

# ***Ionotrope en metabotrope glutamaatreceptoren bij de *Locusta Migratoria****

**Nico Hollanders**

promotor :

Prof. dr. Emmy VAN KERKHOVE

# INHOUDSOPGAVE

INHOUDSOPGAVE .....	I
ABSTRACT.....	III
LIJST VAN AFKORTINGEN .....	IV
VOORWOORD .....	VI
INLEIDING .....	1
<b>1. LOCUSTA MIGRATORIA.....</b>	<b>1</b>
1.1. ALGEMENE BOUW VAN SPRINKHANEN .....	2
<b>2. DORSAAL ONGEPAARDE MEDIANE (DUM) NEURONEN .....</b>	<b>3</b>
<b>3. GLUTAMAAT .....</b>	<b>4</b>
<b>4. GLUTAMAATRECEPTOREN .....</b>	<b>6</b>
4.1. IONOTROPE GLUTAMAAT RECEPTOREN (IGLUR).....	6
4.1.1. NMDA receptoren.....	7
4.1.2. AMPA receptoren .....	8
4.1.3. Kainaat receptoren .....	8
4.1.4. Glutamaat geïnduceerde chloor kanalen.....	9
4.2. G-PROTEÏNE GEKOPPELDE GLUTAMAAT RECEPTOREN .....	9
4.2.1. Classificatie .....	9
4.2.2. Transductiepad mechanismen .....	12
4.2.3. Fysiologische rol van mGluR .....	13
<b>5. DOEL VAN DE STUDIE.....</b>	<b>14</b>
MATERIAAL & METHODEN: .....	15
<b>1. HUISVESTING EN VERZORGING VAN SPRINKHANEN .....</b>	<b>15</b>
<b>2. ISOLATIE VAN ORGANEN UIT <i>L. MIGRATORIA</i>.....</b>	<b>15</b>
<b>3. mRNA EXTRACTIE UIT ORGAANWEEFSEL.....</b>	<b>16</b>
<b>4. RT-PCR: OMZETTING mRNA NAAR CDNA.....</b>	<b>17</b>
<b>5. PCR ONDERZOEK NAAR METABOTROPE EN IONOTROPE GLUTAMAATRECEPTOREN ...</b>	<b>17</b>
5.1. KANDIDAATSSEQUENTIE VOOR DE MGLUR VAN DE <i>L. MIGRATORIA</i> .....	18
5.2. POSITIEVE CONTROLE .....	19
5.3. VOLLEDIGE SEQUENTIE VAN GLUCL.....	19
<b>6. PCR EN SEQUENCERING .....</b>	<b>19</b>
<b>7. VISUALISATIE PCR RESULTATEN DOOR GEL ELEKTROFORESE .....</b>	<b>21</b>
<b>8. GEEXTRACTIE VAN CDNA .....</b>	<b>22</b>
RESULTATEN:.....	23

<b>1. HUISHOUDGEN</b> .....	<b>23</b>
1.1. PRIMERS VAN HUISHOUDGEN .....	23
1.2. PCR OPTIMALISATIE POSITIEVE CONTROLE .....	24
1.3. SPECIFICITEIT HUISHOUDGEN .....	25
<b>2. GLUTAMAATRECEPTOREN IN DE <i>L. MIGRATORIA</i></b> .....	<b>26</b>
2.1. EEN IONOTROPE GLUTAMAATRECEPTOR, GLUCL KANAAL, IN <i>L. MIGRATORIA</i> .....	26
2.1.1. <i>ontwikkeling van verbasterde primers voor de sequentie van het GluCl kanaal</i> .....	26
2.1.2. <i>Ontwikkeling van primers voor de iGluR</i> .....	28
2.1.3. <i>Optimalisatie PCR protocol</i> .....	29
2.2. EEN METABOTROPE GLUTAMAAT RECEPTOR .....	32
2.2.1. <i>Ontwikkeling van verbasterde primers mGluR</i> .....	32
2.2.2. <i>Sequentie van een mGluR</i> .....	33
2.2.3. <i>Primers van de mGluR</i> .....	34
2.2.4. <i>Optimalisatie van het PCR protocol</i> .....	35
2.2.5. <i>PCR protocol uitgevoerd op totaal cDNA geïsoleerd uit brein, Malpighi, ganglion en spierweefsel</i> .....	36
2.2.6. <i>Geoptimaliseerd PCR protocol voor de mGluR uitgevoerd op specifiek weefsel</i> .....	37
2.2.7. <i>BAND OP 200BP VOOR SPIERWEEFSEL</i> .....	38
 DISCUSSIE: .....	 40
 <b>1. ZOEKTOCHT NAAR EEN GESCHIKT HUISHOUDGEN</b> .....	 <b>40</b>
<b>2. ZOEKTOCHT NAAR EEN METABOTROPE GLUTAMAATRECEPTOR</b> .....	<b>40</b>
<b>3. ZOEKTOCHT NAAR EEN IONOTROPE GLUTAMAATRECEPTOR</b> .....	<b>42</b>
<b>4. TOEKOMSTPERSPECTIEVEN</b> .....	<b>43</b>
<b>5. CONCLUSIE</b> .....	<b>44</b>
 LITERATUURLIJST: .....	 45
 BIJLAGEN .....	 49
 <b>BIJLAGE I</b> .....	 <b>49</b>
<b>BIJLAGE II</b> .....	<b>50</b>
<b>BIJLAGE III</b> .....	<b>51</b>
<b>BIJLAGE IV</b> .....	<b>52</b>
<b>BIJLAGE V</b> .....	<b>53</b>
<b>BIJLAGE VI</b> .....	<b>54</b>
<b>BIJLAGE VII</b> .....	<b>54</b>

**ABSTRACT**

Glu receptoren spelen bij de *Locusta migratoria* een rol bij allerlei fysiologische functies. Daarom kunnen ze gebruikt worden in de strijd tegen sprinkhaanplagen door het ontwikkelen van sprinkhaan specifieke Glu receptor blokkers. Door alignering werden gekende glutamaat receptoren van insecten met elkaar vergeleken en werden verbasterde primers ontwikkeld op basis van hun geconserveerde regio's. Door PCR technieken werd cDNA van het mRNA van de *L. migratoria* onderzocht op de aanwezigheid van ionotrope (iGluR) en metabotrope (mGluR) glutamaat receptoren. Het onderzoek bevestigt de rol van het *Locusta migratoria* insuline gerelateerd peptide (LIRP) als een uitstekend huishoudgen voor de sprinkhaan. Het onderzoek heeft voor het eerst aangetoond dat er mRNA wordt aangemaakt voor een metabotrope glutamaat receptor (mGluR) en een glutamaat gevoelig chloor kanaal (GluCl), een specifieke ionotrope glutamaat receptor (iGluR). Patch clamp en andere immunofluorescente technieken zijn in de toekomst echter nodig om met zekerheid uitspraken te doen over de fysiologische rollen van deze glutamaatreceptoren.

## LIJST VAN AFKORTINGEN

ACPD : 1S, 3R-1-aminocyclopentaaan-1,3-dicarboxylzuur

AMGluR : *Apis Mellifera* glutamaat receptor

AMPA : -Amino-3-hydroxy-5-Methyl-4-isoxasolePropionisch zuur

AMV: avian myeloblastosis virus

ATP : adenosine tri-fosfaat

Bp : baseparen

cAMP : cyclisch adenosine monofosfaat

CHO cellen : chinese hamster eicellen

CZS : centraal zenuwstelsel

ddNTP : dideoxynucleotidtrifosfaat

DmGluCl $\alpha$  : *Drosophila Melanogaster* glutamaat geïnduceerd chloorkanaal alfa

dNTP : deoxynucleotidtrifosfaat, verzameling van deoxy- adenosine-, guanine-, thymine- en cytosinetrifosfaat (respectievelijk dATP dGTP dTTP en DCTP)

DUM neuronen : dorsale ongepaarde mediane neuronen

F2,6P2 : fructose 2,6-bifosfaat

gDNA : genomisch DNA

Glu : glutamaat

GluCl : glutamaat geïnduceerd chloor kanaal

Gly : glycine

iGluR : ionotrope glutamaatreceptor

IK<sub>AHP</sub> : Ca<sup>2+</sup> geactiveerde K<sup>+</sup> kanalen

IK<sub>M</sub> : voltagegevoelige K<sup>+</sup> kanalen

IUPAC : Internationale unie voor pure en toegepaste chemie

LIRP : *Locusta* insuline gerelateerde peptide

LTD : lange termijn depressie

LTP : lange termijn potentiatie

mGluR : metabotrope glutamaatreceptoren

mRNA : messenger RNA

Mxr : glutamaat receptor *Drosophila Melanogaster*

## LIJST VAN AFKORTINGEN

NMDA : N-Methyl-D-Aspartaat

NSF : N-ethylmaleimide gevoelige factor

PCAR-1 : calciumgevoelig kanaal

PCR : Polymerase chain reaction

PDZ domein : acroniem van post synaptische densiteit proteïne (PSD95), Drosophila disk grote tumor suppressor (DlgA) en zo-1 proteïne

PFK : fosfofructokinase

PICK-1 : proteïne die een interactie ondergaat met C kinase1

PKA : proteïne kinase A

PLC : fosfolipase C

PTX : pertussis toxine

Q : glutamine

R : arginine

RACE : snelle amplificatie van cDNA uiteinden

rpm : rondes per minuut

RT-PCR : reverse transcriptase PCR

SNP : single nucleotide polymorphism, mutatie van één nucleotide

SPF : synaptisch plasticiteits fenomeen

ssDNA : single strand DNA

Taq : *Thermus Aquaticus*

T<sub>M</sub> : smelttemperatuur

UV licht : ultraviolet licht

X-stralen : röntgen stralen

## VOORWOORD

Dit document is het resultaat van een 6 maand durende onderzoeksstage aan de Universiteit Hasselt en is een afsluiting van 4 interessante jaren uit mijn leven waarin ik enorm heb bijgeleerd zowel op wetenschappelijk als op menselijk vlak. Daarom had ik graag enkele mensen en instanties bedankt.

Allereerst mijn promotor Emmy Van Kerkhove, die me deze kans heeft gegeven en altijd beschikbaar was om raad te geven indien dat nodig was. Ook Jean-Michel Rigo heeft steeds als ik er om vroeg tijd gemaakt om mijn thesis na te lezen en raad te geven en Daniël Janssen heeft me doorheen deze stage constant bijgestaan in raad en daad.

Aan al de mensen van het *masterkot* en die daarbuiten: jullie hebben ervoor gezorgd dat ik elke dag met veel plezier naar mijn stageplaats ben gekomen. Andy, Gunter, Anne en in het bijzonder Marijke en Dennis: hopelijk kruisen onze professionele loopbanen elkaar in de toekomst. Het was een plezier om met jullie samen te werken.

Aan het thuisfront hebben ze me altijd gesteund en ik ben dan ook enorm dankbaar in zo'n familie te zijn opgegroeid. Dankzij hen heb ik de kwaliteiten meegekregen die nodig zijn om een goede wetenschapper te worden: vastberadenheid, zelfrelativisme en een gezonde dosis humor. Ook richt ik hier een dankwoord aan mijn neef die heeft voorgesteld mijn thesis na te lezen, desondanks het feit dat hij zelf druk aan zijn thesis zat te werken. Berry, die bonobo's mogen trots zijn met u te hebben samengewerkt.

Dit dankwoord is pas compleet als ik ook Els Maurissen vermeld. Poema, bedankt om me te steunen tijdens mijn thesistijd en daarbuiten. Ik ben blij dat je deel uitmaakt van mijn leven.

Ten slotte ook bedankt aan jullie, lezers van mijn thesis. Zonder jullie was dit werk grotendeels voor niets geweest. Want wat is nu wetenschappelijk onderzoek als het niet gedeeld kan worden?

Veel leesplezier!

## INLEIDING

### 1. *Locusta migratoria*

“Wat de ene sprinkhaan overliet, heeft de tweede afgeknaagd, wat de tweede nog overliet, heeft de derde afgemaaid en wat na de derde overbleef, heeft de vierde kaalgevreten. “Joël I. Sprinkhaanplagen zijn nog steeds niet gereduceerd tot legendes uit de oudheid. Verschillende gewassen worden vandaag nog steeds bedreigd door dit gulzige insect. Organisaties als het Food and Agriculture Organisation of the United Nations (FAO) houdt de trek van sprinkhanen nauwgezet bij(1).

Het bestuderen van een insectenbrein heeft tal van voordelen. Het bevat in vergelijking met het zoogdierbrein veel minder neuronen, wat het in kaart brengen van onderlinge contacten vergemakkelijkt. De neuronen zijn groot genoeg om met een elektrode te penetreren en de toegang tot neuronen wordt niet bemoeilijkt door een pulsatieve bloedtoevoer. In deze thesis wordt gekozen verder in te gaan op de sprinkhaan, waarvan tot op heden weinig bekend is. Een beter begrip in de werking van het sprinkhaanbrein kan bijdragen tot ontdekkingen die extrapolieerbaar zijn naar andere organismen zoals de mens. Het kan ook leiden tot de ontwikkeling van nieuwe pesticiden. De *Locusta migratoria* of treksprinkhaan (fig 1) kan zowel solitair als in groep voorkomen. De solitaire vorm is niet zwermend(2). Onder de juiste omstandigheden zullen ze zich snel voortplanten en groeperen. De overgang van solitaire naar migrerende vorm neemt 2

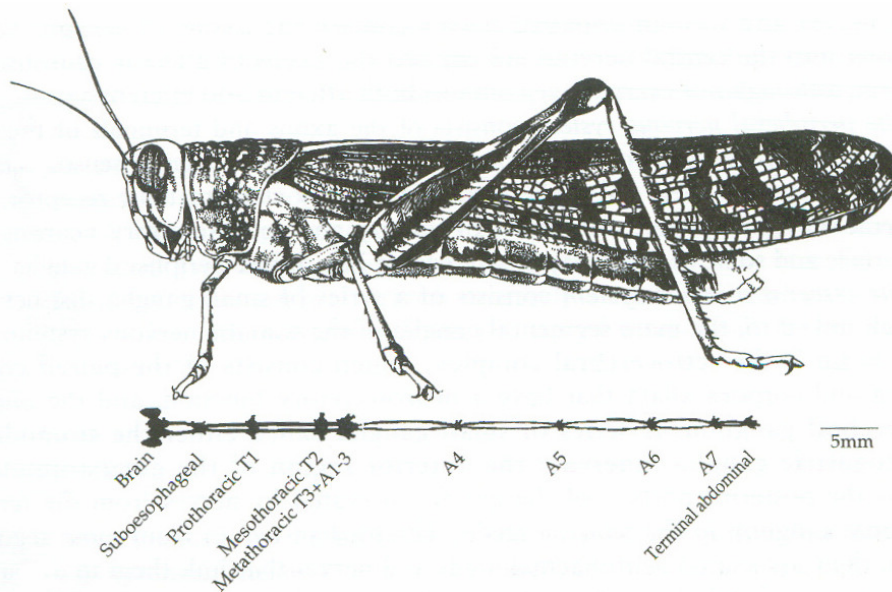


Fig. 1: *Locusta migratoria*(51)

generaties in beslag. Vooral de migrerende vorm brengt veel schade toe aan akkers aangezien de sprinkhaan elke dag zijn eigen gewicht aan voedsel eet en een zwerm 2 miljard exemplaren kan bevatten. De economische schade kan oplopen tot in de miljoenen(3).. Momenteel wordt er gebruik gemaakt van insecticiden om de plaag in te perken. Deze insecticiden hebben echter ook schadelijke gevolgen voor omringend fauna en flora en de mens. Een andere manier om sprinkhanen te verdelgen is gebruik maken van de fungus *Metarhizium flavoviride*, die stoffen afscheidt die de cuticula van de *L. migratoria* afbreken(4). Het beter in kaart brengen van neuronale signaliseringspaden van de sprinkhaan kan nieuwe, meer specifieke insecticiden opleveren die enkel de sprinkhaan als target hebben.



### 1.1. Algemene bouw van sprinkhanen



**Fig. 2: Het centraal zenuwstelsel van de sprinkhaan:** De ventrale chorda is weergegeven met brein en ganglia. In bijlage III worden de ganglia meer gedetailleerd weergegeven(5)

Het somatisch zenuwstelsel van de *L. migratoria* bestaat uit een ventrale keten bilateraal symmetrische, segmentale ganglia die via gepaarde axonbundels, connectieven genaamd, contact maken met elkaar(5,6) (fig. 2). In elk ganglion vormen de somata van de neuronen en de gliale cellen een cortex die zich rond de centraal gelegen kern van tracten en commissuren bevindt. Het perifeer zenuwstelsel bestaat uit axonen en terminalen van de efferente neuronen en axonen. Het visceraal zenuwstelsel bestaat uit een serie smalle ganglia gelinkt aan de segmentale ganglia van het somatisch zenuwstelsel.

Het brein bestaat uit het protocerebrum, deutocerebrum en tritocerebrum, die onderling complex verbonden zijn. Het protocerebrum hangt samen met fotoreceptoren en met de corpora cardiaca. Ook de “paddenstoellichaampjes” zijn hier terug te vinden, die olfactorische signalen verwerken. In het centrale deel van het protocerebrum worden stimuli van octopamine geregistreerd. Octopamine is een neuromodulator die enkel bij invertebraten voorkomt en bij de sprinkhaan het metabolisme reguleert bij springen en vliegen. Het deutocerebrum krijgt informatie van de sensorische (zoals olfactorische) en motorische stimuli van de antennae. Van het tritocerebrum is niet zoveel gekend.

Het is gelinkt met de paddenstoellichaampjes, de optische lobi, het stomatogastrisch zenuwstelsel en het retrocerebraal complex. Het bevat motorneuronen die het labrum en de pharyngeale dilatorspiers besturen en het ontvangt sensorische stimuli van de monddelen.

Er zijn 3 suboesophagale ganglia namelijk de mandibulaire, maxillaire en de labiale neuromeren. Ze zijn betrokken bij motorische en sensorische signalen van en naar de monddelen, alsook bij de speekselsecretie, nekspieren en de corpora cardiata. Auditorische signalen en de motorische patronen van wandelen, vliegen, ademhalen en stridulatie worden hier eveneens verwerkt.

Er zijn 3 thoracale ganglia: pro-, meso- en metathoracale ganglia. Van al de verschillende insectenganglia zijn de thoracale ganglia het meest bestudeerd. Ze spelen een rol bij de besturing van de poten, vleugels en de rest van het lichaam en ontvangen auditorische informatie van het tympanum.

De sprinkhaan heeft 11 abdominale neuromeren. De eerste 3 zijn gefuseerd met het metathoracale neuromeer om het metathoracale ganglion te vormen, terwijl de laatste 4 gefuseerd zijn tot de terminale abdominale ganglion. De 4 tussenliggende neuromeren vormen aparte ganglia.

## 2. Dorsaal ongepaarde mediane (DUM) neuron

In de segmentale ganglia bevinden zich een groep bilateraal symmetrische neuron waarvan de cellichamen aan de dorsale middellijn gelegen zijn en waarvan de axonen contact maken met 2 laterale neurieten die elk aan 1 zijde van de ganglion uitlopen. Deze neuron worden efferente DUM neuron genoemd(5). De meeste DUM neuron bevinden zich in de meso- en metathoracale ganglia. Aangezien deze ganglia de controle van de vlucht reguleert, werd er terecht een verband vermoed met DUM neuron en de controle van de vlucht(7).

DUM neuron van insecten moduleren de activiteit van skeletspieren en viscerale spieren. Hun rol is vergelijkbaar met die van het sympathisch zenuwstelsel in vertebraten(8). De efferente DUM neuron worden gekenmerkt door het genereren van spontane endogene actiepotentialen. Ze bezitten een complexe verzameling aan ionkanalen(9) die instaan voor het spontaan vuren van de neuron (bijlage II). Efferente DUM neuron scheiden octopamine af aan perifere targets of aan de haemolymfe wanneer ze worden geactiveerd.

Octopamine speelt een belangrijke rol in het metabolisme van de sprinkhaan(10). Tijdens de vlucht van de sprinkhaan worden enorme hoeveelheden energie geconsumeerd en stijgt de adenosine trifosfaat (ATP) turnover 100x in vergelijking met de rust situatie.

Als een sprinkhaan opstijgt, komt er octopamine vrij uit DUM neuronen, waardoor de concentratie aan fructose 2,6-bifosfaat (F2,6P<sub>2</sub>) toeneemt in de vleugelspieren. F2,6P<sub>2</sub> is een belangrijke modulator van de glycolyse. Na een langere vlucht daalt geleidelijk de glycolyse in de spier en wordt vooral vet, wat veel energierijker is, verbrandt als energiebron. Cyclisch adenosine monofosfaat (cAMP) afhankelijke proteïne kinase A (PKA) is nodig voor de signaaltransductie maar is alleen niet voldoende, wat kan wijzen op een parallelle controle via een Ca<sup>2+</sup> afhankelijke signaliseringspad.

Voor langere vluchten moeten twee dingen gebeuren. Ten eerste moeten vetten vrijgezet worden uit de vetreserves door adipokinetische hormonen, ten tweede moet er een verschuiving zijn van suikeroxidatie naar vetoxidatie via een nog onbekend systeem. Het algemene controle element van de glycolyse is fosfofructokinase (PFK) dat geïnhibeerd wordt door hoge ATP concentraties en geactiveerd door AMP(10). De concentraties van deze effectoren veranderen niet tijdens de vlucht, dus is er ook geen verlaagde PFK activiteit. Een andere activator van PFK, namelijk F2,6P<sub>2</sub> daalt met 80% binnen 10 minuten tijdens de vlucht. F2,6P<sub>2</sub> werkt als intracellulaire boodschapper die wordt geactiveerd door extracellulaire signalen. Hoe F2,6P<sub>2</sub> wordt beïnvloedt tijdens inspanning is niet bekend. F2,6P<sub>2</sub> stijgt binnen 5 minuten na octopamine blootstelling in vliegspieren van de sprinkhaan. Stijging van octopamine concentraties in de vliegspeer is onafhankelijk van octopamine concentraties in de hemolymfe. De enige bron voor octopamine in vliegspieren zijn dus de centrale DUM neuronen.

### 3. Glutamaat

L-Glutamaat (Glu) (fig. 3) is één van de belangrijkste excitatorische neurotransmitters in het centrale zenuwstelsel van zoogdieren. Glu behoort tot de niet essentiële aminozuren(10). Het menselijke lichaam is in staat zelf Glu aan te maken. Het aminozuur speelt een rol in sommige neurale aandoeningen zoals

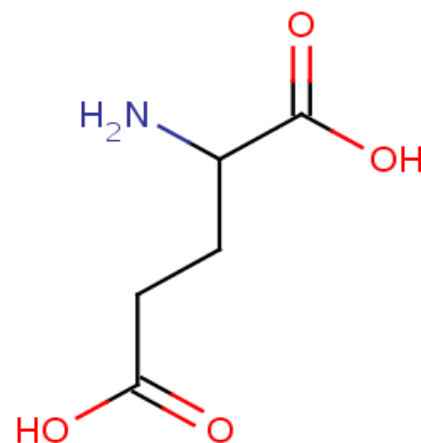


Fig. 3: chemische voorstelling L-glutamaat(52)

Alzheimer(12) en epilepsie(13). Alzheimer kan het gevolg zijn van glutamaat excitotoxiciteit en men stelt vaak een verhoogde Glu concentratie vast bij deze ziekte. Ook bij epilepsie wordt een verhoogde Glu concentratie vastgesteld. Daarom kan Glu aangewend worden als therapeutisch target voor deze aandoeningen.

Glutamaat wordt opgestapeld in vesikels in de buurt van synapsen en heeft excitatorische effecten. Een overmaat aan extracellulair glutamaat kan leiden tot excitotoxiciteit. Om deze toxiciteit te voorkomen bevinden er zich glutamaat transporters op neuronale en gliale membranen die ervoor zorgen dat extracellulair Glu snel wordt verwijderd als de concentratie een waarde van meer dan 1 mM bereikt. Hersenschade kan tot gevolg hebben dat deze glutamaat transporters hun werking omkeren. Hierdoor depolariseert het membraan potentiaal, waardoor voltagegevoelige calciumkanalen worden geactiveerd. Omdat de influx van calcium een lagere intracellulaire natrium concentratie tot gevolg heeft, zal de Na/Ca antiporter geen calcium meer naar buiten pompen, wat leidt tot een nog grotere  $Ca^{2+}$  influx, waardoor er neuronale schade optreedt als gevolg van mitochondriale schade of door Glu/ $Ca^{2+}$  gemedieerde transcriptiefactoren die coderen voor pro-apoptotische genen. Hierop kan uiteindelijk celdood volgen.

Bij de *protostomata*, waartoe de insecten ook behoren, speelt L-glutamaat ook een rol bij de inhibitorische synaptische overdracht. Afhankelijk van de ontvangende receptor volgt een inhibitorische of excitatorische respons. In de DUM neuron van de sprinkhaan is de meest typische respons na blootstelling aan L-glutamaat een hyperpolarisatie(2). Glu kan de synaptische overdracht versterken of verzwakken in het brein.

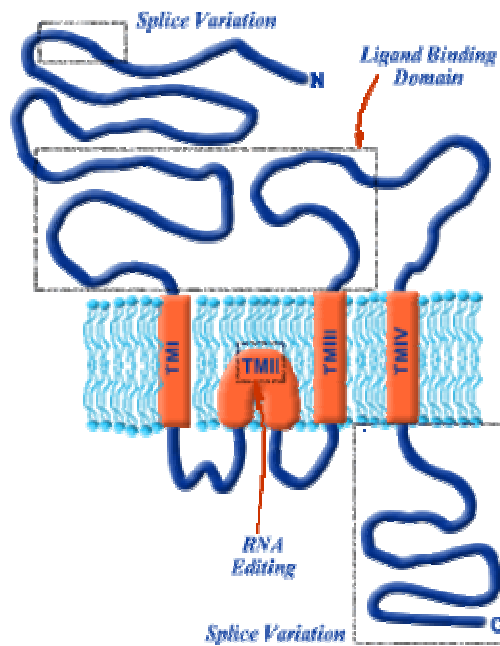
Verscheidene onderzoeken hebben een rol van Glu via metabotrope glutamaat receptoren (mGluR)s bij leren en plasticiteit aangetoond. Zowel bij de lange termijn potentiatie (LTP)(14) als bij lange termijn depressie (LTD)(15,16) zou Glu betrokken zijn. Dit werd vastgesteld bij de honingbij *Apis Mellifera*(17) en de *Drosophila*(18). Uit deze studies kan worden geconcludeerd dat glutamaat een evolutionair geconserveerde rol speelt bij associatief leren en ontwikkeling.

## 4. Glutamaatreceptoren

De sprinkhaan bevat 3 grote klassen van receptoren die geactiveerd kunnen worden door Glu(2). Excitatorische ionotrope glutamaatreceptoren maken een eerste klasse op en als ze worden geactiveerd laten ze kationen door. Deze groep bevat subtypes die worden onderscheiden door hun gevoeligheid voor agonisten zoals quisqualaat, kaïnaat en aspartaat. Een tweede klasse glutamaat receptoren zijn de inhibitorische ionotrope Glu receptoren die zorgen voor een hyperpolarisatie door in te werken op anion selectieve kanalen, die vooral Cl<sup>-</sup> doorlaten. De derde groep zijn metabotrope receptoren die via tweede boodschappers een membraanpotential teweegbrengen. De receptoren bevinden zich ter hoogte van synapsen binnen het centraal zenuwstelsel (CZS) en op neuromusculaire juncties alsook op de cellichamen, op andere extrasynaptische plaatsen van het CZS, en op extrajunctionale sites langs de membranen van spiervezels(2).

### 4.1. Ionotrope glutamaat receptoren (iGluR)

Ligand gemedieerde ionkanalen, of iGluRs zijn opgebouwd uit 4 subunits. iGluRs spelen een rol in de synaptische overdracht(19). Wanneer Glu op postsynaptische ionotrope receptoren bindt, ontstaat een doorstroom van onder andere Na<sup>+</sup>, Ca<sup>2+</sup> en K<sup>+</sup>. Dit heeft een depolarisatie van het celmembraan tot gevolg waardoor een actiepotential optreedt. iGluRs worden onderverdeeld in 3 groepen op basis van de farmacologische stoffen die hen activeren, α-Amino-3-hydroxy-5-Methyl-4-isoxasolePropionisch zuur (AMPA) wekt AMPA receptoren, kaïnaat exciteert kaïnaat receptoren, en *N*-Methyl-D-Aspartaat (NMDA) werkt in op NMDA receptoren(20) (fig. 5). Deze drie receptoren werken excitatorisch. De basisstructuur van iGluRs (Fig. 4) lijkt op die van alle ionotrope receptoren. In het centrale deel van de sequentie van een subunit bevinden zich 4 hydrofobe regio's (TMI-IV) (21). Het TMII domein vormt een 'opnieuw intredende' lus, wat aanleiding geeft tot een extracellulaire N-terminus en intracellulaire C-terminus. De lange lus tussen TMIII en TMIV bevindt zich extracellulair, terwijl deze zich bij andere ionotrope receptoren intracellulair bevindt. De lus vormt samen met de N-terminus het ligand bindend domein. De diversiteit van iGluRs is te wijten aan splits varianten en RNA modulatie.



**Fig. 4: Globale structuur van iGluRs.** iGluRs hebben dezelfde basisstructuur als andere ionotrope receptoren. Ze bezitten een extracellulaire N-terminus die samen met de grote lus het ligand bindend domein vormen. De C-terminus is intracellulair gelegen en vaak een site waar veel splits variatie optreedt. Ook is de C-terminus een interactieplaats met intracellulaire proteïnen(21)

#### 4.1.1. NMDA receptoren

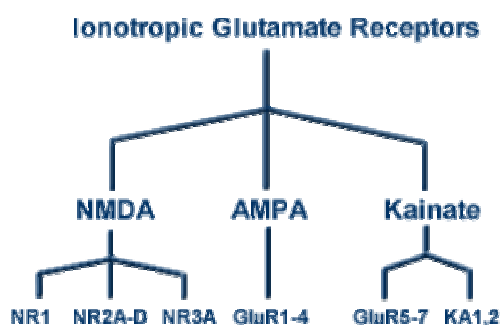
NMDA receptoren bevatten altijd een NR1 subunit(20). De splits varianten worden geproduceerd door het splitsen van mRNA uit één enkel gen. Splits variatie treedt op in zowel de N- en als de C-terminus. De variatie is vooral belangrijk voor intracellulaire interacties met PDZ bindende proteïnen en NR2 subunits (gekozen uit NR2A-D). Het glutamaat bindend domein van NMDA receptoren bevindt zich op de junctie tussen NR1 en NR2. NMDA receptoren kunnen niet functioneren zonder de binding van de co-agonist glycine (gly) op de NR1 subunit. De NMDA receptor is inactief bij de rust membraanpotentialaal door een voltagegevoelige blokkering van de kanaalporie door magnesium ionen. Bij een blijvende activatie van AMPA receptoren depolariseert de postsynaptische cel, waardoor de voltagegevoelige inhibitie wordt opgeheven en NMDA activatie wordt toegelaten. NMDA receptoren zijn permeabel voor calcium en andere ionen. Als de NMDA receptor wordt geactiveerd, treedt er een uitstroom van  $K^+$  en een instroom van  $Na^+$  en  $Ca^{2+}$  op in de postsynaptische cel, wat cruciaal is voor de inductie van NMDA receptor afhankelijke LTP en LTD.

#### 4.1.2. AMPA receptoren

De AMPA receptor zorgt voor een snelle synaptische transmissie in het centrale zenuwstelsel en is opgebouwd uit 4 subunits (GluR1-4) die elk een afzonderlijk gen hebben(20). Het ligand bindend domein bestaat uit de N-terminale regio S1-S2 terwijl de C-terminus bindingsplaatsen bevat voor N-ethylmaleimide gevoelige factor (NSF) en PICK-1, beide signalisatie moleculen. Alle AMPA subunits hebben 2 splits varianten: flip en flop. Aan het C-terminaal eind van de lus tussen TMIII en TMIV bevindt zich de alternatieve splits cassette. AMPA receptoren zijn ondoordringbaar voor  $Ca^{2+}$  in afwezigheid van glutamaat. De calcium permeabiliteit van de GluR2 subunit is afhankelijk van de posttranscriptionele modificatie van het GluR2 mRNA, waarbij een glutamine (Q) in de TMII regio verandert in een arginine (R), Q/R modulatie genaamd. Bevat de TMII regio glutamine, dan is de receptor  $Ca^{2+}$  permeabel, indien de regio arginine bevat niet. In het centrale zenuwstelsel is vooral de R vorm aanwezig.

#### 4.1.3. Kainaat receptoren

Kainaat receptoren zijn opgebouwd uit subunits GluR5-7 en KA1/2(20). De N- terminus vormt samen met de lus tussen TMIII en TMIV het ligand bindend domein. De herintredende TMII lus vormt de binnenkant van de porie van het ionenkanaal. Splits variatie en RNA modulatie treedt ook op bij kainaat receptoren. De kainaat receptoren moduleren de waarschijnlijkheid van het vuren van een postsynaptische cel(22). Ze beïnvloeden ook de concentratie aan neurotransmitters die worden vrijgezet door presynaptische cellen(23). Dankzij deze mechanismen staan kainaat receptoren in voor de regulatie van excitatorische synaptische overdracht, de inhibitorische synaptische overdracht en spelen ze een rol in de synaptische plasticiteit



**Fig. 5: overzicht van ionotrope glutamaatreceptoren en hun subunits** De glutamaat geïnduceerde chloor kanalen vormen een 4<sup>de</sup> groep en zijn niet opgenomen in dit schema(21).

#### 4.1.4. *Glutamaat geïnduceerde chloor kanalen*

Glutamaat geïnduceerde chloor kanalen (GluCl) zijn leden van de Cys-loop familie der ionotrope receptoren, die snelle inhibitorische neurotransmissie tewerkstellen. GluCls worden enkel gevonden in zenuw en spiercellen van invertebraten en zijn daarom potentiële specifieke doelwitten voor insecticiden(24). Er treedt een puur hyperpolariserend effect op na blootstelling van een GluCl aan ibotenaat (een glutamaat analoog). Ze veroorzaken een inhibitorische synaptische transmissie. Ze werden eerst ontdekt in arthropoden als extrajunctionale glutamaat receptoren (H receptoren) die hyperpolarisatie van de pootspier van de sprinkhaan teweegbracht. De inhibitorische ionotrope Glu receptor is selectief voor Cl<sup>-</sup>. Op moleculair en functioneel niveau zijn GluCls slecht gekarakteriseerd. Tot nu toe zijn er 6 GluCls gekend bij de nematode, terwijl in de *Drosophila melanogaster*, slechts 1 is gevonden via hybridisatie screening(24).

#### 4.2. G-proteïne gekoppelde glutamaat receptoren

Metabotrope glutamaat receptoren (mGluR) of G-proteïne gekoppelde glutamaat receptoren worden in groepen opgedeeld op basis van eigenschappen als hun structuur en fysiologische activiteit. Er zijn momenteel verschillende genen gekend die coderen voor mGluRs. Sommige hiervan worden gecreëerd door alternatieve splitsing van mRNA(25). mGluRs spelen een rol bij snelle excitatorische synaptische overdracht en bij de inductie van het synaptisch plasticiteits fenomeen (SPF). SPF is het versterken of afzwakken van synapsen van neuronen waardoor het brein een leerproces doormaakt. Dit wordt ook wel eens lange termijn potentiatie (LTP) en lange termijn depressie (LTD) genoemd. mGluRs staan ook in voor de modulatie van Glu geïnduceerde neurotoxiciteit.

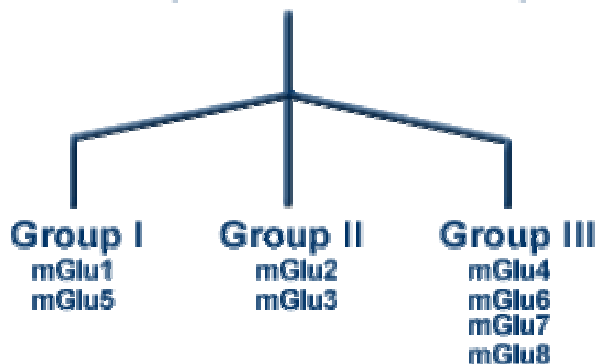
##### 4.2.1. *Classificatie*

mGluR1a is de mGluR die het vroegst in de geschiedenis werd ontdekt. mGluRs werden voor het eerst bestudeerd in *Xenopus* oocyten, die werden getransfecteerd met cDNA van ratten(26). Op basis van mGluR1a werden nadien 7 andere gerelateerde genen en verschillende splits varianten ontdekt. De mGluRs krijgen een nummer van 1-8 op basis van de volgorde waarin ze werden ontdekt. De splits varianten, die momenteel enkel zijn gevonden voor mGluR1, mGluR4 en mGluR5, krijgen een Grieks of Romeins karakterteken achter hun naam. mGluRs worden onderverdeeld in 3 groepen (Fig.6). De verschillen in gensequenties tussen de verschillende groepen ligt op 45%, terwijl de gensequenties van



mGluRs uit dezelfde groep voor 70% identiek zijn. Groep-I bevat mGluR1 en mGluR5. Ze beschikken, buiten over een grote gelijkheid in gensequentie, ook over eenzelfde transductiepad. Groep-I mGluRs stimuleren fosfolipase C (PLC) met een  $\text{Ca}^{2+}$  release uit de interne opslagplaatsen tot gevolg. Binnen dezelfde groep is er weliswaar verschil in de snelheid van  $\text{Ca}^{2+}$  release. Zo zijn mGluR1b en c trager dan mGluR1a in het induceren van een  $\text{Ca}^{2+}$  release. De verklaring hiervoor ligt waarschijnlijk in de affiniteit voor het G-proteïne. Deze affiniteit verschilt namelijk tussen de receptoren. Dit is nog niet bevestigd omdat de G proteïnen die PLC activeren nog niet gekend zijn. De stimulatie van PLC door mGluR1a is gedeeltelijk gevoelig voor het pertussis toxine (PTX), wat zou duiden op tussenkomst van de  $G_i$ - $G_o$  familie(27). Toch wordt mGluR1a niet volledig geïnhibeerd door PTX, waardoor het mogelijk is dat de  $G_q$  familie betrokken is bij de PLC stimulatie.

### Metabotropic Glutamate Receptors



*Fig.6: Overzicht mGluR groepering(20)*

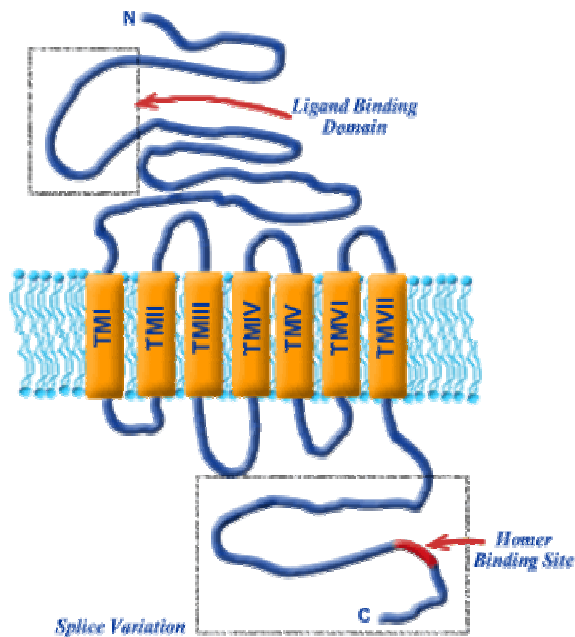
mGluR2 en mGluR3 worden in groep-II ondergebracht terwijl groep-III mGluR4, mGluR6, mGluR7 en mGluR8 bevat. Beide groepen receptoren inhiberen adenylyl cyclase. Groep-II inhibeert cAMP productie (28,29). Voor groep-III was de maximale waargenomen inhibitie slechts 50%. Dit zou kunnen duiden op een onvolledige koppeling van deze receptoren tot dit transductiepad. Wel werd de werking van beide groepen geïnhibeerd door PTX, wat duidt op betrokkenheid van de  $G_i$  familie. De groepen verschillen onderling ook in hun reactie op diverse agonisten (tabel 1).

**Tabel 1: Overzicht van de groepering van mGluRs.** Een overzicht van de voornaamste verschillen tussen de mGluR groepen(30)

Verschillen	Groep-I	Groep-II	Groep-III
Transductiepad	PLC stimulatie	Adenylyl cyclase inhibitie	Adenylyl cyclase inhibitie
G-proteïne	Gi/Go of Gq	Gi	Gi
Meest potente agonist	Quisqualaat	L-CCG-1 en DCG-IV	L-AP4

Een mGluR heeft veel overeenkomsten gemeen met het calciumkanaal PCaR1. Allereerst hebben ze beiden een putatief signaal peptide, waaruit blijkt dat het amino-terminaal domein van de receptor waarschijnlijk extracellulair ligt (fig 7). Ook bevatten ze beide 7 dicht bij elkaar gelegen hydrofobe segmenten, die dienst doet als membraan verankerend domein. De C-terminus ligt intracellulair, is variabel in lengte en niet zo goed geconserveerd tussen de verschillende groepen.

De C-terminus speelt een rol in de transductie van deze receptoren omdat verschillende kinasen hierop kunnen ingrijpen om de activiteit van de receptor te beïnvloeden. In het extracellulaire domein ligt een extra hydrofobe groep, dit is de meest geconserveerde sequentie en tevens het ligand bindend domein. De eerste en derde intracellulaire lus spelen een rol in de G- proteïne koppeling.



**Fig. 7: algemene structuur van mGluRs.** Ze zijn gekoppeld met G-proteïnen en hebben 7-transmembranaire domeinen. De N-terminus is veel groter dan in de adrenerge GPCR familie en bevat het ligand bindend domein. De C-terminus ondergaat de splits variatie. De Homer bindingsplaats is de plaats waar proteïnen van de Homer familie kunnen binden en zo hun regulatorische rol kunnen uitoefenen.

De Glu bindende site is gelegen in een kloof gevormd tussen 2 globulaire domeinen. Na een initiële binding op 1 domein, zal een ander domein plooiën en zo het aminozuur vangen in een zakje(31). mGluRs zijn interessant op het gebied van hun G-proteïne gekoppelde domein omdat ze op dezelfde wijze werken als andere G-proteïne receptoren, maar toch geen gelijkenissen in hun gensequentie vertonen. Toch zijn er aanwijzingen om aan te nemen dat de G-proteïnen verschillende structurele gelijkenissen hebben.

#### 4.2.2. Transductiepad mechanismen

Het effect van Glu op mGluRs kan op diverse manieren worden overgedragen(zie tabel 1). Als Glu bindt op mGluRs van groep 1, wordt hierdoor PLC geactiveerd, wat aanleiding geeft tot het ontstaan van  $IP_3$  en diacylglycerol. protein kinase C wordt hierop geactiveerd.  $IP_3$  zorgt voor een vrijstelling van intracellulaire  $Ca^{2+}$  opslag (cfr bijlage I). Andere transductiepaden werken via de inhibitie van adenylyl cyclase. Dit laatste pad reguleert ook de excitatorische synaptische overdracht in het CA1 gebied van de hippocampus (LTD/LTP) (32). Anderzijds worden voltagegevoelige  $Ca^{2+}$  kanalen, voltagegevoelige  $K^+$  kanalen en andere ionotrope receptoren ook beïnvloed downstream van mGluRs

#### 4.2.3. *Fysiologische rol van mGluR*

mGluRs kunnen zowel excitatorische als inhibitorische effecten hebben. Onder de excitatorische effecten plaatst men 1S, 3R-1-aminocyclopentaaan-1,3-dicarboxylzuur (ACPD) en andere mGluR agonisten, die een traag ontwikkelende depolarisatie en inwaartse stroom induceren, die geassocieerd is met een toename van het vuren van neuron(31). ACPD zorgt er ook voor dat de vuurmodus verandert van een ritmisch uitbarsten naar enkelvoudige spikes. Deze depolariserende effecten zijn waarschijnlijk te wijten aan de inhibitie van  $K^+$  kanalen, Zoals de voltage gevoelige kaliumkanalen ( $IK_M$ ), die het rust membraanpotentiaal van neuron controleren. De toename in vuurratio is waarschijnlijk te wijten aan de inhibitie van  $Ca^{2+}$  geactiveerde  $K^+$  kanalen ( $IK_{AHP}$ ), die een rol heeft in de nahyperpolarisatie die volgt na het actiepotentiaal.  $IK_{AHP}$  en  $IK_M$  hebben ook een rol in de reductie van het actiepotentiaal tijdens een langdurige depolariserende stap.

mGluRs kunnen ook inhibitorische effecten hebben. Ze hyperpolariseren Glu ON bipolaire cellen(31). mGluR zorgt ook voor presynaptische inhibitie en potentiatie, en heeft een rol in synaptische plasticiteit.

mGluR heeft ook een rol in neuronale sterfte. Glu is namelijk neurotoxisch in het brein. Zo is Glu onder andere verantwoordelijk voor de schade die plaatsvindt na ischemie en anoxie. NMDA receptoren hebben een belangrijke rol in deze neurotoxische effecten omdat ze  $Ca^{2+}$  permeabel zijn. Neuronale sterfte treedt niet acuut op maar meestal pas na 24 uur.

Deze vertraagde toxiciteit is waarschijnlijk afhankelijk van Glu- geïnduceerde Glu release. Dus zal mGluR inwerken op neurotoxiciteit via potentiatie van NMDA receptoren, maar zal ook een beschermende rol spelen door presynaptische inhibitie van Glu release.

## 5. Doel van de studie

Er is op genetisch gebied nog niet veel gekend van de sprinkhaan. Een uitgebreidere kennis kan aanleiding geven tot de ontwikkeling van nieuwe, voor de mens minder toxische, insecticiden. In deze studie werd er gezocht naar een metabotrope en een ionotrope glutamaatreceptor bij de *Locusta migratoria*. Met behulp van verbasterde primers en cDNA materiaal van de *Locusta migratoria* werden kandidaatsequenties ontwikkeld voor glutamaat receptoren die later met PCR werden onderzocht. Zo werd de aanwezigheid van de kandidaatsequenties bekeken in verschillende orgaanweefsels.

## MATERIAAL & METHODEN:

### 1. Huisvesting en verzorging van sprinkhanen

Voor de uitgevoerde experimenten werd gebruikt gemaakt van volwassen, migratorische *L. migratoria*. Ze werden geogst uit een dicht bevolkte laboratoriumkolonie die op 32°C werd gehouden en een 14uur/10uur dag/nacht cyclus kende. De proefdieren werden regelmatig voorzien van vers of ingevroren gras. Ook werd een potje met haver ter beschikking gesteld. De dode sprinkhanen werden verwijderd uit de kooi samen met afvalproducten zoals voedselresten

### 2. Isolatie van organen uit *L. migratoria*

De sprinkhanen nodig voor onderzoek werden gewoonlijk per 5 volwassen exemplaren uit de kooi genomen. Ze werden in een plastic bakje geplaatst voorzien van luchtgaten en meegenomen naar de preparatiekamer. De preparatieplaats, schaar, pincet en ander dissectiemateriaal werden ontsmet met alcohol. Nadien werden de sprinkhanen verdoofd met CO<sub>2</sub>. Er werd 0,5 cm van het onderlijf geknipt. Dan werd de kop verwijderd, samen met het spijsverteringsstelsel. Het spijsverteringsstelsel werd in gedestilleerd water gelegd. Hierdoor ontrafelden de buisjes van Malpighi en konden ze makkelijker geïsoleerd worden. Het lijfje van de sprinkhaan werd bilateraal doorgesneden zodat er een ventrale en een dorsale helft werd verkregen. De ventrale helft werd bijgehouden om het thoracaal ganglion te isoleren, aan de dorsale kant werd ongeveer ter hoogte van de vleugels spierweefsel geïsoleerd. Het kopje van de sprinkhaan werd opengeknipt om hersenweefsel te verwijderen. Al het organisch materiaal werd ondergedompeld in *RNAlater* (Ambion, Cambridgeshire, UK) zodat het mRNA niet zou degraderen. Het weefsel werd bewaard in aparte epjes om crosscontaminatie van mRNA tegen te gaan. Materiaal werd bewaard op -80°C

### 3. mRNA extractie uit orgaanweefsel

Nadat de organen geïsoleerd werden, werd er uit dit weefsel RNA geïsoleerd met de RNeasy mini kit (QIAGEN, Benelux). Orgaanmateriaal van *L. migratoria* werd bevroren met vloeibaar stikstof en verpulverd zodat er een fijn mengsel ontstond. Dit werd in een 1,5 ml epje opgevangen. 1000µl RLT buffer werd aangelengd met 10 µl β-mercapto-ethanol. Er werd 600 µl van deze RLT mix toegevoegd aan het epje waarin het verpulverd orgaanmateriaal werd bewaard. Er werd gemengd door met een injectienaald op en neer te pipetteren. Het supernatans werd voorzichtig weggepipetteerd en op een gDNA Eliminator spin filter aangebracht, die geplaatst werd in een 2 ml collectietube. Dit werd 1 minuut gecentrifugeerd op 13000 rondes per minuut (rpm). De flowthrough werd bewaard en de kolom weggegooid. Nadien werd 350µl 70% ethanol toegevoegd bij 350µl flowthrough . Dit werd gemixt door op en neer pipetteren. 700 µl van deze mix, en eventueel het precipitaat dat werd gevormd, werd overgebracht naar een RNeasy spin kolom die bevestigd werd in een 2 ml collectiebuisje. Nadien werd er gewassen met RWi buffer en 2 keer met RPE buffer. Na elke wasstap werd er gecentrifugeerd op 10000 rpm en het flowthrough werd verwijderd. Tenslotte werd de RNeasy spin kolom in een nieuw 1,5 ml epje gebracht en er werd 40 µl RNase-vrij water aangebracht onmiddellijk op het spin kolom membraan. Er werd 1 min gecentrifugeerd op 10000 rpm om het RNA te elueren. Het mRNA werd bewaard op -80°C of er werd onmiddellijk een reverse transcriptase (RT) PCR op uitgevoerd om het onstabiele RNA om te zetten tot stabielere cDNA.

#### 4. RT-PCR: Omzetting mRNA naar cDNA

De RT-PCR werd uitgevoerd met de RT-PCR kit (Promega, Benelux). Het mRNA werd 10 minuten geïncubeerd op 70°C. Daarna werd het kort gespind en op ijs gezet. Er werd 4µl MgCl<sub>2</sub>, 2µl RTasebuffer, 2µl DNTP mix, 0,5µl RNasin, 0,75µl AMV RTase en 1µl Oligo(dT) primers toegevoegd. Daarna werd er kort gespind om alle producten in de vloeistof in contact te laten komen met elkaar.

De stalen werden in de PCR gezet onder het volgende protocol

1. 60 min      45 °C (45-50°C om RNA secundaire structuurproblemen op te lossen)
2. 5 min      95 °C (inactieveert avian myeloblastosis virus (AMV) Rtase en verhindert dat het bindt met cDNA)
3. 5 min      0-5 °C (inactieveert AMV Rtase en verhindert dat het bindt met cDNA)
4. ∞          12 °C (*bewaartemperatuur*)

De concentratie aan cDNA die werd bekomen na de RT-PCR werd bepaald door middel van spectrofotometrie.

#### 5. PCR onderzoek naar metabotrope en ionotrope glutamaatreceptoren

Het cDNA van de RT-PCR werd als basis gebruikt om onderzoek te doen naar de aanwezigheid van specifiek mRNA materiaal in de *Locusta migratoria*. Er werden primers ontwikkeld om de aanwezigheid mGluRs of iGluRs aan te tonen in het cDNA materiaal. Hiervoor werd gebruik gemaakt van PCR. Alle PCRs werden uitgevoerd met een PCR kit van Roche. De PCR mix bevatte altijd PCR buffer, Taq, MgCl<sub>2</sub> en nuclease vrij water. Het cDNA werd bereid via bovenvernoemde procedure, dNTPs werden apart besteld, en de primers werden ontwikkeld door Eurogentech. De hoeveelheden die toegepast werden zijn terug te vinden in de tabel (tabel 2)



**Tabel 2:** overzicht van de producten die in de PCR mix werden gebruikt. De hoeveelheden zijn ook terug te vinden in de handleiding van de Roche Kit. De hoeveelheden in de tabel slaan op de hoeveelheden voor 1 PCR product, met een totaal volume van 25 $\mu$ l

product	hoeveelheid ( $\mu$ l)
PCR buffer	2,5
dNTP	0,15
MgCl <sub>2</sub>	0,75
primer (forward)	1
primer (reverse)	1
cDNA (1 $\mu$ g/ $\mu$ l)	1
Taq	0,25
nuclease vrij water	18,3

### 5.1. Kandidaatssequentie voor de mGluR van de *L. migratoria*

Allereerst werd er gezocht naar een mogelijke kandidaatssequentie voor een mGluR van de *Locusta migratoria*. Er is tot op heden weinig bekend over het genoom van de *L. migratoria*, daarom werden er verbasterde primers ontwikkeld op basis van de alignering van gekende glutamaatreceptoren van verschillende insecten. Met de informatie, bekomen uit deze metabotrope glutamaatreceptoren van insecten, werden 2 paar verbasterde primers ontwikkeld. Verbasterde primers zijn een primermengsel van sterk op elkaar lijkende sequenties, die op strategische plaatsen verschillen in nucleotidesequentie. De plaats en aard van de nucleotideverschillen worden bepaald op basis van verschillen in nucleotidesequenties van gekende glutamaatreceptoren.

De ontwikkelde verbasterde primers werden gebruikt voor een PCR op totaal cDNA materiaal geïsoleerd uit brein, Malpighi, spier en ganglion van *Locusta migratoria*. Het opgeleverde PCR product werd op een agarose gel gebracht en later gesequeneerd. Op basis van deze sequentie werden 2 primers ontwikkeld (PrimerDesign) om de aanwezigheid van deze DNA sequentie aan te tonen in verschillende organen van de sprinkhaan. De primers bakenen een stuk van ongeveer 200bp af. Dit is slechts een deel van de volledige sequentie.

### 5.2. Positieve controle

Er werd een positieve controle gecreëerd om fouten in extractie, PCR producten, ... op te sporen. De positieve controle is gebaseerd op een insuline gerelateerd proteïne van de *L. migratoria*. Zijn coderende sequentie is een huishoudgen. Dit zijn genen die continu tot expressie worden gebracht in de cel, omdat ze instaan voor de basisfuncties van een cel. De cel maakt constant mRNA aan van deze genen, dus ze zijn altijd terug te vinden in het aangemaakt cDNA. Het gebruikte gen is terug te vinden op Pubmed accessie nummer X17024. Er werden 2 primers ontwikkeld om dit mRNA product makkelijk op te sporen in het totaal lichaam cDNA.

### 5.3. Volledige sequentie van GluCl

Er werden verbasterde primers ontwikkeld voor de GluCl van de *Locusta migratoria*. De alignering van de GluCl van de *Drosophila Melanogaster* en die van de *Caenorhabditis elegans* gaf aanleiding tot de ontwikkeling van een verbasterd primerpaar.

Dankzij het toepassen van een RACE PCR op een cDNA bibliotheek werd een volledige sequentie geconstrueerd die in sequentie voor 80% overeenkwam met de reeds gekende GluCls.

Op dit onderzoek werd verder ingegaan door primers te ontwikkelen voor een nested PCR die de volledige GluCl sequentie moest aantonen in cDNA mix van de weefsels buisjes van Malpighi, spier, brein en ganglion. De ontwikkeling van de primers en optimalisatie van het PCR protocol wordt later behandeld in dit document.

## 6. PCR en sequenering

Polymerase chain reaction (PCR) is een techniek die vaak gebruikt wordt in de moleculaire biologie. De PCR gebruikt het enzyme Taq polymerase om uitgaande van een basisstreng DNA een stuk van deze streng te amplificeren in een thermale cyclus. Welk stuk precies wordt geamplificeerd is afhankelijk van de primers die worden gebruikt. Primers zijn stukjes DNA die complementair kunnen binden op welbepaalde plaatsen op het template DNA. In de PCR mix worden dNTPs toegevoegd, die de bouwstenen zijn voor de nieuwe DNA strengen, en een PCR buffer met een bepaalde  $Mg^{+}$  concentratie om de DNA strengen makkelijker te denatureren.

De PCR doorloopt meestal 20-35 cycli van 3 stappen. Tijdens de initialisatiestap wordt de PCR 5 minuten opgewarmd tot een temperatuur van 95°C om al het DNA te denatureren.

Hierop volgt de annealingstap waarbij de temperatuur wordt verlaagd tot een temperatuur waarop de primers kunnen binden met de single strand DNA (ssDNA). De temperatuur waarop dit plaats vindt is afhankelijk van de smelttemperatuur ( $T_m$ ) van de primers en is meestal gelegen tussen 50-64°C. Deze temperatuur wordt zo'n 30 seconden aangehouden. Na de annealing vindt de elongatie stap plaats. Taq polymerase synthetiseert nieuwe DNA strengen complementair met de DNA template streng. Deze temperatuur ligt rond de 72°C en is afhankelijk van het gebruikte merk DNA polymerase. De elongatietijd is afhankelijk van de verwachte lengte van het te amplificeren DNA en algemeen wordt er ongeveer 1000 basen per minuut voor uitgeteld.

RACE PCR is een techniek die in de moleculaire biologie gebruikt wordt om mRNA uiteinden te amplificeren gebruikt makend van een reverse transcription PCR. Het zorgt ervoor dat met een gekend stuk DNA in het midden van de DNA sequentie een stuk kan worden geamplificeerd van een ongekend stuk DNA op het uiteinde van de DNA sequentie. Men kan zowel het 5' als het 3' uiteinde van het mRNA amplificeren.

Nested PCR is bedoeld om aspecifieke primerbinding met onzuiverheden in het PCR product te reduceren. Men ontwikkelt 2 primerparen om 2 achtereenvolgende PCRs uit te voeren. Dit vermindert de kans op aspecifieke bindingen.

Om de nucleotidevolgorde van een bepaald stuk DNA te weten te komen wordt DNAsequencing toegepast. Frederick Sanger was in 1975 de eerste om met de keten terminatie methode de sequenties van DNA eenvoudig en snel in kaart te brengen(33). Hij maakt gebruik van de PCR methode, maar voegt ook een lage concentratie dideoxynucleotiden (ddNTP) toe. Wanneer deze in het DNA worden geïncorporeerd, zal de elongatie beëindigd worden. Door de cyclus te herhalen, gebruik makend van ddATP ddCTP, ddTTP en ddGTP, en achteraf de grootte van de bekomen fragmenten te vergelijken door gebruik te maken van een polyacrylamide of agarose gel, kan men iets te weten komen over de volgorde waarin de nucleotiden zijn geplaatst. De ddNTPs zijn radio of fluorescent gelabeld en kunnen aangetoond worden door respectievelijk blootstelling aan X-stralen en UV licht. Als er voor elke ddNTP een aparte fluorescente kleur wordt gebruikt, kan men alle

ddNTPs samenvoegen zodat het mogelijk wordt om met 1 reactie de DNA sequentie te bepalen. Deze laatste methode wordt dye terminator sequencing genoemd.

Onder tweede generatie sequenceringsmethoden zijn Pyrosequencing en 454 sequencing onder te brengen. Pyrosequencing werd ontwikkeld door Mostafa Ronaghi en is gebaseerd op chemiluminescente enzymatische reacties, die optreden als een moleculaire herkenning plaatsvindt(34-36). Telkens als een nucleotide wordt toegevoegd aan de DNA keten, zorgen een cascade aan enzymatische reacties voor licht emissie. Deze techniek wordt vooral gebruikt voor korte DNA strengen, SNP detectie en methylatie analyse.

De 454 sequencing methode is een grote parallelle sequenceringsmethode door een synthese systeem, die het mogelijk maakt 20 Mbasen DNA sequenties in 4,5 uur te sequencen(37). Het systeem fixeert DNA fragmenten in aerosol en adapter geligeerde DNA fragmenten met DNA vangende kralen in een water-olie emulsie. Het gevangen DNA wordt dan parallel geamplificeerd door PCR in aparte welltjes. Als een nucleotide complementair met de template streng in een well vloeit, wordt de DNA streng verlengd, wat een lichtgevend signaal oplevert door de enzymenmix in de well plaatjes.

## 7. Visualisatie PCR resultaten door gel elektroforese

De PCR resultaten werden geëvalueerd met een gel elektroforese. Er werd een 2% agarose gel bereid door 1g agarose op te lossen in 50 ml TAE buffer. Dit mengsel werd in de magnetron opgewarmd gedurende 2 minuten op 600 W om het oplossen te versnellen. Daarna werd 1/10000 GelRed toegevoegd (in een 50 ml gel 5 µl GelRed). Na het mengen werd het mengsel de tijd gegeven af te koelen in een Gel elektroforese bakje. De bak werd gevuld met TAE buffer tot de gel volledig in de buffer was ondergedompeld. Het PCR eindproduct werd verzaamd met Orange G en op gel aangebracht, waarna het een half uur onder 120V spanning werd gezet. Dan werd de gel gewassen met water gedurende 5 minuten en gevisualiseerd in een UV transilluminator. Ook werden enkele gels met ethidium bromide (EtBr) gekleurd om een onderscheid met GelRed te maken en om de sequenceringsmethode te vergemakkelijken.

## 8. Gelextractie van cDNA

De geextractie van cDNA werd uitgevoerd met de “Qiaquick PCR purificatie kit protocol gebruik makend van een microcentrifuge” (QIAGEN, Benelux). De DNA fragmenten werden uit de gel gesneden en in 1,5 ml epjes gebracht. De gelfracties werden gewogen, er werden 3 volumes QG buffer toegevoegd per volume uitgesneden gel en het geheel werd 10 minuten geïncubeerd op 50°C. Nadien werd per volume gel product evenveel volume isopropanol toegevoegd om de opbrengst te vergroten. Dit product werd op een QIAquick spin kolom aangebracht dat was gemonteerd op een 2 ml collectiebuisje. Daarna werd 1 minuut gecentrifugeerd op volle snelheid (13000 rpm). Het flowthrough werd weggegoten. Nadien werd 0.75 ml Buffer PE op de kolom gebracht en er werd 1 minuut gecentrifugeerd op volle snelheid als wasstap. Flowthrough werd weggegoten en er werd opnieuw gecentrifugeerd om al het achterblijvende ethanol te verwijderen.

De QIAquick kolom werd in een zuiver 1,5 ml microcentrifuge buisje gezet en er werd 35 µl EB buffer aangebracht aan het membraan om het DNA te elueren. Dit werd 1 minuut op rust gebracht en dan 1,5 min gecentrifugeerd op volle snelheid. Het eindproduct werd opgestuurd naar QIAGEN om de gensequentie te bepalen.

## RESULTATEN:

### 1. Huishoudgen

De positieve controle die werd gebruikt om de kwaliteit van het cDNA materiaal en het protocol te testen is gebaseerd op een huishoudgen van de *Locusta migratoria*. Het betreft een insuline gerelateerd peptide van 686bp groot, dat wordt teruggevonden in de sprinkhaan (sequentie 1).

```

1   gccgcccgac accgcaccca gagatgtgga agctgtgctt cgcactgctc 50
51   gccgtgctgg cggctctgctt gtcgacggcc acgcaggcgc agtccgacct 100
101  gttcctcctg tcgcccgaagc gcagcggcgc gccgcagccc gtcgcccgct 150
151  actgcggcga gaagctctcc aacgcgctca agctcgtctg tcgtggaac 200
201  tacaacacca tgttcaagaa ggcttcacaa gatgtgtcag actcggagtc 250
251  tgaagacaac tactggagcg ggcagtccgc ggacgaggcg gcggaggcgg 300
301  cggcggcggc gctgccgcgc taccatcc tggcgcggcc gagcgcgggc 350
351  gggctgctga cgggcgcggg gttccggcgc cgcacgcgcg gegtcttcga 400
401  cgagtgctgc cgcaagacct gcagcatcag cgagctgcag acctactgcg 450
451  gccgccgcta gccgccgcgc cccacaccgc cgccctccta tttattgtcc 500
501  ctgcacggct ctcccagctc acggggggcgc cacggcctcc catcagtatt 550
551  attcttctta tttcgcattt gtttttactg aaattgtata cgttccatgt 600
601  gattcgtaag acgaaagttg gtacaaaaaa ctggtcaaaa ctcgtcaaaa 650
651  taaatttaca tgtgcacaat aaaaaaaaaa nnaaaa 686

```

**Sequentie 1:** Bovenstaande sequentie is het beste huishoudgen voor de *Locusta migratoria* voor ons onderzoeksopzet. Vet gedrukte sequenties zijn de forward en reverse primers die werden ontwikkeld met Primerdesign om de aanwezigheid van deze sequentie aan te tonen. De gehele sequentie codeert een peptide van de insuline superfamilie, het *Locusta* insuline gerelateerde peptide (LIRP).

#### 1.1. Primers van huishoudgen

Volgende primers (*primerdesign*) gebaseerd op dit huishoudgen werden gebruikt als positieve controle (tabel 3).

**Tabel 3:** Geeft een primerpaar (Eurogentech) weer dat werd ontwikkeld als positieve controle. Het beslaat een stuk van de DNasequentie van een gen dat codeert voor een insuline gerelateerd proteïne. In de tabel zijn ook de smelttemperatuur ( $T_M$ ) en het moleculair gewicht van de primers vermeld.

primernaam	sequentie 5'-3'	lengte (bp)	$T_M$ (°C)	moleculair gewicht (g/mol)
House sense	ACCCAGAGAT GTGGAAGCTG	20	62	6191
House antisense	TAGTTGCCAC GACAGACGAG	20	62	6151

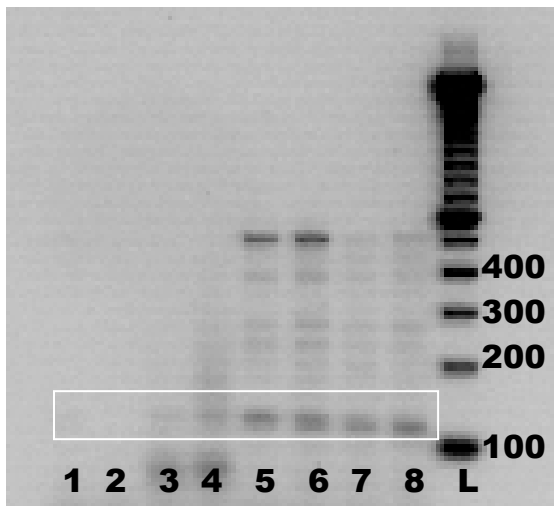
### 1.2. PCR optimalisatie positieve controle

De ontwikkelde primers werden getest op totaal cDNA geïsoleerd uit brein, Malpighi, ganglion en spierweefsel van de *Locusta migratoria*. Er werd gebruik gemaakt van een gradiënt PCR om het protocol te optimaliseren. Het PCR product werd op gel gezet. Er zijn bandjes te zien op een hoogte tussen 100 en 200 bp voor de temperaturen 53°C-56,7°C. De temperaturen werden op gel gerangschikt van laagste naar hoogste temperatuur beginnende van de ladder (fig. 8). Als optimale annealingtemperatuur werd 53°C gekozen. Aan de hand van deze temperatuur werden het volgende PCR protocol uitgevoerd (tabel 4).

**Tabel 4:** Het optimale PCR protocol dat werd gebruikt voor de positieve controle.

stap	tijd	temperatuur
1) denaturatiestap	5 min	94 °C
2) denaturatiestap*	30 s	94 °C
3) annealingstap*	2 min 30s	53 °C
4) elongatiestap*	45 s	72 °C
5) elongatiestap	3 min	72 °C

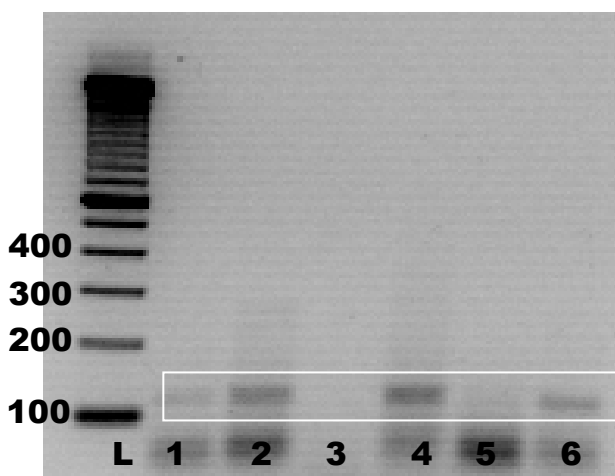
\* Stappen 2 tot en met 4 werden 32x herhaald



**Fig 8 : gradiënt PCR huishoudgen.** Een gradiënt PCR werd ingezet om het protocol van de positieve controle te optimaliseren. Beginnende van de ladder (L) (100bp) is er achtereenvolgens te zien: laan 8 van 53°C annealingstemperatuur, laan 7 met 53,7°C, een laan 6 54,9°C, laan 5 56,7°C, laan 4 59,1°C laan 3 61°C, laan 2 62,2°C, laan 1 63°C. Er zijn bandjes te zien tussen 100 en 200 bp voor de temperaturen 53°C-56,7°C.

### 1.3. Specificiteit huishoudgen

Nadien werd gekeken naar de specificiteit van dit huishoudgen. Het geoptimaliseerde protocol werd toegepast op brein-, Malpighi- en spierweefsel (fig. 9).



**Fig. 9: geoptimaliseerde PCR voor het huishoudgen op totaal cDNA geïsoleerd uit brein, Malpighi, ganglion en spierweefsel van de *Locusta migratoria*.** Deze figuur toont de specificiteit van de positieve controle aan. Boven de 100bp en onder 200bp (cfr ladder) is een band waarneembaar voor al de geteste organen: brein, Malpighi en spier. Van links naar rechts is er een ladder, laan 1 en 2 bevat breinweefsel, laan 3 en 4 Malpighiweefsel en laan 5 en 6 spierweefsel te zien.



## 2. Glutamaatreceptoren in de *L. migratoria*

Tijdens de onderzoeksstage werd getracht de glutamaatreceptoren in de *L. migratoria* beter in kaart te brengen. Zowel het glutamaat geïnduceerde chloor kanaal, een ionotrope glutamaatreceptor, als de aanwezigheid van een metabotrope glutamaatreceptor werd onder de loep genomen.

### 2.1. Een ionotrope glutamaatreceptor, GluCl kanaal, in *L. migratoria*

Er werd onderzoek gedaan naar een volledige sequentie van een ionotrope glutamaat receptor. Als basis werden GluCl kanalen van verschillende organismen genomen.

#### 2.1.1. ontwikkeling van verbasterde primers voor de sequentie van het GluCl kanaal

Als basis werden 2 GluCl kanaal sequenties met elkaar vergeleken (tabel 5). Eén was afkomstig van de *D. Melanogaster* en de ander van de *C. elegans*. De alignering van de twee had een verbasterd primerpaar tot gevolg (tabel 6). De PCR met deze primers gaf aanleiding een DNA sequentie (sequentie 2). Door gebruik te maken van RACE PCR en een cDNA bibliotheek werd een volledige sequentie gevonden uitgaande van de gedeeltelijke sequentie (fig 10-12). De bekomen sequentie (niet toegevoegd) had op DNA niveau een homologie van 80% en op proteïneniveau van 99% met de GluCl kanalen van de *Drosophila melanogaster* en de *C. elegans*.

**Tabel 5:** Deze tabel bevat 2 accessie nummers voor de gensequenties die als basis werden gebruikt voor de ontwikkeling van een degeneratief primerpaar. Dit primerpaar zou dan deels de sequentie van een GluCl kanaal moeten opleveren.

organisme	accessie nummer pubmed
GluCl <i>C. Elegans</i>	AY195803.1
GluCl <i>D. Melanogaster</i>	AF297500.1

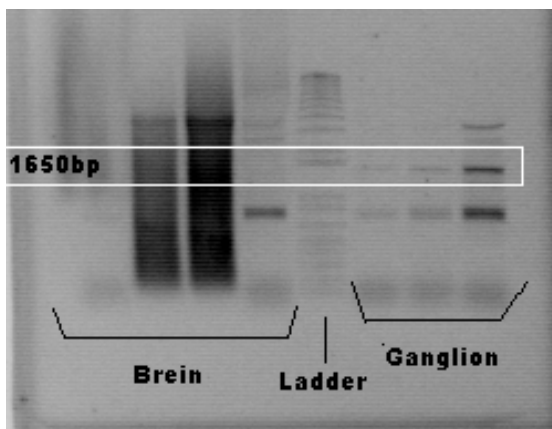
**Tabel 6** Deze tabel bevat 2 verbasterde primers (Eurogentech) Ze werden ontwikkeld om een deel van de sequentie van een iGluR op te sporen bij de sprinkhaan. De primers zijn gebaseerd op de GluCl kanalen van *C. elegans* en die van *D. melanogaster*. In Bijlage VII staat een legende voor de gebruikte letters in de primersequentie.

primernaam	sequentie 5'-3'	lengte (bp)
DEG iGluR FOR	GTMTCATGGG TWTCATTYTG G	21
DEG iGluR REV	TCSAGMAGKG CYCCGAAYAC RAA YGT	26

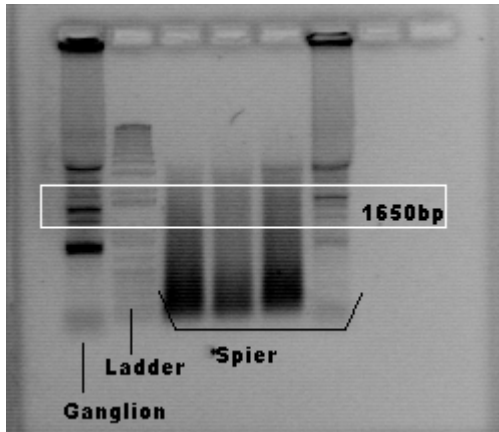
```

1   TGTATCATGG GTATCATTCT GGCTCGATCA GGGTGCCGTT CCCGCACGAG 50
51  TGTCCCTCGG AGTCACCACG CTCCTTACTA TGGCCACCCA AACCTCGGGA 100
101 ATCAACGCCT CACTCCCGCC TGTATCCTAC ACTAAGGCCA TCGACGTTTG 150
151 GACCGGCGTC TGCCTAACAT TCGTATTCGG GGCACCTTCTC GAA           193
  
```

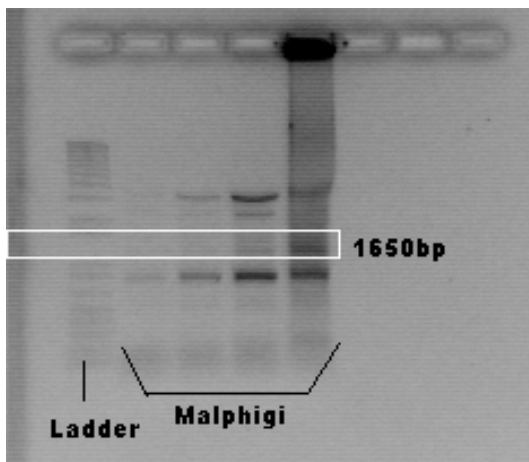
**sequentie 2:** de sequentie opgeleverd door de toepassing van de primers DEG iGluR FOR en DEG iGluR REV. Het is een gedeelte van de sequentie van een iGluR.



**Fig. 10: Resultaat RACE PCR voor brein en ganglion:** Het resultaat van de RACE PCR voor brein en ganglion. Er is een Kbase ladder gebruikt. Er is een band te zien op een hoogte van 1650bp



**Fig. 11: Resultaat RACE PCR voor ganglion en spier** Het resultaat van de RACE PCR voor ganglion en spier. Er is een Kbase ladder gebruikt. Er is een band te zien op een hoogte van 1650bp



**Fig. 12: Resultaat RACE PCR de buisjes van Malpighi:** Het resultaat van de RACE PCR voor de buisjes van Malpighi. Er is een Kbase ladder gebruikt. Er is een band te zien op een hoogte van 1650bp

### 2.1.2. Ontwikkeling van primers voor de *iGluR*

Er werden 2 primerparen (Eurogentech) ontworpen om een nested PCR uit te voeren op totaal cDNA geïsoleerd uit brein, ganglion, Malpighi en spier van de *Locusta migratoria* (tabel 7). Uitgaande van deze primers kunnen we de aanwezigheid van het cDNA voor een GluCl kanaal bevestigen zonder tussenkomst van een cDNA bibliotheek. De optimalisatie van de PCR is gestrand op een negatief resultaat.

**Tabel 7:** In de tabel staan 2 primerparen die werden ontwikkeld voor de nested PCR. Ze beslaan een groot stuk in de sequentie van *GluCl* die in voorgaand onderzoek uit een cDNA bibliotheek werd gehaald. Primers F1 en R1 zijn het ene primerpaar, terwijl F2 en R2 het tweede primerpaar zijn.

primernaam	sequentie 5'-3'	lengte (bp)	T <sub>M</sub> (°C)	moleculair gewicht (g/mol)
LomiGluR_tF1	GAATACATGG GCGCTCCTAA	20	60°C	6126
LomiGluR_tR1	TACACCACCG TGTCTTGAGC	20	62°C	6052
LomiGluR_tF2	CCGTTCTCAG GCAGTACCAT	20	62°C	6052
LomiGluR_tR2	GCAAGACCAC CGTATTGCTT	20	60°C	6077

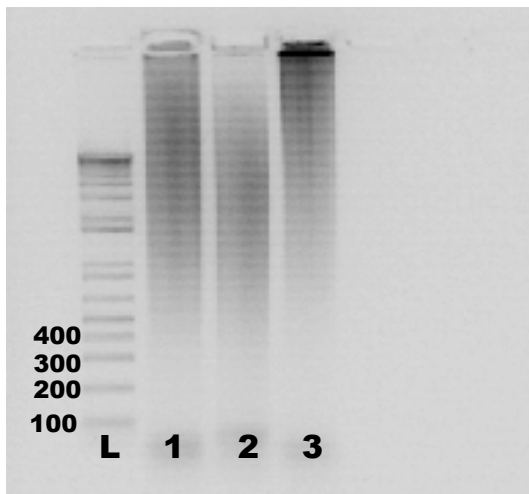
### 2.1.3. Optimalisatie PCR protocol

De nested PCR werd eerst onderworpen aan een temperatuursgradiënt om de PCR te optimaliseren. Aangezien de nested PCR uit twee stappen bestaat, werd er dus ook een gradiënt van de eerste gradiënt PCR ingezet om het ideale protocol te bekomen (tabel 8). Onderstaande gels zijn de resultaten van de nested PCR. Het zijn beide temperatuursgradiënten. Op figuur 13 is er een ladder te zien, een PCRproduct met 57°C annealingtemperatuur, 1 met 60°C annealingtemperatuur en het laatste laantje met 63°C annealingtemperatuur. Nadien werd voor elk van deze PCR producten een temperatuursgradiënt ingezet met dezelfde annealingtemperaturen (57-60-63°C) maar met het 2<sup>de</sup> primerpaar PCR (fig. 14). De samenstelling van de gel die de nested PCR tot gevolg had, wordt weergegeven in een tabel (tabel 9)

**Tabel 8:** het PCR protocol dat werd ontworpen als eerste en tweede stap van de nested PCR

stap	tijd	temperatuur
1) denaturatiestap	5 min	94 °C
2) denaturatiestap*	1 minuut	94 °C
3) annealingstap*	45 sec	57°C 60°C 63°C
4) elongatiestap*	6 min	72°C
5) elongatiestap	8 minuten	72°C

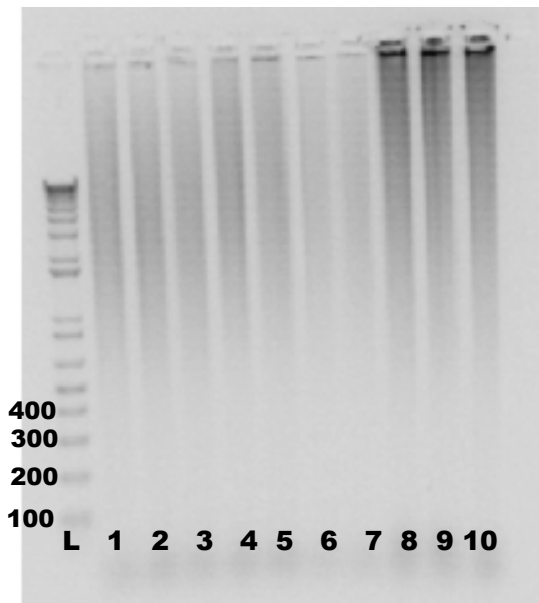
\* Stappen 2 tot en met 4 worden 32x herhaald



**Fig. 13:** Gel van eerste gradiënt PCR van de nested PCR De gel bevat van links naar rechts een 100bp ladder, het PCR product met 57°C annealingstemperatuur, het PCR product met 60°C annealingstemperatuur en het PCR product met 63°C annealingstemperatuur. In geen enkele baan is een bevredigend bandje te zien.

**Tabel 9:** Tabel bevat een overzicht van de gel van de 2<sup>de</sup> nested PCR.

laan	annealingstemp (°C)	1 <sup>ste</sup> PCR	annealingstemp (°C)	2 <sup>de</sup> PCR
L		100 bp ladder		100 bp ladder
1				57
2		57		60
3				63
4				57
5				60
6		60		63
7				63
8				57
9		63		60
10				63



**Fig. 14:** Gel van tweede Gradiënt PCR van de nested PCR: gel met de producten van de 2<sup>de</sup> PCR van de nested PCR. Tabel 9 geeft weer welk product in welk laantje te zien is.

## 2.2. Een metabotrope glutamaat receptor

Allereerst werd er gezocht naar een mogelijke kandidaatssequentie voor een mGluR van de *Locusta migratoria*. Er is tot op heden weinig bekend van de *L. migratoria*, daarom werden er verbasterde primers ontwikkeld op basis van de alignering van gekende glutamaatreceptoren van verschillende insecten zoals de *Drosophila melanogaster*, *Apis Mellifera* en *Anopheles Gambiae*.

### 2.2.1. Ontwikkeling van verbasterde primers mGluR

Voor de ontwikkeling van verbasterde primers werden genen coderend voor mGluRs van de *Drosophila melanogaster*, *Apis Mellifera* en *Anopheles Gambiae* met elkaar vergeleken (tabel 10). Op basis van deze informatie werden de volgende verbasterde primers (tabel 11) ontwikkeld. DEG mGluR F1 is de forward primer die werd ontwikkeld samen met de reverse primer DEG mGluR B1. DEG mGluR F2 en DEG mGluR B2 zijn respectievelijk 2 samenhangende forward en reverse primers.

**Tabel 10:** Tabel vermeldt de accessie nummers van de genen die gebruikt werden voor het ontwerpen van verbasterde primers gerangschikt volgens organisme. De sequenties coderen allemaal metabotrope glutamaatreceptoren van insecten.

organisme	accessie nummer Pubmed
mGluR <i>Drosophila Melanogaster</i>	NP_995780 P91685
mGluR <i>Apis Mellifera</i>	BAD08344 BAD08343
mGluR <i>Anopheles Gambiae</i>	XP_313901

**Tabel 11:** De tabel geeft 2 paar verbasterde primers (Eurogentech) weer, alsook hun lengte, smelttemperatuur ( $T_M$ ) en moleculair gewicht. Deze primers zijn ontwikkeld om mogelijke metabotrope glutamaatreceptoren op te sporen bij de *L. migratoria*. In bijlage VII is de legende terug te vinden voor gebruikte letterafkortingen in de DNA sequentie. Het geeft een idee van de primers die allemaal in de primermix zijn verwerkt

primernaam	sequentie 5'-3'	lengte (bp)	$T_M$ (°C)	moleculair gewicht (g/mol)
DEG mGluR F1	ATGAATTCAATC CYTGGTTTGYDG AATWCTGGGA	34	66,27	10493,7
DEG mGluR B1	TGGAATTCCCGA ARTABAKBGGTA YAAAHGCMAGCCA	37	69,86	11410,13
DEG mGluR F2	TGGAATTCAAAA CRAATCGHATYK CRCGVATCTT	34	65,87	10424,17
DEG mGluR B2	ATGAATCCAWG TSGTRTACATKG TRAAWCCAATA	35	64,09	10769,57

### 2.2.2. Sequentie van een mGluR

Deze verbasterde primerparen werden gebruikt voor het uitvoeren van een PCR op totaal lichaam cDNA materiaal van *Locusta migratoria*. Het opgeleverde PCR product werd op een agarose gel gebracht en later opgestuurd voor sequenering (QIAGEN, Benelux), wat de volgende sequentie opleverde (sequentie 3).



```

1   gcagtactaa caaggaagat tcccgaagct ttcaacgaat ctaaacacat 50
51  aggatttact atgtatacaa catgtggtat atggctggca tttgtaccac 100
101 tatacttcgg aactggaaac catgtgccgc tcagaataac aagtatgtca 150
151 gtgacaatca gcctgtcagc aagtgtgaca ctagcttgtc tgttctcacc 200
201 aaaactgtac atcattctgg tacacccaga gcgtaatggt cgccagacca 250
251 taatgcctgg tcggttcagc agcaggagtc ctgcagtaac aggcacagct 300
301 cagacaggaa gcatgatggc tgcagtagtg tgtagcaatc aacataggcc 350
351 tccattccag gcagcacttc ctcagcaaag tggctcttca caaggacttg 400
401 actctggact tcagagtgat ggagtggacc 430

```

**Sequentie 3:** Deze sequentie werd bekomen met behulp van verbasterde primers. De sequentie van mGluR receptoren van diverse insecten werden onderling vergeleken en op basis hiervan werden verbasterde primers ontwikkeld. Nadien werd er een PCR uitgevoerd op cDNA materiaal van een mix van brein, ganglion, Malpighi en spier van de *Locusta migratoria*, met deze sequentie als resultaat. Vet gedrukte sequenties zijn de sense en antisense primers die werden ontwikkeld om de aanwezigheid van deze sequentie aan te tonen

### 2.2.3. Primers van de mGluR

Op basis van de ontwikkelde sequentie werden 2 primers (tabel 12) ontworpen (PrimerDesign) om de aanwezigheid van deze DNA sequentie aan te tonen in verschillende organen van de *L. migratoria*. Ze bakenen een regio van 219 baseparen (bp) af.

**Tabel 12:** De tabel geeft 2 primers(Eurogentech) weer, alsook hun lengte, smelttemperatuur en moleculair gewicht. Deze primers werden gebruikt om de aanwezigheid aan te tonen van de mGluR coderende DNA sequentie van *Locusta migratoria*.

primernaam	sequentie 5'-3'	lengte (bp)	T <sub>M</sub> (°C)	moleculair (g/mol)	gewicht
LommGluRFOR	GACAATCAGC CTGTCAGCAA	20	55°C	6095	
LommGluRREV	GGAATGGAGG CCTATGTTGA	20	55°C	6237	

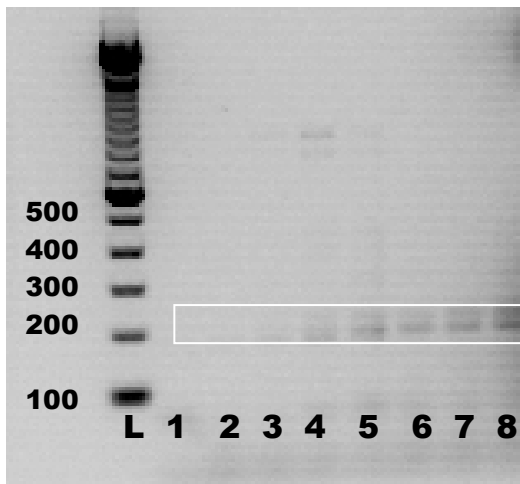
#### 2.2.4. Optimalisatie van het PCR protocol

Het PCR protocol voor het primerpaar LommGluRFOR en LommGluRRev werd geoptimaliseerd door middel van een gradiënt PCR. De verschillende temperaturen voor de elongatietijd werden rond de smeltemperatuur van de primers gekozen om zo te testen wat de ideale elongatietemperatuur is. Er werd gebruik gemaakt van totaal lichaam cDNA materiaal om de PCR zo algemeen mogelijk te houden. Het protocol zag er uit als in tabel 13. Nadat het PCR protocol werd doorlopen werden de bekomen PCR producten samen met orange G op agarose gel gebracht en gevisualiseerd met de UV transilluminator. Er zijn 2 bandjes waarneembaar rond 200bp voor de temperaturen 50°C tot en met 56,1°C. Van links naar rechts is er een 100bp ladder te zien, de volgende 8 laantjes stellen het PCR product van de verschillende annealingtemperaturen voor gerangschikt van hoogste naar laagste temperatuur (fig 15).

**Tabel 13:** in onderstaande tabel is het PCR protocol voor de gradiënt PCR opgenomen. De gradiënt PCR werd uitgevoerd om het PCR protocol te optimaliseren voor het primerpaar mLocGluRREV en mLocGluRFOR. De tabel is chronologisch ingedeeld op basis van de stappen die worden doorlopen.

stap	tijd	temperatuur
1) denaturatiestap	5 min	94 °C
2) denaturatiestap*	30s	94 °C
3) annealingstap*	45s	50°C- 60 °C
4) elongatiestap*	45s	72°C
5) elongatiestap	5 min	72°C

\* Stappen 2 tot en met 4 worden 28x herhaald



**Fig 15: temperatuursgradiënt voor de mGluR.** Deze figuur is agarosegel met temperatuursgradiënt om de ideale PCR condities te bepalen voor het primerpaar LommGluRFOR en LommGluRREV. Van links naar rechts is er in de lanen een 100 basepaarladder te zien (L), daarachter de PCR producten van gradiënt PCR. Van 1 tot 8 respectievelijk 60°C, 59.2°C, 58.0°C, 56.1°C, 53.7°C, 51.9°C, 50.7°C en 50°C. Er zijn bandjes waarneembaar rond 200bp voor de temperaturen 50°C-56,1°C.

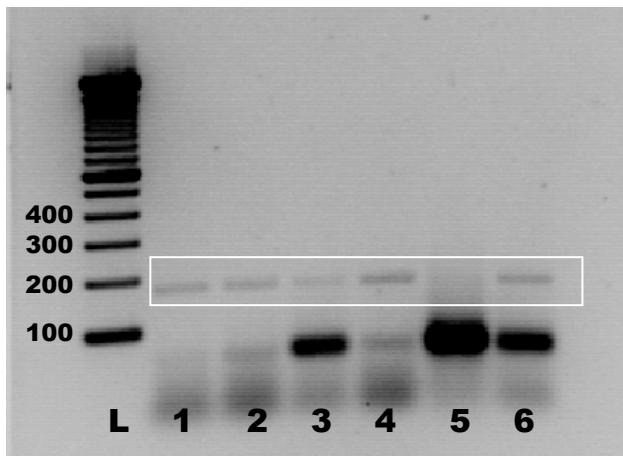
#### 2.2.5. PCR protocol uitgevoerd op totaal cDNA geïsoleerd uit brein, Malpighi, ganglion en spierweefsel

Op basis van de bovenstaande gradiënt PCR werd onderstaand PCR protocol opgesteld. Het primerpaar LommGluRRev en LommGluRFOR werden gebruikt samen met een totale cDNA mix van brein, ganglion, Malpighi en spierweefsel van de *Locusta migratoria* (tabel 14). De geoptimaliseerde PCR leverde volgende agarose gel op. Van links naar rechts is er eerst een ladder te zien, dan 6 laantjes totaal lichaam cDNA. Er is een bandje te zien op 200 bp (fig 16).

**Tabel 14:** Het geoptimaliseerde PCR protocol voor het mLocGluRREV en mLocGluRFOR primerpaar

stap	tijd	temperatuur
1) denaturatiestap	5 min	94 °C
2) denaturatiestap*	30s	94 °C
3) annealingstap*	45s	50,5 °C
4) elongatiestap*	45s	72 °C
5) elongatiestap	5 min	72 °C

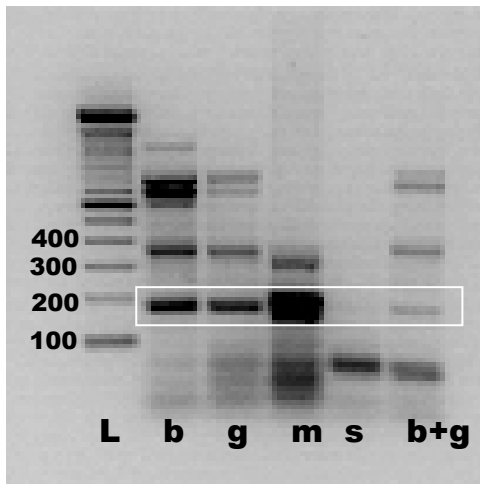
\* Stappen 2 tot en met 4 worden 32x herhaald



*Fig 16: mGluR in een totaal cDNA mix met brein, spier, ganglion, en malpighi weefsel. Het eerste laantje representeert een 100 bp ladder. De volgende 6 laantjes zijn de cDNA resultaten na PCR. Er zijn bandjes te zien rond 200 bp.*

#### *2.2.6. Geoptimaliseerd PCR protocol voor de mGluR uitgevoerd op specifiek weefsel*

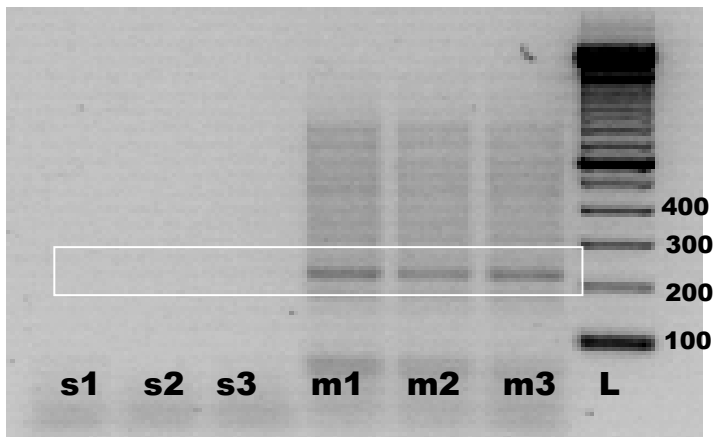
Nu er zekerheid is dat het geoptimaliseerde protocol bandjes geeft op de gewenste hoogte, wordt het PCR protocol weefselspecifiek toegepast. Er werd uit de sprinkhanen apart mRNA geïsoleerd uit respectievelijk brein, ganglion, buisjes van Malpighi, spier en de combinatie brein en ganglion. Hieruit werd cDNA gemaakt wat als template DNA werd gebruikt voor PCR. De hieruit resulterende gel staat hieronder afgebeeld. Ze bevat van links naar rechts een 100bp ladder, PCR product van breinweefsel, van ganglion-, Malpighi-, spierweefsel en tenslotte van de combinatie brein+ganglionweefsel. Er zijn bandjes te zien rond 200bp voor elk weefsel, behalve spierweefsel.(fig. 17)



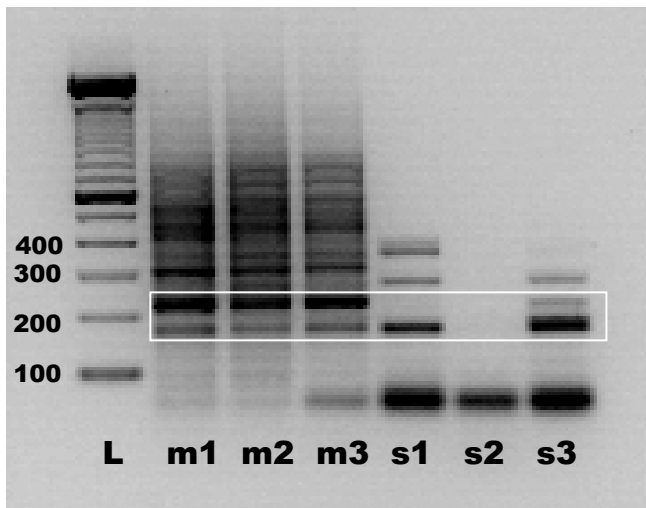
*Fig 17: mGluR aanwezig in specifieke organen* Op deze figuur is weergegeven, van links naar rechts, een 100bp ladder, PCR van breinweefsel (b), ganglionweefsel (g), Malpighiweefsel (m), spierweefsel (s) en tenslotte brein+ganglionweefsel (b+g). De bandjes op 200 bp werd waargenomen in elk laantje, behalve bij spierweefsel.

#### 2.2.7. Band op 200bp voor spierweefsel.

Er werd een PCR gestart om het cDNA densiteit te verhogen. De PCR werd ingezet met bekend protocol en spier- en Malpighiweefsel als template DNA. Van dit PCR product werd 10 $\mu$ l op gel gebracht, de rest werd bewaard om als template te dienen voor een herhaling van het PCR protocol. De gel van de eerste PCR gaf opnieuw enkel een band op 200bp voor Malpighiweefsel en geen voor spierweefsel. Vanaf de 100bp ladder zijn er op de gel 3 laantjes Malpighiweefsel en 3 laantjes spierweefsel te zien (fig. 18). Met de 15 $\mu$ l cDNA materiaal dat niet op gel werd gezet werd opnieuw een PCR uitgevoerd met het gewoonlijke PCR protocol. 10 $\mu$ l van dit PCR product werd op gel gezet terwijl de andere 15  $\mu$ l werd bewaard om verder mee te werken. Op de gel is er van links naar rechts een 100 bp ladder, 3 laantjes Malpighiweefsel en 3 laantjes spierweefsel te zien. Het Malpighiweefsel geeft een smeer, terwijl het spierweefsel bandjes geeft op de gewenste hoogte van 200bp (fig. 19).



*Fig. 18: Spierweefsel eerste PCR LocmGluR 9: de eerste drie laantjes (s1-s3) zijn gevuld met spierweefsel, er is opnieuw geen bandje te bespeuren. De andere 3 laantjes (m1-m3) nabij de DNA ladder is Malpighi. Ondanks de "besmeuring" van genomisch DNA is er toch nog een duidelijke 200 bp band te zien.*



*Fig. 19: Spierweefsel 2<sup>de</sup> PCR in het eerste laantje is een 100bp DNA ladder te zien, de volgende 3 bandjes zijn Malpighi. Hier zijn 2 bandjes te zien op 200bp, alsook een smeer over de gehele lengte. De laatste 3 bandjes zijn spierweefsel waar een band ter hoogte van 200 bp waarneembaar is.*

## DISCUSSIE:

Het onderzoek had als doel de kennis over glutamaatreceptoren van de sprinkhaan aan te dikken. Er werden zowel ionotrope als metabotrope glutamaatreceptoren bestudeerd. Ook werd er gebruik gemaakt van een huishoudgen als positieve controle van de PCR. Er is genetisch gezien nog niet veel gekend van dit organisme waardoor er via alignering met beter gekende organismen naar analogieën werd gezocht.

### 1. Zoektocht naar een geschikt huishoudgen

Het feit dat de sprinkhaan een solitaire en een migratoire fase kent is een probleem bij het zoeken naar een geschikt huishoudgen. De externe verschillen zijn een directe afspiegeling van hun genetische divergentie. Zo verandert de concentratie van huishoudgenen uit verschillende categorieën weefselspecifiek bij de overgang van het solitair organisme naar migratie(38). Zo zijn er veranderingen gedetecteerd bij peptidase activiteiten, zuurstof bindende peptiden, en apoptose gerelateerde genen(38,39). Het huishoudgen waarvoor uiteindelijk werd geopteerd codeert een insuline gerelateerde peptide (LIRP) met een grootte van 686 bp. Vorig onderzoek heeft uitgewezen dat de concentratie van het transcript van dit gen bij de sprinkhaan niet erg schommelt in de tijd of spatiaal (40).

Met de ontwikkelde primers werd aangetoond dat er een transcript gevormd wordt voor het insuline gerelateerde proteïne. Dit bevestigt de rol van LIRP als betrouwbare positieve controle bij de *Locusta migratoria* voor de organen spier, buisjes van Malpighi en brein.

### 2. Zoektocht naar een metabotrope glutamaatreceptor

Voor de zoektocht naar een metabotrope glutamaatreceptor werden mGluRs van de *Drosophila melanogaster*, *Apis Mellifera* en *Anopheles Gambiae* vergeleken met elkaar. Al deze organismen zijn evolutief gezien nauw met elkaar en met de *Locusta migratoria* verbonden, wat de kans op analogie met de sprinkhaan vergroot(41). Ze behoren tot hetzelfde koninkrijk, dat van de animalia, hetzelfde phylum, arthropoda en dezelfde klasse, insecta.

De sequentie die de primerparen oplevert vertoont op nucleotideniveau homologie met de gekende mGluRs van de *Drosophila melanogaster*, *Anopheles Gambiae* en *Apis*

*mellifera*(42). Zo is de homologie van de *L. migratoria* mGluR sequentie voor 77% homoloog met die van de *Drosophila*, 75% met die van de *Anopheles* en 72% met de mGluR sequentie van de *Mellifera*. Dit BLAST resultaat is een hoopgevende indicatie dat de sequentie inderdaad een mGluR is. De *Locusta migratoria* mGluR is iets meer analoog met AmGluRA(75%) van de *Apis mellifera* dan met AmGluRB(72%). Bij de hongiingbij zijn namelijk 2 mGluRs tot op heden geïdentificeerd AmGluRA en AmGluRB(43). Het verschil tussen beide subtypes vindt echter vooral op fysiologisch vlak plaats, dus is het wijselijk nog geen conclusies te trekken omtrent nauwere verbondenheid met 1 van deze AmGluR subtypes. De 77% homologie met de *Drosophila melanogaster* was terug te brengen naar de mXR glutamaatreceptor. Deze mGluR is nog niet voldoende gekarakteriseerd, maar hij behoort zeker niet tot de groep I mGluRs(44). De mXR van de fruitvlieg kan enkel geactiveerd worden door insect extracten(44), wat doet vermoeden dat deze mGluR enkel bij insecten terug te vinden is. Deze theoriën moeten later nog door fysiologische experimenten bevestigd worden bij de *Locusta migratoria*.

Er werd een dubbele band waargenomen ter hoogte van 200 bp tijdens de optimalisering van het PCR protocol voor de mGluR. Dit kan het gevolg zijn van de aanwezigheid van 2 isovormen. Door het uitsluiten van een klein intron is dit transcript kleiner dan het transcript waar de intron wel aanwezig is. Het langere transcript ligt dan ook hoger op de gel dan het kortere transcript. Een andere verklaring voor de dubbele band is dat er een aspecifieke binding heeft plaatsgevonden van ongeveer dezelfde grootte als het theoretische fragment. Deze theorie lijkt minder waarschijnlijk omdat er geen andere aspecifieke bindingen in de baan te zien zijn buiten de 2 banden rond 200bp. Om hierover zekerheid te krijgen moet de sequentie worden gesequeneerd.

Bij spierweefsel is het mGluR transcript aanwezig, maar in mindere mate. De extra banden aanwezig op andere hoogten kunnen aspecifieke bindingen zijn die bijvoorbeeld optreden na genomisch DNA besmetting van het cDNA staal. In het licht van dit onderzoek kunnen de aspecifieke bindingen genegeerd worden aangezien ze niet in de buurt van 200bp optreden, waar de interessesequentie is gelegen. De aanwezigheid van het mGluR transcript resulteert niet altijd in minder receptoren op het membraanoppervlak van de spiercel. Hier is geen



besluit over te maken enkel en alleen op basis van cDNA. Dit gegeven moet later onderzocht worden op proteïneniveau.

Deze studie heeft mGluR aangetoond in het brein, ganglia, spier en buisjes van Malpighi. De mGluR heeft een rol in verschillende breinfuncties zoals het synaptische plasticiteitssyndroom (15,16), wat de aanwezigheid hier zou kunnen verklaren. In ganglia is mGluR betrokken in de synaptische overdracht(45). In spiercellen van de *Drosophila* is een mGluR aanwezig, DGluRII, dat bij een mutatie zorgt voor abnormale neuromusculaire signalisering(46). Bij de *Locusta Migratoria* is het denkbaar dat de mGluR een gelijkaardige rol speelt bij de neuromusculaire overdracht. De buisjes van Malpighi bevatten een accessorische musculatuur wat een mogelijke verklaring geeft waarom mGluR hier aanwezig is.

### 3. Zoektocht naar een ionotrope glutamaatreceptor

De gehele DNA sequentie van de cDNA bibliotheek had een homologie tot 80% met de reeds gekende GluCl van de *Drosophila*. Op proteïneniveau loopt deze homologie zelfs op tot 99% met de GluCl kanaal  $\alpha$  subunit (DmGluCl $\alpha$ )(47).

De optimalisatie van de annealingtemperatuur van het PCR protocol om het GluClkanaal transcript aan te tonen in totaal lichaam cDNA van de *Locusta migratoria* had echter niet het gewenste resultaat. Verdere optimalisatie van cDNA concentratie, elongatietijd of gebruik van andere PCRmix concentraties gaven eveneens geen gunstig resultaat. Men zou kunnen argumenteren dat het GluCl kanaal transcript niet aanwezig is in de *Locusta migratoria*. Het onderzoek met de cDNA bibliotheek wijst echter op de aanwezigheid van GluCl kanaal transcript. Een vorig gepubliceerd artikel maakt melding van een functioneel GluCl kanaal op het oppervlakte van DUM neuronen van de *Locusta migratoria*(24). Het is mogelijk dat de transcriptie van mRNA van het GluCl kanaal op welbepaalde tijdstippen plaatsvindt, en dat het daarom onvindbaar is in de gel of het zou kunnen dat de transcriptie met zo'n lage snelheid gebeurt dat het niet waarneembaar is met de PCR. Aangezien de nested PCR 2x 32 cycli inhouden, lijkt dit echter minder waarschijnlijk, rekening houdend met het exponentieel karakter van de PCR. De meest waarschijnlijke verklaring is dat de primers onvoldoende efficiënt zijn. Aangezien GluCl kanalen reeds zijn aangetoond in spier en zenuwcellen van diverse invertebraten(45), waar ze een inhibitorische functie hebben, is het goed mogelijk dat

de GluCl kanalen ook in het weefsel van de *Locusta migratoria* te vinden is. De ontwikkeling van nieuwe primers voor het GluCl kanaal transcript is dan ook de meest logische volgende stap naar de toekomst toe.

#### 4. Toekomstperspectieven

Een kanttekening die zeker dient gemaakt te worden bij dit onderzoek is dat de aanwezigheid van mRNA niet altijd evenredig is met de aanwezigheid van de eindproteïne. Het mRNA overgeschreven van het DNA moet namelijk nog door het kernmembraan worden getransporteerd. Daarna moet het nog door ribosomen omgezet worden naar een proteïne en dit voordat het mRNA is gedegradeerd. Er zijn dus nog verschillende controlepunten die moeten doorkruist worden alvorens de receptor kan geïncorporeerd worden in het celmembraan. Om terecht te kunnen aannemen dat deze kanalen aanwezig zijn op het celoppervlak kan men best gebruik maken van specifieke antigenen. In de toekomst lijkt het me dan ook nuttig om fluorescerende antilichamen te ontwikkelen voor respectievelijk het mGluR en GluCl. Omdat deze receptoren enkel functioneel zijn op het celoppervlak kan men via fluorescentiemicroscopie dan onomstotelijk aantonen dat de kanalen aanwezig zijn. Men kan ook werken via western blot om de aanwezigheid van het proteïne aan te tonen. Het gebruik van deze technieken wordt echter verhinderd door het feit dat er genetisch gezien nog niet veel bekend is van de sprinkhaan. Men moet dus nog beginnende van niets een antilichaam gaan ontwikkelen.

Om aan te tonen dat de receptoren functioneel aanwezig zijn kan men via patch clamp proberen de gevonden kanalen te karakteriseren. Voordat dit gebeurt, moet eerst de volledige cDNA sequentie gekend zijn van de kanalen. Nadien kunnen die dan geïncorporeerd worden in CHO cellen. Wanneer deze CHO cellen de kanalen tot expressie brengen, kan men patch clamp onderzoek verrichten.

## 5. Conclusie

Dit onderzoek heeft uitgewezen dat men voorzichtig kan aannemen dat er actief mRNA wordt aangemaakt in de *Locusta migratoria*, en dat voor een metabotrope glutamaat receptor en zeer waarschijnlijk ook voor een glutamaat geïnduceerde receptor. Voor de mGluR is dit bevestigd voor spier-, brein-, ganglion- en Malpighiweefsel. De mGluR zou wel eens insectspecifieke kunnen zijn en behorend tot groep II of groep III mGluRs.

Dit onderzoek is het eerste dat de aanwezigheid van een mGluR bij de *Locusta migratoria* heeft kunnen aantonen. Men moet echter voorzichtig blijven als men wil beweren dat er dan ook functionele proteïnen aanwezig zijn in de *L. migratoria*. Om hierover zekerheid te krijgen is verder onderzoek, zowel met patch clamp als met immunofluorescente technieken noodzakelijk. Er is nog steeds enorm weinig bekend van de *Locusta migratoria*. Voor de ontwikkeling van soortspecifieke insecticiden is een grondigere kennis van dit organisme onontbeerlijk.

**LITERATUURLIJST:**

1. www.FAO.org
2. Burrows M. Glutamate in *The Neurobiology of an Insect Brain* Oxford University Press, 1996; 171-174
3. Krall S. Importance of locusts and grasshoppers for African agriculture and methods for determining crop losses in *Deutsche Gesellschaft für Technische Zusammenarbeit, Eschborn* 1994
4. Tiago PV, Fungaro MH, Furlaneto MC. Cuticle-degrading proteases from the entomopathogen *Metarhizium flavoviride* and their distribution in secreted and intracellular fractions in *Letters in Applied Microbiology* 2002;34: 91-94.
5. Burrows M. Anatomy of the nervous system in *The Neurobiology of an Insect Brain* Oxford University Press 1996; 194-207
6. Burrows M. Anatomy of the nervous system in *The Neurobiology of an Insect Brain* Oxford University Press 1996; 12-36
7. Oudejans R, Vroemen S, Jansen R. Locust adipokinetic hormones: Carrier-independent transport and differential inactivation at physiological concentrations during rest and flight, *Neurobiology* 1996; 93: 8654-8659
8. Pflugger H, Watson A. Structure and distribution of dorsal unpaired median (DUM) neurones in the abdominal nerve cord of male and female locusts, *Journal of Comparative Neurology* 1988 Feb 15;268: 329-45
9. Grolleau F, Lapied B. Dorsal unpaired median neurones in the insect central nervous system: towards a better understanding of the ionic mechanisms underlying spontaneous electric activity, *Journal of Experimental Biology* 2000; 203: 1633-48
10. Mentel T, Duch C, Stypa H. Central Modulatory Neurons Control Fuel Selection in Flight Muscle of Migratory Locust, *The Journal of Neuroscience* 2003; 23: 1109
11. Bear M, Connors B, Paradiso M. *Synaptic transmission in Neuroscience exploring the brain*, Pennsylvania, Lippincott Williams & Wilkins; 2001 2de editie: 105-19
12. Rossi D, Brambilla L, Valori C. Defective Tumor Necrosis Factor- $\alpha$ -dependent Control of Astrocyte Glutamate Release in a Transgenic Mouse Model of Alzheimer Disease, *Journal of Biological Chemistry* 2005; 280: 42088-42096

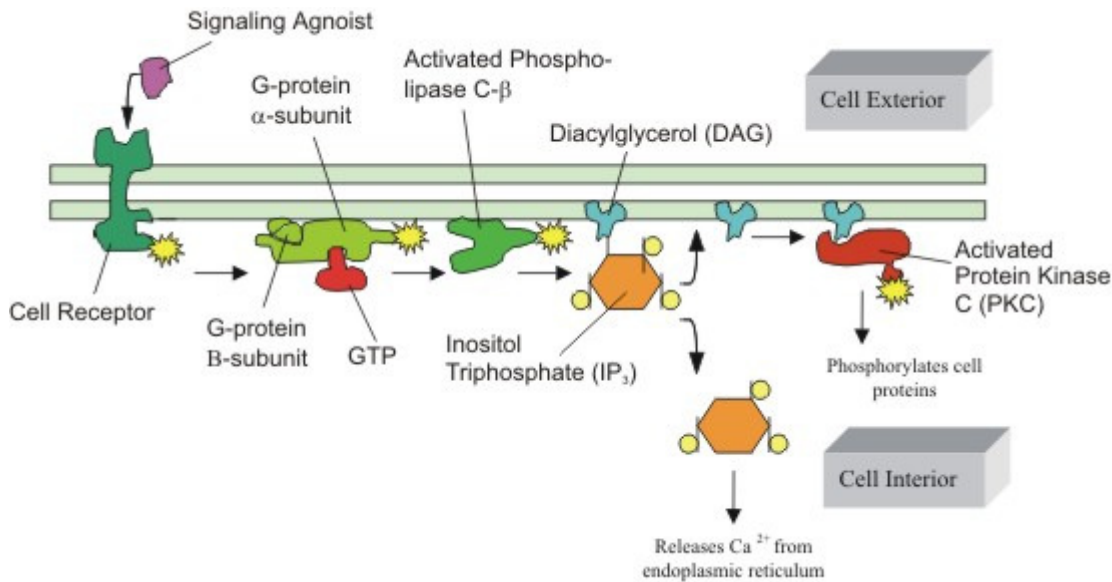
13. Baumeister F, Shin Y, Egger J. Glutamate in Pyridoxine-Dependent Epilepsy: Neurotoxic Glutamate Concentration in the Cerebrospinal Fluid and Its Normalization by Pyridoxine, *PEDIATRICS* 1994; 94: 318-321
14. Riedel G, Casabona G, Reymann K. Inhibition of Long-Term Potentiation in the Dentate Gyrus of Freely Moving Rats by the Metabotropic Glutamate Receptor Antagonist MCPG, *The Journal of Neuroscience* 1995; 15: 87-98
15. Manahan-Vaughan D. Group 1 and 2 Metabotropic Glutamate Receptors Play Differential Roles in Hippocampal Long-Term Depression and Long-Term Potentiation in Freely Moving Rats, *Journal of Neuroscience* 1997; 17: 3303-3311
16. Calabresi P, Centonze D, Gubellini P. Glutamate-Triggered Events Inducing Corticostriatal Long-Term Depression, *Journal of Neuroscience* 1999; 19: 6102-6110
17. Locatelli F, Bundrock G, Müller U. Focal and Temporal Release of Glutamate in the Mushroom Bodies Improves Olfactory Memory in *Apis mellifera*, *The Journal of Neuroscience* 2005; 25: 11614-11618
18. Xia S, Miyashita T, Fu TF. NMDA receptors mediate olfactory learning and memory in *Drosophila*, *Current Biology* 2005; 15: 603–615
19. Petrenko A, Yamakura T, Baba H. The Role of *N*-Methyl-D-Aspartate (NMDA) Receptors in Pain: A Review, *Anesthesia & Analgesia* 2003; 97: 1108-1116
20. Howe J. How Glutamate Receptors Are Built, *The Neuroscientist* 1999; 5: 311-323
21. <http://www.bris.ac.uk/Depts/Synaptic/info/glutamate.html>
22. Mayer ML. Crystal structures of the GluR5 and GluR6 ligand binding cores: molecular mechanisms underlying kainate receptor selectivity, *Neuron* 2005; 45: 539–552
23. Song I, Huganir RL. Regulation of AMPA receptors during synaptic plasticity, *Trends in Neurosciences* 2002; 25: 578–5
24. Janssen D, Derst C, Buckinx R. Dorsal Unpaired Median Neurons of *Locusta migratoria* express Ivermectin- and Fipronil-sensitive glutamate-gated chloride channels, *Journal of Neurophysiology* 2007; 97: 2642-2650
25. Nakanishi S. Molecular diversity of glutamate receptors and implications for brain function, *Science* 1992; 258: 597–603

26. Houamed K, Kuijper J, Gilbert T. Cloning, expression, and gene structure of a G-proteïne-coupled glutamate receptor from rat brain, *Science* 1991; 251: 1318–1321
27. Aramori I, Nakanishi S. Signal transduction and pharmacological characteristics of a metabotropic glutamate receptor, mGluR1, in transfected CHO cells, *Neuron* 1992; 8: 757–765
28. Tanabe Y, Masu M, Ishii T. A family of metabotropic glutamate receptors, *Neuron* 1992; 8: 169–179
29. Tanabe Y, Nomura A, Masu M. Signal transduction, pharmacological properties, and expression patterns of two rat metabotropic glutamate receptors, mGluR3 and mGluR4, *Journal of Neuroscience* 1993; 13: 1372–1378
30. Pin J en Duvoisin R. Review: Neurotransmitter receptors I The metabotropic Glutamate Receptors: Structure and Functions, *Neuropharmacology* 1995; 34: 5
31. Pin J en Duvoisin R. Review: Neurotransmitter receptors I The metabotropic Glutamate Receptors: Structure and Functions, *Neuropharmacology* 1995; 34: 1-26
32. Gereau R, Conn R. A cyclic AMP-dependent form of associative synaptic plasticity induced by coactivation of  $\beta$ -adrenergic receptors and metabotropic glutamate receptors in rat hippocampus, *Journal of Neuroscience* 1994; 14: 3310–3318
33. Sanger F, Nicklen S, Coulson AR., DNA sequencing with chain-terminating inhibitors, *Proceedings of the Nationall Academy of Science* 1977 ; 74: 5463-7
34. Ronaghi et al. Real-time DNA sequencing using detection of pyrophosphate release, *Analytical Biochemistry* 1996
35. Ronaghi et al. A sequencing method based on real-time pyrophosphate, *Science* 1998
36. Ronaghi et al. Improved performance of Pyrosequencing using single-stranded DNA-binding protein, *Analytical Biochemistry* 2000
37. Margulies et al. Genome Sequencing in Microfabricated High-Density Picolitre Reactions, *Nature* 2005
38. Kang L, Chen X, Zhou Y. The analysis of large-scale gene expression correlated to the phase changes of the migratory locust, *Proceedings of the National Academy of Sciences* 2004; 101: 17611–17615
39. Eisenberg E, Levanon E. Human Housekeeping genes are compact, *Trends in Genetics* 2003; 19: 362-365

40. Kromer-Metzger E, Lagueux M. Expression of the gene encoding an insulin-related peptide in *Locusta* (Insecta, Orthoptera). Evidence for alternative promoter usage, *European journal of biochemistry* 1994; 222: 427-34
41. Zahradnik J, Chvala M. *De grote encyclopedie der insekten*, Rebo 1991.
42. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>
43. Funada M, Yasuo S, Yoshimura T. Characterization of the two distinct subtypes of metabotropic glutamate receptors from honeybee, *Apis mellifera*, *Journal of Neuroscience* 2004; 359: 190-194
44. Mitri C., Parmentier ML, Pin JP. Divergent evolution in metabotropic glutamate receptors. A new receptor activated by an endogenous ligand different from glutamate in insects, *Journal of Biological Chemistry* 2004; 279: 9313-9320
45. Cleland TA. Inhibitory glutamate receptor channel. *Molecular Neurobiology* 1996; 13: 97-136
46. Cartmell, J, and Schoepp DD. Regulation of neurotransmitter release by metabotropic glutamate receptors, *Journal of Neurochemistry* 2000; 75: 889-907
47. Kane NS, Hirschberg B, Qian S. Drug-resistant *Drosophila* indicate glutamate-gated chloride channels are targets for the antiparasitics nodulisporic acid and ivermectin, *Proceedings of the National Academy of Science* 2000; 97: 13949-13954
48. [http://www.ruf.rice.edu/~rur/issue1\\_files/Biology/Barron/Barron\\_3\\_small.jpg](http://www.ruf.rice.edu/~rur/issue1_files/Biology/Barron/Barron_3_small.jpg)
49. Grolleau F. Lapied B. Dorsal unpaired median neurones in the insect central nervous system: towards a better understanding of the ionic mechanisms underlying spontaneous electric activity *Journal of Experimental Biology* 2000; 203:1633-48
50. Krall S. Importance of locusts and grasshoppers for African agriculture and methods for determining crop losses. *Deutsche Gesellschaft für Technische Zusammenarbeit*, Eschborn 1994
51. [http://commons.wikimedia.org/wiki/Locusta\\_Migratoria](http://commons.wikimedia.org/wiki/Locusta_Migratoria)
52. [www.bmrb.wisc.edu](http://www.bmrb.wisc.edu)

## BIJLAGEN

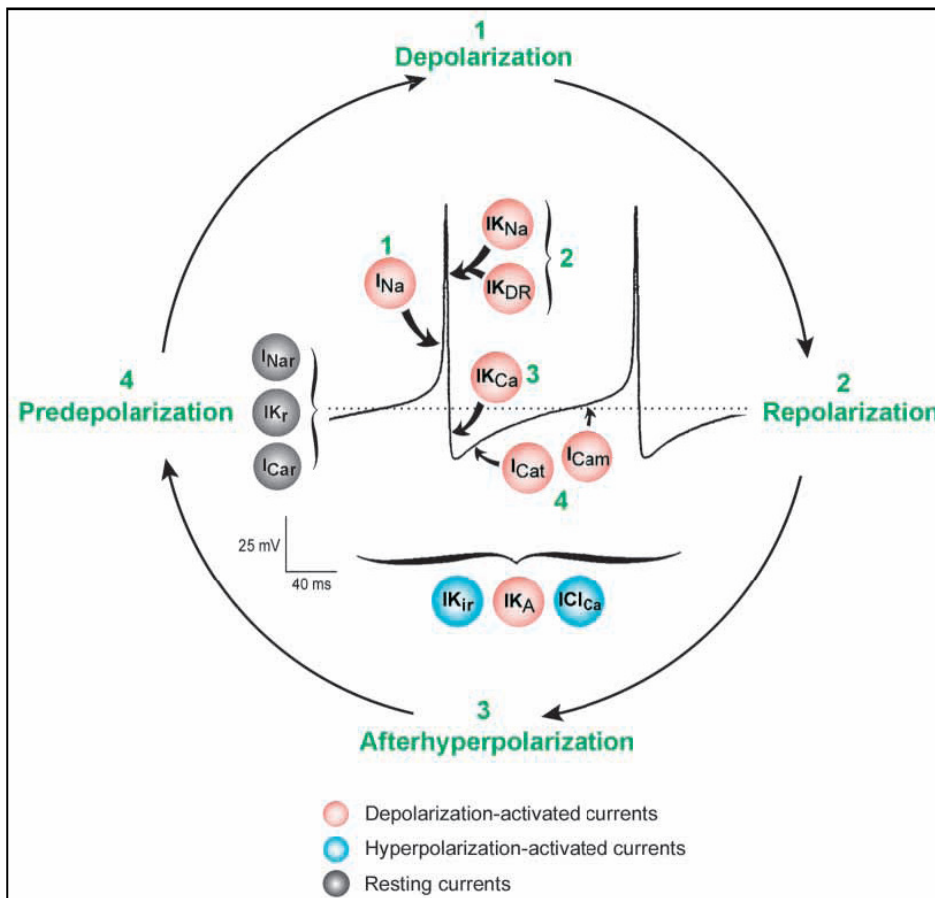
## BIJLAGE I



**Bijlage I: Fosfolipase C beïnvloedt Ca<sup>2+</sup>opslag.** Een signaliserende agonist, in ons geval glutamaat, activeert een metabotrope glutamaatreceptor. Het G proteïne aan de cytosol zijde van het plasma membraan zal, met GTP als energiebron, fosfolipase C (PLC) activeren. PLC zal diacylglycerol activeren, wat aanleiding geeft tot proteïne kinase C (PKC) en inositol trifosfaat (IP<sub>3</sub>). IP<sub>3</sub> zorgt op zijn beurt voor de vrijzetting van intracellulair calcium uit het endoplasmatisch reticulum(48).



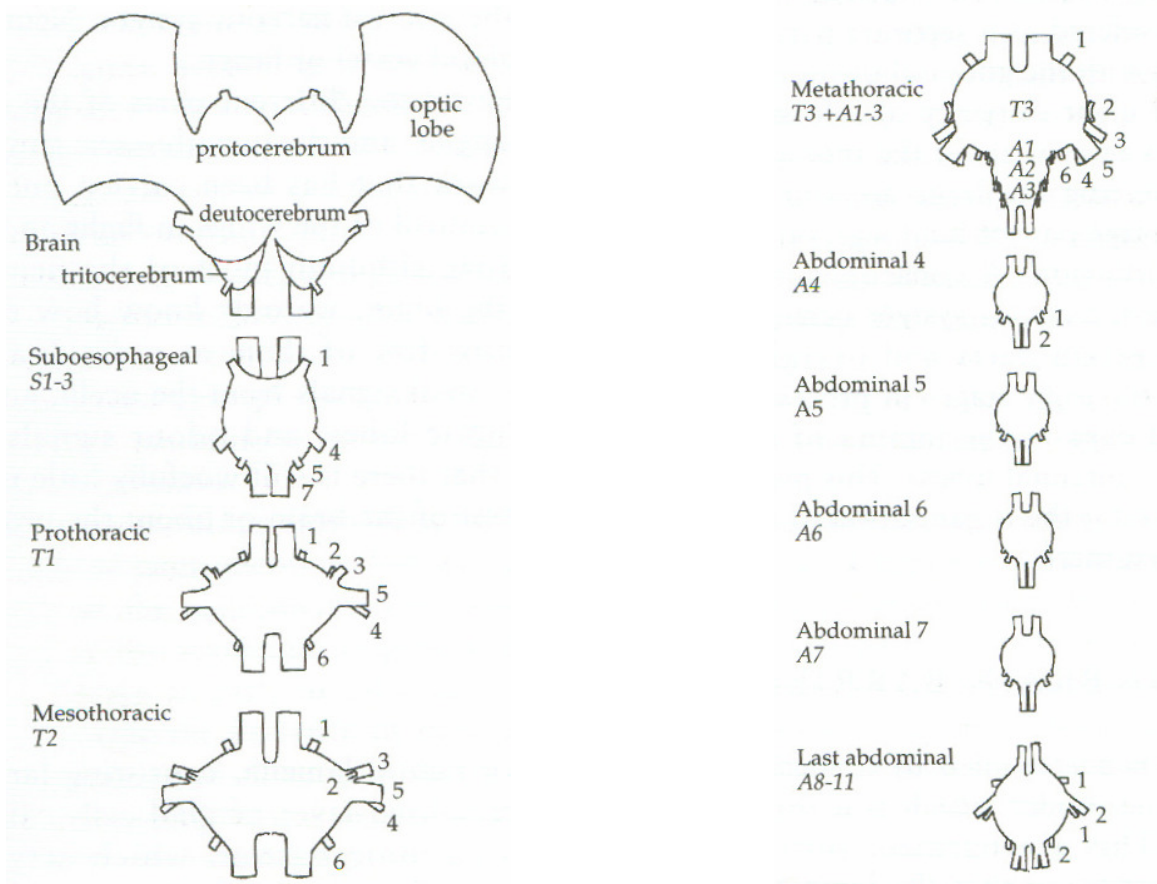
## BIJLAGE II



**Bijlage II: Het spontaan vuren van DUM neuronen.** DUM neuronen bezitten de mogelijkheid een endogeen spontaan actiepotentiaal te veroorzaken. De figuur schetst een mogelijk model voor het spontaan vuren van abdominale ganglion DUM neuronen van de kakkerlak. Dit moet echter nog gestaafd worden door uitgebreid elektrofysiologisch onderzoek. Als DUM neuronen voldoende gedepolariseerd zijn, activeren ze de voltagegevoelige  $Na^+$  kanalen (-35mV) waardoor een depolariserende fase van het  $Na^+$  afhankelijk actiepotentiaal wordt veroorzaakt. Zowel de repolarisatie als de hyperpolarisatie die hierop volgt worden veroorzaakt door  $K^+$  kanalen. De  $Na^+$  afhankelijke  $K^+$  kanalen worden samen geactiveerd met  $Na^+$ kanalen om de duur van het actiepotentiaal te beperken. De snelheid van de repolarisatie en het ontstaan van de nahyperpolarisatie worden veroorzaakt door de uitwaarts recificerende  $K^+$  stroom en vooral de  $Ca^{2+}$ afhankelijke  $K^+$  stroom. De hyperpolarisatie betreft ionkanalen die worden geactiveerd bij potentialen die meer negatief zijn dan de rustmembraanpotentiaal. De ionkanalen worden op deze manier

gedesactiveerd als de DUM neuron hyperpolariseert tot waarden die minder negatief zijn dan het rustniveau. Het sluiten van de  $K^+$ kanalen is voldoende om een kleine depolarisatie te veroorzaken van de ICatLVA  $Ca^{2+}$ stroom. De hieropvolgende  $Ca^{2+}$ stroom initieert de predepolarisatie en is essentieel om ICamLVA  $Va^{s+}$  stroom te activeren. Uiteindelijk zorgt de mLVA  $Ca^{2+}$  stroom voor meer depolarisatie, die op zijn beurt zorgt voor het bereiken van het activatiepotentiaal van  $Na^+$ kanalen. De  $Na^+$ kanalen depolariseren het actiepotentiaal. De “resting currents” samen met A-like  $K^+$ - en  $Ca^{2+}$ - gevoelige  $Cl^-$  stromen en de inactivatie van de ICatLVA  $Ca^{2+}$  stroom zullen de frequentie van het actiepotentiaal beïnvloeden.  $Ca^{2+}$  speelt een belangrijke regulatoire rol in de spontane elektrische activiteit van DUM neuronen omdat  $Ca^{2+}$  direct of indirect dienst doet als second messenger en zo het vuurpatroon kan veranderen waardoor het invloed heeft op de neuromodulatorische functie(49).

### BIJLAGE III



**Bijlage III:** schematisch overzicht van het brein en de ganglia van de sprinkhaan

## BIJLAGE IV

**Bijlage IV.** Schade aan gewassen veroorzaakt door de woestijn sprinkhaan(50).

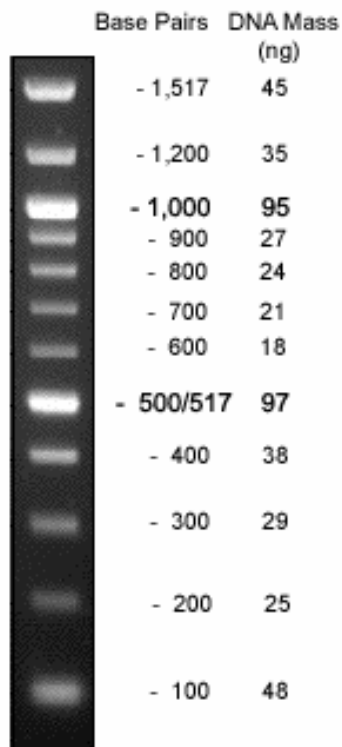
<b>Year</b>	<b>Country</b>	<b>Crops destroyed by the desert locust</b>
1944	Libya	7,000,000 grapevines; 19% of total vine cultivation
1954	Sudan	55,000 tonnes of grain
1957	Senegal	16,000 tonnes of millet, 2000 tonnes of other crops
1957	Guinea	6000 tonnes of oranges
1958	Ethiopia	167,000 tonnes of grain, which is enough to feed 1,000,000 people for a year
1962	India	4000 hectares of cotton (value f 300,000)

## BIJLAGE V

**Bijlage V:** Overzicht van de locatie van DUM neuronen in het centraal zenuwstelsel van de *Locusta migratoria*

regio in centraal zenuwstelsel		aantal octopaminerge DUM neuronen	aantal andere octopaminerge neuronen
brein		0	vele
suboesophagaal ganglion	- mandibulaire neuromeer S1	7-8	2
	- maxillaire neuromeer S2	7-8	2
	- Labiale neuromeer S3	7-8	2
prothoracaal ganglion T1		8-10	4
mesothoracaal ganglion		18-20	2
metathoracaal ganglion	- metathoracale neuromeer T1	18-20	2
	- abdominale neuromeer A1	3	2
	- abdominale neuromeer A2	3	2
	- abdominale neuromeer A3	3	2
abdominale ganglia A4-A6		3	2
abdominaal ganglion A7		8	0
laatste abdominale ganglion	neuromeer A8	8	0
	neuromeer A9	3	0
	neuromeer A10, A11	0	4

BIJLAGE VI



**Bijlage VI:** Deze figuur is de representatie van de 100 bp ladder (*Biolabs New England*) die gebruikt werd voor de agarose gels.

BIJLAGE VII

**Bijlage VII:** De afkortingen gebruikt bij de verbasterde primers. Ze zijn opgesteld door IUPAC

M	A/C
R	A/G
W	A/TC
S	C/G
Y	C/T
K	G/T
V	A/C/G
H	A/C/T
D	A/G/T
B	C/G/T
N	A/C/T/G

## Auteursrechterlijke overeenkomst

*Opdat de Universiteit Hasselt uw eindverhandeling wereldwijd kan reproduceren, vertalen en distribueren is uw akkoord voor deze overeenkomst noodzakelijk. Gelieve de tijd te nemen om deze overeenkomst door te nemen, de gevraagde informatie in te vullen (en de overeenkomst te ondertekenen en af te geven).*

Ik/wij verlenen het wereldwijde auteursrecht voor de ingediende eindverhandeling:

**Ionotrope en metabotrope glutamaatreceptoren bij de *Locusta Migratoria***

Richting: **Master in de biomedische wetenschappen**

Jaar: **2007**

in alle mogelijke mediaformaten, - bestaande en in de toekomst te ontwikkelen - , aan de Universiteit Hasselt.

Niet tegenstaand deze toekenning van het auteursrecht aan de Universiteit Hasselt behoud ik als auteur het recht om de eindverhandeling, - in zijn geheel of gedeeltelijk -, vrij te reproduceren, (her)publiceren of distribueren zonder de toelating te moeten verkrijgen van de Universiteit Hasselt.

Ik bevestig dat de eindverhandeling mijn origineel werk is, en dat ik het recht heb om de rechten te verlenen die in deze overeenkomst worden beschreven. Ik verklaar tevens dat de eindverhandeling, naar mijn weten, het auteursrecht van anderen niet overtreedt.

Ik verklaar tevens dat ik voor het materiaal in de eindverhandeling dat beschermd wordt door het auteursrecht, de nodige toelatingen heb verkregen zodat ik deze ook aan de Universiteit Hasselt kan overdragen en dat dit duidelijk in de tekst en inhoud van de eindverhandeling werd genotificeerd.

Universiteit Hasselt zal mij als auteur(s) van de eindverhandeling identificeren en zal geen wijzigingen aanbrengen aan de eindverhandeling, uitgezonderd deze toegelaten door deze overeenkomst.

Ik ga akkoord,

**Nico Hollanders**

Datum: **19.06.2007**