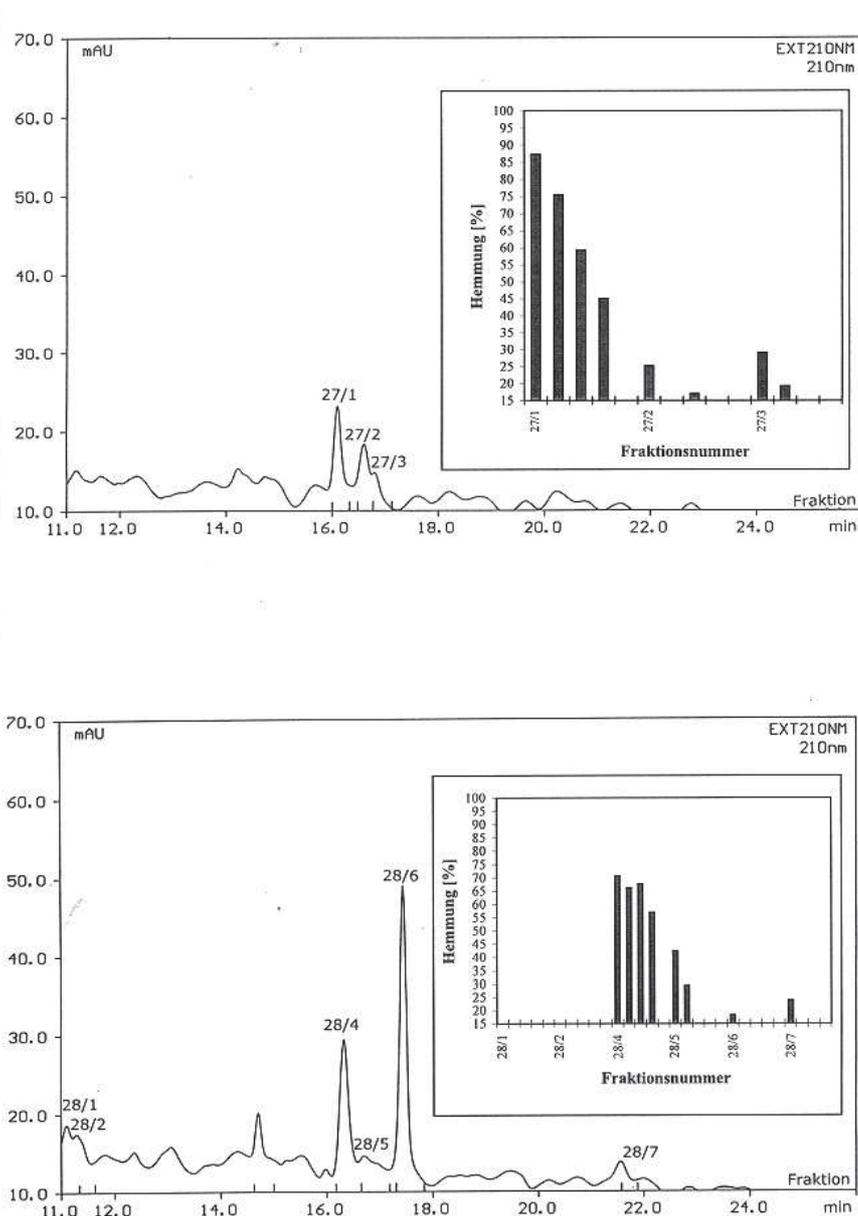


Abbildung 23: Trennung der Fraktionen 27 und 28 und Pea-CAH-I-like Immunreaktivität in den neu gewonnenen Fraktionen. Es wurden 8,4; 4,2; 2,1 und 1,05 RCK-Äquiv./Kav. (von links nach rechts) auf die Mikrotiterplatte aufgetragen.

In Zusammenarbeit mit Herrn Dipl. Chem. J. Rapus wurden die Fraktionen 27, 28, 29 und 30 zur weiteren Bearbeitung ausgewählt. Der Vergleich der Absorptionsspektren mit der Spektrenbibliothek hatte hier ebenfalls Hinweise auf Peptide mit Tryptophanrest(en) ergeben. Mit einem zweiten HPLC-Schritt wurden diese Fraktionen weiter getrennt (siehe Abbildungen 23 und 24). Aus den neu gewonnenen Fraktionen wurden Aliquots entsprechend 20 RCK/Kavität entnommen und als Verdünnungsreihe (siehe oben) getestet. Besonders stark ist die Pea-CAH-I-like Immunreaktivität in den Fraktionen 27/1 (87 bis 45 % Hemmung) und 28/4 (71 bis 57 % Hemmung). Weniger hoch ist die Immunreaktivität in den Fraktionen 28/5,

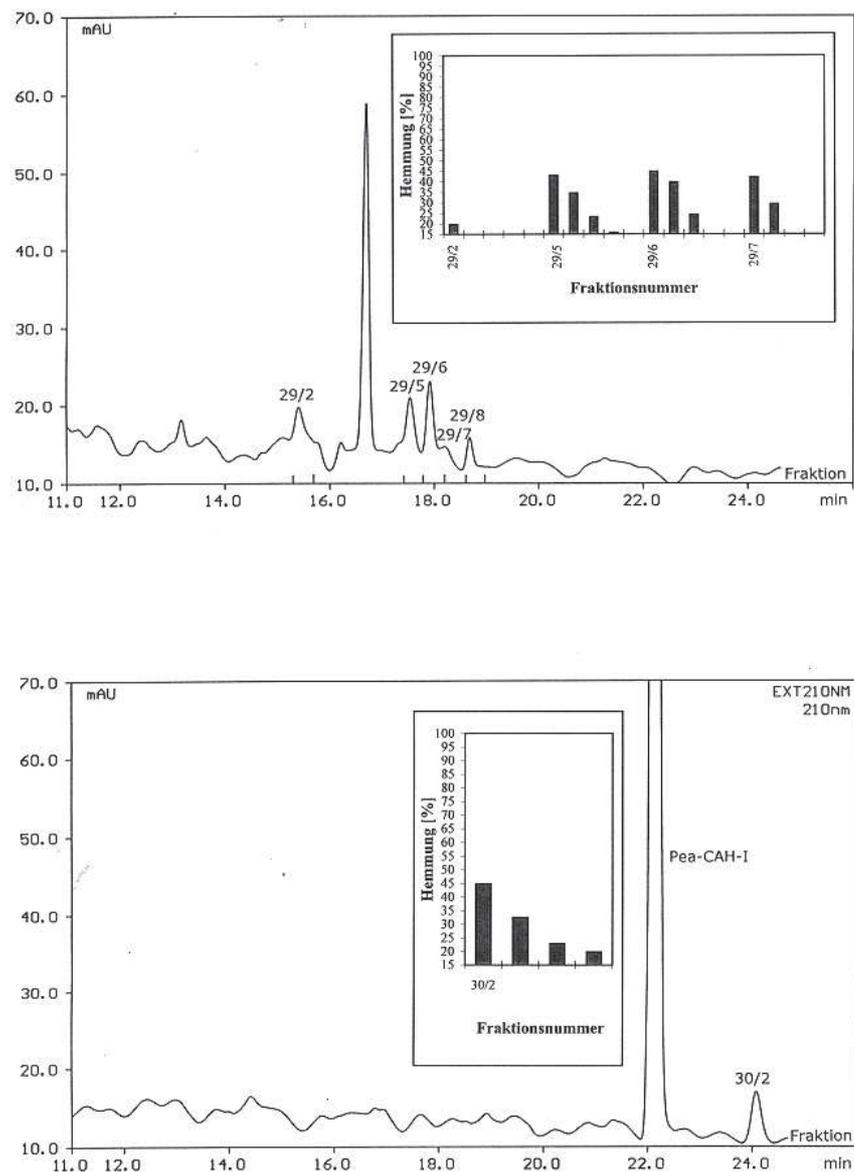


Abbildung 24: Trennung der Fraktionen 29 und 30 und Pea-CAH-I-like Immunreaktivität in den neu gewonnenen Fraktionen. Es wurden 8,4; 4,2; 2,1 und 1,05 RCK-Äquiv./Kav. (von links nach rechts) auf die Mikrotiterplatte aufgetragen.

29/5-7 und 30/2. Hier liegt die Hemmung der Antikörperbindung bei 8,4 RCK-/Äquivalenten/Kavität noch über 40%. Die Fraktionen 28/1, 28/2, 28/6, 28/7 und 29/2 zeigen keine, die Fraktionen 27/2 und 27/3 nur sehr wenig konzentrationsabhängige Immunreaktivität. Das in Fraktion 30 befindliche Pea-CAH-I (30/1) sowie alle Verbindungen, die ihren Spektren zufolge Sulfidgruppen enthielten, wurden nicht bearbeitet.

Das Material aus den Fraktionen 27/1 und 28/4 wurde mit der MALDI-TOF-Massenspektrometrie (matrix-assisted laser desorption ionisation-time of flight) untersucht. Diese Technik bot die Möglichkeit, mit minimalem Substanzeinsatz vorab der eigentlichen Strukturaufklärung weitere Hinweise über das vorliegende Material zu erlangen. Das Mas-

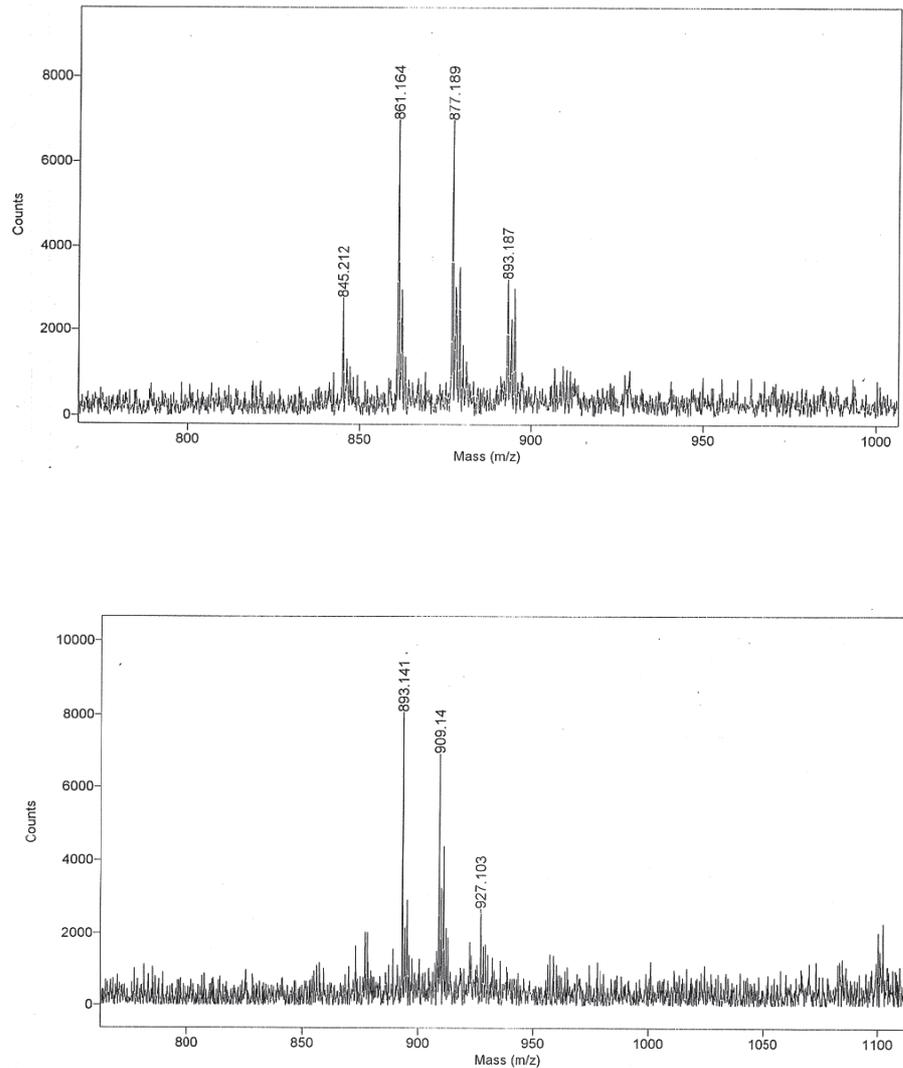


Abbildung 25: Massenspektren der Fraktionen 27/1 und 28/4.

senspektrum von Fraktion 27/1 (siehe Abbildung 25 oben) zeigt vier Peaks bei 845,212 Da; 861,164 Da; 877,189 Da und 893,187 Da. Die Massendifferenzen und das Intensitätsverhältnis der Peaks untereinander weisen darauf hin, daß es sich dabei um zwei Peptide (Peptid 1: 845,212 Da und 861,164 Da, Peptid 2: 877,189 Da und 893,187 Da) handeln könnte. In Fraktion 28/4 (siehe Abbildung 25 unten) befindet sich höchstwahrscheinlich ein unbekanntes Peptid. Es stellt sich durch zwei Peaks bei 893,095 Da und 909,148 Da im Massenspektrum dar. Die Peaks aller isolierten Peptide sind durch eine Massendifferenz von 16 Da gekennzeichnet. Diese Massendifferenz ist typisch für AKH/RPCH-Peptide, die in der MALDI-TOF Na^+ - und K^+ -Addukte bilden (Dr. R. Predel, pers. Mitteilung; Verhaert *et al.* 1997).

13.3.2 Die Identifizierung von Pea-MIP

Die Untersuchung der verschiedenen Gewebeextrakte (siehe unten) mit dem kompetitiven Anti-Pea-CAH-I-Enzymimmunoassay führte zur Identifizierung einer Vielzahl relativ schwach immunreaktiver Fraktionen im Elutionsbereich der uns interessierenden Peptide bzw. zeigte stärkere Pea-CAH-I-like Immunreaktivität in einem Bereich, in dem vorwiegend höhermolekulare Verbindungen eluieren. Die Analyse der Absorptionsspektren mittels Spektrenplot und Spektrenbibliothek erbrachte Hinweise darauf, daß bei allen getesteten Extrakten in einer der schwach immunreaktiven Fraktionen möglicherweise das aus den Corpora cardiaca von *Periplaneta americana* isolierte Peptid Pea-MIP enthalten war.

Pea-CAH-I-like Immunreaktivität in Extrakten des 5. freien Abdominalganglions von *Periplaneta americana*

Immuncytochemische Untersuchungen hatten angedeutet, daß die Pea-CAH-I-like Immunreaktivität im Bauchmark der Amerikanischen Schabe nicht auf die Markierung von Pea-CAH-I/-II zurückgeht (vgl. Abschnitt 13.2). Elektrophysiologische Untersuchungen, die die Beeinflussung der Spontanaktivität der DUM-Neurone im 5. freien Abdominalganglion durch Pea-CAH-I demonstrierten (Heine und Wicher 1998, Wicher 2000), sprechen ebenfalls dafür, daß dort möglicherweise Pea-CAH-I-ähnliche Peptide vorkommen. Es wurde deshalb versucht, kreuzreaktive Peptide aus dem 5. freien Abdominalganglion zu isolieren.

Ein Gewebeextrakt aus 250 Abdominalganglien weiblicher Schaben wurde mittels HPLC in 42 Fraktionen (4.95 - 49.50 min) (vgl. Abbildung 26 oben) aufgetrennt. Die Fraktionen 15 bis 42 wurden getestet (vgl. Abbildung 26 unten). Pea-CAH-I-like Immunreaktivität konnte in mehreren Fraktionen beobachtet werden. Die Fraktionen 36-42 zeigen eine relativ hohe Immunreaktivität. Unter den gegebenen Versuchsbedingungen eluieren in diesem Bereich jedoch eher höhermolekulare Verbindungen, die im Rahmen dieser Arbeit nicht betrachtet werden sollten. Immunreaktivität ist weiterhin in den Fraktionen 21, 28 und 30 bis 35 zu finden. Die Hemmung überschreitet hier jedoch nicht 30 %. Die Analyse der Absorptionsspektren erbrachte Hinweise darauf, daß in Fraktion 28 möglicherweise Pea-MIP enthalten sein könnte.

Ein Extrakt aus 500 5. Abdominalganglien wurde mit der HPLC aufgetrennt und fraktioniert. Gemäß Spektrenanalyse war Pea-MIP in Fraktion 32 enthalten. Ein Aliquot dieser Fraktion entsprechend 25 5. AG wurde im Enzymimmunoassay getestet (10,4; 5,2; 2,6; 1,3 AG/Kavität) und zeigte erneut eine konzentrationsabhängige Hemmung der Antikörperbindung (vgl. Abbildung 29 oben). In einem weiteren Auftrennungsschritt wurde der Peak, dessen Retentionszeit und Absorptionsspektrum Pea-MIP entsprach, isoliert und stand nun für die Massenspektroskopie zur Verfügung. Abbil-

dung 29 (unten) zeigt die Übereinstimmung der Retentionszeiten von synthetischem Pea-MIP und dem isolierten nativen Material.

Pea-CAH-I-like Immunreaktivität in Extrakten von Gehirn und Retrocerebralkomplex von *Nauphoeta cinerea*

Ein Gewebeextrakt aus den Gehirnen von 500 Tieren beiderlei Geschlechts wurde mit der HPLC in 39 (20.65 - 47.86 min) Fraktionen aufgeteilt. Fraktion 5 bis 32 wurden im kompetitiven Enzymimmunoassay als Verdünnungsreihe entsprechend 52; 26; 13 und 6,5 Gehirnen pro Kavität getestet (vgl. Abbildung 27). Die Pea-CAH-I-like Immunreaktivität verteilt sich auf viele Fraktionen. Durch eine stärkere Hemmung der Antikörperbindung fallen die Fraktionen 11 - 13 und 28 - 32 auf. Im dazwischenliegenden Bereich sind mehrere Fraktionen durch mäßige Immunreaktivität gekennzeichnet. Dazu gehört auch Fraktion 23, in der durch Vergleich der Absorptionsspektren Pea-MIP vermutet werden konnte. Eine weitere Präparation sollte hier zu mehr Klarheit führen.

Die Untersuchung eines mit der HPLC fraktionierten Gewebeextraktes von 100 Retrocerebralkomplexen männlicher und weiblicher Tiere ergab ein ähnliches Bild. Von den 61 Fraktionen (3.11 - 40.00 min) wurden die Fraktionen 10 - 50 als Verdünnungsreihe in den Schritten 42; 21; 10,5 und 5,25 RCK-Äquivalente pro Kavität aufgetragen (vgl. Abbildung 28). Pea-CAH-I-like Immunreaktivität verteilt sich über viele Fraktionen. Besonders stark tritt sie in den Fraktionen ab F45 in Erscheinung. Herausragend mit über 60 % Hemmung ist Fraktion 48. Unter den gegebenen Elutionsbedingungen und nach Einschätzung der Absorptionsspektren liegen hier aber vermutlich höhermolekulare Verbindungen vor. Auch in den Fraktionen, denen Verbindungen mit kurzen Retentionszeiten zugeordnet werden können, sind höhere Werte an Pea-CAH-I-like Immunreaktivität zu finden (F10 - 14). Im interessierenden Mittelteil liegen eher verstreut mehrere Fraktionen, die die Antikörperbindung im kompetitiven Enzymimmunoassay zwischen 15 und 30 % hemmen. Die Analyse der Absorptionsspektren erbrachte Hinweise darauf, daß Fraktion 34 Pea-MIP enthalten könnte.

Gewebeextrakte aus jeweils 500 Gehirnen und Retrocerebralkomplexen von männlichen und weiblichen Tieren wurden hergestellt und mit der HPLC fraktioniert. Anhand der Absorptionsspektren wurde in den Fraktionen 29 (Gehirne) und 26 (RCK) Pea-MIP vermutet. Aliquots dieser Fraktionen entsprechend 4,2; 2,1; 1,05 und 0,5 Gehirnen/Kavität bzw. 15,6; 7,8; 3,9 und 1,95 RCK/Kavität wurden im kompetitiven Enzymimmunoassay getestet und konnten die Antikörperbindung konzentrationsabhängig hemmen (vgl. Abbildung 29 oben). Aus den Fraktionen wurden in einer weiteren HPLC-Auftrennung per Spektrenanalyse die Pea-MIP-Peaks isoliert und konnten nun zur Be-

stimmung der Massenzahl mit der MALDI benutzt werden. Die Retentionszeiten von synthetischem Pea-MIP und dem aufgereinigten Material aus den Gewebeextrakten waren identisch (vgl. Abbildung 29 unten).

Bestimmung der Massen

Die Massenbestimmung sollte die Identität der isolierten Substanzen mit Pea-MIP bestätigen. Pea-MIP erscheint als H^+ - (1046,13 Da), als Na^+ - (1068,12 Da) und K^+ -Addukt (1084,23 Da) im Spektrum (siehe Abbildung 30). Pea-MIP wird vergleichsweise schlecht ionisiert. Besonders der $[\mu+H]$ -Peak erreichte erst durch das Waschen der Proben eine aussagekräftige Signalstärke. Im Massenspektrum der isolierten Substanzen aus dem Gehirn- und dem RCK-Extrakt (siehe Abbildungen 31 und 32) sind markante Peaks bei 1068,5 Da (Gehirn) bzw. 1068,7 Da (RCK) und 1084,4 Da (Gehirn) bzw. 1084,7 Da (RCK) zu sehen. Diese Massen stimmen mit denen der Na^+ - und K^+ -Addukte von Pea-MIP überein. Die $[\mu+H]$ -Peaks (1045,1 Da Gehirn und 1047,8 Da RCK) sind hier nur schwach ausgeprägt. Versuche zur Probenvorbehandlung zeigten, daß Waschen nach dem Auftragen der Proben das Signal-Rausch-Verhältnis verbessert. Das immunreaktive Material aus dem Extrakt der 5. Abdominalganglien wurde so vorbereitet und erzielte das klarste Ergebnis. Eindeutig zu identifizieren sind hier nicht nur die Massen der Na^+ - und K^+ -Addukte von Pea-MIP bei 1068,3 Da und 1084,3 Da, sondern auch der $[\mu+H]$ -Peak von Pea-MIP bei 1046,2 Da (siehe Abbildung 33).

Anhand der Übereinstimmung der Retentionszeiten und der Massenzahlen mit dem synthetischem Peptid konnte Pea-MIP bei *Periplaneta americana* im 5. freien Abdominalganglion sowie im Gehirn und im Retrocerebralkomplex von *Nauphoeta cinerea* identifiziert werden.

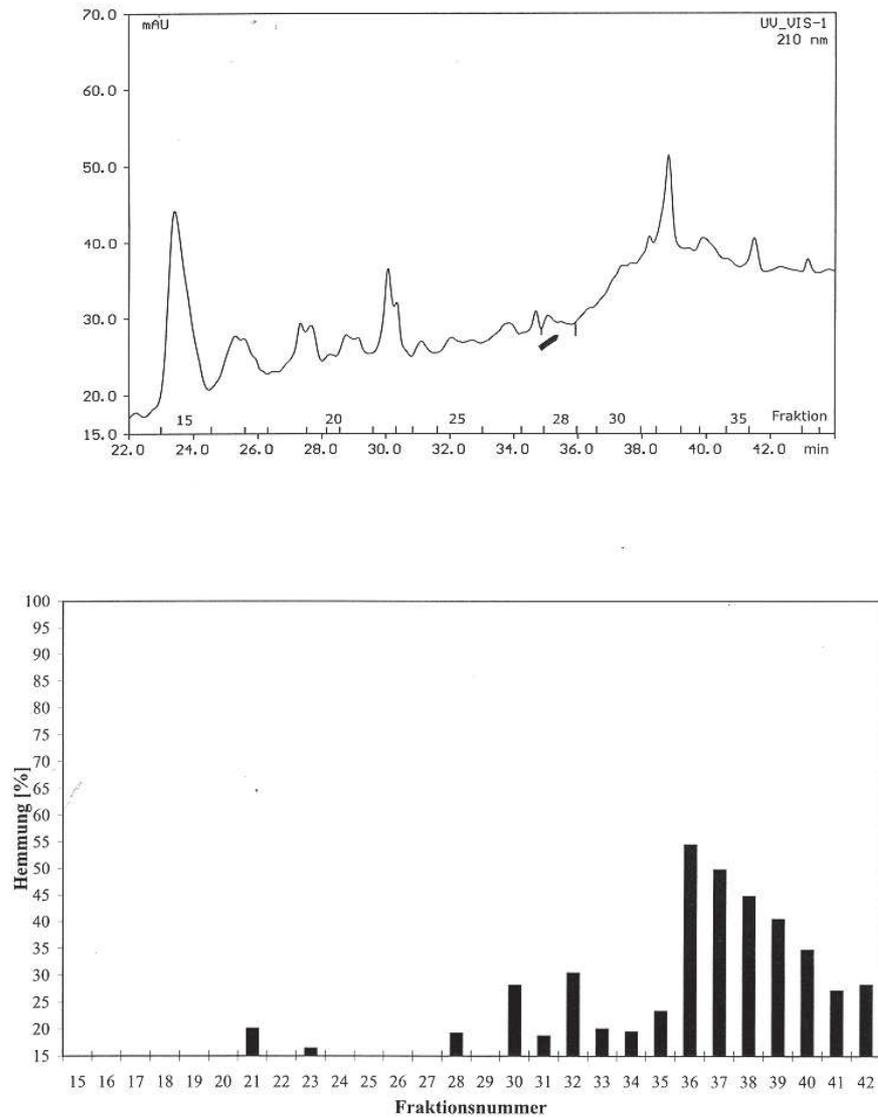


Abbildung 26: Fraktionierung eines Gewebeextraktes von 250 5. AG (weibl.) von *Periplaneta americana* mit der HPLC (oben) und Pea-CAH-I-like Immunreaktivität in den Fraktionen (unten). Dargestellt wurde die Immunreaktivität entsprechend 106 AG5/Kav. F28 wurde im Chromatogramm mit einem Pfeil gekennzeichnet.

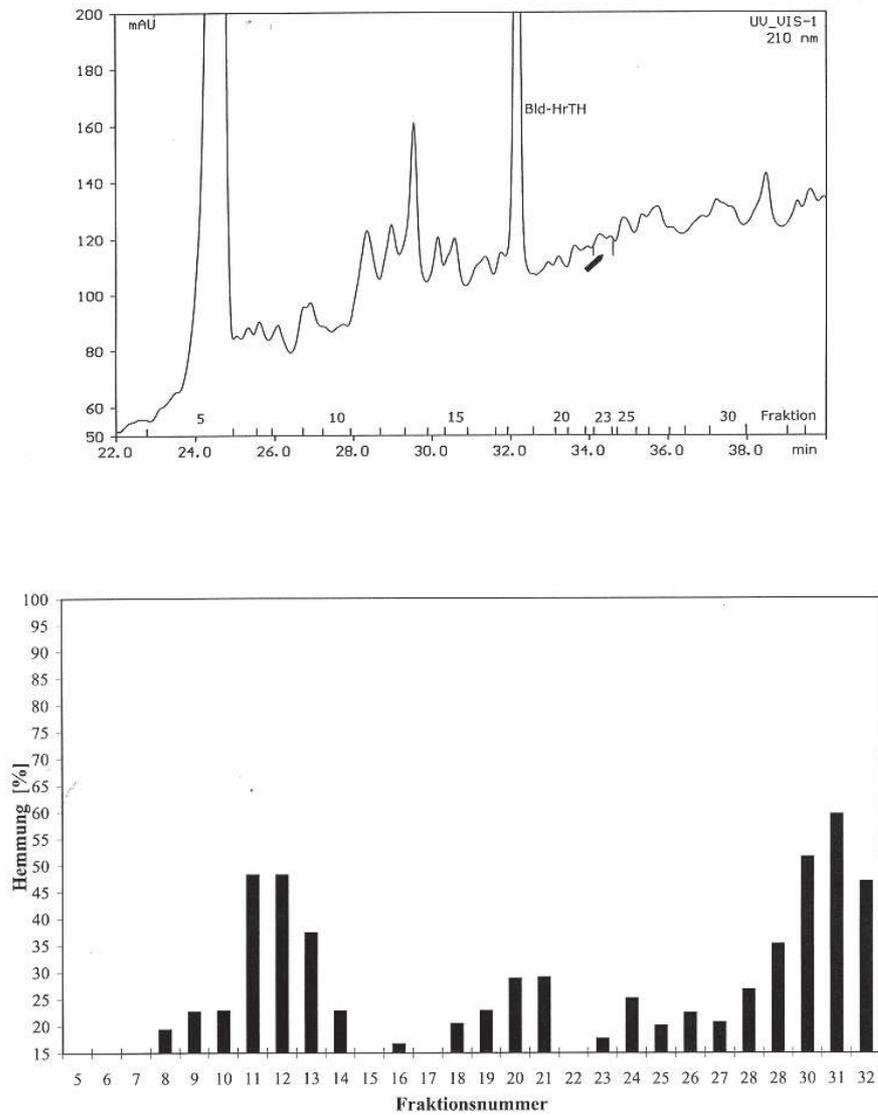


Abbildung 27: Fraktionierung eines Gewebeextraktes von 500 Gehirnen von *Nauphoeta cinerea* mit der HPLC (oben) und Pea-CAH-I-like Immunreaktivität in den Fraktionen (unten). Dargestellt wurde die Immunreaktivität entsprechend 52 Hirne/Kav. F23 wurde im Chromatogramm mit einem Pfeil gekennzeichnet.

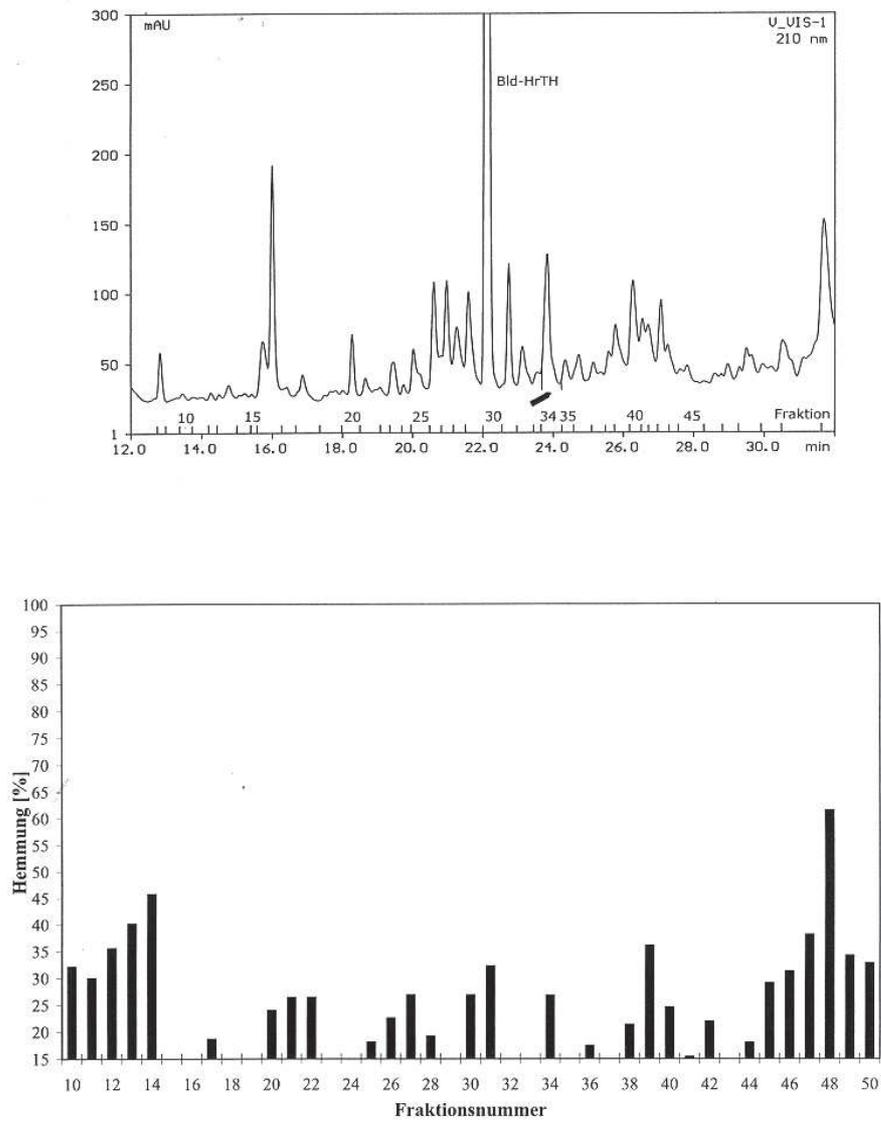


Abbildung 28: Fraktionierung eines Gewebeextraktes von 100 Retrocerebralkomplexen von *Nauphoeta cinerea* mit der HPLC (oben) und Pea-CAH-I-like Immunreaktivität in den Fraktionen (unten). Dargestellt wurde die Immunreaktivität entsprechend 42 RCK/Kav. F34 wurde im Chromatogramm mit einem Pfeil gekennzeichnet.

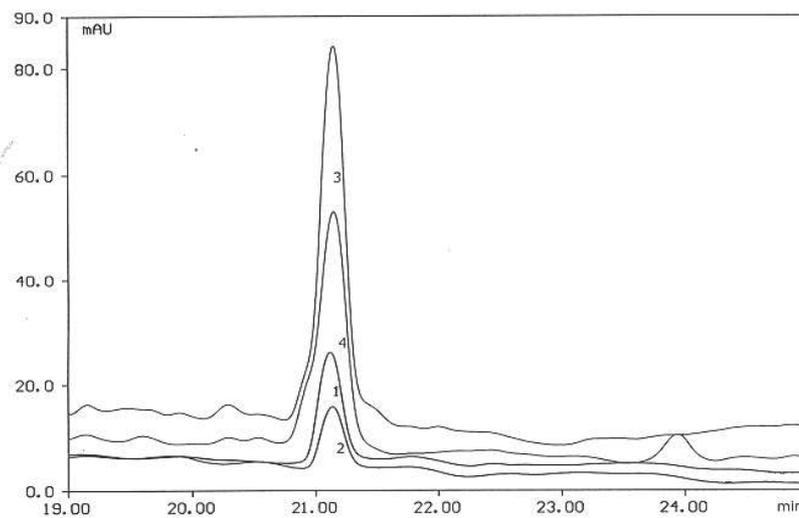
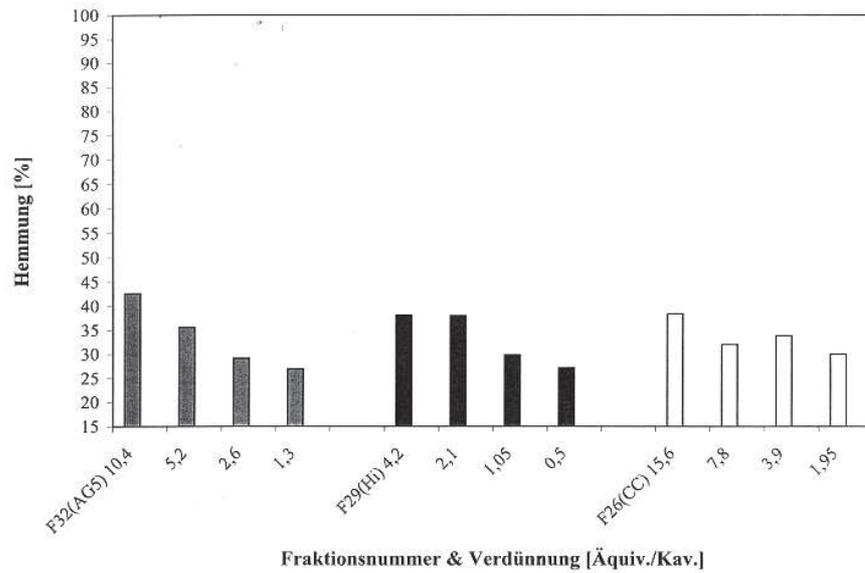


Abbildung 29: Konzentrationsabhängige Hemmung der Antikörperbindung im kompetitiven Anti-Pea-CAH-I-Enzymimmunoassay durch die Fraktionen F32 (5. freies AG von *Periplaneta americana*), F29 und F26 (Gehirn und Retrocerebralkomplex von *Nauphoeta cinerea*) (oben). Der Vergleich der HPLC-Retentionszeiten des isolierten immunreaktiven Materials aus den o. g. Fraktionen mit synthetischem Pea-MIP weist auf die Identität der kreuzreaktiven Substanzen mit Pea-MIP hin (unten): 1 = Pea – MIP, 2 = F32 (5. AG, *P. a.*), 3 = F29 (Gehirn, *N. c.*), 4 = F26 (RCK, *N. c.*).

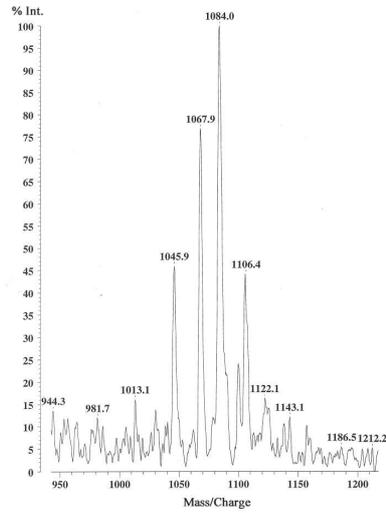


Abbildung 30: Massenspektrum von synthetischem Pea-MIP, gemittelt aus 32 Einzelspektren. Zu sehen sind der $[\mu+\text{H}]$ -Peak (1045,9 Da), der $[\mu+\text{Na}]$ -Peak (1067,9 Da) und der $[\mu+\text{K}]$ -Peak (1084,0 Da).

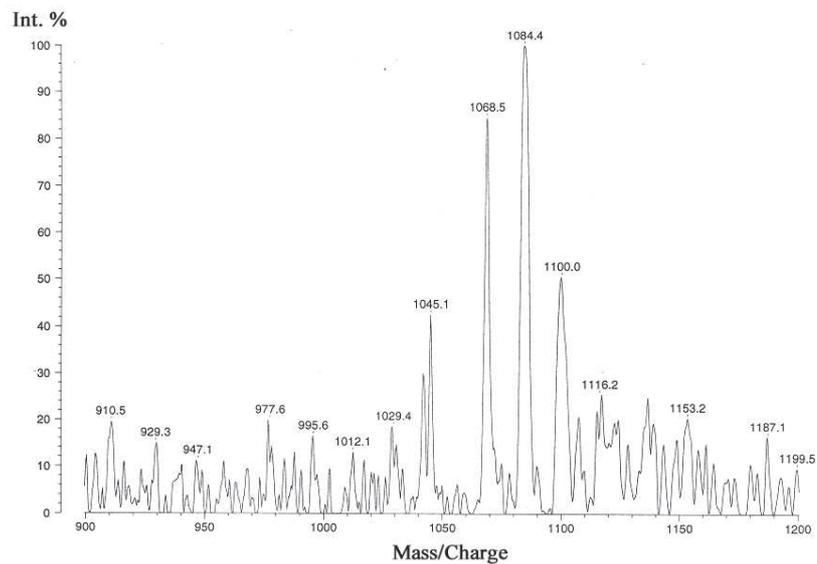


Abbildung 31: Massenspektrum der isolierten immunreaktiven Substanz aus Fraktion 29 des Gehirnextraktes von *Nauphoeta cinerea*, gemittelt aus 85 Einzelspektren. Die Massen 1045,1 Da; 1068,5 Da und 1084,4 Da entsprechen denen der H^+ -, Na^+ - und K^+ -Addukte von Pea-MIP.

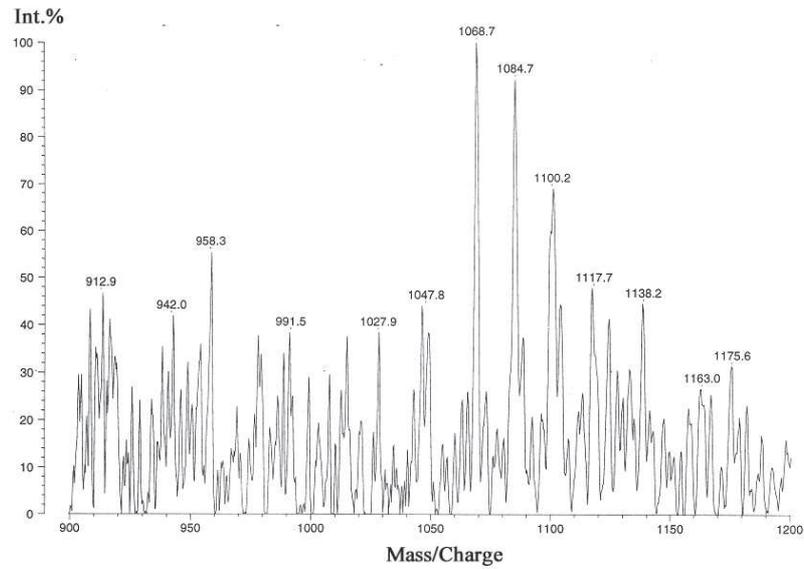


Abbildung 32: Massenspektrum der isolierten immunreaktiven Substanz aus Fraktion 26 des RCK-Extrakttes von *Nauphoeta cinerea*, gemittelt aus 72 Einzelspektren. Die Massen 1068,7 Da und 1084,7 Da entsprechen denen der Na^+ - und K^+ -Addukte von Pea-MIP. Der $[\mu+\text{H}]$ -Peak liegt bei 1047,8 Da.

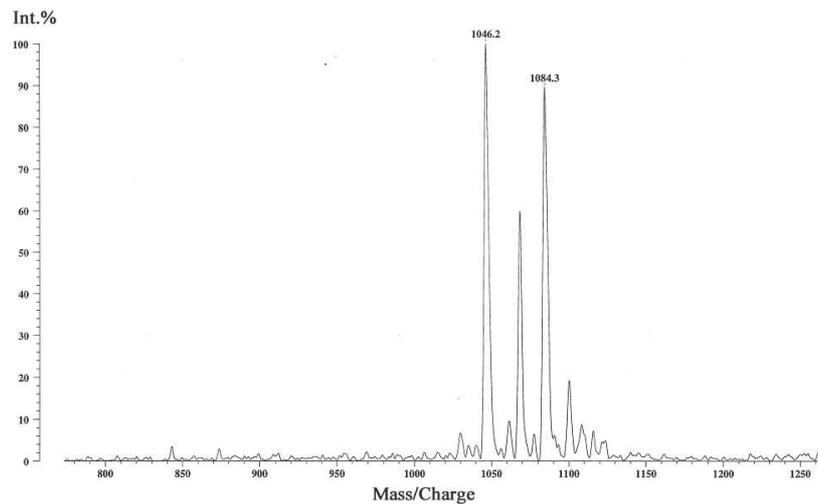


Abbildung 33: Massenspektrum der Substanz aus Fraktion 32 des Extrakttes aus 5. Abdominalganglien von *Periplaneta americana*, gemittelt aus 79 Einzelspektren. Die Massen 1046,2 Da, 1068,5 Da (im Bild nicht beschriftet) und 1084,4 Da entsprechen denen der H^+ -, Na^+ - und K^+ -Addukte von Pea-MIP.

Teil IV

**DISKUSSION und
ZUSAMMENFASSUNG**

14 Diskussion

Ein polyklonales Antiserum gegen das hypertrehalosämisch und cardioakzeleratorisch wirkende Peptid Pea-CAH-I aus den Corpora cardiaca der Schabe *Periplaneta americana* färbte neben den glandulären Zellen der Corpora cardiaca auch Fasern und Neurone im Nervensystem der Amerikanischen Schabe. Immunmarkierungen im Nervensystem von Insekten, die in den Corpora cardiaca kein Pea-CAH-I/-II synthetisieren, deuteten an, daß das Antiserum möglicherweise auch mit Pea-CAH-I-ähnlichen Peptiden aus dem Nervensystem kreuzreagiert. Die Kreuzreaktivität des Anti-Pea-CAH-I-Serums sollte deshalb zur Suche und Isolierung Pea-CAH-I-ähnlicher Peptide genutzt werden.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden drei unbekannte kreuzreaktive Peptide aus dem Retrocerebralkomplex von *Periplaneta americana* isoliert. Es gelang außerdem die Identifizierung von Pea-MIP im 5. freien Abdominalganglion von *Periplaneta americana* und im Gehirn und im Retrocerebralkomplex der Schabe *Nauphoeta cinerea*. Das Antiserum wurde dazu in einem kompetitiven Anti-Pea-CAH-I-Enzymimmunoassay verwendet und zum Screening der mittels HPLC fraktionierten Gewebeextrakte eingesetzt. Die genannten Peptide wurden auf Grund ihrer Kreuzreaktivität in diesem Enzymimmunoassay und ihrer Absorptionseigenschaften in der HPLC sowie im Falle von Pea-MIP durch den Vergleich mit dem synthetischen Peptid isoliert. Die Aminosäuresequenz der drei Peptide aus dem Retrocerebralkomplex von *Periplaneta americana* ist noch nicht bekannt. Pea-MIP gehört nicht zur Familie der AKH/RPCH-Peptide. Es ist ein Nonapeptid mit der Masse 1045,4 Da und gehört zu den sogenannten W^2W^9 -Peptiden. W^2W^9 -Peptide werden C-terminal durch Tryptophanamid abgeschlossen. Pea-CAH-I und alle anderen Oktapeptide der AKH/RPCH-Familie sind ebenfalls durch einen C-terminalen Tryptophanamidrest gekennzeichnet. Untersuchungen zur Spezifität des Anti-Pea-CAH-I-Serums hatten gezeigt, daß das Antiserum mit dem C-terminalen Tryptophanamidrest der Peptide kreuzreagiert.

14.1 Spezifität des Anti-Pea-CAH-I-Serums

Zur Charakterisierung der Antiserumspezifität wurde die Kreuzreaktivität des Anti-Pea-CAH-I-Serums mit Peptiden der AKH/RPCH-Familie und anderer Peptidfamilien sowie mit synthetischen Pea-CAH-I-Analoga und Tryptophan- bzw. Tryptophanamidkonjugaten in kompetitiven und nichtkompetitiven Anti-Pea-CAH-I-Enzymimmunoassays sowie durch Flüssigphasepräabsorptionen des Antiserums in Kombination mit Immunmarkierungen getestet.

Beide Enzymimmunoassay-Techniken lieferten übereinstimmende Aussagen zur Spezifität des Antiserums, obwohl die Immobilisierung Einfluß auf die Detektion der

Peptide im nichtcompetitiven Enzymimmunoassay hatte. Dies soll im Anschluß diskutiert werden.

Das Anti-Pea-CAH-I-Serum ist nicht substanzspezifisch. Es kreuzreagiert mit allen Peptiden, deren C-Terminus durch die Aminosäurefolge -Pro-Asn-Trpa gebildet wird und erkennt auch Peptide, bei denen innerhalb dieser Struktur die Aminosäuren Asparagin oder Prolin und Asparagin ersetzt wurden. Die Kreuzreaktivität des Anti-Pea-CAH-I-Serums mit den verwendeten Antigenen war im kompetitiven Enzymimmunoassay meßbar (Kreuzreaktivitätsverhältnisse, $KRV = 1 : z$, siehe Tabelle 14). Je größer z ist, desto geringer ist die Kreuzreaktivität.

Alle Peptide mit der Sequenz -Pro-Asn-Trpa wurden genauso gut erkannt wie Pea-CAH-I, sofern die Sequenz den C-Terminus eines längeren Peptids, mindestens eines Tetrapeptids, bildete. Das synthetische Tripeptid Pro-Asn-Trpa (des¹⁻⁵-Pea-CAH-I) war nicht nicht voll kreuzreaktiv. Vermutlich besitzt auch die Peptidbindung zwischen Prolin und dem in N-terminaler Richtung folgenden Aminosäurerest Bedeutung für die Antigen-Antikörper-Reaktion. Die Position selbst wurde bei den getesteten Peptiden durch verschiedene Aminosäuren besetzt und scheint für die Kreuzreaktivität mit dem Anti-Pea-CAH-I-Serum nicht entscheidend zu sein.

Die Kreuzreaktivität des Antiserums verringert sich mit jedem Aminosäureaustausch innerhalb der C-terminalen Aminosäurefolge -Pro-Asn-Trpa um ca. den Faktor Zehn. Wird Asparagin durch eine andere Aminosäure (Glycin, Serin) ersetzt (-P-X-Wa-Peptide), liegen die KRV zwischen 1 : 10 und 1 : 100. Werden gleichzeitig Prolin und Asparagin ausgetauscht (-X-X-Wa-Peptide), liegen die KRV zwischen 1 : 100 und 1 : 1000. Eine Ausnahme bilden -P-X-Wa-Peptide mit Asparaginsäure in Position 8. Der Austausch von Asparagin und Asparaginsäure wird durch das Antiserum vollständig toleriert, so daß die KRV der -P-D-Wa-Peptide ebenso wie die KRV der -P-N-Wa-Peptide annähernd bei 1 : 1 liegen. Der Vergleich der bei den -P-X-Wa-Peptiden in Position 8 stehenden Aminosäuren (Glycin, Serin, Asparaginsäure) zeigt, daß die Länge der Seitenkette offensichtlich eine größere Bedeutung für die Bindung der Antikörper besitzt als ihre Ladung und Polarität. Chersi *et al.* (1997) geben ebenfalls an, daß bestimmte Aminosäureaustausche die Kreuzreaktivität von Anti-Peptid-Seren offenbar nicht beeinflussen. Dazu gehört nicht nur der Austausch von Asparagin und Asparaginsäure, sondern auch die Wechsel zwischen Alanin und Glycin sowie zwischen Leucin und Isoleucin.

Die Wertigkeit der Aminosäuren am Carboxy-Terminus der Peptide für die Kreuzreaktivität mit dem Anti-Pea-CAH-I-Serum ist unterschiedlich. Der Prolinrest hat für die Antikörperbindung an die Aminosäuresequenz -Pro-Asn-Trpa höchstwahrscheinlich eine größere Bedeutung als der Asparagin- bzw. Asparaginsäurerest. Hinweis darauf gibt die Kreuzreaktivität des Antiserums mit dem C-terminalen Dipeptid Asn-Trpa

(des¹⁻⁶-Pea-CAH-I), das verglichen mit dem Tripeptid Pro-Asn-Trpa im kompetitiven Enzymimmunoassay sehr viel schlechter erkannt wird (*KRV* 1 : 827). Minimale strukturelle Voraussetzung für die Kreuzreaktivität mit dem Anti-Pea-CAH-I-Serum ist der C-terminale Tryptophanamidrest. Eindrucksvoller Beweis hierfür ist die Kreuzreaktivität des Antiserums mit dem Glutaraldehyd-Konjugat aus BSA und Tryptophanamid. Wichtig für die Bindung der Antikörper ist dabei auch die Amidierung. Die Kreuzreaktivität eines nach dem gleichen Verfahren hergestellten Tryptophankonjugats ist nochmals deutlich reduziert (1 : 9658) und tritt erst bei sehr hohen Substanzmengen in Erscheinung. Auch Peptide, die C-terminal über Tryptophan hinaus um ein bis zwei Aminosäuren verlängert sind und durch ein anderes Aminosäureamid abgeschlossen werden, kreuzreagieren nicht mehr mit dem Anti-Pea-CAH-I-Serum.

Im nichtkompetitiven Enzymimmunoassay war die Kreuzreaktivität der Peptide mit dem Anti-Pea-CAH-I-Serum nicht nur von der Primärstruktur ihres Carboxy-Terminus abhängig, sondern auch vom N-Terminus, da dieser die Immobilisierung der Peptide beeinflusste.

Am deutlichsten zeigte sich dieser Einfluß bei Hepta- und Oktapeptiden ohne N-terminalen Pyroglutamatrest sowie bei kurzen Peptiden mit fünf und weniger Aminosäuren. Die getesteten kurzen Peptide (Ausnahme: APGWa) waren weniger kreuzreaktiv als N-terminal geblockte Oktapeptide mit entsprechendem C-Terminus. Im Gegensatz dazu sind Hepta- und Oktapeptide ohne N-terminalen Pyroglutamatrest als immobilisierte Antigene im nichtkompetitiven Enzymimmunoassay sehr viel stärker kreuzreaktiv als die N-terminal geblockten Peptide mit dem gleichen C-Terminus. Die Abnahme der Kreuzreaktivität mit der zunehmenden Veränderung des C-terminalen Tripeptides durch ein (-P-X-Wa-Peptide) oder zwei (-X-X-Wa-Peptide) Aminosäureaustausche und der Verlust der Kreuzreaktivität bei der C-terminalen Verlängerung der Peptide lassen sich jedoch auch bei Peptiden ohne Pyroglutamatrest beobachten. Die Länge der Peptide hatte dabei offensichtlich einen stärkeren Einfluß als der N-terminale Pyroglutamatrest. So wurde das -X-X-Wa-Pentapeptid PPGLWa trotz des freien Aminoendes im Gegensatz zum ungeblockten -X-X-Wa-Nonapeptid Pea-MIP nicht detektiert.

Bei sehr kurzen Peptiden kann durch die geringe Molekülgröße vermutlich recht leicht die Zugänglichkeit des Epitops für die Antikörperbindung vermindert werden (z. B. durch Bindung an die Mikrotiterplatte am Epitop oder in Epitopnähe oder durch zu dichte Packung der Moleküle). Vergleichbare Erfahrungen machten auch Clottens *et al.* (1993) mit verschiedenen C-terminalen Analoga von Achetakinin-I (Pentapeptide), die nur im kompetitiven und nicht im nichtkompetitiven Enzymimmunoassay kreuzreaktiv waren. Dagegen begünstigte der Wegfall des Pyroglutamatrestes die Detektion der untersuchten Peptide. Das könnte sowohl durch eine höhere Menge immobilisierten

Peptids als auch durch eine verbesserte Darbietung des Epitops z. B. durch eine andere Ausrichtung der immobilisierten Peptide verursacht worden sein.

Die Immobilisierung wirkte sich im nichtcompetitiven Anti-Pea-CAH-I- Enzymimmunoassay am stärksten auf die Detektion der schwach kreuzreaktiven -X-X-Wa-Peptide aus. Im Gegensatz zu -X-X-Wa-Peptiden mit einem N-terminalen Pyroglutamatrest wurde nur das ungeblockte -X-X-Wa-Peptid Pea-MIP im nichtcompetitiven Enzymimmunoassay eindeutig erkannt.

Die Kreuzreaktivität der -P-N-Wa- und -P-X-Wa-Peptide mit einem N-terminalen Pyroglutamatrest und ohne weitere freie Aminogruppen hatte im nichtcompetitiven Enzymimmunoassay demonstriert, daß auch Peptide ohne freie Aminogruppen an einer mit Glutaraldehyd aktivierten Proteinschicht immobilisiert werden können. Auch das N-terminal freie des-pGlu¹-Pea-CAH-I wurde weitestgehend unabhängig von Glutaraldehyd an der der Poly-L-Lysin-Schicht gebunden. Möglicherweise können so Peptide auch ohne freie Aminogruppen bei einer Glutaraldehydfixierung im Gewebe gebunden werden. Dies gilt jedoch offenbar nicht für -X-X-Wa-Peptide mit einem N-terminalen Pyroglutamatrest. -X-X-Wa-Peptide ohne freien N-Terminus wurden im nichtcompetitiven Enzymimmunoassay nur sehr wenig bzw. so immobilisiert, daß die Tryptophanamid-spezifischen Antikörper nicht mehr binden können. Bei einer Immunmarkierung im glutaraldehydfixierten Gewebe werden N-terminal geblockte -X-X-Wa-Peptide offensichtlich ebenfalls nicht markiert, denn die glandulären Zellen der Corpora cardiaca von *Schistocerca gregaria* (AKH/RPCH-Peptide: Lom-AKH-I, C-terminal verlängert, Stone *et al.* 1978 und Scg-AKH-II, -X-X-Wa-Peptid, Siegert *et al.* 1985, Gäde *et al.* 1986) und von *Gryllus bimaculatus* (Grb-AKH, -X-X-Wa-Peptid, Gäde und Rinehart 1987) wurden nicht angefärbt. Andererseits werden im Nervensystem offensichtlich Antigene mit einem C-terminalen Tryptophanamidrest immunocytochemisch angefärbt, denn die Immunmarkierung im Gehirn und im neurosekretorischen Speicher der Corpora cardiaca von *Periplaneta americana*, *Schistocerca gregaria* und *Nauphoeta cinerea* konnte durch die Präinkubation des Anti-Pea-CAH-I-Serums mit -X-X-Wa-Peptiden konzentrationsabhängig unterdrückt werden.

Immunmarkierungen an Gehirn-Retrocerebralkomplexen von *Periplaneta americana* und *Blatta orientalis* nach der Präabsorption des Antiserums mit APGWa oder verschiedenen -X-X-Wa-Peptiden bestätigten ebenfalls, daß die Kreuzreaktivität des Anti-Pea-CAH-I-Serums gegenüber -P-X-Wa-Peptiden oder Antigenen mit einem C-terminalen Tryptophanamidrest schwächer ist als die Kreuzreaktivität mit -P-N-Wa-Peptiden, denn die Immunfärbung von Pea-CAH-I/-II in den glandulären Zellen dieser Arten wurde verhältnismäßig wenig reduziert.

Die Sekundärstruktur der AKH/RPCH-Peptide bietet eine gute Erklärungsmöglichkeit für die unterschiedliche Bedeutung der Aminosäurereste für die Kreuzreaktivität.

Der Carboxyterminus bildet bei AKH/RPCH-Peptiden mit einem Prolinrest in Position 6 eine Schleife, während der N-terminale Teil eine getreckte Konformation (antiparalleles Faltblatt (Zubrzycki und Gäde 1994) oder eine P_{II} -Struktur (Cusinato *et al.* 1998)) einnimmt. Die Form der Schleife (Schleifentyp, Zahl der beteiligten Aminosäurereste, Wasserstoffbrückenbindungen etc.) wird von den einzelnen Autoren in Abhängigkeit von Lösungsmittel und/oder Analysentechnik unterschiedlich beschrieben (Stone *et al.* 1978, Wheeler *et al.* 1990, Zubrzycki und Gäde 1994, Zubrzycki 1998, Cusinato *et al.* 1998). Wichtig ist, daß die neuesten Arbeiten auch Hinweis darauf geben, daß diese Konformationen ebenfalls in wässriger Lösung und bei der Bindung am Rezeptor eingenommen werden können. Die aromatischen Seitenketten des Phenylalanin- und des Tryptophanamidrestes sind bei allen beschriebenen Konformationen ins Innere der Schleife geklappt. Die Säureamidgruppe des Tryptophanrestes erhält so eine exponierte, nach außen gerichtete Stellung. Besonders gut ersichtlich wird dies an einem Molekülmodell von Emp-AKH (unterscheidet sich von Pea-CAH-I nur durch einen Threoninrest in Position 5), das für die Sekundärstruktur des Peptids in wässriger Umgebung errechnet wurde (Zubrzycki 1998). Die Kreuzreaktivität der Peptide mit dem Anti-Pea-CAH-I-Serum wird danach also scheinbar einerseits entscheidend durch die räumliche Struktur und andererseits durch die frei zugängliche Amidgruppe des Tryptophanamidrestes bestimmt. Trotzdem reicht die Schleife allein offensichtlich nicht für die Bindung der Antikörper aus, wie das Ausbleiben der Kreuzreaktivität mit Cam-HrTH-II (-Pro⁶-Asn⁷-Trp⁸-Gly⁹-Thra¹⁰) zeigt. Für die Kreuzreaktivität der -X-X-Wa-Peptide dagegen genügt der Tryptophanamidrest.

Die Spezifität des Anti-Pea-CAH-I-Serums für den Tryptophanamidrest wurde ohne Einschränkungen nur gegenüber gelösten Antigenen im kompetitiven Enzymimmunoassay deutlich. Auch in der Literatur wird teilweise die Meinung vertreten, daß im Enzymimmunoassay Kreuzreaktivität angezeigt werden kann, die ohne Bedeutung für die Immuncytochemie ist (Nieuwenhuijzen Krusemann 1983), da durch die Verwendung höherer Antigenmengen im Enzymimmunoassay auch niederaffine Antikörper binden können. Andererseits geht Veenstra (1988) davon aus, daß die Kreuzreaktivität mit der Konzentration des Antiserums steigt. Wegen der geringeren Verdünnung könnte deshalb die Kreuzreaktivität eines Antiserums in der Immuncytochemie eher in Erscheinung treten als im Enzymimmunoassay. Tatsächlich handelt es sich aber zumindest im vorliegenden Fall eher um ein Fixierungsproblem. Da jedoch mit dem Antiserum erwartungsgemäß die glandulären Zellen von *Periplaneta americana* gefärbt wurden, bestand aus methodenkritischer Sicht kein Anlaß eine andere Fixierungsprozedur auszuwählen. Bei der Verwendung eines Antiserums für Immunmarkierungen bei verschiedenen Arten dagegen wird in der Literatur ein einheitliches Protokoll gefordert (Veenstra 1988). Es bestätigt sich aber, daß sich die Ergebnisse nicht formal von der Immuncytochemie auf

die Enzymimmunoassays und umgekehrt übertragen lassen. Ein anderes Problem wird bei der Flüssigphasepräabsorption des Antiserums mit heterologen Antigenen sichtbar. Die Präinkubation des Anti-Pea-CAH-I-Serums mit -P-X-Wa-Peptiden (Eckert *et al.* 1996) verhinderte die Immunfärbung des Gehirns und des neurosekretorischen Teils der Corpora cardiaca bei *Periplaneta americana* ebenso wie die Präabsorption des Antiserums mit verschiedenen -X-X-Wa-Peptiden. Das erste Ergebnis wies genauso auf das Vorhandensein kreuzreagierender Antigene in den Geweben hin, legte aber die Möglichkeit nahe, daß es sich hier potentiell um Peptide mit der Struktur -P-X-Wa handeln könnte. Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen aber, daß die Markierung offenbar auf der Bindung von Antikörpern beruhte, die auch für die Kreuzreaktivität mit -X-X-Wa-Peptiden verantwortlich sind, so daß nunmehr "nur" von einer Markierung von Antigenen mit einem C-terminalen Tryptophanamidrest ausgegangen werden sollte.

Aus dem Verlauf der Untersuchungen wird deutlich, wie wichtig der Einsatz verschiedener Methoden ist. Obwohl die Verwendung eines kompetitiven Enzymimmunoassays oder Radioimmunoassays zur Bewertung der Spezifität von vielen Autoren kritisch betrachtet wird (Petrusz *et al.* 1976, Schipper und Tilders 1983, Van Leeuwen 1986), da sich die Testbedingungen (Konkurrenz der Antigene, Antiserumverdünnung) sehr stark von der Situation bei der Immunmarkierung am Gewebe unterscheiden, besteht hier im Gegensatz zum nichtkompetitiven Enzymimmunoassay nicht die Möglichkeit falsch-negativer Ergebnisse. Dagegen wurde der Einfluß der N-Termini auf die Immobilisierung bzw. Fixierung von -X-X-Wa-Peptiden erst durch die Ergebnisse der nichtkompetitiven Enzymimmunoassays herausgearbeitet.

Aussagen zur Spezifität eines Antiserums durch die Arbeit mit einem Spektrum verwandter und nichtverwandter Peptide sind natürlich in starkem Maße von den verwendeten Peptiden selbst abhängig. Höhere Sicherheit hätte durch das kostenintensive *epitope mapping* gewonnen werden können. Bei diesem Verfahren wird die Kreuzreaktivität synthetischer Analoga getestet, bei denen durch den sukzessiven Austausch der Aminosäurereste systematisch mehr oder weniger immunologisch ähnliche Epitope erzeugt wurden (z. B. Geysen *et al.* 1986). Wie die Isolation zweier vom Immunogen strukturell völlig verschiedener Peptide zeigt (Salzet *et al.* 1996), läßt sich jedoch die Kreuzreaktivität eines Antiserums nie vollständig abschätzen.

14.2 Pea-CAH-I-like-Immunreaktivität im Nervensystem von Schaben

Im Gehirn von *Periplaneta americana* zeigen insgesamt 12 Zellgruppen in Proto- und Deutocerebrum Pea-CAH-I-like Immunreaktivität. Desweiteren werden Fasern in den meisten Neuropilbereichen (Pilzkörper, protocerebrale Brücke, Zentral- und Sub-

peduncularkörper, Antennalglomeruli, aglomeruläre Neuropile und tritocerebrale Glomeruli) des Gehirns gefärbt. In den Corpora cardiaca werden durch das Anti-Pea-CAH-I-Serum außer den glandulären Zellen auch Fasern im neurosekretorischen Teil der Drüse markiert (Eckert *et al.* 1996). Durch Präabsorption des Antiserums mit verschiedenen -X-X-Wa-Peptiden konnte gezeigt werden, daß die Immunmarkierungen im Gehirn und im neurohämalen Speicher der Corpora cardiaca nicht auf Pea-CAH-I oder -II, sondern höchstwahrscheinlich auf die Kreuzreaktivität von Antigenen mit einem C-terminalen Tryptophanamidrest zurückzuführen sind. Dieses Ergebnis steht nicht nur in Einklang mit den Arbeiten von Eckert (1977) und Schooneveld *et al.* (1986), die zeigten, daß glanduläre Antigene aus den Corpora cardiaca nicht im Gehirn vorkommen, sondern wird auch durch Immunfärbungen mit drei polyklonalen Antiseren gegen Lia-AKH (-Pro-Ser-Trpa) (Prof. G. Gäde, Kapstadt, RSA), das Tetrapeptid APGWa (Dr. J. van Minnen, Amsterdam, NL) und Metamorphosin A (-Gly-Leu-Trpa) (Dr. T. Leitz, Heidelberg, BRD) bekräftigt (Dr. M. Eckert, persönliche Mitteilung). Während sich die glandulären Zellen nur mit dem Anti-Pea-CAH-I-Serum anfärbten, stimmten im Gehirn und im neurosekretorischen Speicher der Corpora cardiaca die Anti-Pea-CAH-I-Markierungen mit der Anti-Lia-AKH-like und der Anti-Metamorphosin-like Immunreaktivität überein bzw. mit der Anti-APGWa-ähnlichen Immunreaktivität weitestgehend überein. Die Anti-APGWa-/Anti-Pea-CAH-I-Doppelmarkierung zeigte gleichzeitig, daß im Gehirn wahrscheinlich mehrere Pea-CAH-I-ähnliche Substanzen vorkommen, da einige wenige Neurone nur durch das Anti-Pea-CAH-I-Serum angefärbt wurden.

Auch Siegert und Mordue (1992) lokalisierten Pea-CAH-I und -II nach mechanischer Trennung von glandulärem und aglandulärem Teil der Corpora cardiaca ausschließlich im glandulären Abschnitt der Drüse. Sie bestimmten mittels HPLC 105 pmol Pea-CAH-I und 27 pmol Pea-CAH-II bei weiblichen sowie 72 pmol Pea-CAH-I und 15 pmol Pea-CAH-II bei männlichen Tieren. Unter der Berücksichtigung, daß durch die Kreuzreaktivität des Antiserums nicht nur Pea-CAH-I und -II bestimmt wurden, stehen die mit 165 pmol und 144 pmol gemessenen Werte für den Gehalt an Pea-CAH-I-ähnlicher Immunreaktivität pro Retrocerebralkomplex damit in gutem Einklang. Etwas tiefer, aber in derselben Größenordnung liegen mit 46 pmol Pea-CAH-I und 15 pmol Pea-CAH-II auch die Angaben von O'Shea *et al.* (1984). Ausgehend von den Ergebnissen der Präabsorptionen wurden bei der Messung der Pea-CAH-I-like Immunreaktivität im Gehirn (1,37 pmol bei Weibchen bzw. 1,34 pmol bei Männchen) wahrscheinlich nur kreuzreagierende Antigene erfaßt. Im Gegensatz zu diesen Ergebnissen, die darauf hindeuten, daß Pea-CAH-I oder -II nicht im Gehirn vorkommen, ermittelten O'Shea *et al.* (1984) durch Retentionszeitvergleich mit den isolierten nativen Peptiden in der HPLC 0,9 pmol Pea-CAH-I und 0,01 pmol Pea-CAH-II in diesem Organ. Aufgrund der

riesigen Mengen von Pea-CAH-I und -II in den Corpora cardiaca besteht jedoch immer die Möglichkeit, daß Spuren dieser Peptide bei der Präparation auf die Gehirne übertragen werden. In der vorliegenden Arbeit wurde versucht, dieses Problem durch die Verwendung von separaten Präparationsbestecken für die Entnahme von Gehirn und Retrocerebralkomplex sowie durch die Präparation ohne Ringerlösung zu umgehen. O'Shea *et al.* (1984) wiesen mit dem oben genannten Verfahren Pea-CAH-I auch im Bauchmark (0,3 pmol) und im Vorderdarm (0,2 pmol) von *Periplaneta americana* nach. Mit dem kompetitiven Enzymimmunoassay wurden bei der Amerikanischen Schabe im Unterschlundganglion 0,09 pmol, in den Thorakalganglien 0,26 pmol, in den Abdominalganglien 0,314 pmol sowie im abdominalen Teil des Herzens mit den anhaftenden lateralen Herznerven 0,037 pmol Pea-CAH-I-like Immunreaktivität gemessen. Immunmarkierungen mit dem Anti-Pea-CAH-I-Serum hatten Interneurone sowie möglicherweise interganglionär projizierende Neurone in den Thorakalganglien (Balsam 1993), immunreaktive Fasern in den Segmental- und Lateralnerven des Herzens (Dr. M. Eckert, unveröffentlicht) sowie ein charakteristisches Neuronenmuster in den freien Abdominalganglien (Eckert *et al.* 1997) und Fasern mit Pea-CAH-I-like Immunreaktivität, die die Abdominalganglien über die Segmentalnerven und den Mediannerv verlassen und intersegmental verlaufende Fasern in den Konnektiven gezeigt (Dr. M. Eckert, unveröffentlicht). Die Pea-CAH-I-like-Immunmarkierung der Neurone in den Abdominalganglien (exemplarisch durchgeführt am 4. und 5. freien Abdominalganglion) konnte durch die Präabsorption des Antiserums mit Pea-MIP unterdrückt werden und wies damit darauf hin, daß in diesen Zellen kein Pea-CAH-I oder ein anderes Peptid mit dem C-Terminus -Pro-Asn/Asp-Trpa vorkommt. Die Immunmarkierung dieser Neurone mit einem Antiserum gegen APGWa (siehe oben) bekräftigt dieses Ergebnis (Dr. M. Eckert, persönliche Mitteilung).

Diesen Ergebnissen entsprechend wurden Pea-CAH-I und -II nur in Gewebeextrakten aus Retrocerebralkomplexen von *Periplaneta americana* gefunden. Aus zwei weiteren Fraktionen des RCK-Extraktes mit immunreaktivem Material wurden drei unbekannte Peptide isoliert. Ausgehend von der Spezifität des Antiserums ist anzunehmen, daß sie mindestens einen C-terminalen Tryptophanamidrest besitzen. Die Absorptionsspektren der isolierten Peptide in der HPLC sprechen ebenfalls für das Vorhandensein von Tryptophan. Im Massenspektrum zeigten sich diese Peptide jeweils als Peaks mit einer Massendifferenz von 16 Da. Diese Massendifferenz ist typisch für AKH/RPCH-Peptide, die in der MALDI-TOF Na⁺- und K⁺-Addukte bilden. Die Massenzahlen (845,212 Da und 861,164 Da; 877,189 Da und 893,187 Da sowie 893,095 Da und 909,148 Da) lassen sich weder bekannten AKH/RPCH-Peptiden noch Bruchstücken von Pea-CAH-I/-II zuordnen. Die Massen der isolierten Peptide sind geringer als die der bekannten AKH/RPCH-Oktapeptide, die ca. bei 1000 Da liegen. Wei-

tere Informationen über diese Peptide liegen zum gegenwärtigen Zeitpunkt noch nicht vor, da Sequenzierung und physiologische Charakterisierung Folgearbeiten vorbehalten bleiben müssen. Für die Möglichkeit, daß bei *Periplaneta americana* noch weitere AKH/RPCH-Peptide vorkommen, sprechen auch Immunmarkierungen im neurosekretorischen Teil der Corpora cardiaca und im Gehirn mit einem Anti-Lom-AKH-I-Serum, das auch spezifisch für den mittleren Molekülteil von Lom-AKH-I ist (Schooneveld *et al.* 1985, 1986). Bei den Heuschrecken *Locusta migratoria* und *Schistocerca gregaria* wurde ein AKH/RPCH-Peptid isoliert, das den Energiestoffwechsel der Wanderheuschrecke nicht beeinflußt. Das vorläufig als Lom-HrTH bezeichnete Peptid ist das erste Mitglied dieser Familie, das im Gehirn synthetisiert und im neurohämalen Teil der Corpora cardiaca gespeichert wird (Siegert 1999).

Schooneveld *et al.* (1985, 1987) und Clottens *et al.* (1989) hatten durch die Verwendung von C- oder N-Terminus-spezifischen Antiseren bzw. durch die Präabsorption der Antiseren gezeigt, daß bei insgesamt mehr als 20 Insektenarten aus neun verschiedenen Ordnungen im Nervensystem keine glandulären AKH/RPCH-Peptide gefärbt werden. Durch die Präinkubation des Anti-Pea-CAH-I-Serums mit -X-X-Wa- bzw. -P-X-Wa-Peptiden konnte dies auch bei weiteren Schabenarten (*Periplaneta brunnea*, *Blatta orientalis*, *Blattella germanica*, *Nauphoeta cinerea*) demonstriert werden. Gehirn und neurohämaler Drüsenteil der Corpora cardiaca wurden bei allen Arten durch das Antiserum markiert. Im Unterschied zur Immunfärbung der glandulären Zellen von *Periplaneta brunnea* und *Blatta orientalis* (Pea-CAH-I/-II) konnte in diesen Geweben die Pea-CAH-I-like Immunreaktivität durch die Präinkubation des Antiserums mit -P-X-Wa- oder -X-X-Wa-Peptiden unterdrückt werden. Bei *Blattella germanica* und *Nauphoeta cinerea* blieben die glandulären Zellen unmarkiert, da das Dekapeptid Bld-HrTH nicht kreuzreaktiv ist. Es wurde außerdem deutlich, daß *Periplaneta brunnea*, deren AKH/RPCH-Peptide noch nicht sequenziert wurden, glanduläre Peptide mit dem C-Terminus -Pro-Asn/Asp-Trpa produziert, möglicherweise bedingt durch die enge Verwandtschaft mit *Periplaneta americana* sogar Pea-CAH-I und -II. Bei *Nauphoeta cinerea* wurde die Pea-CAH-I-like Immunreaktivität mit dem kompetitiven Enzymimmunoassay gemessen. Im Gehirn wurden 0,338 pmol Pea-CAH-I-like Immunreaktivität und im Retrocerebralkomplex nur etwa ein Sechstel davon, das heißt 0,054 pmol, bestimmt. Das Verteilungsmuster der Pea-CAH-I-like Immunreaktivität in diesen Organen ist völlig anders als bei *Periplaneta americana*, bei der in den Corpora cardiaca die glandulären Peptide gemessen wurden.

Im 5. freien Abdominalganglion von *Periplaneta americana* sowie im Gehirn und im Retrocerebralkomplex von *Nauphoeta cinerea* wurde das Nonapeptid Pea-MIP (*Periplaneta americana-myoinhibitory peptide*) nachgewiesen. Obwohl das Peptid in Fraktionen mit geringer Immunreaktivität enthalten war, konnte es anhand der Überein-

stimmung von Retentionszeit und Massenzahl mit synthetischem Pea-MIP eindeutig identifiziert werden. Pea-MIP ist kein AKH/RPCH-Peptid, sondern gehört zu den sogenannten W^2W^9 -Peptiden. Die Kreuzreaktivität von Pea-MIP mit dem Anti-Pea-CAH-I-Serum wird durch den C-terminalen Tryptophanamidrest verursacht, der neben einem Tryptophanrest in der zweiten Position ein familientypisches Merkmal der W^2W^9 -Peptide darstellt. Sowohl bei *Periplaneta americana* als auch bei *Nauphoeta cinerea* hatten bereits immunocytochemische Untersuchungen gezeigt, daß in diesen Geweben Antigene mit einem C-terminalen Tryptophanamidrest markiert werden. Bei *Periplaneta americana* bekräftigte die Immunmarkierung mit einem Anti-Pea-MIP-Serum, das nicht mit Pea-CAH-I/-II kreuzreagiert (Predel *et al.* 2001), die Vermutung, daß die Neurone in den Abdominalganglien mit Pea-CAH-I-like Immunreaktivität wahrscheinlich Pea-MIP enthalten. Da in diesem Ganglion kein Pea-CAH-I vorkommt, müßten auch die Untersuchungen zur Beeinflussung der Spikeaktivität von DUM-Neuronen im 5. freien Abdominalganglion von *Periplaneta americana* durch Pea-CAH-I neu hinterfragt werden (Heine und Wicher 1998, Wicher 2000). Pea-CAH-I täuscht hier offensichtlich die Wirkung eines anderen Peptids, möglicherweise von Pea-MIP vor. Ursache hierfür könnte der gemeinsame C-terminale Tryptophanamidrest sein. Auch Lorenz *et al.* (1999a) gehen davon aus, daß die beiden Tryptophan(amid)reste großen Einfluß auf die biologische Aktivität besitzen, da sie Merkmal aller W^2W^9 -Peptide sind und konservierte Molekülabschnitte im allgemeinen als potentielle Bindungsorte für den Rezeptorkontakt betrachtet werden.

Bei *Periplaneta americana* wurde Pea-MIP zuerst in den Corpora cardiaca und dann auch im Gehirn und in den abdominalen perisymphatischen Organen identifiziert (Predel *et al.* 2001). Vorkommen und Verteilung der Pea-MIP-like Immunreaktivität, die auch im stomatogastrischen Nervensystem gefunden wurde, deuten darauf hin, daß Pea-MIP zur Regulation visceraler Muskeln (Antennenherz, Vorderdarm, Enddarm) beiträgt (Predel *et al.* 2001). Vergleichbare Untersuchungen wurden bei *Nauphoeta cinerea* noch nicht durchgeführt. Pea-MIP ist jedoch das erste W^2W^9 -Peptid, das bei zwei Arten nachgewiesen wurde.

Außer bei Schaben wurden W^2W^9 -Peptide bisher im Bauchmark von *Manduca sexta* (Blackburn *et al.* 1995) und im Gehirn von verschiedenen Orthopteren (*Locusta migratoria* (Schoofs *et al.* 1991), *Gryllus bimaculatus* (Lorenz *et al.* 1995, 1999) und *Carausius morosus* (Lorenz *et al.* 2000)) gefunden. Bei Grillen übernehmen sie wahrscheinlich Funktionen bei Wachstum, Entwicklung und Reproduktion, denn sie hemmen die Juvenilhormonsynthese (Lorenz *et al.* 1995, 1999a) und die Ecdysteroidsynthese in den Ovarien (Lorenz *et al.* 1997) *in vitro* und beeinflussen auch die Juvenilhormon-, Ecdysteroid- und Vitellogenintiter im Blut *in vivo* (Lorenz *et al.* 1998). Beim Tabakschwärmer und bei der Wanderheuschrecke wirken W^2W^9 -Peptide, ähnlich wie bei den

Schaben, als myoinhibitorische Peptide auf verschiedene viscerale Muskeln (Verdauungstrakt, Ovidukt) (Blackburn *et al.* 1995, Schoofs *et al.* 1991). Schoofs *et al.* (1996) sehen Lom-MIP auch in der Rolle eines potentiellen Inhibitors für die AKH-Freisetzung, da sich in den Corpora cardiaca der Wanderheuschrecke Nervenendigungen mit Lom-MIP-ähnlicher Immunreaktivität in enger Nachbarschaft zu den glandulären Zellen befinden. Mit dem Anti-Pea-CAH-I-Serum könnten auch bei *Schistocerca gregaria*, deren W²W⁹-Peptide noch nicht untersucht wurden, im Zentralkörper des Gehirns W²W⁹-Peptid(e) markiert worden sein. Durch Antiseren gegen arteigene W²W⁹-Peptide wurde sowohl der Zentralkörper im Gehirn von *Gryllus bimaculatus* (Witek *et al.* 1999) als auch bei *Locusta migratoria* (Schoofs *et al.* (1996) angefärbt. Die Lom-MIP-like Immunfärbung des Zentralkörpers bei der Wanderheuschrecke ist der Pea-CAH-I-like Immunmarkierung bei *Schistocerca gregaria* sehr ähnlich.

Charakteristisch für die Pea-CAH-I-like Immunreaktivität ist ihre breite Verteilung in allen fraktionierten Gewebeextrakten. Während die drei kreuzreaktiven Peptide aus dem Retrocerebralkomplex von *Periplaneta americana* aus Fraktionen mit sehr starker Immunreaktivität isoliert wurden, gehörten die Fraktionen, in denen Pea-MIP enthalten war, zu den schwach immunreaktiven. Die Identifizierung von Pea-MIP in den Gewebeextrakten wurde in erster Linie durch den Einsatz von HPLC und MALDI-TOF-Massenspektrometrie ermöglicht. Neben der Kreuzreaktivität im kompetitiven Anti-Pea-CAH-I-Enzymimmunoassay war die Spektrenanalyse, die auf das Vorhandensein von Pea-MIP hinwies, Auslöser für die weitere Bearbeitung dieser Fraktionen. Pea-MIP wurde weitestgehend durch den Vergleich mit der Retentionszeit und dem Absorptionsspektrum von synthetischem Pea-MIP isoliert, da die Isolation allein anhand der Kreuzreaktivität mit dem Anti-Pea-CAH-I-Serum über die verschiedenen Trennschritte das Material für die weitere Peptidcharakterisierung verbraucht hätte.

Obwohl die immuncytochemischen Untersuchungen eindeutig gezeigt haben, daß -X-X-Wa-Peptide im Gewebe markiert werden und ihre Kreuzreaktivität mit dem Anti-Pea-CAH-I-Serum durch die Verwendung synthetischer Peptide im kompetitiven Enzymimmunoassay gemessen und auch deutlich gegen nichtkreuzreaktive Peptide abgegrenzt werden konnte (Ermittlung von *KRV*), macht die Identifizierung von Pea-MIP deutlich, daß das Anti-Pea-CAH-I-Serum zur Isolierung kreuzreagierender Antigene nur bedingt geeignet ist. Die Kreuzreaktivität des Antiserums mit dem Tryptophanamidrest ist offensichtlich zu gering, um -X-X-Wa-Peptide bei geringerem Substanzgehalt in Gewebeextrakten eindeutig zu erkennen und ausschließlich anhand ihrer Kreuzreaktivität zu isolieren. Das Problem entsteht hierbei offensichtlich aus den unterschiedlichen Testbedingungen, die bei den verschiedenen Methoden gelten. In der Immuncytochemie markiert das Antiserum Peptide mit einem C-terminalen Tryptophanamidrest, da das Antiserum in einer relativ hohen Konzentration eingesetzt wird. Im kompetitiven

Enzymimmunoassay ist die Antiserumkonzentration wesentlich geringer, wurde aber bei der Untersuchung der Antiserumspezifität durch die hohen Stoffmengen der synthetischen Peptide ausgeglichen.

Welche Antigene die Pea-CAH-I-like Immunreaktivität in den schwach immunreaktiven Fraktionen verursachten, ist nicht bekannt. Wie bereits anhand der Isolation von Pea-MIP diskutiert, ist die weitere Untersuchung dieser Fraktionen mit dem kompetitiven Anti-Pea-CAH-I-Enzymimmunoassay nicht sinnvoll.

Antiseren, die eine familienspezifische Aminosäuresequenz erkennen, wurden bereits erfolgreich zur Suche nach weiteren Familienmitgliedern eingesetzt (z. B. Isolation von 16 neuen Allatostatinen aus zwei Lepidopterenarten, Duve *et al.* (1997)). Für die Suche nach Pea-CAH-I-ähnlichen Peptiden im Nervensystem von *Periplaneta americana* oder anderen Schaben müßte jedoch ein neues Antiserum hergestellt werden. Erfolgversprechender wäre dabei die Herstellung eines Antiserums, das spezifisch für den N-Terminus von Pea-CAH-I bzw. eines Analogons ist, das keinen Pyroglutamarest besitzt (des-pGlu¹-Pea-CAH-I oder X¹-Pea-CAH-I). So könnte die Bildung von Antikörpern gegen den Pyroglutamarest, der bei Peptiden aus verschiedenen Familien vorkommt, vermieden werden. Im Unterschied zu der in dieser Arbeit eingesetzten Prozedur der Gewebeaufarbeitung, HPLC-Fraktionierung und Isolierung immunreaktiven Materials über weitere Trennschritte könnte die verstärkte Nutzung massenspektrometrischer Verfahren den Zeit- und Arbeitsaufwand entscheidend reduzieren (Überblick bei Verhaert und De Loof 1998). ESI- und MALDI-TOF lassen die direkte massenspektrometrische Untersuchung von Geweben nahezu ohne weitere Manipulationen zu. Peptide konnten so in einzelnen Riesenneuronen der Schnecke *Lymnea stagnalis* (van Veelen *et al.* 1993) oder aus den Neurohämälorganen verschiedener Insekten (Corpora cardiaca (Verhaert *et al.* 1997), Perisymphatische Organe (Predel 1998a)) direkt bestimmt werden. Durch ESI-TOF und durch die Ergänzung der MALDI-TOF mit chemischen, enzymatischen oder physikalischen Fragmentationsmethoden ist nicht nur die exakte Bestimmung der Massen, sondern auch die Sequenzierung der Peptide möglich. Die erste *de novo*-Sequenzierung eines Peptids durch *direct tissue*-MALDI- und -ESI-TOF ist die Identifizierung eines Undekapeptids aus den Corpora cardiaca des Schmetterlings *Vanessa cardui* (Koellisch *et al.* 1999b). Das Peptid stellt offensichtlich ein Zwischenprodukt aus der Biosynthese von Mas-AKH dar, das ebenfalls in den Corpora cardiaca dieser Art nachgewiesen wurde (Köllisch *et al.* 1999a). Der Nachweis von Peptiden direkt aus einem immunocytochemisch charakterisierten Gewebe heraus, stellt deshalb eine ausgezeichnete Alternative zu dem in dieser Arbeit verwendeten Verfahren dar.

15 Zusammenfassung

Die Neuropeptide bilden die vielfältigste Klasse unter den Neuromediatoren. Bei Insekten sind mittlerweile mehr als 240 Neuropeptide bekannt (Zusammenfassungen bei Gäde 1997 und Gäde *et al.* 1997b), dabei wurden allein bei Heuschrecken mehr als 40 (Schoofs *et al.* 1997) und bei der Amerikanischen Schabe mehr als 20 Neuropeptide (Predel 1998) sequenziert. Die topochemische Lokalisation der Neuropeptide ist eine Grundvoraussetzung für das Verständnis ihrer Funktion. Die Neuropeptide der Insekten lassen sich nach ihrer Primärstruktur in mehr als 20 Peptidfamilien einordnen (Nässel 1993). Eine der größten Peptidfamilien stellt dabei die *adipokinetic hormone/red pigment-concentrating hormone*-Familie oder kurz AKH/RPCH-Familie dar.

Die AKH/RPCH-Peptide der Insekten wurden bisher fast ausnahmslos direkt aus den Corpora cardiaca isoliert. Die glandulären Zellen der Corpora cardiaca gelten deshalb als Syntheseort für die Peptide der AKH/RPCH-Familie. Immunocytochemische Untersuchungen zeigten AKH-ähnliche Immunreaktivität außer in den glandulären Zellen auch im Nervensystem zahlreicher Insektenarten. Die Untersuchungen demonstrieren jedoch auch, daß sich die im Nervensystem markierten Antigene von den glandulären Peptiden unterscheiden (Schooneveld *et al.* 1985, 1987).

Bei *Periplaneta americana* wurden in den Corpora cardiaca zwei Peptide der AKH/RPCH-Familie gefunden, Pea-CAH-I (Neurohormon D, Myotropin I) und Pea-CAH-II. Ein polyklonales Antiserum gegen Pea-CAH-I färbte neben den glandulären Zellen ebenfalls Neurone und Fasern im Nervensystem der Amerikanischen Schabe. Immunmarkierungen im Nervensystem von Insekten, die kein Pea-CAH-I/-II in den Corpora cardiaca synthetisieren, bekräftigten die Vermutung, daß das Antiserum möglicherweise mit Pea-CAH-I-ähnlichen Peptiden aus dem Nervensystem kreuzreagiert.

In der vorliegenden Arbeit sollte deshalb die Kreuzreaktivität des Anti-Pea-CAH-I-Serums zur Charakterisierung der Pea-CAH-I-like Immunreaktivität und zur Isolierung Pea-CAH-I-ähnlicher Peptide aus dem Nervensystem eingesetzt werden. Diese Zielstellung erforderte jedoch zunächst die genaue Bestimmung der Antiserumspezifität.

Die Ergebnisse der Untersuchungen können wie folgt zusammengefaßt werden:

1. Die Pea-CAH-I-like Immunreaktivität im Nervensystem von *Periplaneta americana* wird offensichtlich durch Antigene mit einem C-terminalen Tryptophanamidrest und nicht durch Pea-CAH-I/-II verursacht. Die Immunfärbung im Gehirn, im neurohämalen Teil der Corpora cardiaca und im Bauchmark konnte durch die Präinkubation des Antiserums mit verschiedenen Peptiden mit einem Tryptophanamidrest am C-Terminus (-X-X-Wa-Peptide) unterdrückt werden. Die Immunmarkierung von Pea-CAH-I und -II in den glandulären Zellen der Corpora cardiaca wurde im Unterschied dazu durch diese Präabsorptionen des Antiserums

kaum beeinflusst. Entsprechende Untersuchungen bei *Periplaneta brunnea*, *Blatta orientalis*, *Blattella germanica* und *Nauphoeta cinerea* zeigten ebenfalls, daß im Gehirn dieser Schabenarten Antigene mit einem Tryptophanamidrest durch das Anti-Pea-CAH-I-Serum angefärbt werden. Die Flüssigphasepräabsorptionen des Anti-Pea-CAH-I-Serums mit -X-X-Wa-Peptiden erwiesen sich als einfache Methode zur Differenzierung der Pea-CAH-I-like Immunreaktivität.

2. Durch die Verwendung des Antiserums in einem kompetitiven Anti-Pea-CAH-I-Enzymimmunoassay sowie durch HPLC und MALDI-TOF Massenspektrometrie konnte gezeigt werden, daß neben Pea-CAH-I und -II noch weitere Peptide mit dem Antiserum kreuzreagieren.
 - (a) Aus einem RCK-Extrakt von *Periplaneta americana* wurden drei kreuzreaktive Peptide isoliert. Der Spezifität des Anti-Pea-CAH-I-Serums entsprechend (siehe unten) besitzen sie einen C-terminalen Tryptophanamidrest. Auch die Absorptionsspektren der isolierten Peptide sprechen für das Vorhandensein von Tryptophan. Im Massenspektrum stellten sich diese Peptide jeweils als zwei Peaks mit einer Massendifferenz von 16 Da dar. Diese Massendifferenz ist typisch für AKH/RPCH-Peptide, die in der MALDI-TOF Na^+ - und K^+ -Addukte bilden. Die Massenzahlen der isolierten Peptide lassen sich keinen bekannten Peptiden zuordnen. Die Peptidmassen sind kleiner als die der bekannten AKH/RPCH-Oktapeptide und entsprechen auch nicht den Massen von Pea-CAH-I/-II-Fragmenten.
 - (b) Das Nonapeptid Pea-MIP wurde anhand der Übereinstimmung der Retentionszeit und Massenzahl mit synthetischem Pea-MIP im 5. freien Abdominalganglion von *Periplaneta americana* sowie im Gehirn und Retrocerebralkomplex von *Nauphoeta cinerea* nachgewiesen. Pea-MIP ist kein Mitglied der AKH/RPCH-Familie, sondern gehört zu den W^2W^9 -Peptiden. Die Kreuzreaktivität von Pea-MIP mit dem Anti-Pea-CAH-I-Serum beruht auf dem Tryptophanamidrest am C-Terminus des Peptids. Wie Immunmarkierungen mit einem Anti-Pea-MIP-Serum zeigten (Predel *et al.* 2001), ist Pea-MIP in den Neuronen der Abdominalganglien enthalten, die auch durch das Anti-Pea-CAH-I-Serum markiert wurden (Eckert *et al.* 1997). Pea-MIP ist bisher das einzige W^2W^9 -Peptid, das bei verschiedenen Arten nachgewiesen wurde.
3. Die Spezifität des Antiserums war durch die Bestimmung der Kreuzreaktivität verschiedener heterologer Antigene in kompetitiven und nichtkompetitiven Anti-Pea-CAH-I-Enzymimmunoassays sowie durch Flüssigphasepräabsorptionen und Immunmarkierungen untersucht worden. Die Spezifität des Antiserums wird wie folgt beschrieben:

-
- (a) Das Anti-Pea-CAH-I-Serum ist nicht substanzspezifisch für Pea-CAH-I (pQ¹-V²-N³-F⁴-S⁵-P⁶-N⁷-Wa⁸), da die Antikörper gegen das C-terminale Tripeptid von Pea-CAH-I gerichtet sind, das auch typisch für eine Reihe anderer AKH/RPCH-Oktapeptide (-P-N-Wa-Peptide) ist. Das Antiserum bindet außerdem mit abnehmender Kreuzreaktivität auch -P-X-Wa- und -X-X-Wa-Peptide. Der Austausch der Aminosäurereste in den Positionen 6 und 7 wird durch das Anti-Pea-CAH-I-Serum toleriert. Eine Ausnahme bilden -P-D-Wa-Peptide, die genauso gut erkannt werden wie -P-N-Wa-Peptide. Asparaginsäure und Asparagin werden in der vorletzten Position durch das Antiserum nicht unterschieden. Dagegen führt die C-terminale Verlängerung der Peptide und die damit verbundene Umwandlung von Tryptophanamid in Tryptophan zum Verlust der Kreuzreaktivität. Der Tryptophanamidrest am C-Terminus ist damit die minimale Voraussetzung für die Kreuzreaktivität mit dem Anti-Pea-CAH-I-Serum.
- (b) Die Kreuzreaktivität des Anti-Pea-CAH-I-Serums mit den Peptiden kann sich durch die Immobilisierung der Peptide verändern, da Länge und Struktur des N-Terminus die Immobilisierung beeinflussen. Peptide mit fünf und weniger Aminosäuren wurden im nichtcompetitiven Anti-Pea-CAH-I-Enzymimmunoassay fast ausnahmslos schlechter erkannt als C-terminal vergleichbare längere Peptide. Peptide mit einem N-terminalen Pyroglutamarest werden schlechter immobilisiert als Peptide mit freiem Amino-Terminus. Von den am schwächsten kreuzreaktiven -X-X-Wa-Peptiden wurden nur -X-X-Wa-Peptide ohne N-terminalen Pyroglutamarest im nichtcompetitiven Anti-Pea-CAH-I-Enzymimmunoassay eindeutig detektiert.
- (c) Anhand der Kreuzreaktivität von -P-N/D-Wa- und -P-X-Wa-Peptiden mit einem N-terminalen Pyroglutamarest konnte im nichtcompetitiven Enzymimmunoassay demonstriert werden, daß sich Peptide mit geblocktem N-Terminus und ohne weitere freie Aminogruppen an einer mit Glutaraldehyd aktivierten Poly-L-Lysin-Schicht immobilisieren lassen. Die Immobilisierung der Peptide war weitestgehend unabhängig von Glutaraldehyd. Dies wurde auch für Peptide mit freiem N-Terminus festgestellt. Möglicherweise können so auch Peptide ohne freie Aminogruppen bei einer Glutaraldehydfixierung im Gewebe fixiert werden. Das gilt jedoch nicht für N-terminal geblockte -X-X-Wa-Peptide.
- (d) Durch Flüssigphasepräabsorptionen des Anti-Pea-CAH-I-Serums mit -X-X-Wa-Peptiden konnte gezeigt werden, daß das Antiserum trotz der geringen Kreuzreaktivität bei einer Immunmarkierung im Gewebe Antigene mit einem C-terminalen Tryptophanamidrest markiert. Die glandulären Zellen von

Schistocerca gregaria und *Gryllus bimaculatus* wurden vermutlich nicht markiert, weil deren glanduläre -X-X-Wa-Peptide durch den N-terminalen Pyroglutamatrest nicht ausreichend fixiert wurden.

4. Der Gehalt an Pea-CAH-I-like Immunreaktivität im Retrocerebralkomplex und verschiedenen Abschnitten des Nervensystems von *Periplaneta americana* wurde gemessen. Zur Einordnung der Meßergebnisse konnten nur Literaturangaben zum Gehalt an Pea-CAH-I/-II in den Corpora cardiaca von *Periplaneta americana* verwendet werden. Wird die Immunreaktivität weiterer kreuzreagierender Verbindungen einbezogen, stehen die hier ermittelten Werte für den Gehalt an Pea-CAH-I-like Immunreaktivität im Retrocerebralkomplex der Amerikanischen Schabe in gutem Einklang mit diesen Daten. Die quantitative Verteilung der Pea-CAH-I-like Immunreaktivität in Gehirn und Retrocerebralkomplex von *Nauphoeta cinerea* unterscheidet sich deutlich von der Verteilung bei *Periplaneta americana*, bei der die glandulären Peptide gemessen wurden.
5. Anhand der Spezifität des Anti-Pea-CAH-I-Serums wurde deutlich, welche Bedeutung die Charakterisierung der Antiserumspezifität für die Interpretation immunocytochemischer Daten besitzt. Die Untersuchungen bekräftigten außerdem, wie wichtig der Einsatz verschiedener, sich ergänzender Methoden ist, da die Kreuzreaktivität des Antiserums auch von den Testbedingungen der Methoden beeinflußt wurde. Dies wurde nicht nur bei der Charakterisierung des Anti-Pea-CAH-I-Serums klar, sondern zeigte sich auch bei der Verwendung des kompetitiven Anti-Pea-CAH-I-Enzymimmunoassays zum Screening der Immunreaktivität in fraktionierten Gewebeextrakten. Trotz einer hinreichend hohen Empfindlichkeit des Enzymimmunoassays für Pea-CAH-I (0,1 pmol) reichte die Kreuzreaktivität des Anti-Pea-CAH-I-Serums für den C-terminalen Tryptophanamidrest nicht aus, um das -X-X-Wa-Peptid Pea-MIP in Gewebeextrakten eindeutig zu erkennen. Das Anti-Pea-CAH-I-Serum ist deshalb nur bedingt zur Isolierung kreuzreaktiver Peptide geeignet. Durch den Einsatz von HPLC und MALDI konnte dieses Problem gelöst werden. Eine Alternative zu dem hier verwendeten Isolierungsverfahren könnte beispielsweise die Untersuchung immunocytochemisch charakterisierter Gewebe oder Zellen durch die *direct-tissue*-MALDI-TOF-Massenspektrometrie darstellen.

Quellenverzeichnis

- [1] Adams, ME, Ray, MF, Ho, RK, Kramer, SJ, Marbach, P: Immunohistochemical localisation and physiological actions of two related insect neuropeptides (CC I and CC II). *Soc. Neurosci. Abstr.* **11** (1985), 942
- [2] Adams, ME: Peptides as chemical signals: hormones to transmitters. *in: Cockroaches as models for neurobiology: applications in biochemical research*, eds. Huber, I, Masler, EP, Rao, BR, CRC Press, Inc. Boca Raton, Florida 1990, 3–33
- [3] Ali, I, Steele, JE: Evidence that free fatty acids in trophocytes of *Periplaneta americana* fat body may be regulated by the activity of phospholipase A₂ and cyclooxygenase. *Insect Biochem. Mol. Biol.* **27** (1997), 681–692
- [4] Allgemeines über die Anlagerung an Polystyrol. *Nunc Bulletin* Nr. **6**, 1988
- [5] Ball, JM, Henry, NL, Montelaro, RC, Newman, MJ: A versatile synthetic peptide-based ELISA for identifying antibody epitopes. *J. Immunol. Meth.* **171** (1994), 37–44
- [6] Baumann, E, Penzlin, H: Sequence analysis of neurohormone D, a neuropeptide of an insect, *Periplaneta americana*. *Biomed. Biochim. Acta* **43**, K13–K16
- [7] Baumann, E, Gersch, M, Penzlin, H: The occurrence of neurohormone D, in the nervous system of several arthropods. *Zool. Jb. Physiol.* **88** (1984a), 213–223
- [8] Blackburn, MB, Wagner, RM, Kochansky, JP, Harrison, DJ, Thomas-Laemont, P, Raina, AK: The identification of two myoinhibitory peptides, with sequence similarities to the galanins, isolated from the ventral nerve cord of *Manduca sexta*. *Regul. Peptides* **57** (1995), 213–219
- [9] Boer, HH, Schott, LPC, Veenstra, JA, Reichelt, D: Immunocytochemical identification of neural elements in the central nervous system of a snail, some insects, a fish, and a mammal with an antiserum to the molluscan cardio-excitatory tetrapeptide FMRF-amide. *Cell Tiss. Res.* **213** (1980), 21–27
- [10] Bogerd, J, Kooiman, FP, Pijnnenburg, MAP, Hekking, LHP, Oudejans, RCHM, van der Horst, DJ: Molecular cloning of three distinct cDNAs, each encoding a different adipokinetic hormone precursor, of the migratory locust, *Locusta migratoria*. Differential expression of the distinct adipokinetic hormone precursor genes during flight activity. *J. Biol. Chem.* **270** (1995), 23038–23043
- [11] Boureme, D, Tamarelle, M, Girardie, J: Production and characterization of antibodies to neuroparsins A and B isolated from the corpora cardiaca of the locust. *Gen. Comp. Endocrinol.* **76** (1987), 169–177

- [12] Bradbury, AF, Finnie, MDA, Smyth, DG: Mechanisms for C-terminal amide formation by pituitary enzymes. *Nature* **298** (1982), 686–688
- [13] Bradfield, JY, Keeley, LL: Adipokinetic hormone gene sequence from *Manduca sexta*. *J. Biol. Chem.* **264** (1989), 12791–12793
- [14] Burt, SM, Carter, TJN, Kricka, LJ: Thermal characteristics of microtiter plates used in immunological assays. *J. Immunol. Meth.* **31** (1979), 231–236
- [15] Clottens, F, Gäde, G, Huybrechts, R, De Loof, A: Immunohistochemical localization of the hypertrehalosaemic hormone II (Cam-HrTH-II) and related peptides in the nervous system of *Carausius morosus* and *Sarcophaga bullata*. *Cell Tiss. Res.* **258** (1989), 631–638
- [16] Diederer, JHB, Maas, HA, Pel, HJ, Schooneveld, H, Jansen, WF, Vullings, HGB: Co-localization of the adipokinetic hormones I and II in the same glandular cells and in the same secretory granules of corpus cardiacum of *Locusta migratoria* and *Schistocerca gregaria*. An immuno-electron-microscopic study. *Cell Tiss. Res.* **249** (1987), 379–389
- [17] Duve, H, Johnsen, AH, Maestro, JL, Scott, AG, Winstanley, D, Davey, M, East, PD, Thorpe A: Lepidopteran peptides of the allatostatin superfamily. *Peptides* **18** (1997), 1301–1309
- [18] Eckert, M: Immunologische Untersuchungen des neuroendokrinen Systems von Insekten. IV. Differenzierte immunhistochemische Darstellung von Neurosekreten des Gehirns und der Corpora cardiaca bei der Schabe *Periplaneta americana*. *Zool. Jb. Physiol.* **81** (1977), 25–41
- [19] Eckert, M, Gabriel, J, Birkenbeil, H, Greiner, G, Rapus, J, Gäde, G: A comparative study using an antiserum against a synthetic analogue of the corpora cardiaca peptide Pea-CAH-I (MI, neurohormone D) of *Periplaneta americana*. *Cell Tiss. Res.* **284** (1996), 401–413
- [20] Eckert, E, Härtig, W, Rapus, J: Colocalization of neurohormone D (Pea-CAH-I)-like immunoreactivity with taurine in the cockroach ventral nerve cord. *in: Proc. of the 25th Göttingen Neurobiology Conference 1997*, Vol. II, **778**, eds. Elsner, N, Wässle, H, G. Thieme Verlag Stuttgart 1997
- [21] Elia, AJ, Money, TGA, Orchard, I: Flight and running induce elevated levels of FMRFamide-related peptides in the haemolymph of the cockroach, *Periplaneta americana* (L.). *J. Insect Phys.* **41** (1995), 565–570

- [22] Fernlund, P, Josefsson, L: Crustacean color-change hormone: amino acid sequence and chemical synthesis. *Science* **177** (1972), 173–175
- [23] Fischer-Lougheed, J, O’Shea, M, Cornish, I, Losberger, C, Roulet, E, Schulz-Aellen, MF: AKH biosynthesis: transcriptional and translational control of two co-localized prohormones. *J. Experimental Biol.* **177** (1993), 223–241
- [24] Fujiwara, K, Kitagawa, T: A new enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) using glutaraldehyde coupling of the hapten to carrier-coated microtiter plates. *J. Biochem.* **114** (1993), 708–713
- [25] Gäde, G: Hypertrehalosaemic hormones and myoactive factors from cockroach corpus cardiacum are very likely identical. *Naturwissenschaften* **72** (1985), 95–97
- [26] Gäde, G: The adipokinetic hormone/red pigment-concentrating hormone peptide family: structures interrelationships and functions. *J. Insect Phys.* **36** (1990), 1–12
- [27] Gäde, G: A unique charged tyrosin-containing member of the adipokinetic hormone/red-pigment-concentrating hormone peptide family isolated and sequenced from two beetle species. *Biochem. J.* **275** (1991), 671–677
- [28] Gäde, G: Structure-activity relationships for the carbohydrate-mobilizing action further bioanalogues of the adipokinetic hormone/red pigment-concentrating hormone family of peptides. *J. Insect Physiol.* **38** (1992), 259–266
- [29] Gäde, G: Molecular evolution of peptides of the AKH/RPCH family. *in: Perspectives in comparative endocrinology*, eds. Davey, KG, Peter, RE, Tobe, SS, Natl. Res. Council of Canada, Ottawa 1994, 119–128
- [30] Gäde, G: Functional and evolutionary aspects of peptides of the AKH/RPCH family: the Odonata and Dictyoptera story. *in: Insects. Chemical, physiological and environmental aspects*, eds. Konopinska, D, Wroclaw University Press, Wroclaw 1995, 28–34
- [31] Gäde, G: The revolution in insect neuropeptides illustrated by the adipokinetic hormone/red pigment-concentrating hormone family of peptides. *Z. Naturforsch.* **51** (1996), 607–617
- [32] Gäde, G: The explosion of structural information on insect neuropeptides. *in: Progress in the chemistry of organic natural products* **71**, eds. Herz, W; Kirby, GW, Moore, RE, Steglich, W, Tamm, C. Springer Verlag Wien New York 1997, 1–128

- [33] Gäde, G: Hyperprolinaemia caused by novel members of the adipokinetic hormone/ red pigment-concentrating hormone family of peptides isolated from corpora cardiaca of onitine beetles. *Biochem. J.* **321** (1997a), 201–206
- [34] Gäde, G: Distinct sequences of AKH/RPCH family members in beetle *Scarabaeus*-species corpus cardiacum contain three aromatic amino acid residues. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **230** (1997b), 16–21
- [35] Gäde, G, Grandcolas, P, Kellner, R: Structural data on hypertrehalosaemic neuropeptides from *Cryptocercus punctulatus* and *Therea petiveriana*: how do they fit into the phylogeny of cockroaches? *Proc. R. Soc. Lond. B* **294** (1997), 763–768
- [36] Gäde, G, Hayes, TK: Structure-activity relationships for *Periplaneta americana* hypertrehalosemic hormone I: The importance of side chains and termini. *Peptides* **16** (1995), 1173–1180
- [37] Gäde, Hoffmann, KH, Spring, JH: Hormonal regulation in insects: Facts, gaps, and future directions. *Physiol. Reviews* **77** (1997b), 963–1032
- [38] Gäde, G, Janssens, MP-E: Cicadas contain novel members of the AKH/RPCH family peptides with hypertrehalosaemic activity. *Biol. Chem. Hoppe-Seyler* **375** (1994), 803–809
- [39] Gäde, G, Kellner, R: The metabolic neuropeptides of the corpus cardiacum from the potato beetle and the American cockroach are identical. *Peptides* **10** (1989), 1287–1289
- [40] Gäde, G, Kellner, R: Primary structures of the hypertrehalosemic peptides from corpora cardiaca of the primitive cockroach *Polyphaga aegyptiaca*. *Gen. Comp. Endocrinol.* **86** (1992), 119–127
- [41] Gäde, G, Kellner, R: Dragonfly *Erythemis simplicicollis* contains a novel adipokinetic neuropeptide. *Arch. Insect Biochem. Physiol.* **40** (1999), 99–106
- [42] Gäde, G, Kellner, R, Rinehart, KL, Proefke, ML: A tryptophan-substituted member of the AKH/RPCH family isolated from a stick insect corpus cardiacum. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **189** (1992), 1303–1309
- [43] Gäde, G, Rinehart, KLJr: Amino acid sequence of a hypertrehalosaemic neuropeptide from the corpus cardiacum of the cockroach, *Nauphoeta cinerea*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **141** (1986), 774–781
- [44] Gäde, G, Rinehart, KL: Primary structures of hypertrehalosaemic neuropeptides isolated from the corpora cardiaca of the cockroaches *Leucophaea maderae*,

- Gromphadorina portentosa, Blattella germanica and *Blatta orientalis* and of the stick insect *Extatosoma tiaratum* assigned by fast atom bombardment mass spectrometry. Biol. Chem. Hoppe-Seyler **371** (1990), 345–354
- [45] Gäde, G, Wilps, H, Kellner, R: Isolation and structure of a novel charged member of red pigment-concentrating hormone-adipokinetic family of peptides isolated from the corpora cardiaca of the blowfly *Phormia terranova*. Biochem. J. **269** (1990), 309–313
- [46] Gaus, G, Kleinholz, LH, Kegel, G, Keller, R: Isolation and characterization of red pigment-concentrating hormone (RPCH) from six crustacean species. J. Comp. Physiol. **160B** (1990), 373–379
- [47] Gersch, M, Baumann, E, Birkenbeil, H, Pass, G, Penzlin, H: Die Wirkungsweise des herzaktiven Peptid Neurohormon D von *Periplaneta americana*. Zool. Jb. Physiol. **86** (1982), 17–33
- [48] Gersch, M: Experimentelle Untersuchungen zur Ausschüttung von Neurohormonen aus Ganglien des Bauchmarks von *Periplaneta americana* nach elektrischer Reizung *in vitro*. Zool. Jb. Physiol. **78** (1974), 138–149
- [49] Geysen, HM, Rodda, SJ, Mason, TJ: *A priori* delineation of a peptide which mimics a discontinuous antigenic determinant. Mol. Immunology **23** (1986), 709–715
- [50] Goldsworthy, GM, Coast, GM, Wheeler, C, Cusinato, O, Kay, I, Khambay, B: The structure and functional activity of neuropeptides. *in*: Insect molecular science, eds. Crampton, JM, Eggleston, P, Academic Press, London 1992, 205–225
- [51] Hatle, JD, Spring, JH: Tests of potential adipokinetic hormone precursor related peptide (APRP) functions: lack of responses. Arch. Ins. Biochem. Phys. **42** (1999), 163–166
- [52] Healy, MJR: Statistical analysis of radioimmunoassay data. Biochem. J. **130** (1972), 207–210
- [53] Heine, M, Wicher, D: Ca^{2+} -resting current and Ca^{2+} -induced Ca^{2+} -release in insect neurosecretory neurons. NeuroReport **9** (1998), 3309–3314
- [54] Khan, MA, Steele, JE: Enhancement of hypertrehalosemic hormone biosynthesis by trehalose in isolated cockroach (*Periplaneta americana*) corpora cardiaca *in vitro*. J. Insect Physiol. **380** (1992), 659–664
- [55] Kiessig, ST, Pas, P, Porstmann, T, Partowinia-Peters, M: Auswertung von Enzymimmunoassays. GIT Labormedizin **17** (1994), 58–64

- [56] Köllisch, GV, Verhaert, PD, Lorenz, MW, Kellner, R, Gäde, G, Hoffmann, KH: Structure elucidation of MAS-AKH as the major adipokinetic hormone in the butterfly *Vanessa cardui* (Lepidoptera: Nymphalidae). *Eur. J. Entomol.* **96** (1999), 309–315
- [57] Koellisch, G, Verhaert, P, Raymackers, J, Meheus, L, Hoffmann, K, Lorenz, M, Kellner, R: Direct *de novo* neuropeptide sequencing in neuronal tissue by nanoflow ESI-TOF MS. <http://www.inmerge.com/ASMS/SearchAbstracts.asp> (1999b)
- [58] Kono, Y, Takahashi, M, Matsshita, K, Nishina, M, Kameda, Y, Hori, E: Inhibition of flight in *Periplaneta americana* (L.) by a trehalase inhibitor, Validoxyamine A. *J. Insect Physiol.* **40**, (1994), 455–461
- [59] Jahagirdar, AP, Gole, JWD, Viswanata, T, Downer, RGH: Stimulation of carbohydrate metabolising enzymes by synthetic hypertrehalosemic peptides in thoracic musculature of the American cockroach, *Periplaneta americana*. *Archives Int. Physiol. Biochim.* **98** (1990), 231–236
- [60] Lehman, HK, Margiuc, CM, Miller, TA, Lee, TD, Hildebrandt, JG: Crustacean cardioactive peptide in the sphinx moth, *Manduca sexta*. *Peptides* **14** (1993), 735–741
- [61] Leitz, T, Morand, K, Mann, M: Metamorphosin A: a novel peptide controlling development of the lower metazoan *Hydractina echinata* (Coelenterata, Hydrozoa). *Dev. Biol.* **163** (1994), 440–446
- [62] Lewis, DK, Jezierski, MK, Keeley, LL, Bradfield, JY: Hypertrehalosemic hormone in a cockroach: molecular cloning and expression. *Mol. and Cell. Endocrin.* **130** (1997), 101–108
- [63] Liedtke, A: Elektronenmikroskopische Charakterisierung der Struktur und der Innervation des Herzmuskels der Schabe *Periplaneta americana*. Diplomarbeit an der Friedrich-Schiller-Universität Jena 1991
- [64] Lorenz, JI, Lorenz, MW, Hoffmann, KH: Factors that regulate juvenile hormone and ecdysteroid biosynthesis in the cricket, *Gryllus bimaculatus* (Ensifera: Gryllidae). *Eur. J. Entomol.* **94** (1997), 369–379
- [65] Lorenz, MW, Kellner, R, Hoffmann, KH: A family of neuropeptides that inhibit juvenile hormone synthesis in the cricket, *Gryllus bimaculatus*. *J. Biol. Chem.* **270** (1995), 21103–21108

- [66] Lorenz, MW, Kellner, R, Hoffmann, KH: Allatostatins in *Gryllus bimaculatus* (Ensifera: Gryllidae): new structures and physiological properties. Eur. J. Entomol. **96** (1999a), 267–274
- [67] Lorenz, MW, Kellner, R, Hoffmann, KH, Gäde, G: Identification of multiple peptide homologues to cockroach and cricket allatostatins in the stick insect *Carausius morosus*. Insect Biochem. Mol. Biol. **30** (2000), 711–718
- [68] Lorenz, MW, Kellner, R, Woodring, J, Hoffmann, KH, Gäde, G: Hypertrehalosaemic peptides in the honeybee (*Apis mellifera*): purification, identification and function. J. Insect Physiol. **45** (1999b), 647–653
- [69] Lorenz, MW, Lorenz, JI, Treiblmayr, K, Hoffmann, KH: *In vivo* effects of allatostatins in crickets, *Gryllus bimaculatus* (Ensifera: Gryllidae). Archives Ins. Biochem. Physiol. **38** (1998), 32–43
- [70] Mangerich, S, Keller, R, Dirksen, H: Immunocytochemical identification of structures containing putative red-pigment-concentrating hormone in two species of decapod crustaceans. Cell Tiss. Res. **245** (1986), 377–386
- [71] Midgley, AR, Niswender, GD, Rebar, RW: Principles for the assessment of the reliability of radioimmunoassay methods. Acta Endocrinology, Suppl. **142** (1969), 163–184
- [72] Moshitzky, P, Yamashiro, D, Stuve, L, Ramachandran, J, Applebaum, SW: Determination of locust AKH-I by radioimmunoassay and the identification of an AKH-like factor in the locust brain. Insect Biochem. **17** (1987), 765–769
- [73] Moshitzky, P, Henzel, WJ, Rafael, A, Ramachandran, J, Applebaum, SW: Synthesis of adipokinetic hormone (AKH-I) in the locust brain. Insect Biochem. **17** (1987), 1133–1137
- [74] Nässel, DR: Neuropeptides in the insect brain: a review. Cell Tiss. Res. **273** (1993), 1–29
- [75] Nässel, DR: Neuropeptides, multifunctional messengers in the nervous system in insects. Verh. Dtsch. Zool. Ges. **87** (1994), 59–81
- [76] Nässel, DR: Peptidergic neurohormonal control systems in invertebrates. Current opinion in Neurobiology **6** (1996), 842–850
- [77] Nässel, DR, Bayraktaroglu, E, Dirksen, H: Neuropeptides in neurosecretory and efferent neural systems of insect thoracic and abdominal ganglia. Zoological Science **11** (1994), 15–31

- [78] Nickoloff, EL: The role of immunoassay in clinical laboratory. *in: Progress in Clinical Biochemistry and Medicine*, Vol. 3, Springer Verlag Heidelberg 1986, 113–155
- [79] Nieuwenhuijzen Krusemann, AC: Application of ELISA for assessment of anti-serum immunoreactivity in endocrine immunocytochemical studies. *J. Clin. Pathol.* **36** (1983), 406–410
- [80] Noyes, BE, Katz, FN, Schaffer, MH: Identification and expression of *Drosophila* adipokinetic hormone gene. *Mol. Cell. Endocrinol.* **109** (1995), 133–141
- [81] Noyes, BE, Schaffer, MH: The structurally similar neuropeptides adipokinetic hormone I and II are derived from similar, very small mRNAs. *J. Biol. Chem.* **265** (1990), 483–489
- [82] Nusbaum, MP, Marder, E: A neuronal role for a crustacean red pigment concentrating hormone-like peptide: neuromodulation of the pyloric rhythm in the crab, *Cancer borealis*. *J. Exp. Biol.* **135** (1988), 165–181
- [83] Oliver, DGA, Sanders, AH, Hogg, RD, Hellmann, JW: Thermal gradients in microtitration plates, effects on enzyme-linked immunoassay. *J. Immunol. Meth.* **42** (1981), 195–201
- [84] O'Shea, M, Witten, J, Schaffer, M: Isolation and characterization of two myoactive neuropeptides: further evidence of an invertebrate peptide family. *J. Neurosci.* **4** (1984), 521–529
- [85] Oudejans, RCHM, Vroemen, SF, Jansen, RFR, Van der Horst, DJ: Locust adipokinetic hormones: carrier independent transport and differential inactivation at physiological concentrations during rest and flight. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93** (1996), 8654–8659
- [86] Porstmann, T, Kiessig, ST: Enzyme immunoassay techniques. *J. Immunol. Methods* **150** (1992), 5–21
- [87] Porstmann, T, Porstmann, B: Enzymimmunoassay. *in: Immunologische Arbeitsmethoden*, ed. Friemel, H, 4. überarbeitete Auflage, G. Fischer Verlag Jena 1991, 135–188
- [88] Predel, R: A modified method of sample preparation in MALDI-TOF mass spectrometry developed for the investigation of perisymphathetic organs of insects. *in: Proc. of the 26th Göttingen Neurobiology Conference 1998*, Vol. II, **601**, G. Thieme Verlag Stuttgart 1998

- [89] Predel, R: Die myotropen Neuropeptide der Amerikanischen Schabe - Isolierung aus den Neurohämälorganen, Strukturaufklärung und Physiologie. Nova Acta Leopoldina Supplementum **15** (1998), 117–132
- [90] Predel, Agricola, H, Linde, D, Veenstra, J, Wollweber, L, Penzlin, H: The insect neuropeptide corazonin: immunocytochemical and physiological studies in blattariae. Zoology (ZACS) **98** (1994), 35–49
- [91] Predel, R, Rapus, J, Eckert, M: Myoinhibitors from the American cockroach. Peptides **15** (2001), *in press*
- [92] Raina, AK, Gäde, G: Insect peptide nomenclature. Insect Biochem. **18** (1988), 785–787
- [93] Randeffect bei ELISA MicroWells. Nunc Bulletin Nr. **1**, 1985
- [94] Richter, K: Zur Integration eines peptidergen Neurohormons bei der nervösen Herzregulation der Insekten Sitzungsberichte der AdW der DDR **5N** (1977), 29–39
- [95] Roberts, VA, Nachman, RJ, Coast, GM, Hariharan, M, Chung, JS, Holman, GM, Williams, H, Tainer, JA: Consensus chemistry and β -turn conformation of the active core of an insect kinin neuropeptide family. Chemistry & Biology **4** (1997), 105–117
- [96] Rodbard, D, Cooper, JA: A model for the prediction of confidence limits in radioimmunoassay and competitive protein binding assays. *in: In vitro procedures with radioisotopes in medicine*, International Atomic Energy Agency, Vienna 1970, 659–673
- [97] Salzet, M, Vandenbulcke, F, Verger-Bocquet, M: Structural characterization of osmoregulator peptides from the brain of the leech *Theromyzon tessulatum*. Mol. Brain Res. **43** (1996), 301–310
- [98] Scarborough, RM, Jamieson, GC, Kalish, F, Kramer, SJ, McEnroe, GA, Miller, CA, Schooley, DA: Isolation and primary structure of two peptides with cardio-acceleratory and hyperglycemic activity from the corpora cardiaca of *Periplaneta americana*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **81** (1984), 5575–5579
- [99] Schaffer, MH, Noyes, BE, Slaughter, CA, Thorne, GC, Gaskell, SJ: The fruitfly *Drosophila melanogaster* contains a novel charged adipokinetic-hormone-family peptide. Biochem. J. **269** (1990), 315–320
- [100] Schmid, GH, Radunz, A, Gröschel-Stewart, U: Immunologie und ihre Anwendung in der Biologie. G. Thieme Verlag Stuttgart-New York 1993

- [101] Schoofs, L, Holman, GM, Hayes, TK, Nachman, RJ, De Loof, A: Isolation, identification and synthesis of locustamyoinhibiting peptide (Lom-MIP), a novel biologically active neuropeptide from *Locusta migratoria*. Regul. Peptides **36** (1991), 111–119
- [102] Schoofs, L, Veelaert, D, De Loof, A: Peptides in locusts, *Locusta migratoria* and *Schistocerca gregaria*. Peptides **18** (1997), 145–156
- [103] Schoofs, L, Veelaert, D, Vanden Broeck, J, De Loof, A: Immunocytochemical distribution of locustamyoinhibiting peptide (Lom-MIP) in the nervous system of *Locusta migratoria*. Regul. Peptides **63** (1996), 171–179
- [104] Schooneveld, H, Romberg-Privee, HM, Veenstra, JA: Adipokinetic hormone-immunoreactive peptide in the endocrine and central nervous system of several insect species: a comparative immunocytochemical approach. Gen. Comp. Endocrinol. **57** (1985), 184–194
- [105] Schooneveld, H, Romberg-Privee, HM, Veenstra, JA: Immunocytochemical differentiation between adipokinetic hormone (AKH)- like peptides in neurons and glandular cells in the corpus cardiacum of *Locusta migratoria* and *Periplaneta americana* with C- terminal and N-terminal specific antisera to AKH. Cell Tiss. Res. **243** (1986), 9–14
- [106] Schooneveld, H, Romberg-Privee, HM, Veenstra, JA: Phylogenetic differentiation of glandular cells in corpora cardiaca as studied immunocytochemically with region-specific antisera to adipokinetic hormone. J. Insect Physiol. **33** (1987), 167–176
- [107] Schooneveld, H, Tesser, GI, Veenstra, JA, Romberg-Privee, HM: Adipokinetic hormone and AKH-like peptide demonstrated in the corpora cardiaca and nervous system of *Locusta migratoria* by immunocytochemistry. Cell Tiss. Res. **230** (1983), 67–76
- [108] Schulz-Aellen, MF, Roulet, MF, Fischer-Lougheed, J, O’Shea, M: Synthesis of a homodimer neurohormone precursor of locust adipokinetic hormone studied by *in vitro*-translation and cDNA cloning. Neuron **2** (1989), 1369–1373
- [109] Sherff, CM, Mulloney, B: Red pigment concentrating hormone is a modulator of the crayfish swimmeret system. J. Exp. Biol. **155** (1991), 21–35
- [110] Siegert, KJ: Locust corpora cardiaca contain an inactive adipokinetic hormone. FEBS Letters **447** (1999), 237–240

- [111] Siegert, KJ, Mordue, W: Elucidation of the primary structures of the cockroach hyperglycaemic hormones I and II using enzymatic techniques and gas-phase sequencing. *Physiol. Entomol.* **11** (1986), 205–211
- [112] Siegert, KJ, Mordue, W: Content and localization of the hyperglycemic hormones I and II in the corpus cardiacum of the American cockroach, *Periplaneta americana*. *Comp. Biochem. Physiol.* **101B** (1992), 315–319
- [113] Siegert, KJ, Morgan, P, Mordue, W: Primary structures of locust adipokinetic hormones II. *Biol. Chem. Hoppe-Seyler* **366** (1985), 723–727
- [114] Singer, R, Clarke, SF, Crafter, VA, Gray, BC, Kilshaw, D, Randell, JA, Robinson, JL, White, JM: Selection and evaluation of laboratory instrumentation in clinical chemistry: II. Guidelines for selection and evaluation. *Medical Laboratory Sciences* **44** (1987), 6–14
- [115] Smyth, DG, Stein, WH, Moore, S: The sequence of amino acid residues in bovine pancreatic ribonuclease: revisions and confirmations. *J. Biol. Chem.* **298** (1963), 227–234
- [116] Soback, L: Studien zur Proctolin-like Immunreaktivität an ausgewählten Organsystemen von *Periplaneta americana*. Dissertation an der Friedrich-Schiller-Universität Jena 1987
- [117] Socha, R, Kodrik, D, Zemek, R: Adipokinetic hormone stimulates insect locomotor activity. *Naturwissenschaften* **88** (1999), 85–86
- [118] Steele, JE, Ireland, R: Hormonal activation of phosphorylase in cockroach fat body trophocytes: a correlation with trans-membrane calcium flux. *Archives Ins. Biochem. Physiol.* **42** (1999), 233–244
- [119] Sternberger, LA, Hardy, PH, Cuculis, JJ, Meyer, HG: The unlabeled antibody enzyme method of immunohistochemistry. Preparation and properties of soluble antigene-antibody complex (horseradish-antihorseradish peroxidase), and its use in identification of spirochetes. *J. Histochem. Cytochem.* **18** (1970), 313–315
- [120] Isolation of granules containing adipokinetic hormone from the corpora cardiaca by differential centrifugation. *Gen. Comp. Endocrinol.* **39** (1979), 543–547
- [121] Thamm, J, Rapus, J, Eckert, M, Gäde, G: Indications for still unknown peptides from the corpora cardiaca of *Periplaneta americana* recognized by an anti-Pea-CAH-I serum. *in: Proc. of the 25th Göttingen Neurobiology Conference 1997, Vol. II, 779*, eds. Elsner, N, Wässle, H, G. Thieme Verlag Stuttgart 1997

- [122] Tijssen, P: Practice and theory of enzyme immunoassay. *in*: Laboratory techniques in biochemistry and molecular biology, Vol. 15. eds. Burdon, RH, van Knippenberg, PH, Elsevier Science Publishers B. V. Amsterdam, Niederlande 1985
- [123] Van der Horst, DJ, Vroemen, SF, Van Marrewijk, WJA: Metabolism of stored reserves of insect fat body: hormonal signal transduction implicated in glycogen mobilization and biosynthesis of the lipophorin system. *Comp. Biochem. Physiol.* **117B** (1997), 463–474
- [124] Van Veelen, P, Jiménez, CR, Li, KW, Wildering, WC, Geraerts, WPM, Tjaden, UR, van der Greef, J: Direct peptide profiling of single neurons by matrix-assisted laser desorption ionization mass spectrometry. *Org. Mass Spectr.* **28** (1993), 1542–1546
- [125] Veelaert, D, Passier, P, Devreese, B, Vanden Broeck, J, Van Beeumen, J, Vullings, HGB, Diederens, JHB, Schoofs, L, De Loof, A: Isolation and identification of an adipokinetic hormone release-inducing factor in locusts: the crustacean cardioactive peptide. *Endocrinology* **138** (1997), 138–142
- [126] Veenstra, JA, Hagedorn, HH: Isolation of two AKH-related peptides from cicadas. *Arch. Ins. Biochem.* **29** (1995), 391–396
- [127] Verhaert, P, Vandesande, F, De Loof, A, Hoyes, J, Bordoli, R: High-speed sequence analysis of unseparated neuropeptides from single insects using nanoflow Q-TOF MS/MS. *in*: Proceedings of the 45th ASMS conference on mass spectrometry and allied topics, Palm Springs, CA 1997, 12
- [128] Verhaert, P, De Loof, A: The use of time of mass spectrometry in the study of insect neurohormones - An overview. *Book of Abstracts, VI. Eur. Congr. Entomol.* eds. Brunnhofer, V, Soldan, T, Ceske Budejovice 1998, 99
- [129] Vroemen, SF, De Jonge, H, van Marrewijk, WJA, van der Horst, DJ: The phospholipase C signaling pathway in locust fat body is activated via G_q and not affected by cAMP. *Ins. Biochem. Mol. Biol.* **28** (1998a), 483–490
- [130] Vroemen, SF, van der Horst, DJ, van Marrewijk, WJA: New insights into adipokinetic hormone signaling. *Mol. Cell. Endocrinol.* **141** (1998b), 7–12
- [131] Wicher, D: Different peptidergic modulation of Na^+ and Ca^{2+} currents via protein kinase A in an insect neuron. *in*: Deutsche Physiologische Gesellschaft, Abstracts of the 79th annual meeting 19–22 march 2000, Ulm, Springer-Verlag 2000

- [132] Wicher, D, Penzlin, H: Ca²⁺ currents in cockroach neurones: properties and modulation by neurohormone D. *NeuroReport* **5** (1994), 1023–1026
- [133] Wicher, D, Walther, C, Penzlin, H: Neurohormone D induces ionic current changes in cockroach central neurones. *J. Comp. Physiol. A* **174** (1994), 507–515
- [134] Wild, D, Davies, C: Signal generation and detection systems. *in: The immunoassay handbook*, ed. Wild, D, Stockton Press, USA, New York 1994, 66–77
- [135] Wilps, H, Gäde, G: Hormonal regulation of carbohydrate metabolism in the blowfly *Phormia terranova*. *Insect Physiol.* **36** (1990), 441–449
- [136] Witek, G, Verhaert, P, Lorenz, MW, Hoffmann, KH: Immunolocalization of two types of allatostatins in the central nervous system of the cricket *Gryllus bimaculatus* (Ensifera: Gryllidae). *Eur. J. Entomol.* **96** (1999), 279–285
- [137] Ziegler, R, Schulz, M: Regulation of carbohydrate metabolism during flight in *Manduca sexta*. *J. Insect Physiol.* **32** (1986), 997–1001

Abkürzungsverzeichnis

a	Bezeichnung für die Amidierung der Carboxylgruppe von Aminosäuren
Aq. dest.	Aqua destillata
a-Kan-Ak	anti-Kaninchen speziesspezifischer Sekundärantikörper
Ag	Antigen
AG	Abdominalganglion
Ak	Antikörper
AKH/RPCH	adipokinetic hormone/red pigment concentrating hormone
AL	Antennallobus
AP	alkalische Phosphatase
Av-AP	Avidin gekoppelte alkalische Phosphatase
bL	β -Lobus
BSA	Bovine serum albumin, Rinderserumalbumin
BSA-GA	mit Glutaraldehyd vernetztes BSA
CC	Corpora cardiaca
CCAP	crustacean cardioactive peptide
D	Darm
EIA	Enzymimmunoassay
ELISA	Enzyme linked immunosorbent assay
ESI-TOF	electrospray ionization - time of flight
FaRP	FMRFamid-related peptide(s)
GA	Glutaraldehyd
GE	Gewebeextrakt
GZ	glanduläre Zellen der Corpora cardiaca
Hi	Gehirn
HRP	Meerrettichperoxidase (horse radish peroxidase)
IR	Immunreaktivität
K.	Konjugat
Kav.	Kavität (Vertiefungen der Mikrotiterplatte)
KRV	Kreuzreaktivitätsverhältnis
LW	Leerwert
<i>N. c.</i>	<i>Nauphoeta cinerea</i>
MALDI-TOF	matrix-assisted laser desorption/ionization - time of flight
NR	Nervus recurrens
NSS	neurosekretorischer Speicher der Corpora cardiaca
<i>P. a.</i>	<i>Periplaneta americana</i>
OPD	o-Phenylendiamin

PBS	Phosphate buffered saline
PLL	Poly-L-Lysin
PLL-GA	mit Glutaraldehyd aktiviertes Poly-L-Lysin
pNPP	p-Nitrophenylphosphat
RCK	Retrocerebralkomplex
rpm	rounds per minute
SOG	Suboesophagalganglion
TBS	Tris buffered saline
TFA	Trifluoressigsäure
TG	Thorakalganglion
TMB	Tetramethylbenzidin
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan ($C_4H_{11}NO_3$)
VK	Variationskoeffizient
WFR	Wiederfindungsrate
X	Bezeichnung für eine variabel besetzte Aminosäureposition

Inhaltsverzeichnis

I EINLEITUNG	1
1 Einführung	2
II MATERIAL und METHODEN	7
2 Tiermaterial	8
3 Anti-Pea-CAH-I-Serum	8
4 Peptide	8
5 Konjugate	8
6 Herstellung von Gewebeextrakten	10
6.1 Präparation der Organe	10
6.2 Gewebeextraktion	11
6.3 Festphasenreinigung der Gewebeextrakte	11
7 Enzymimmunoassays	12
7.1 Wichtige Chemikalien für die Enzymimmunoassays	12
7.2 Pufferlösungen	12
7.3 Geräte	12
7.4 Durchführung der Anti-Pea-CAH-I-Enzymimmunoassays	14
7.4.1 Allgemeines	14
7.4.2 Competitive Anti-Pea-CAH-I-Enzymimmunoassays	14
7.4.2.1 Competitive Anti-Pea-CAH-I-Enzymimmunoassays mit alkalischer Phosphatase als Markerenzym	14
7.4.2.2 Competitiver Enzymimmunoassay mit Meerrettichper- oxidase als Markerenzym	16

7.4.3	Nichtcompetitiver Anti-Pea-CAH-I-Enzymimmunoassay mit alkalischer Phosphatase als Markerenzym	18
7.5	Auswertung der gewonnenen Daten	20
7.5.1	Berechnung der Standardkurven für die competitiven Enzymimmunoassays	20
7.5.2	Quantitative Angaben zur Kreuzreaktivität	21
7.5.3	Angaben zur Immunreaktivität in aufgetrennten Gewebeextrakten	21
7.5.4	Statistische Verfahren	22
8	Immuncytochemie	22
9	HPLC	25
10	Massenspektrometrie	25
III	ERGEBNISSE	27
11	Anti-Pea-CAH-I-Enzymimmunoassays	28
11.1	Etablierung der Enzymimmunoassays	28
11.1.1	Competitive Enzymimmunoassays	28
11.1.2	Direkter Enzymimmunoassay	30
11.2	Analytische Qualitätsparameter der Enzymimmunoassays	31
11.2.1	Richtigkeit	31
11.2.2	Präzision	32
11.2.3	Empfindlichkeit	33
12	Spezifität des Anti-Pea-CAH-I-Serums	34
12.1	Charakterisierung der Antiserumspezifität mit dem competitiven Anti-Pea-CAH-I-Enzymimmunoassay	34
12.2	Untersuchungen zur Spezifität des Anti-Pea-CAH-I-Serums mit dem nichtcompetitiven Enzymimmunoassay	38
12.3	Immuncytochemische Untersuchungen zur Spezifität des Anti-Pea-CAH-I-Serums	47
13	Die Identifizierung von Pea-CAH-I-ähnlichen Peptiden	55
13.1	Quantitative Bestimmung der Pea-CAH-I-like Immunreaktivität	55
13.2	Immuncytochemische Differenzierung der Pea-CAH-I-like Immunreaktivität	57

Danksagung

An erster Stelle möchte ich mich bei meinem Betreuer, Herrn Doz. Dr. M. Eckert, für die Vergabe des Themas, seine stete praktische und moralische Unterstützung bei der Umsetzung der Aufgabe sowie für seine Geduld und sein Verständnis für meine familienpolitischen Entscheidungen bedanken. Herrn Prof. Penzlin und Herrn Prof. Bolz danke ich dafür, daß ich die praktischen Arbeiten am Institut durchführen und beenden konnte.

Mein herzlicher Dank gilt weiterhin Herrn Dipl. Chem. J. Rapus für die enge Zusammenarbeit während der gesamten Zeit, für die Bearbeitung unzähliger Gewebeextrakte mit der HPLC und besonders für die Hilfe bei der Peptidisolierung. Bedanken möchte ich mich bei Herrn Dr. R. Predel für alle konstruktiven Diskussionen und die Messung der Proben mit der MALDI-TOF, durch die diese Arbeit abgeschlossen werden konnte. Herrn Prof. G. Gäde danke ich für die AKH/RPCH-Peptide, die die Untersuchung der Antiserumspezifität in dieser Ausführlichkeit überhaupt erst ermöglichten.

Bei Herrn Prof. Dr. H. Kluge und den Mitarbeitern des Zentralen Liquorlabors der Klinik für Neurologie und Psychiatrie der FSU Jena bedanke ich mich für die Möglichkeit und das Vertrauen, die Mikrotiterplatten dort außerhalb des Routinebetriebs allein messen zu dürfen. Vielen Dank auch für die Meßgelegenheiten am Inst. für Pharmazie und im Inst. für Mikrobiologie. Die Anschaffung eines Readers durch die Jenaer Arbeitsgruppe der Sächs. Akademie der Wissenschaften zu Leipzig, der freie Zugang und die uneingeschränkte Nutzung des Geräts führten zu einer erheblichen Arbeitserleichterung für mich. Herrn Prof. Dr. K. Richter und allen seinen Mitarbeitern sei für die Unterstützung und die freundliche Zusammenarbeit gedankt.

Bei Frau Winkler und Frau Krause bedanke ich mich für ihre große Hilfe bei den Präparationen. Frau Raue danke ich für die Hilfe bei den immuncytochemischen Arbeiten. Frau Dr. A. Nürnberger danke ich ganz herzlich für ihre Ratschläge und die spontane Hilfe, als mein Sohn plötzlich ins Krankenhaus mußte. Vielen Dank allen ungenannten Kollegen des Institutes, die ebenfalls den Fortgang der Arbeiten unterstützten.

Entscheidenden Anteil am Gelingen dieser Arbeit hatten meine Familie und unsere Freunde. Mein besonderer Dank gilt meinem Mann, ohne den ich das mir selbst auferlegte Arbeitspensum nicht geschafft hätte. Meine Kinder verkomplizierten die Promotionsphase zwar, aber sie gaben mir auch die Kraft, die Arbeit abzuschließen. Vielen Dank, Ihr beiden! Meinen Eltern und Schwiegereltern danke ich für die Kinderbetreuung, die mir besonders während des Zusammenschreibens längere Arbeitsphasen ermöglichte. Vielen Dank auch Hübners für den geliehenen Laptop und den entscheidenden Tip für einen Krippenplatz, Beate für die Telefonate und Erholungspausen in

Marburg, Susi und Sabine für ihre Hilfe vor Ort. Mein ganz besonderer Dank gilt Herrn Dr. D. Schweitzer und Herrn Dipl. Inf. Jürgen Weiprecht für ihre Großzügigkeit und uneigennütige Hilfe, die ich jederzeit in Anspruch nehmen durfte.

Zuletzt möchte ich der Techniker Krankenkasse Jena noch für die Genehmigung der Mutter-Kind-Kur danken. Durch den Kuraufenthalt konnte ich nach eineinhalbjährigem Schlafentzug wieder zu einem normalen Lebensrhythmus zurückkehren und diese Arbeit fertig schreiben.

Erklärung zur Selbständigkeit

Hiermit erkläre ich, die vorliegende Arbeit selbständig und nur unter Zuhilfenahme der angegebenen Quellen erstellt zu haben.

Jena, den 31. 03. 2001

Lebenslauf

Name	Jana Thamm, geb. Gabriel	
wohnhaft	Unterm Sande 2a, 07751 Maua	
geboren am	14. 07. 1967 in Glauchau	
Nationalität	deutsch	
Familienstand	verheiratet, zwei Kinder	
Schule	POS Glauchau	1974–1983
	EOS Glauchau	1983–1985
Universität	FSU Jena, Biol.-Pharm. Fakultät	
	Studium der Biologie	1986–1991
	Forschungsstudium	1990–1993
	Wiss. Assistentin	1993–1996
	Promotionsstudentin	seit 1993
Prüfungen	Mittlere Reife	1984
	Abitur	1986
	Studienjahresarbeit	1989
	Diplom	1991
Erziehungsurlaub		1996–1998
		1999–2000
Tätigkeit	Wiss. Assistentin, HKI Jena	seit 2001

Erklärung zur Bewerbung

Hiermit erkläre ich, daß ich mich mit der vorliegenden Arbeit an keiner anderen Hochschule um den akademischen Grad Dr. rer. nat. beworben habe und daß ich weder früher noch gegenwärtig die Eröffnung eines Verfahrens zum Erwerb des o.g. akademischen Grades an einer anderen Hochschule beantragt habe.

Jena, den 31. 03. 2001