

Karakterisatie van twee orexine receptor-orthologen bij *Bombus terrestris*

Els LISMONT

Promotor: Prof. Roger Huybrechts
Co-promotor: Dr. Heleen Verlinden
Begeleider: Drs. Magdalena Bil

Proefschrift ingediend tot het
Behalen van de graad van
Master of Science in de Biologie

Academiejaar 2012-2013

© Copyright by KU Leuven

Zonder voorafgaande schriftelijke toestemming van zowel de promotor(en) als de auteur(s) is overnemen, kopiëren, gebruiken of realiseren van deze uitgave of gedeelten ervan verboden. Voor aanvragen tot of informatie i.v.m. het overnemen en/of gebruik en/of realisatie van gedeelten uit deze publicatie, wend u tot de KU Leuven, Faculteit Wetenschappen, Geel Huis, Kasteelpark Arenberg 11 bus 2100, 3001 Leuven (Heverlee), Telefoon +32 16 32 14 01.

Voorafgaande schriftelijke toestemming van de promotor(en) is eveneens vereist voor het aanwenden van de in dit afstudeerwerk beschreven (originele) methoden, producten, schakelingen en programma's voor industrieel of commercieel nut en voor de inzending van deze publicatie ter deelname aan wetenschappelijke prijzen of wedstrijden.

Dankwoord

Mijn laatste jaar als studente in de biologie heeft mij, op zijn zachtst uitgedrukt, bijzonder veel bijgebracht op zowel professioneel als persoonlijk vlak. Hiervoor wens ik een aantal mensen die nauw betrokken waren graag te bedanken.

Eerst en vooral wil ik mijn promotor Professor Huybrechts bedanken voor de kansen die ik gekregen heb. De ruime zelfstandigheid en het vertrouwen dat ik heb mogen ervaren heeft mijn kritische ingesteldheid telkens opnieuw verruimd.

Doorheen het onderzoek heb ik in afwisselende periodes met verschillende begeleiders nauw samengewerkt. Alhoewel dit telkens opnieuw een logische aanpassing vergt, ben ik ervan overtuigd dat deze diversiteit aan zienswijzen mij heeft geholpen om te leren werken in teamverband. Vandaar zou ik respectievelijk Julie, Kristel en Magda willen bedanken om hun begeleiding en praktijkervaring met mij te delen.

Ook zou ik graag Heleen willen bedanken voor de opvolging van het onderzoek en haar ervaring die ze met mij heeft gedeeld. Bedankt voor de vrijheid en het vertrouwen dat ik heb gekregen en dat je in mij bent blijven geloven.

Daarnaast wil ik Professor Huybrechts, Professor Schoofs en Professor Vanden Broeck bedanken voor het ter beschikking stellen van de infrastructuur. Waarschijnlijk zal ik over de hele periode bijna iedereen wel eens lastig gevallen hebben met mijn vragen. Vandaar ook mijn oprechte dank aan de overige leden van het HSV labo. In het bijzonder wil ik Cynthia, Joost, Liesbet T., Lotte, Rik, Rut en Tewodros bedanken. Tenslotte ook bedankt aan mijn mede thesisstudenten voor de goede sfeer op het labo.

Speciale dank aan Dr. Veerle Mommaerts en Dr. Lieve Vandendriessche van Biobest voor het ter beschikking stellen van de darren. Ook dank aan Jelle van Zweden voor de hommels die ik mocht gebruiken.

Graag wil ik ook mijn ouders bedanken dat ik de kans heb gekregen om verder te studeren, alsook de rest van mijn familie om ervoor te zorgen dat ik mij dit jaar kon concentreren op mijn thesiswerk. Daarbij gaat mijn voornaamste dank uit naar mijn zus Riet, die naast haar fulltime job, extra taken op haar schouders heeft genomen zodat ik mij volop kon concentreren op mijn onderzoek. Ook bedankt aan mijn vader en Ann om mijn masterproef na te lezen.

Tenslotte is een dankwoordje aan Jan hier zeker op zijn plaats. Bedankt voor je steun dit jaar (en de voorbijaande jaren) en de tijd die je, ondanks je eigen drukke programma, vaak voor mij hebt vrijgemaakt. Zonder jou zou ik niet staan waar ik vandaag sta.

Inhoudsopgave

Dankwoord	i
Inhoudsopgave	ii
Lijst van afkortingen	v
Hoofdstuk 1: Inleiding en probleemstelling	1
1. De gewone aardhommel: <i>Bombus terrestris</i>	1
1.1 Taxonomische classificatie en voorkomen	1
1.2 Levenscyclus, taakverdeling en andere eigenschappen	2
2 GPCRs	4
2.1. Structuur	5
2.2. Classificatie	6
2.3. Heterotrimerische G-proteïnen	6
2.4. Effectoren	7
2.4.1. Adenylaat cyclase als effector van G-proteïnen	7
2.4.2. Fosfolipase C als effector van G-proteïnen	8
3. Neuropeptiden en hun receptoren	9
4. Allatotropine	10
5. Doelstelling	12
Hoofdstuk 2: Materiaal en methoden	13
A. Kloneren	13
A.1. Isolatie en amplificatie van het doelwitgen	13
A.2. Agarose gelelektroforese	16
A.3. TOPO [®] klonering	17
A.4. Transformatie naar bacteriën	19
A.5. Opgroeien van bacteriën	20
A.6. Opzuiveren van plasmide DNA op kleine schaal (mini-prep)	21
A.7. Analyse van het opgezuiverde plasmide	23
A.7.1. Concentratie meting	23
A.7.2. Analyse door PCR en agarose gelelektroforese	23
A.7.3. Sequentiebepaling	24

A.7.3.1 Sequencerings PCR	25
A.7.3.2. Neerslaan	26
A.7.3.3. Sequentiebepaling	26
A.8. Opzuiveren van plasmide DNA op grote schaal (maxi-prep)	27
B. Karakterisatie van receptoren	29
B.1. Celkweek	32
B.2. Transfectie van CHO cellen	34
B.3. Aequorine-bioluminescentie analyse	35
B.4. Co-transfectie van HEK293 cellen	37
B.5. Luciferase reporter gen analyse	38
C. Weefseldistributie analyse	41
C.1. Verzamelen van de weefsels	41
C.2. RNA extractie	42
C.2.1. Homogenisatie van het weefsel	42
C.2.2. Totale RNA extractie	42
C.2.3. RNA concentratie en zuiverheid	44
C.3. cDNA synthese	44
C.4. Kwantitatieve real-time PCR	45
C.4.1 Selecteren van de kandidaat huishoudgenen	46
C.4.2. Ontwerpen van de primers	46
C.4.3. <i>In vitro</i> primertest	46
C.4.4. Selecteren van de stabielste huishoudgenen	48
C.4.5. q-RT-PCR	49
D. Fylogenetische en structurele analyse	50
Hoofdstuk 3: Resultaten	51
1. Klonering	51
2. Aequorine-bioluminescentie analyse	55
3. Luciferase reporter gen analyse	56
4. Weefseldistributie analyse	57
5. Fylogenetische en structurele analyse	59

Hoofdstuk 4: Discussie.....	60
Samenvatting.....	63
Summary	64
Referenties.....	65
1. Literatuur.....	65
2. Websites:	70
Addendum	72
S1 Sequenties van de doelwitgenen	72
ATR.....	72
OXR-achtig	74
S2 Resultaten sequentiebepaling van het ATR insert op nucleotideniveau	76
Forward primer:.....	76
Interne forward primer:	77
Reverse primer:	79
S3 Resultaten sequentiebepaling van het OXR-achtig insert op nucleotideniveau.....	81
Forward primer:.....	81
Interne forward primer:	82
Reverse primer:	84
S4 AZ sequenties van de getest neuropeptiden	86
S5 Berekeningen om de dosis-respons curve op te stellen.....	87
S5.1: CHO cellen.....	87
S5.2: HEK cellen.....	87
S6 Concentratie en zuiverheid opgezuiverd RNA	88
S7 Criteria primers q-RT-PCR.....	89
S8 Primers weefseldistributie.....	91
S9 Selectie van stabiele huishoudgenen.....	92
S10 Structurele analyse	95
S11 Genen fylogenetische analyse	97

Lijst van afkortingen

7TM	Zeven transmembraan
A	Adenosine
A ₂₃₀	Absorbantie gemeten bij 230 nm
A ₂₆₀	Absorbantie gemeten bij 260 nm
A ₂₈₀	Absorbantie gemeten bij 280 nm
AC	Adenylaat cyclase of adanylyl cyclase
ACTβ	β-Actin
AD	Gedestilleerd water (<i>aqua destilata</i>)
AK	Arginine kinase
AMP	Adenosinemonofosfaat
AT	Allatotropine
ATL	Allatotropine-achtig
ATP	Adenosinetrifosfaat
ATR	Allatotropine receptor
AZ	Aminozuur
BGH	Bovine groeihormoon of 'Bovine growth hormone'
<i>Bomte-AT</i>	<i>Bombus terrestris</i> allatotropine
<i>Bomte-ATR</i>	<i>Bombus terrestris</i> allatotropine receptor
bp	Baseparen
BSA	Bovine serum albumin
C	Cytosine
Ca ²⁺	Calcium ionen
cAMP	Cyclisch adenosinemonofosfaat
CBP	CREB-bindings proteïne
cDNA	Complementair DNA
cGMP	Cyclisch guanosinemonofosfaat
CHO	Chinese hamster ovarium of 'Chinese hamster ovary'
CA	<i>Corpora allata</i>
CO ₂	Koolstofdioxide
C _t	Cyclische drempelwaarde of 'cycle threshold'
CRE	Cylisch AMP respons element
CREB	CRE-bindings proteïne
DAG	Diacylglycerol
ddNTPs	Dideoxyribonucleotide trifosfaten
DMEM	'Dulbecco's Modified Eagle's Medium'
(DMEM/F-12)	'Dulbecco's Modified Eagle Medium: Nutrient Mixture F-12'
DMSO	Dimethylsulfoxide

DNA	Desoxyribonucleïnezuur
DNase	Deoxyribonuclease
dNTPs	Deoxyribonucleotide trifosfaten
dsDNA	Dubbelstrengig DNA
DTT	Dithiothreitol
dTTP	Deoxythymidinetrifosfaat
dUTP	Deoxyuridinetrifosfaat
EC ₅₀	Half maximale effectieve concentratie
EDTA	Ethyleendiaminetetra-azijnzuur
EF1A	Elongation factor 1 α
ER	Endoplasmatisch reticulum
<i>et al.</i>	<i>et alia</i> of en anderen (e.a.)
EtOH	Ethanol
G	Guanosine
G α	α -subeenheid van een heterotrimerisch G-proteïne
G $\beta\gamma$	β - en γ -subeenheden van een heterotrimerisch G-proteïne
G _i (G _{ai})	G α subeenheid dat AC inhibeert
G _q (G _{aq})	G α subeenheid dat koppelt aan PLC
G _s (G _{as})	G α subeenheid dat AC stimuleert
GABA _B	γ -aminoboterzuur receptor B
GADPH	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase
GAP	GTPase activerend proteïne
GDP	Guanosinedifosfaat
GEF	Guanine nucleotide uitwisselingsfactor of 'guanine nucleotide-exchange factor'
GPCR	G-proteïne gekoppelde receptor of 'G-protein coupled receptor'
GPCRs	G-proteïne gekoppelde receptoren of 'G-protein coupled receptors'
G-proteïne	GTP-bindend proteïne
GTP	Guanosinetrifosfaat
HCl	Waterstofchloride
HCMV	Humaan cytomegalovirus
HEK	Humane embryonale niercellen of 'Human embryonic kidney cells'
IBMX	3-isobutyl-1-methylxanthin
IP ₃	Inositol-1,4,5-trisfosfaat
JH	Juveniel hormoon
KCl	Kaliumchloride
KH ₂ PO ₄	kaliumdiwaterstoffosfaat
KOAc	Kaliumacetaat

KOH	Kaliumhydroxide
KT	kamertemperatuur
LB	Luria-Bertani
<i>Locmi</i> -AT	<i>Locusta migratoria</i> allatotropine
LPS	Lipopolysaccharide
M	Molair
<i>Manse</i> -AT	<i>Manduca sexta</i> allatotropine
<i>Manse</i> -ATR	<i>Manduca sexta</i> allatotropine receptor
Mg ²⁺	Magnesium ionen
MgCl ₂	Magnesiumchloride
Mg(OAc) ₂	Magnesium acetaat
MgSO ₄	Magnesiumsulfaat
MOPS	3-morpholino-propaansulfonzuur
mRNA	Boodschapper RNA of 'messenger' RNA
Na ₂ HPO ₄	Natriumwaterstoffosfaat
NaCl	Natriumchloride
NaOH	Natriumhydroxide
NCBI	National Center for Biotechnology Information
NF	Normalisatiefactor
Nonidet-P40	Octylphenoxypolyethoxyethanol
NTC	'Non template control'
O ₂	Zuurstof
OH	Hydroxyl
ORF	Open leesraam of 'open reading frame'
OXR	Orexine receptor
OXR-achtig	Orexine-receptor achtige receptor
OXRs	Orexine receptoren
PBS	'Phosphate-buffered saline'
PCR	Polymerase kettingreactie of 'Polymerase Chain Reaction'
PI	Propidium iodide
PIP ₂	Fosfatidylinositol-4,5-bisfosfaat
PKA	Proteïne kinase A of cAMP afhankelijke proteïne kinase A
PKC	Proteïne kinase C
PLA ₂	Phospholipase A ₂
PLC	Fosfolipase C
PLCβ	Isovorm β van PLC
PM	Plasmamembraan
PP _i	Inorganisch pyrofosfaat

Q	Relatieve hoeveelheid of 'quantity'
q-RT-PCR	Kwantitatieve real-time polymerase-kettingreactie of 'quantitative real-time polymerase chain reaction'
RNA	Ribonucleïnezuur
RNAi	'RNA interference'
RNase	Ribonuclease
rpm	toeren per minuut of 'Routes per minute'
RPL13	Ribosomal protein L13
RPP2	Acidic ribosomal protein P2
RT	Reverse transcriptase
SD	Standaard deviatie
SDS	Natriumdodecylsulfaat
SE	Standaard error
sl-CSD	'Single locus complementary sex determination'
ssDNA	Enkelstrengig DNA of 'single stranded DNA'
T	Thymidine
TAE	Tris-acetaat-EDTA
T _m	Smelttemperatuur
<i>Trica-ATL</i>	<i>Tribolium castaneum</i> allatotropine achtig
<i>Trica-ATR</i>	<i>Tribolium castaneum</i> allatotropine receptor
Tris-HCl	Tris-Hydrochloride
TUB	α -Tubulin
Tween 20	Polysorbaat 20
UDG	Uracil-N-glycosylase of uracil-DNA glycosylase
UNG	Uracil-N-glycosylase of uracil-DNA glycosylase
UV	Ultraviolet

Hoofdstuk 1: Inleiding en probleemstelling

1. De gewone aardhommel: *Bombus terrestris*

1.1 Taxonomische classificatie en voorkomen

De gewone aardhommel, *Bombus terrestris*, behoort tot de orde van de Hymenoptera of Vliesvleugeligen, waartoe ook de bijen, wespen en mieren behoren. Op dit moment zijn er 25000 soorten bijen gekend, verdeeld over 4000 genera. 250 soorten hiervan behoren tot de hommels (Goulson, 2010). Een samenvatting van de belangrijkste taxonomische classificatie wordt weergegeven in tabel 1.1 (National Center for Biotechnology Information (NCBI), URL:<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/wwwtax.cgi?mode=Info&id=30195&lvl=3&lin=f&keep=1&srchmode=1&unlock>).

Tabel 1.1: Taxonomische classificatie van *Bombus terrestris*

Taxonomische rang	Wetenschappelijke classificatie
Domein	Eukaryota
Rijk	Metazoa
Phylum	Arthropoda
Superklasse	Hexapoda
Klasse	Insecta
Subklasse	Neoptera
Infraklasse	Endopterygota
Orde	Hymenoptera
Suborde	Aculeata
Superfamilie	Apoidea
Familie	Apidae
Subfamilie	Bombinae
Tak	Bombini
Geslacht	Bombus
Soort	<i>Bombus terrestris</i>

Deze hommel leefde oorspronkelijk vooral in Europa, Centraal-Azië en Noord-Amerika (Sladen, 1912). Ondertussen is *B. terrestris* ook reeds geïntroduceerd als bestuiver in Tasmanië, Nieuw-Zeeland, Chili en Japan. Nu ze ook Argentinië heeft bereikt, wordt meer en meer duidelijk dat *B. terrestris* op die plaats meer een invasieve soort is in plaats van een bedreigde soort (Rasmont *et al.*, 2008).

De koninginnen van deze soort zijn 20-22 mm lang en hebben een spanwijdte van 40-42 mm groot. Ze zijn zwart gekleurd en hebben een okergele band vooraan op de thorax en op het tweede segment van het abdomen. Vanaf het vierde segment zijn ze geelbruin gekleurd. De werksters zijn 11-17 mm lang. Wat betreft de kleur zien ze er hetzelfde uit als de koninginnen maar hebben ze eerder een witte tot wit-geelbruine staart. De darren zijn 14-16 mm lang en hebben een spanwijdte van 30-33 mm. Ze zijn ook zwart gekleurd met een gele band vooraan

op de thorax en op het tweede segment van het abdomen. Ze hebben een gelbruine-witte staart (Fig. 1.1) (Sladen, 1912).



Figuur 1.1: Afbeelding van *Bombus terrestris* met bovenaan de koningin, daaronder een werkster en onderaan een dar (aangepaste figuur uit Sladen, 2012).

Daar *B. terrestris* pollen van veel verschillende soorten bloemen verzamelt, wordt deze een polylectische hommelmel genoemd (Rasmont *et al.*, 2008).

1.2 Levenscyclus, taakverdeling en andere eigenschappen

Hommels zijn groter dan bijen en zijn daarbij sterk behaard. Ze zijn in staat om hun lichaamstemperatuur te regelen en zijn dus endotherm. Vergeleken met de bijen zijn ze bijgevolg goed aangepast om in koudere condities te functioneren en kunnen ze vroeger en later op de dag foerageren (Goulson, 2010).

Hommels hebben een speciale vorm van ongeslachtelijke voortplanting; namelijk arrhenotoky. Onbevuchte eitjes ontwikkelen zich tot mannetjes en bevruchte eitjes ontwikkelen zich normaal gezien tot vrouwtjes. Seksdeterminatie bij deze haplodiploïden wordt bepaald door één locus en wordt daarom ook ‘single locus complementary sex determination’ (sl-CSD) genoemd. Niet alleen de hemizygotie haploïde eitjes ontwikkelen tot darren, maar ook diploïde eitjes die homozygoot zijn voor dit locus ontwikkelen tot darren. Heterozygoten voor dit locus ontwikkelen tot vrouwtjes. De diploïde darren zijn meestal niet levensvatbaar of steriel. De productie van deze darren draagt een grote kost voor de kolonie met zich mee. 50% van de bevruchte eitjes ontwikkelen niet tot werksters maar tot darren en verlagen dus de productiviteit van de kolonie. In dit geval sterft de koningin meestal omdat er niet genoeg werksters zijn om haar te voeden. Gelukkig bestaan er meer dan 46 allelen van dit locus in *B. terrestris* en komt dit probleem alleen voor in meer geïsoleerde populaties (Goulson, 2010; van Wilgenburg *et al.*, 2006; Whitehorn *et al.*, 2009).

Bombus terrestris heeft een jaarlijkse levenscyclus. Ze voeden zich met nectar en stuifmeel gedurende hun hele leven. De larven worden gevoed door de volwassen werksters. De koninginnen van *B. terrestris* komen tevoorschijn uit hun winterslaap in februari of maart. Ze

gaan dan op zoek naar een goede ondergrondse plaats om hun nest te bouwen. Vaak worden niet meer gebruikte nesten van bijvoorbeeld knaagdieren als nestplaats gekozen. Achtergelaten haren, droog gras en mos kunnen immers als isolatiemateriaal gebruikt worden. Dit materiaal wordt opgerold tot een bal, waarin ze een centrale kamer met één ingang bouwen. De koningin voorziet het nest van pollen die ze vermengt met nectar en boetseert tot een klompje. In dit klompje legt ze 8-16 bevruchte eieren, die ze door meiose produceert en bevrucht met het opgeslagen sperma. Over het klompje zet ze een laagje wax af. De koningin broedt de eitjes uit met een lichaamstemperatuur van 37-39°C. Voor de ingang van het nest maakt ze een pot van wax waarin ze nectar opslaat. Hiermee kan ze zichzelf voeden terwijl ze in contact blijft met haar broedsel. Dit is waarschijnlijk de meest kwetsbare fase van de kolonie. De koningin moet immers af en toe haar nest verlaten om nieuwe nectar en pollen te verzamelen. Naast de voor de hand liggende risico's die gepaard gaan met foerageren, zoals predatie door vogels of spinnen, kan zowel een tekort aan nectar en pollen in de nabije omgeving als slecht weer ervoor zorgen dat de koningin niet kan uitvliegen, met als gevolg dat zij en haar kolonie sterven (Goulson, 2010).

Na vier dagen komen de eitjes uit. De larven voeden zich met de pollen in het klompje. Ze leven dan in het zogenoemde broedklompje, een holte in de pollen. Het broedklompje breekt en met zijde en wax bouwen ze nieuwe individuele cellen. Hierin zullen ze verblijven tot ze verpoppen. Ze worden gevoed door teruggegeven pollen en nectar. De larven ondergaan vier vervellingen en hebben dus vier instar stadia. Bij de laatste vervelling, 10 tot 14 dagen nadat de larven uit het ei gekomen zijn, spinnen ze een zijden cocon. Ongeveer 14 dagen later verpoppen ze tot volwassen hommels. De totale ontwikkelingstijd is dus 4-5 weken, afhankelijk van de voedselvoorraad en de temperatuur. De larven en poppen die in het midden van het broedklompje gelegen zijn, worden beter warm gehouden dan die die aan de buitenzijde. Hierdoor zullen ze groter zijn en iets sneller ontwikkelen dan de anderen. Als de larven verpoppen tot adulten moeten ze zichzelf uit de cocon bijten. De koningin zal hen hierbij helpen. De nieuwe adulten hebben initieel een witte kleur. Na 24 uur zijn ze echter reeds gekleurd. De eerste adulten zijn werksters. Zij nemen de taken van de koningin over, zoals het verzamelen van de nectar en pollen, het voeden en broeden van de larven, ... (Goulson, 2010).

Een kolonie van *Bombus terrestris* kan tot 350 werksters bevatten. Op het einde van het seizoen worden de darren en nieuwe koninginnen geproduceerd. Vanaf nu zal de koningin geen werksters meer produceren. De larven die zullen ontwikkelen tot nieuwe koninginnen hebben meer voedsel en tijd nodig dan de larven die uitgroeien tot werksters. Ze kunnen dus pas geproduceerd worden wanneer er genoeg werksters aanwezig zijn om de larven te voeden. Het aantal nieuwe koninginnen en darren hangt af van de grootte van de kolonie. In tegenstelling tot grotere kolonies, zullen kleine kolonies maar weinig reproducerende nakomelingen voortbrengen. De koninginnen bouwen een vetreserve op om te kunnen

overwinteren. De darren verlaten de kolonie en keren nooit meer terug. Ze voeden zichzelf en gaan op zoek naar een partner. Nadat de nieuwe koninginnen gepaard hebben met een dar, slaan ze het sperma op in spermatheca en gaan ze op zoek naar een goede plaats om te overwinteren. Ze graven zich in en overwinteren in een smalle, ovale kamer onder de grond (Goulson, 2010).

Ondertussen zal het oorspronkelijke nest uitsterven. De koninginnen produceren geen nieuwe werksters meer en de oude werksters worden oud. Bovendien worden de eitjes die de werksters leggen, vernietigd door de koningin en vice versa. Hierdoor zal het oorspronkelijke nest uitsterven (Goulson, 2010).

Niet alle kolonies van *B. terrestris* hebben dezelfde levenscyclus. In een studie in Tasmanië zijn kolonies ontdekt met een bivoltine levenscyclus. Dit betekent dat er twee generaties voorkomen in één jaar. Een eerste generatie wordt gestart in augustus-september waarbij nieuwe koninginnen geproduceerd worden van oktober tot december. Een tweede generatie komt tevoorschijn in januari-februari waarbij nieuwe koninginnen geproduceerd worden van maart tot mei (Buttermore, 1997). Er zijn ook enkele populaties in Turkije die overzomereren in plaats van overwinteren (Gurel *et al.*, 2008). De laatste jaren is er in het zuiden van het Verenigd Koninkrijk een nieuw fenomeen ontdekt. Door veranderingen in het klimaat en de beschikbaarheid van exotische planten die in de winter overleven, worden er meer kolonies ontdekt die ook in de winter actief zijn (Goulson, 2010).

2 GPCRs

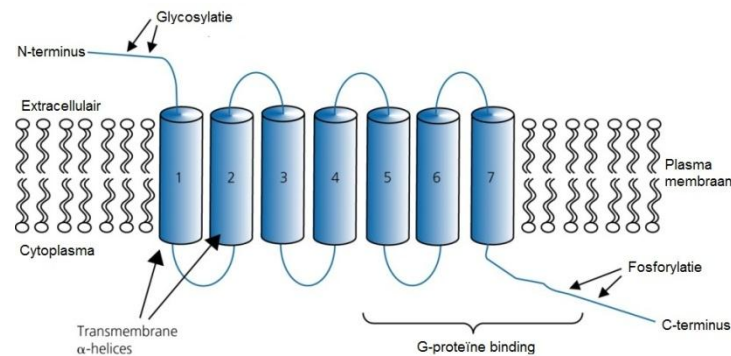
Communicatie via extracellulaire signalen kan intracellulaire fysiologische reacties uitlokken. Bij binding van een extracellulair signaal aan een receptor proteïne gelocaliseerd ter hoogte van het plasmamembraan (PM) wordt het signaal doorgegeven via signaaltransductie en wordt een intracellulaire respons uitgelokt. De vier belangrijkste receptorproteïnen zijn: ionotrope receptoren, enkelvoudige transmembraan receptoren, zeven-transmembrane G-proteïne gekoppelde receptoren en nucleaire receptoren (Vanden Broeck *et al.*, 1998)

G-proteïne gekoppelde receptoren (GPCRs) bestaan uit een grote familie receptoren met eenzelfde structuur. Ze bezitten geen grote homologie in sequentie, maar hun topologische structuur is goed bewaard gebleven doorheen de evolutie. Ze zijn nog voor de divergentie van de protostomia en de deuterostomia ontstaan en komen in de meeste metazoïsche fylya voor. Na vele genduplicaties zijn een meervoud van ligand specifieke receptoren ontstaan. Deze liganden zijn chemisch erg divers en bevatten neuropeptiden, biogene amines, peptides, glycoproteïnen, vetten, proteases, nucleotiden, ionen en fotonen (Caers *et al.*, 2012; Meeusen *et al.*, 2003; Vanden Broeck, 1996; Vanden Broeck *et al.*, 1998; Vanden Broeck, 2001b).

GPCRs bezitten allemaal zeven transmembrane domeinen (7TM), een gekoppelde heterotrimerisch G-proteïne die als aan- en uitschakelaar functioneert, een membraan

gebonden effector en een terugkoppelingsmechanisme. Ze zijn van groot belang in de natuur. Er is immers voorspeld dat een derde van alle geneesmiddelen inwerkt op deze receptoren en er zijn er nog veel meer die verderop in de signaalcascade een effect hebben. Bovendien zijn deze receptoren mogelijke doelwitreceptoren voor agriculturele toepassingen zoals de productie van insecticiden (Hancock, 2010; Lodish *et al.*, 2008; Meeusen *et al.*, 2003; Vanden Broeck, 1996).

2.1. Structuur



Figuur 1.2: Algemene structuur van G-Proteïne gekoppelde receptoren. GPCRs bevatten zeven transmembrane α -helices. Ze bevatten 3 intracellulaire- en 3 extracellulaire lussen. De derde lus interageert, samen met de C-terminus, waarschijnlijk met het heterotrimerische G-proteïne. De N-terminus ligt aan de extracellulaire zijde van het PM en is vatbaar voor glycosylatie. De C-terminus ligt intracellulair en kan gefosforyleerd worden (aangepaste figuur uit: Hancock, 2010).

GPCRs behoren tot de zeven-transmembrane receptoren (7TM receptoren) omwille van hun structuur (Fig. 1.2). De transmembraandomeinen bestaan uit 22-24 hydrofobe aminozuren (AZ) die α -helices vormen. De N-terminus ligt aan de extracellulaire zijde van het PM en is betrokken bij de ligand specifieke interacties. Bovendien bevat ze bindingsplaatsen voor glycosylatie. De C-terminus is intracellulair gelegen en interageert waarschijnlijk samen met de derde intracellulaire lus met het heterotrimerische G-proteïne. Bovendien bevat de C-terminus de sites die gefosforyleerd kunnen worden door o.a. GPCR gereguleerde kinases. Door de binding van arrestines aan de gefosforyleerde GPCR wordt de receptor ongevoelig gemaakt doordat de receptor niet meer kan interageren met het G-proteïne. Indien arrestine associeert met clatherines wordt de receptor door endocytose geïnternaliseerd (Caers *et al.*, 2012; Hancock, 2010; Lodish *et al.*, 2008; Meeusen *et al.*, 2003).

Lang werd gedacht dat één receptor gekoppeld was aan één G-proteïne. Maar intussen is duidelijk geworden dat het verhaal ingewikkelder is dan dat. Er zijn immers ook GPCRs gevonden die dimeren of oligomeren vormen en in groep samenwerken. Deze interacties hebben een effect op de activiteit van de receptoren (Meeusen *et al.*, 2003).

2.2. Classificatie

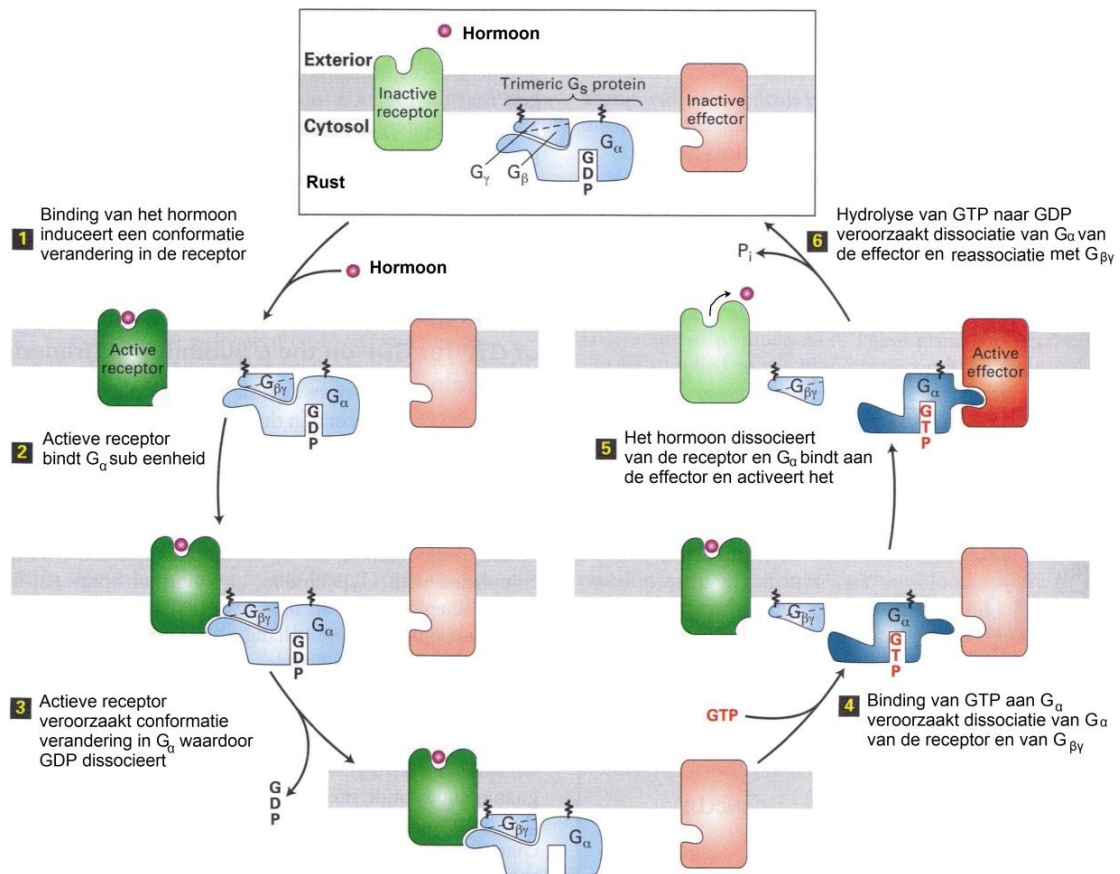
De familie van de GPCRs wordt onderverdeeld in drie grote families. Familie A is de grootste groep van deze receptoren en bevat de adrenaline- en rhodopsinereceptoren. Familie B bevat de receptoren voor glucagon, calcitonine en het parathyroid hormoon. Ze activeren allemaal adenylaat cyclase (AC) wat tot een verhoging van de intracellulaire cyclisch adenosinemonofosfaat (cAMP) concentratie leidt. Familie C bevat een groot extracellulair N-terminaal domein en bevat de γ -aminoboterzuur B (GABA_B) receptoren en de glutaminereceptoren (Hancock, 2010). Alle neuropeptidereceptoren behoren tot de families A en B (Caers *et al.*, 2012)

2.3. Heterotrimerische G-proteïnen

Heterotrimerische G-proteïnen bestaan uit drie subeenheden; namelijk α , β en γ . De β - en de γ -subeenheden blijven aan elkaar gebonden en kunnen gezien worden als één subeenheid ($G_{\beta\gamma}$). De α -subeenheid (G_{α}) kan wel dissociëren van $G_{\beta\gamma}$ (Hancock, 2010; Lodish *et al.*, 2008).

G-proteïnen zijn guanine nucleotide bindende proteïnen en kunnen gezien worden als een schakelaar die aan of uit staat. In inactieve staat (rust) vormen G_{α} en $G_{\beta\gamma}$ een complex en zijn de twee subeenheden gebonden aan het membraan (Fig. 1.3). Wanneer het hormoon, of een andere agonist, bindt aan de GPCR ondergaat de receptor een conformatie verandering waardoor ze gaat binden met G_{α} . Door deze binding dissocieert guanosinedifosfaat (GDP) en bindt guanosinetrifosfaat (GTP) aan G_{α} . De geactiveerde receptor functioneert dus als een guanine nucleotide uitwisselingsfactor (GEF). Door de binding van GTP aan G_{α} dissocieert G_{α} van de receptor en van $G_{\beta\gamma}$. De geactiveerde G_{α} subeenheid associeert met de nabijgelegen effector en activeert deze effector. Door de intrinsieke GTPase activiteit van G_{α} hydrolyseert GTP in GDP waardoor G_{α} weer inactief wordt en opnieuw een complex vormt met $G_{\beta\gamma}$. Deze hydrolysatie wordt versterkt door de binding van G_{α} aan de effector, dat dus als GTPase activerend proteïne (GAP) functioneert. Het G-proteïne ondergaat bijgevolg een cyclus van activatie en deactivatie (Hancock, 2010; Lodish *et al.*, 2008).

Er bestaat niet één G_{α} -proteïne maar er bestaat een familie van G_{α} -proteïnen waarvan de meest voorkomende G_q , G_s en G_i zijn. Ook van deze drie proteïnen bestaan er op hun beurt meerdere isovormen. G_q interageert met fosfolipase C (PLC β) dat PIP₂ hydrolyseert in IP₃ en DAG (zie 2.4.2). G_s en G_i activeren en inhiberen adenylaat cyclase (AC) met respectievelijk een verhoging of een verlaging van cAMP als gevolg (zie 2.4.1) (Caers *et al.*, 2012; Hancock, 2010).



Figuur 1.3: Algemeen overzicht van de G-proteïne cyclus en activatie van de effector. De heterotrimerische G-proteïne subeenheden G_{α} en $G_{\beta\gamma}$ vormen een complex en zijn covalent gebonden aan het membraan. (1-4) Bij binding van het ligand (hormoon) aan de GPCR wordt GDP uitgewisseld met een GTP en dissocieert G_{α} van de receptor en $G_{\beta\gamma}$. (5) G_{α} activeert de effector en het ligand dissocieert van de receptor (6) Door hydrolyse van GTP wordt het signaal stopgezet en vormt G_{α} weer een heterotrimerisch G-proteïne met $G_{\beta\gamma}$. De cyclus kan nu weer opnieuw beginnen (aangepaste figuur uit: Lodish *et al.*, 2008).

2.4. Effectoren

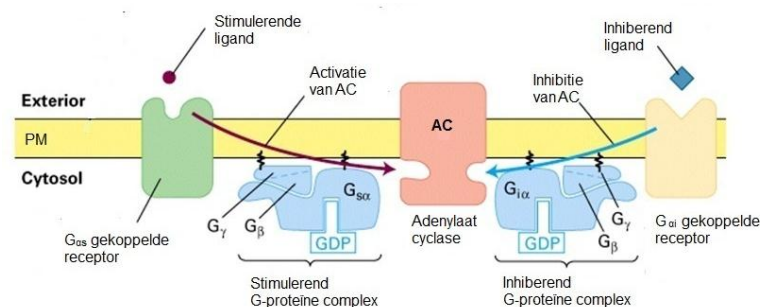
Verschillende GPCRs activeren verschillende G-proteïnen die op hun beurt verschillende effector proteïnen kunnen activeren. De activatie van zo een effector wekt een cellulaire respons op die zowel kan plaatsvinden ter hoogte van het PM als op een nuclear, transcriptieel niveau. De effectoren zijn ofwel membraan gebonden ion-kanalen ofwel enzymen die de formatie van tweede boodschappers katalyseren zoals cAMP, cGMP, IP₃, Ca²⁺ en DAG. Wij zullen ons concentreren op de tweede groep. De meest voorkomende effector proteïnen zijn adenylaat cyclase (AC), fosfolipase C (PLC), cGMP phosphodiesterase, phospholipase A2 (PLA2) en ion-kanalen. Hieronder worden de signaaltransductiewegen van twee van deze effectoren beschreven; namelijk AC en PLC (Lodish *et al.*, 2008; Vanden Broeck, 1996; Vanden Broeck, 2001b).

2.4.1. Adenylaat cyclase als effector van G-proteïnen

Adenylaat cyclase (AC) is een enzym dat adenosinetrifosfaat (ATP) converteert naar cyclisch adenosinemonofosfaat (cAMP). Het bijproduct pyrofosfaat (PP_i) wordt afgebroken door

pyrofosfatases. cAMP is een tweede boodschapper dat cAMP afhankelijke proteïne kinasen kan activeren zoals proteïne kinase A (PKA). Er bestaan ten minste negen isovormen van AC (Hancock, 2010; Lodish *et al.*, 2008).

G-proteïnen kunnen zowel een stimulerend (G_{os}) als een inhiberend effect (G_{oi}) hebben op AC (Fig. 1.4). Bij de binding van een stimulerend ligand aan de G_{os} -gekoppelde receptor wordt G_{os} geactiveerd. Deze activeert de effector AC waardoor ATP wordt geconverteerd naar cAMP. Het signaal wordt beëindigd wanneer cAMP omgezet wordt naar adenosine monofosfaat (AMP) door fosfodiësterases. Bij binding van een inhiberend ligand aan de G_{oi} -gekoppelde receptor wordt G_{oi} geactiveerd. Dit zal een inhiberend effect hebben op AC (Lodish *et al.*, 2008).



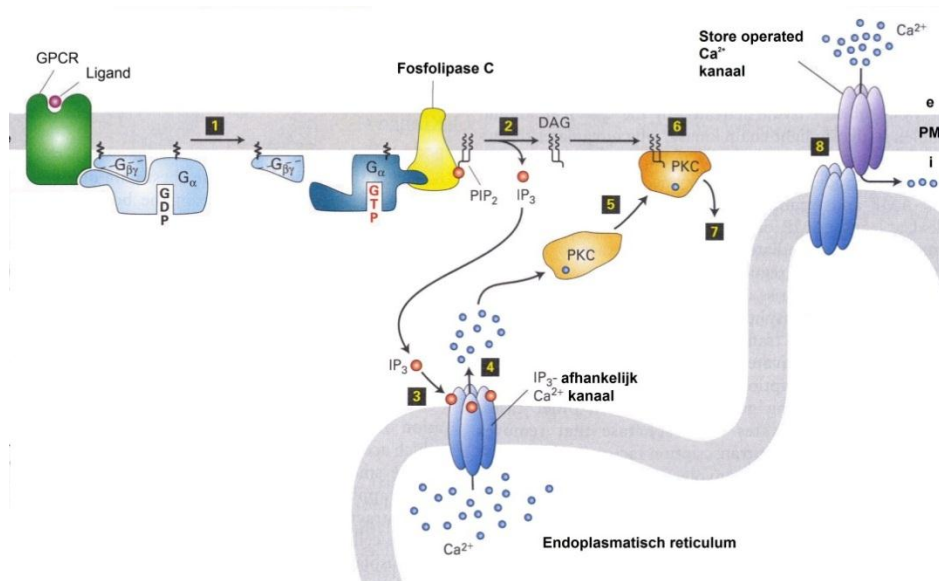
Figuur 1.4: Algemeen schema van hormoon geïnduceerde activatie of inhibitie van adenylyl cyclase (AC). Indien een stimulerend ligand bindt aan de G_{os} -gekoppelde receptor (links) zal het G_{os} AC activeren waardoor ATP wordt geconverteerd naar cAMP. Bij binding van een inhiberend ligand aan de G_{oi} -gekoppelde receptor (rechts) zal G_{oi} AC inhiberen waardoor er geen productie is van de tweede boodschapper cAMP. De $G_{\beta\gamma}$ subeenheid is hetzelfde bij het stimulerend G-proteïne complex als bij het inhiberend G-proteïne complex (aangepaste figuur uit: Lodish *et al.*, 2008).

2.4.2. Fosfolipase C als effector van G-proteïnen

G-proteïnen kunnen ook een effect hebben op fosfolipase C (PLC). Ook dit proteïne is in werkelijkheid een familie van proteïnen waarvan meerdere isovormen bestaan en waarvan $PLC\beta$ de meest gekende is (Hancock, 2010).

Als de cel in rust is, is de intracellulaire Ca^{2+} concentratie erg laag in het cytosol ($<0,2 \mu M$). Ca^{2+} wordt immers ofwel opgeslagen in het endoplasmatisch reticulum (ER) of naar buiten gepompt. Bij het binden van een ligand aan de GPCR wordt G_q geactiveerd (Fig. 1.5). G_q activeert PLC dat fosfatidylinositol 4,5 bisfosfaat (PIP_2) hydrolyseert ter vorming van diacylglycerol (DAG) en inositol-1,4,5-trisfosfaat (IP_3). IP_3 diffundeert in het cytosol en bindt aan het IP_3 -afhankelijke Ca^{2+} kanaal in het membraan van het ER. Hierdoor worden de Ca^{2+} ionen vrijgezet in het cytosol waar ze kunnen binden aan het inactieve cytosolische proteïne kinase C (PKC). PKC wordt getransloceerd naar het PM waar het geactiveerd wordt door DAG. Het actieve PKC kan het meerdere enzymen fosforileren en dus meerdere reacties uitlokken. Door de hoge concentratie aan Ca^{2+} in het cytosol verlaagt de affiniteit van het Ca^{2+} kanaal in het ER voor IP_3 waardoor het kanaal weer gesloten wordt. De Ca^{2+} ionen worden

actief terug naar het ER getransporteerd waardoor het signaal beëindigd wordt (Hancock, 2010; Lodish *et al.*, 2008).



Figuur 1.5: Samenvatting van de IP₃/DAG pathway: (1) Binding van het ligand activeert G_α dat op haar beurt de effector fosfolipase C (PLC) zal activeren. (2) PLC hydrolyseert fosfatidylinositol 4,5 bisfosfaat (PIP₂) in inositol-1,4,5-trisfosfaat (IP₃) en diacylglycerol DAG. (3) IP₃ diffundeert en bindt aan het IP₃ afhankelijk Ca²⁺ kanaal in het membraan van het endoplasmatisch reticulum waardoor Ca²⁺ ionen vrijkomen in het cytosol (4). (5) Ca²⁺ ionen binden aan proteïne kinase C (PKC) waardoor dit proteïne gerecruteerd wordt naar het PM waar het geactiveerd wordt door DAG (6). (7) PKC kan nu meerdere enzymen fosforyleren. (8) Door een interactie tussen het IP₃-afhankelijke Ca²⁺ kanaal en een kanaal in het PM is er ook een extracellulaire influx van Ca²⁺ ionen (aangepaste figuur uit: Lodish *et al.*, 2008).

3. Neuropeptiden en hun receptoren

Alle processen in het leven van insecten, zoals de ontwikkeling, het metabolisme en reproductie worden geregeld door neuropeptiden. Neuropeptiden zijn een grote klasse van regulatorische componenten die worden vrijgegeven door neuronen. Deze extracellulaire moleculen zijn betrokken bij de communicatie tussen cellen als neurotransmitter, neuromodulator of als neurohormoon. Ze bestaan uit 4-20 AZ en binden met een hoge affiniteit aan membraanreceptoren om zo een intracellulaire reactie uit te lokken. De meeste van deze membraanreceptoren behoren tot de GPCRs. Veel van deze systemen zijn behouden gebleven, terwijl andere systemen verloren zijn gegaan in sommige insecten (Caers *et al.*, 2012; Elekonich en Horodyski; 2003; Horodyski *et al.*, 2011).

De eerste functioneel gekarakteriseerde invertebraat receptor werd in 1991 in *D. melanogaster* geïdentificeerd als een tachykinin-achtige receptor (Li *et al.*, 1991). Sinds het eerste genoom van een multicellulair organisme werd vrijgegeven in 1998, namelijk dat van *Caenorhabditis elegans* (Chalfie, 1998; The *C. elegans* Sequencing Consortium, 1998), wordt van meer en meer dierlijke genomen de sequentie bepaald. Met de vrijgave van het genoom van *Drosophila melanogaster* in 2000 (Adams *et al.*, 2000) kwam het onderzoek naar neuropeptiden en GPCRs in een stroomversnelling terecht. In plaats van via de klassieke

methode is het met de komst van de genomsequenties mogelijk om via een omgekeerde farmacologische methode te werk te gaan. In plaats van eerst het bioactief ligand op te zuiveren, dat geïdentificeerd werd op basis van zijn biologische activiteit, en zo op zoek te gaan naar zijn receptor, wordt nu gestart met de receptor en gaat men zo op zoek naar het ligand van de receptor via een bibliotheek van synthetisch geproduceerde voorspelde neuropeptiden. Receptoren waarvan het ligand nog niet gekend is worden weesreceptoren genoemd (Caers *et al.*, 2012; Meeusen *et al.*, 2003; Vanden Broeck, 2001b).

Eens een consensus sequentie gekend is van een klasse proteïnen kan dankzij de bio-informatica het genoom afgescand worden naar nieuwe kandidaten van een proteïne familie. Zo kunnen kandidaat GPCRs voorspeld worden op basis van overeenkomsten in de sequentie of op basis van voorspellingen van de 7TM domeinen. Om zeker te zijn dat het werkelijk om een GPCR gaat is een grondigere biochemische en functioneel genomische analyse noodzakelijk. Niet alleen GPCRs kunnen voorspeld worden vanuit het genoom maar ook potentiële neuropeptiden kunnen voorspeld worden. De komst van peptidomics, de studie die alle peptiden in alle cellen, weefsels, organismen,... enzovoort. probeert te identificeren, maakt het mogelijk om een peptidenbank samen te stellen. Deze peptiden worden eerst *in silico* voorspeld en worden vervolgens geïdentificeerd met behulp van massaspectrometrie (Caers *et al.*, 2012; Hancock, 2010, Meeusen *et al.*, 2003).

4. Allatotropine

Allatotropine (AT) werd voor het eerst gekarakteriseerd in 1989 in vrouwelijke adulten van *Manduca sexta* of de tabakspijlstaart, een nachtvlinder die behoort tot de lepidoptera of vlinders (schubvleugeligen). Het neuropeptide werd vernoemd naar haar biologische functie, namelijk het vermogen om de biosynthese van juveniel hormoon (JH) *in vitro* te stimuleren in de *corpora allata* (CA) (Kataoka *et al.*, 1989). Ook bij andere lepidoptera zoals *Heliothis virescens*, *Lacanobia oleracea*, *Pseudaletia unipuncta*, *Spodoptera frugiperda* en *Samia cynthia ricini* activeert het *Manse*-AT de biosynthese van JH. De productie wordt geïnhibeerd door allatostatines. JH is een pleiotroop hormoon dat meerdere functies bij verschillende insecten uitoefent. Bij de Hymenoptera of de vliesvleugeligen, waartoe de hommels behoren, is het hormoon betrokken bij de caste determinatie, reproductie en polyethisme, de specialisatie van individuele werkers in bepaalde taken (Elekonich en Horodyski, 2003; Goulson, 2010; Horodyski, 2013).

AT bestaat uit een familie van peptiden en komt voor in verscheidene invertebrate fyła. Bij meerdere insecten zijn al ATs geïsoleerd of *in silico* voorspeld (Elekonich en Horodyski, 2003; Weaver en Audsley, 2009). Tevens kunnen verschillende ‘splice’ varianten van één mRNA voorkomen in één organisme. AT is een neuropeptide met meerdere neuronale, endocriene en myoactieve rollen dat wordt vrijgelaten in de hemolymfe. Buiten de stimulatie van de productie van JH zijn ook andere functies van AT ontdekt in verscheidene soorten

insecten en ontwikkelingsstadia. Zo heeft AT een myotropische activiteit in *Locusta migratoria* (Paemen *et al.*, 1991), stimuleert het de hartslag in *M. sexta* (Veenstra *et al.*, 1994), inhibeert het *in vitro* op een dosis-afhankelijke manier het actief ion transport in het epitheel van de middendarm van *M. sexta*, (Lee *et al.*, 1998), stimuleert het contracties in de voordarm bij *Helicoverpa armigera* en *Lacanobia oleracea* (Duve *et al.*, 1999, 2000), stimuleert het de ventrale diafragma oscillaties in *Pseudaletia unipuncta* dat nu *Mythimna unipuncta* genoemd wordt (Koladich *et al.*, 2002) en speelt het een rol in de verwerking van informatie van het licht in het circadiaan ritme van de kakkerlak *Leucophaea maderae* (Petri *et al.*, 2002). De myotropische activiteit van allatotropine is intussen ook al aangetoond bij AT verwante peptiden in Mollusca (Harada *et al.*, 1993; Li *et al.*, 1993) en Annelida (Ukena *et al.*, 1995). Er wordt gesuggereerd dat de myotropische eigenschap de oorspronkelijk rol is van AT en dat de stimulatie van JH pas achteraf in de evolutie secundair tot stand kwam (Elekonich en Horodyski, 2003). Hoewel AT al in verscheidene insecten ontdekt is, is de AT sequentie nog niet geïdentificeerd in *D. melanogaster* (Hauser *et al.*, 2006; Hewes en Taghert, 2001; Vanden Broeck, 2001a), het insect waarbij het meeste neuropeptide-receptor onderzoek is gedaan (Elekonich en Horodyski, 2003; Horodyski *et al.*, 2011).

Pas in 2008 werd de eerste allatotropine receptor geïdentificeerd in *Bombyx mori* (lepidoptera) (Yamanaka *et al.*, 2008). Later zijn ook andere allatotropine receptoren (ATRs) gekarakteriseerd in *M. sexta* (lepidoptera) (Horodyski *et al.*, 2011), *T. castaneum* (coleoptera of schildvleugeligen) (Vuerinckx *et al.*, 2011) en *Aedes aegypti* (diptera of tweevleugeligen) (Nouzova *et al.*, 2012). Naast *Manse*-ATR reageerde ook *Bommo*-ATR en *Trica*-ATR op *Manse*-AT. De receptor van *T. castaneum* reageerde ook op *Locmi*-AT en een endogeen AT-achtig peptide. *Trica*-ATR en *Manse*-ATR koppelden beiden via G_q en G_s wat leidde tot een respectievelijke verhoging van intracellulaire Ca²⁺ en cAMP (Caers *et al.*, 2012).

In 2000 werd aangetoond door Rachinsky en Feldlaufer dat het *Manse*-AT ook de biosynthese van JH hormoon stimuleert in de CA van de larven van *Apis mellifera*. Dit was ook de eerste keer dat dit werd aangetoond in een insect dat niet behoort tot de lepidoptera. Hier werd tevens ook al gesuggereerd dat honingbijen zelf een soort-specifiek peptide zouden hebben met dezelfde eigenschappen als het *Manse*-AT dat werkt via een receptor-gemedieerd proces en waarbij deze receptor, weliswaar met een lagere affiniteit, ook reageert op het *Manse*-AT (Rachinsky en Feldlaufer, 2000). Hoewel AT in eerdere studies niet gevonden werd in *A. Mellifera* (Hauser *et al.*, 2006; Hummon *et al.*, 2006) en *Nasonia vitripennis* (Hauser *et al.*, 2010) werd dit neuropeptide wel geïdentificeerd in 2012 in *A. mellifera*, *N. vitripennis*, *B. terrestris* en andere Hymenoptera (Veenstra *et al.*, 2012).

ATR-achtige receptoren kunnen ook gevonden worden in het genoom van *Anopheles gambiae* (XP_318029), *Schistocerca gregaria* (AEX08666), *Acyrtosiphon pisum* (XP_003246932 en EGI68637), *N. vitripennis* (XP_003423809, XP_001604582 en XP_003425955), *Apis*

mellifera (XP_001120335), *Apis florea* (XP_003690070), *Bombus impatiens* (XP_003486747 en XP_003488643), *Megachile rotundata* (XP_003700808 en XP_003708421), *Harpegnathos saltator* (EFN76143 en EFN82892), *Acromyrmex echinator* (EGI68638 en EGI68637), *Camponotus floridanus* (EFN69879, EFN65383 en EFN73088) en nu ook *Bombus terrestris* (XP_003402490 en XP_003394933) maar is het niet gevonden in het genoom van *D. melanogaster* (Yamanaka *et al.*, 2008). Hoewel de receptor voorspeld wordt in meerdere soorten van de Hymenoptera werd de receptor nog niet experimenteel gekarakteriseerd in deze orde (Caers *et al.*, 2012) (NCBI: URL: <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi> en <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/?term=Orexin+receptor+hymenoptera>).

De sequentie van *Manse*-ATR is vergelijkbaar met de orexine receptoren in zoogdieren (Horodyski *et al.*, 2011). Onlangs werd aangetoond dat allatotropine en orexine beiden verwant zijn aan een neuropeptide in de ambulacraria, dat de echinodermata en de hemichordata bevat. Dit is een bewijs dat, hoewel er structureel geen gelijkenis is tussen allatotropine en orexine deze toch aan elkaar verwant zijn (Mirabeau and Joly, 2013).

5. Doelstelling

Nadat de ATR gekarakteriseerd werd in de lepidoptera, coleoptera en diptera trachten wij de receptor te karakteriseren in de vierde grote orde van de insecta; namelijk de Hymenoptera. Hiervoor wordt *B. terrestris* gekozen als werkorganisme.

Het volledige genoom van *B. terrestris* is nog niet bepaald maar een eerste versie van het genoom is al vrijgegeven in een pre-publicatie door 'The Baylor College of Medicine Human Genome Sequencing Center' in 2011 zodat onderzoekers met deze resultaten reeds aan het werk kunnen gaan (Beebase URL: <http://hymenopteragenome.org/beebase/>) (Munoz-Torres *et al.*, 2011). Op dit moment zijn twee orexine-receptorachtige receptoren voorspeld in het genoom van *B. terrestris*. Eén van deze receptoren blijkt geactiveerd te worden door allatotropine (XM_003402442, XP_003402490). Deze receptor wordt doorheen deze studie de allatotropine receptor (ATR) genoemd. De andere receptor (XM_003394885, XP_003394933) reageert niet op allatotropine en is nog steeds een weesreceptor. Deze receptor noemen we de orexine-receptorachtige receptor (OXR-achtig).

De twee receptoren worden opgepikt vanuit het cDNA van darren en worden gekloneerd in een expressievector. Vervolgens worden de receptoren tot expressie gebracht in eukaryote cellijnen waarmee wordt getest of allatotropine een ligand is van deze receptoren en of deze eventueel koppelen via Ca^{2+} of cAMP. Vervolgens wordt een weefsel distributie analyse uitgevoerd in darren met een kwantitatieve real-time polymerase-kettingreactie (q-RT-PCR). Ten slotte worden de receptoren ook onderworpen aan een structurele en fylogenetische analyse.

Hoofdstuk 2: Materiaal en methoden

A. Kloneren

In een eerste stap worden de doelwitgenen; ATR (**XP_003402490**) en OXR-achtig (**XP_003394933**), opgepikt uit cDNA met behulp van een gradiënt Polymerase kettingreactie (PCR). Door middel van agarose gelelektroforese kan worden nagegaan of, en bij welke temperatuur de reactie is opgegaan. Vervolgens kan het fragment gekloneerd worden in de expressievector pcDNATM3.1/V5-His TOPO[®] TA (InvitrogenTM). Deze vector wordt getransformeerd naar One Shot[®] TOP10 Chemically Competent Cells (InvitrogenTM). Deze *Escherichia coli* cellen zullen de vector, het recombinant plasmide DNA, amplificeren. Het plasmide DNA wordt op kleine schaal geogst door middel van de GenEluteTM HP Plasmid Miniprep Kit (Sigma-Aldrich[®]). Na een grondige analyse van plasmide DNA kan het plasmide op grote schaal geogst worden met de EndoFree[®] Plasmid Maxi Kit (Qiagen). De recombinante expressievector is nu klaar om eukaryote cellen te transfecteren, om daar tot expressie gebracht te worden.

A.1. Isolatie en amplificatie van het doelwitgen

De doelwitgenen; namelijk het ATR gen en het OXR-achtige gen, worden opgepikt en geamplificeerd vanuit cDNA door middel van een PCR. Het cDNA is afkomstig van hersenen van een dar. Het RNA is geëxtraheerd met de RNeasy[®] Lipid Tissue Mini Kit van Qiagen[®] en het cDNA is gesynthetiseerd met SuperScriptTM III Reverse Transcriptase (InvitrogenTM) en willekeurige hexamere primers (InvitrogenTM) (zie C.2 en C.3).

Omdat niet zeker geweten is bij welke temperatuur de primers zullen binden aan het cDNA en of deze binding specifiek is, wordt een gradiënt PCR uitgevoerd. In deze PCR worden meerdere reacties uitgevoerd met bij iedere reactie een andere temperatuur waarbij de primers zullen binden aan het template DNA.

De sequenties van de genen zijn te vinden op de website van het National Center for Biotechnology Information (NCBI, URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) (zie ook addendum S1). De primers worden zo ontworpen zodat het volledige open leesraam (ORF) van het gen exponentieel geamplificeerd wordt. De forward primer bevat ook de Kozak sequentie. Dit verbetert de translatie initiatie in eukaryote cellen. De ribosomale 40S subeenheid bindt aan de 5'cap van het mRNA en scant het mRNA af op zoek naar een startcodon (ATG) alvorens het associeert met de ribosomale 60S subeenheid. Als de 40S subeenheid het startcodon vindt, in combinatie met een purine drie plaatsen stroomopwaarts van dit startcodon en liefst in de vorm van ACCATGG, dan zal translatie door het 80S ribosoom geïnitieerd worden (Kozak, 1986).

De Advantage[®] 2 Polymerase Mix van Clontech bevat twee enzymen: het TITANIUM[™] Taq DNA Polymerase met een TaqStart[™] antilichaam en een kleine hoeveelheid proeflees polymerase. De combinatie van de twee enzymen geeft een drie keer hogere betrouwbaarheid dan het Taq DNA polymerase geïsoleerd uit de thermostabiele bacterie *Thermus aquaticus*. Dit is het eerste opgezuiverde thermostabiele polymerase dat niet denatureert bij een hitte behandeling. Dit maakt het enzym zeer nuttig voor PCR omdat bij denaturatie van het DNA op 94°C het enzym niet zal geïnactiveerd worden waardoor het in meerdere cycli gebruikt kan worden (Brown, 2010). Het TITANIUM[™] Taq DNA Polymerase is een Taq polymerase met een N-terminale deletie waardoor er geen 5'-exonuclease activiteit is zoals bij het oorspronkelijke Taq enzym. Het enzym heeft ook een AZ substitutie waardoor de oplosbaarheid verhoogd wordt. Het TaqStart[™] antilichaam zorgt ervoor dat het polymerase niet actief is bij een te lage temperatuur, alvorens de reactie gestart is. Het antilichaam denatureert bij opwarming, waardoor de reactie gestart kan worden. Dit is de zogenoemde hot start procedure.

Door de hot start procedure wordt het reactiemengsel opgewarmd waardoor de waterstofbruggen tussen de DNA strengen breken. Het template DNA denatureert dus waardoor bij afkoeling de primers kunnen hybridiseren aan het ssDNA. In de elongatie stap wordt een nieuwe DNA streng gesynthetiseerd, complementair aan het template DNA. Hierbij worden dNTPs als bouwstenen gebruikt door het DNA polymerase. Deze cyclus wordt 30 keer herhaald zodat het gen exponentieel vermenigvuldigd wordt. Ten slotte wordt de elongatie stap gedurende 10 minuten aangehouden zodat de 3'A-overhang, die nodig zal zijn om het insert in de vector te ligeren, verzekerd wordt.

Omdat het OXR-achtige gen niet kan worden opgepikt met de standaard-methode zoals bij het ATR gen, is deze methode geoptimaliseerd.

Materiaal:

- Thermocycler (TProfessional/Standard Thermocycler, Biometra)
- dNTPs (10 mM) (Invitrogen[™])
- Forward en reverse primers (Sigma-Aldrich[®])
 - Primers voor ATR:
 - Forward primer: **CACCATGCATCCTCTTGAGTTAGTG**
 - Reverse primer: **TCAATCGTGTTTTTCATTCTG**
 - Primers voor OXR-achtig:
 - Forward primer: **CACCATGTCGACGAATGTATAACAACGA**
 - Reverse primer: **ATGTTGTTTCGTCCGTGGTGATGAAT**
- MilliQ[®] water (Millipore)
- PCR buisjes 0.2 ml (Thermo Scientific)
- Centrifuge 5415D (Eppendorf)

- Advantage[®] 2 Polymerase Mix (Clontech)
 - 50X Advantage[®] 2 Polymerase Mix: Glycerol (50%), Tris-HCl (pH 8.0, 15 mM), KCl (75 mM), EDTA (0,05 mM)
 - 10X Advantage[®] 2 PCR Buffer: Tricine-KOH (pH 8.7, 400 mM), KOAc (150 mM), Mg(OAc)₂ (35 mM), BSA (37.5 µg/ml), Tween 20 (0,05%), Nonidet-P40 (0,05%)

Methode:

- Voor ATR: breng de volgende producten in een PCR buisje (0,2 ml): (5x)
 - 40,5 µl MilliQ[®] water
 - 1 µl cDNA
 - 1 µl forward primer
 - 1 µl reverse primer
 - 1 µl dNTPs
 - 5 µl 10X Advantage[®] 2 PCR Buffer
 - 0.5 µl 50X Advantage[®] 2 Polymerase Mix

Draai het enzym even af in de centrifuge voordat het toegevoegd wordt

- Voor OXR-achtig: breng de volgende producten in een PCR buisje (0,2 ml): (6x)
 - 34,5 µl MilliQ[®] water
 - 5 µl cDNA
 - 2 µl forward primer
 - 2 µl reverse primer
 - 1 µl dNTPs
 - 5 µl 10X Advantage[®] 2 PCR Buffer
 - 0.5 µl 50X Advantage[®] 2 Polymerase Mix
- Pipetteer voorzichtig op en neer om de componenten goed te mengen
- Draai de PCR buisjes even af in de centrifuge zodat alle reagenten op de bodem van het buisje komen te liggen
- Plaats de PCR buisjes in de thermocycler en start het volgende programma:

95°C	3 min	hot start	
94°C	30 sec	denaturatie	
Δ°C	60 sec	binden primers	x30
68°C	90 sec	elongatie	
70°C	10 min	eindelongatie	
4°C	∞	pauze	

Voor het OXR-achtige gen wordt hetzelfde programma gebruikt, maar omdat dit gen 1533 bp lang is t.o.v. 1323 bp bij het ATR gen duurt de elongatiestap 2 min i.p.v. 90 sec. Bij het ATR gen worden de volgende temperaturen gebruikt bij de gradiënt: 50°C, 55°C, 60°C, 64°C en 68°C. Bij het OXR-achtige gen: 50,6°C, 54,0°C, 58,7°C, 61,3°C, 63,6°C en 68,1°C.

- Bewaar het PCR product in de diepvriezer op -20°C

A.2. Agarose gelelektroforese

Met behulp van een agarose gelelektroforese kan worden nagegaan of de PCR reactie is opgegaan en of deze reactie specifiek is en dus alleen het doelwitgen geamplificeerd is. Onder invloed van elektrische stroom zal het DNA, dat een netto negatieve lading heeft, doorheen de gel migreren naar de positieve pool (anode). De DNA fragmenten worden gescheiden op basis van grootte. Kleinere fragmenten kunnen sneller doorheen de poriën van de agarose gel migreren dan grotere fragmenten. Met behulp van een ladder (O'RangeRuler™ 200 bp DNA ladder) kan de lengte van het fragment geschat worden. De laadbuffer verhoogt de dichtheid van de stalen. Hierdoor zal bij het laden van de gel het mengsel onderaan in het slotje glijden en kan nagegaan worden tot waar het staal gemigreerd is in de gel.

De compositie van de gel bepaalt het scheidend vermogen van de gel. Een gel met 0,5% agarose kan fragmenten met een groot verschil in grootte van elkaar scheiden omwille van haar grote poriën. Een gel met 40% agarose bevat veel kleinere poriën en zal fragmenten met een veel kleiner verschil (zelfs tot 1 nucleotide verschil) van elkaar scheiden (Brown, 2010). Om na te gaan of het gen exponentieel geamplificeerd is en of dit bandje de juiste grootte heeft, wordt er gekozen voor een 1% agarose gel.

Materiaal:

- Agarose (Sigma-Aldrich®)
- GelRed™ 10000x in DMSO (Biotum)
- O'RangeRuler™ 200 bp DNA ladder (Fermentas)
- TAE buffer (50x)
 - 242,5 g Trizma® base ($\text{C}(\text{CH}_2\text{OH})_3(\text{NH}_2)$) (Sigma-Aldrich®)
 - 34 g Natriumacetaat trihydraat ($\text{CH}_3\text{COONa}\cdot 3\text{H}_2\text{O}$) (Sigma-Aldrich®)
 - 18,5 g Titriplex III ($\text{Na}_2\text{EDTA}\cdot 3\text{H}_2\text{O}$) (Sigma-Aldrich®)
 - Verdun met gedestilleerd water (AD) tot 900 ml
 - Breng de pH op 7,8 met azijnzuur (CH_3COOH) (Sigma-Aldrich®)
 - Verdun met gedestilleerd water (AD) tot 1 liter
- Voor TAE-buffer (1x)
 - Verdun 200 ml TAE buffer (50x) in 10 l gedestilleerd water (AD)
- 6x Orange DNA Loading Dye (Fermentas)
- Microgolfoven
- Stroombron
- Erlenmeyer (200 ml)
- Kam met kleine slotjes
- Mal

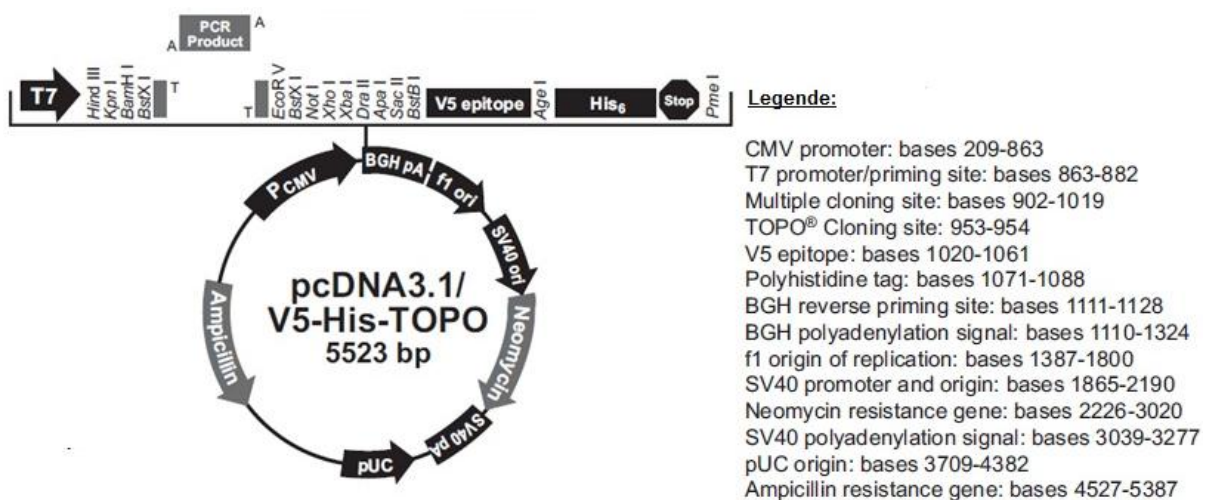
- PCR product
- UV-bron (ProXima 2500, Isogen Life Science)

Methode:

- Weeg 1 gram agarose af
- Voeg 100 ml TAE buffer (1x) toe
- Verhit de oplossing in de microgolfoven totdat de oplossing kookt en de agarose volledig opgelost is
- Koel de oplossing af onder stromend water tot $\pm 50^{\circ}\text{C}$
- Voeg 5 μl GelRed™ toe en meng voorzichtig
- Plaats de kam met de slotjes in de mal
- Giet de oplossing in de mal
- Laat de gel stollen
- Verwijder de kam
- Plaats de gel in een elektroforese bak gevuld met TAE buffer (1x)
- Voeg 1 μl 6x Orange DNA Loading Dye toe aan 5 μl PCR product
- Laad de stalen (6 μl) en de ladder (4 μl O'RangeRuler™ 200 bp DNA ladder) in de slotjes
- Breng de juiste stroomsterkte en elektrische spanning aan (120 volt en 120 ampere)
- Visualiseer de DNA bandjes onder UV-licht

A.3. TOPO® klonering

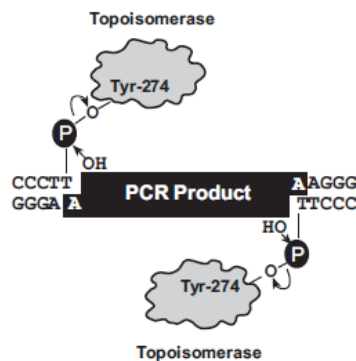
Met behulp van de pcDNA™3.1/V5-His TOPO® TA Expression Kit van Invitrogen™ kan, indien de primers specifiek genoeg zijn, het PCR product van de doelwitgenen rechtstreeks in de expressievector gekloond worden. Een overzicht van de expressievector: pcDNA™3.1/V5-His-TOPO® vector wordt weergegeven in figuur 2.1.



Figuur 2.1.: Overzicht van de pcDNA™3.1/V5-His TOPO® TA vector (Invitrogen™) met bijhorende legende. De topoisomerasen zijn niet weergegeven in de figuur (Invitrogen™).

De pcDNATM3.1/V5-His-TOPO[®] vector bevat een onmiddellijke snelle promotor van het humane cytomegalovirus (HCMV) waardoor het recombinant proteïne tot hoge expressie wordt gebracht in eukaryote cellen zonder noodzaak van extra transcriptiefactoren (Boshart *et al.*, 1985). pUC afgeleide ‘*origin of replication*’ bevordert een hoog aantal kopies van het plasmide in *E. Coli*. Met de T7 en de BGH primer bindingsplaatsen kan de sequentie van het insert bepaald worden. Het SV40 polyadenylatie signaal en het bovine groei-hormoon (BGH) polyadenylatie signaal zorgen voor een efficiënte transcriptie terminatie en polyadenylatie van het mRNA in de eukaryote cellen (Goodwin en Rottman, 1992). Het ampicilline resistentiegen zorgt ervoor dat in aanwezigheid van ampicilline in het medium, alleen de *E. coli* cellen kunnen groeien die het plasmide hebben opgenomen en waarbij de transfectie dus gelukt is.

De expressievector wordt gelineariseerd geleverd met een 3'-T overhang nodig voor de TA Cloning[®] en een Topoisomerase covalent gebonden aan de vector. Het Topoisomerase I is een eiwit dat opgezuiverd is uit het *Vaccinia* virus. Het eiwit herkent de 5'-CCCTT sequentie in een DNA duplex (Shuman, 1992). Door de dubbelstreng te breken en een covalente binding te maken tussen de 3' fosfaatgroep van de gebroken streng en tyrosyl residu nummer 274 (Tyr-274) wordt de bindingsenergie wordt opgeslagen. Door een aanval van een 5' hydroxyl groep wordt de opgeslagen energie overgedragen waardoor het eiwit loskomt en een nieuwe covalente binding gevormd wordt (Shuman, 1994). De TOPO[®] Cloning reactie maakt gebruik van deze eigenschap om efficiënt het insert covalent in de vector te brengen. Deze efficiëntie wordt verhoogd doordat de 3'-A overhang van het insert en de 3'-T overhang van de vector hybridiseren en dus de 5' hydroxyl in de buurt van het topoisomerase wordt gebracht. Deze reactie wordt weergegeven in figuur 2.2. In aanwezigheid van zout kan de incubatietijd verhoogd worden omdat het zout verhindert dat het topoisomerase terug bindt aan het DNA. Doordat meer intacte recombinante moleculen geproduceerd worden, is de transformatie efficiëntie hoger. De expressievector bevat zelf een 3' hydroxylgroep. Ook deze hydroxylgroep kan de binding van topoisomerase aanvallen waardoor de vector kan sluiten zonder insert.



Figuur 2.2.: Weergave van de TOPO[®] Cloning met topoisomerase: De 3'-A overhang van het insert en de 3'-T overhang van de vector hybridiseren. Hierdoor kan de 5' hydroxylgroep van het insert de covalente binding aanvallen tussen de 3'fosfaat en Tyr-274 zodat een nieuwe covalente binding gevormd wordt met het PCR product en de topoisomerase dissocieert (InvitrogenTM).

Materiaal:

- Inset: PCR product met 3' A-overhang
- MilliQ[®] water (Millipore)
- Vector: pcDNA[™]3.1/V5-His-TOPO[®] (Invitrogen[™]): 10 ng/μl plasmide in: 50% glycerol, 50 mM Tris-HCL, pH 7,4 (bij 25°C), 1 mM EDTA, 2 mM DTT, 0,1% Triton[®] X-100, 100 μg/ml BSA, 30 μM fenol rood
- Salt Solution: 1,2 M NaCl, 0,06 M MgCl₂

Methode:

- Breng 2 μl MilliQ[®] water in een microcentrifuge buisje (0,5 ml)
- Voeg 2 μl PCR product toe
- Voeg 2 μl Salt Solution toe
- Voeg 1 μl pcDNA[™]3.1/V5-His-TOPO[®] toe
- Incubeer 30 min op KT
- Bewaar dit product in de diepvriezer op -20°C of ga verder met de transformatie

A.4. Transformatie naar bacteriën

De recombinante expressievectoren worden getransformeerd naar One Shot[®] TOP10 Chemically Competent Cells (Invitrogen[™]). Deze *E. coli* cellen zijn niet resistent tegen ampicilline. Alleen de cellen die de expressievector hebben opgenomen kunnen groeien op de LB agar platen die ampicilline bevatten. Het uitplaten van de cellen is een contaminatie gevoelige stap. Daarom wordt er in een met ethanol ontsmette laminaire flowkast gewerkt en is het gebruik van handschoenen noodzakelijk.

Materiaal:

- Incubator op 37°C (IP30, LTE Scientific)
- Schudincubator, 200 rpm en op 37°C (C25 Incubator/Shake, New Brunswick Scientific)
- Warm waterbad op 42°C
- Ampicilline (10 mg/ml) (500 mg ampicillin sodium salt (Sigma-Aldrich[®]) opgelost in 50 ml MilliQ[®] water (Millipore) en steriel gefilterd
- 70% ethanol (voor 1 l: 700 ml Desinfectol[®], Chem-Lab nv + 300 ml Milli-Q[®] water, Millipore)
- Laminaire flowkast (Clean Air Technologies, Inc.)
- TubeSpin[®] Bioreactor 15 (Techno Plastic Products AG)
- Luria-Bertani (LB) agar platen met 50 μg/ml ampicilline:
 - Weeg 17,5 g LB agar af (Sigma-Aldrich[®]): 10 g/l Tryptone, 5 g/l gistextract, 5g/l NaCl, 15 g/l agar
 - Voeg 0,5 l gedestilleerd water toe (AD)
 - Schud krachtig

- Autoclaveer en laat afkoelen tot $\pm 50^{\circ}\text{C}$
- Voeg 2,5 ml ampicilline (10 mg/ml) toe
- Giet een dunne laag agar in petri schaaltes (MLS nv) en laat stollen
Voer deze stap uit in de laminaire flowkast.
- Sluit de platen af met Parafilm[®] “M” Laboratory film (Pichiney plastic packaging)
- Bewaar de platen in de koelkast op 4°C
- One Shot[®] TOP10 Chemically Competent Cells (Invitrogen[™])
 - TOP10 Cellen
 - SOC Medium: 2% Tryptone, 0,5% Gist extractive, 10 mM NaCl, 2,5 mM KCl, 10 mM MgCl₂, 10 mM MgSO₄ en 20 mM glucose

Methode:

- Plaats het SOC medium en drie LB agar platen in de incubator op 37°C
- Ontdooi de One Shot[®] TOP10 Chemically Competent Cells op ijs
- Voeg 4 μl van de TOPO[®] Cloning reactie toe aan de cellen
Pipetteer dit niet op en neer want dan gaan de cellen stuk.
- Incubeer 30 min op ijs
- Geef de cellen een hittedschok gedurende 30 sec op 42°C
- Zet de cellen onmiddellijk terug op ijs en laat ten minste 2 min afkoelen
- Voeg 250 μl SOC medium toe onder de laminaire flowkast
- Sluit het buisje, plaats deze in een falcon buisje (15 ml) en plaats dit gedurende 1 uur horizontaal in de schudincubator aan 200 rpm op 37°C
- Ontsmet de laminaire flowkast met 70% ethanol
- Spreid 50 μl , 100 μl en de rest van de transformatie uit over drie voorverwarmde LB agar platen
- Incubeer overnacht in de incubator op 37°C

A.5. Opgroeien van bacteriën

De getransformeerde cellen zullen kolonies vormen. De hoeveelheid cellen is echter niet voldoende om een hanteerbare hoeveelheid plasmide op te zuiveren. Daarom wordt elke kolonie apart opnieuw overnacht opgegroeid om een grotere hoeveelheid cellen van een kolonie te hebben. Omdat dit steriel moet gebeuren om contaminatie te voorkomen wordt er in een laminaire flowkast gewerkt en moeten er handschoenen gedragen worden.

Materiaal:

- 70% ethanol (voor 1 l: 700 ml Desinfectol[®], Chem-Lab nv + 300 ml Milli-Q[®] water, Millipore)
- TubeSpin[®] Bioreactor 15 (Techno Plastic Products AG)
- Agarplaat met opgegroeide, recombinantie *E. coli* cellen

- Laminaire flowkast (Clean Air Technologies, Inc.)
- Ampicilline (10 mg/ml) (500 mg ampicillin sodium salt (Sigma-Aldrich[®]) opgelost in 50 ml MilliQ[®] water (Millipore) en steriel gefilterd)
- Schudincubator, 200 rpm en op 37°C (C25 Incubator/Shake, New Brunswick Scientific)
- Luria-Bertani (LB) broth medium:
 - Weeg 10 g LB broth af (Sigma-Aldrich[®]): 10 g/l Tryptone, 5 g/l gistextract en 5 g/l NaCl
 - Voeg een halve liter gedestilleerd water toe (AD)
 - Schud krachtig
 - Autoclaveer
 - Bewaar op KT

Methode:

- Ontsmet de laminaire flowkast met 70% ethanol
- Voeg 5 ml LB broth medium in een falcon buisje (15 ml)
- Voeg 25 µl ampicilline toe (eindconcentratie 50 µg/ml)
- Neem één kolonie en breng deze over naar de falcon
- Plaats in de schudincubator bij 37°C

A.6. Opzuiveren van plasmide DNA op kleine schaal (mini-prep)

Met de GenElute™ HP Plasmid Miniprep Kit (Sigma-Aldrich[®]) kan snel, gemakkelijk en goedkoop tot wel 25 µg plasmide DNA geïsoleerd worden uit de recombinante *E. coli* cultuur. Dit is voldoende om het plasmide DNA verder te analyseren. Wij maken gebruik van de Spin Methode en niet van de Vacuum Methode. In een eerste stap zullen de cellen geoogst worden door centrifugatie. Vervolgens worden de cellen gehersuspendeerd en worden de cellen onderworpen aan de alkaline-SDS lysis procedure. SDS is een detergent dat de vetmoleculen uit het celmembraan verwijdert waardoor de cellen lyseren (Brown, 2010). Door toevoeging van een neutraliserende oplossing zullen de overblijfselen van de cellen, de proteïnen, de vetten, het SDS en het genomisch DNA neerslaan. In aanwezigheid van een hoge zoutconcentratie zal het plasmide DNA binden aan het silica membraan. Dit membraan wordt twee keer gewassen. Bij een eerste wasbeurt zullen contaminanten verwijderd worden. In een tweede wasbeurt wordt het overgebleven zout samen met de overige contaminanten weggewassen. Ten slotte wordt het plasmide DNA geëluëerd met Elution Solution.

Materiaal:

- Centrifuge 5415D (Eppendorf)
- Laminaire flowkast (Clean Air Technologies, Inc.)
- 70% ethanol (voor 1 l: 700 ml Desinfectol[®], Chem-Lab nv + 300 ml Milli-Q[®] water, Millipore)

- GenElute™ HP Plasmid Miniprep Kit
 - Resuspension Solution met 1/200 RNase A Solution
 - Lysis Buffer
 - Neutralization/Binding Buffer
 - Column Preparation Solution
 - Wash Solution 1
 - Wash Solution 2, verdund met Desinfectol® (Chem-Lab nv)
 - Elution Solution (10 mM Tris-HCl, pH 8,5)
 - Microcentrifuge buisjes (2 ml)

Methode:

- Ontsmet de laminaire flowkast met 70% ethanol
 - Breng 2 ml van de overnacht opgegroeide recombinante *E. coli* cultuur in een microcentrifuge buisje
 - Centrifugeer gedurende 1 min aan 13000 rpm en gooi het supernatans weg
- De rest van het protocol moet niet uitgevoerd worden in een laminaire flowkast.*
- Resuspender de pellet bacteriën in 200 µl RNase A bevattende Resuspension Solution
 - Voeg 200 µl Lysis Solution toe en mix onmiddellijk door het microcentrifuge buisje 8 keer om te draaien

Vortex dit zeker niet want hierdoor zal het genomisch DNA breken waardoor ook dit DNA aan het silica membraan zal binden. Het eindproduct zal dan niet alleen plasmide DNA bevatten maar ook vervuild zijn met chromosomaal DNA.

- Incubeer gedurende 5 min op KT

Laat de lysis reactie niet langer dan 5 min opgaan. Dit veroorzaakt denaturatie van het gecondenseerde plasmide DNA waardoor het niet meer gebruikt kan worden voor de meeste toepassingen.

- Voeg 350 µl Neutralization Solution toe en draai de buisjes 6 keer om
- Centrifugeer gedurende 10 min aan 13000 rpm
- Zet een GenElute HP Miniprep Binding Column in het bijgeleverd microcentrifuge buisje
- Voeg 500 µl Column Preparation Solution toe aan de kolom
- Centrifugeer de kolom gedurende 1 min aan 13000 rpm en verwijder het eluaat
- Breng het heldere lysaat aan op de kolom en centrifugeer 1 min aan 13000 rpm, verwijder het eluaat
- Voeg 500 µl Wash Solution 1 toe
- Centrifugeer 1 min aan 13000 rpm, verwijder het eluaat
- Voeg 750 µl Wash Solution 2 toe
- Centrifugeer 1 min aan 13000 rpm, verwijder het eluaat
- Centrifugeer opnieuw 1 min aan 13000 rpm om overtollig ethanol zeker te verwijderen
- Zet de GenElute HP Miniprep Binding Column in een nieuw verzamelbuisje

- Voeg 50 µl Elution Solution toe
- Centrifugeer 1 min aan 13000 rpm
- Bewaar de stalen in de diepvriezer op -20°C

A.7. Analyse van het opgezuiverde plasmide

Het opgezuiverde plasmide wordt eerst geanalyseerd alvorens het op grote schaal wordt geoogst. Door de concentratie en de zuiverheid te meten wordt nagegaan of de mini-prep is gelukt. Door middel van een PCR en agarose gelelektroforese kan worden nagegaan of het insert is opgenomen in de vector en of dit insert in de juiste richting zit. Het is vooral belangrijk dat de sequentie van het insert bepaald wordt. Een juiste sequentie is noodzakelijk voor een juiste expressie in de eukaryote cellen.

A.7.1. Concentratie meting

Met behulp van de NanoDrop[®] Spectrophotometer (ND-1000, NanoDrop Technologies) wordt de concentratie van het opgezuiverde plasmide DNA gemeten. De concentratie wordt bepaald door het meten van de absorptie bij 260 nm (A_{260}). Hierbij komt één unit overeen met 44 µg per ml in neutrale condities. De zuiverheid wordt geschat door de verhouding van de absorptie bij 260 nm over de absorptie bij 280 nm (A_{260}/A_{280}) te berekenen. Een waarde van 1,8 impliceert zuiver DNA. Een waarde van 2 impliceert zuiver RNA. Deze waarden kunnen afhankelijk van de pH en de sequentie van de nucleotide basen variëren. Ook de verhouding A_{260}/A_{230} geeft aan of het staal zuiver is. De waarde van de verhouding ligt tussen de 2,0 en 2,2. Een lagere A_{260}/A_{230} waarde wijst op aanwezigheid van contaminanten die absorberen bij 230 nm zoals fenol en EDTA.

A.7.2. Analyse door PCR en agarose gelelektroforese

Alleen de mini-prep van het OXR-achtige gen wordt geanalyseerd met een PCR en een agarose gelelektroforese nog voor de sequentie bepaald wordt. Bij een PCR met een forward primer gelegen stroomopwaarts van het insert en een reverse primer gelegen in het insert zal het insert alleen maar exponentieel geamplificeerd worden indien het insert aanwezig is in de vector en bovendien in de juiste richting zit. Het PCR product wordt geanalyseerd door een agarose gelelektroforese (1%) (Zie A.2). De keuze van de polymerase is niet zo belangrijk omdat de sequentie van het PCR product niet juist hoeft te zijn.

Materiaal:

- Thermocycler (TProfessional/Standard Thermocycler, Biometra)
- dNTPs (10 mM)
- Forward primer T7 (3,2 mM): TAATACGACTCACTATAGGG (Invitrogen[™])
- Reverse primer OXR-achtig (10 mM): ATGTTGTTCCGTCGGTGATGAAT (Sigma-Aldrich[®])
- MilliQ[®] water (Millipore)

- PCR buisjes 0.2 ml (Thermo Scientific)
- Centrifuge 5415D (Eppendorf)
- Advantage[®] 2 Polymerase Mix (Clontech)
 - 50X Advantage[®] 2 Polymerase Mix: (zie A.1.)
 - 10X Advantage[®] 2 PCR Buffer: (zie A.1.)

Methodede:

- Breng de volgende producten in een PCR buisje: (5x)
 - 40,5 µl MilliQ[®] water
 - 1 µl cDNA
 - 1 µl forward primer
 - 1 µl reverse primer
 - 1 µl dNTPs
 - 5 µl 10X Advantage[®] 2 PCR Buffer
 - 0.5 µl 50X Advantage[®] 2 Polymerase Mix
- Draai de buisjes kort af in de centrifuge
- Plaats de PCR buisjes in de Thermocycler en start het volgende programma:

95°C	3 min	hot start	
94°C	30 sec	denaturatie	
Δ°C	60 sec	binden primers	x30
68°C	2 min	elongatie	
4°C	∞	pauze	

- Analyseer het PCR product met een agarose gelelektroforese (zie procedure A.2.)

A.7.3. Sequentiebepaling

Om na te gaan of de sequentie van het insert juist is en om zeker te zijn dat het fragment in de juiste richting zit wordt de sequentie van het fragment bepaald. Het bepalen van de sequentie is gebaseerd op de ‘*dideoxy chain termination reaction*’ van Sanger (Sanger *et al.*, 1977).

In deze PCR worden naast dNTPs ook een kleine hoeveelheid 2',3' dideoxyribonucleotide trifosfaten (ddNTPs) toegevoegd. Deze nucleotiden missen naast de gebruikelijke 2'-OH (hydroxylgroep) ook een 3'-OH. Doordat de 5'-P (fosfaatgroep) van een volgend nucleotide niet meer kan binden aan de 3'-OH, kan de elongatie niet verder opgaan. Tijdens de elongatie wordt willekeurig een dNTP of een ddNTP ingebouwd. Hierdoor ontstaan fragmenten met verschillende lengtes. Door capillaire elektroforese worden deze fragmenten gescheiden op basis van grootte. Elke ddNTP (ddATP, ddCTP, ddGTP en ddTTP) draagt een fluorescent merker. Wanneer het fragment het capillair verlaat wordt het fluorescent signaal gelezen door een laser. De volgorde van de fluorescente signalen geeft de sequentie van het fragment weer.

A.7.3.1 Sequencerings PCR

In een PCR worden de fragmenten van verschillende lengtes geproduceerd die noodzakelijk zijn voor het bepalen van de sequentie. De ddNTPs bevatten een fluorescente merker waardoor alle fragmenten een label dragen die gelezen kan worden. Omdat de fragmenten 1533 en 1323 bp lang zijn wordt de sequentie langs twee kanten gelezen; namelijk met een forward en een reverse primer. Bovendien wordt ook een interne forward primer gebruikt om zeker te zijn dat de sequentie van het hele insert bepaald is. Voor elk gen worden er dus drie PCR reacties uitgevoerd.

Materiaal:

- Thermocycler (TProfessional/Standard Thermocycler, Biometra)
- Forward, reverse en interne primers:
 - Forward primer T7 (3,2 mM) (Invitrogen™): TAATACGACTCACTATAGGG
 - Reverse primer BGH (3,2 mM) (Invitrogen™): TAGAAGGCACAGTCGAGG
 - Intern OXR-achtig (10 mM) (Sigma-Aldrich®): ACTTGGCGATAAGGAGTCCT
 - Intern ATR (10 mM) (Sigma-Aldrich®): CCACCACTGGACGAGCAA
- Centrifuge 5415D (Eppendorf)
- PCR buisjes 0.2 ml (Thermo Scientific)
- BigDye® Terminator v1.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems®)
 - BigDye® ready reaction mix
 - BigDye® Terminator v1.1/3.1 Sequencing Buffer (5x), verdund met MilliQ® water tot (2,5x)
- MilliQ® water (Millipore)

Methode:

- Voeg de volgende componenten toe in een PCR buisje van 0,2 ml
 - 8 µl MilliQ® water
 - 6 µl BigDye® Terminator v1.1/3.1 Sequencing Buffer (2,5x)
 - 1 µl primer (Forward of Reverse)
 - 2 µl BigDye® ready reaction mix
- Pipetteer voorzichtig op en neer en draai kort af in de centrifuge
- Plaats de PCR buisjes in de Thermocycler en start het volgende programma:

96°C	2 min	hot start	x 25
96°C	30 sec	denaturatie	
50 °C	15 sec	binden van de primer	
60 °C	150 sec	elongatie	
6°C	∞	pauze	

A.7.3.2. Neerslaan

De niet ingebouwde ddNTPs kunnen voor storingen zorgen in de sequentiebepaling. Door de DNA fragmenten neer te slaan worden alle contaminanten verwijderd.

Materiaal:

- Thermoblock (Biometra)
- Desinfectol[®] (Chem-Lab nv)
- 70% ethanol (voor 50 ml: 35 ml Desinfectol[®], Chem-Lab nv + 15 ml Milli-Q[®] water, Millipore)
- NaAc (Natrium acetaat) 3 M
- EDTA (125 mM en 0,1 mM)
- Centrifuge 4°C (Heraeus Fresco 21 Centrifuge, Thermo Scientific)
- Vortex

Methode:

- Voeg de volgende componenten toe in een microcentrifuge buisje van 0,5 ml:
 - 50 µl 95% ethanol in een microcentrifuge buisje van 0,5 ml
 - 2 µl NaAc
 - 2 µl EDTA (125 mM)
 - 20 µl PCR product

- Incubeer 15 min op KT
- Centrifugeer 20 min op 4°C en gooi het supernatans weg
- Voeg 250 µl 70% ethanol toe
- Schud kort met een vortex
- Centrifugeer 10 min op 4°C en gooi het supernatans weg

Deze stap mag ook in een centrifuge op KT uitgevoerd worden.

• Droog de pellet in de Thermoblock gedurende 1 min op 90°C terwijl het buisje open is
In deze fase kan het product bewaard worden in de diepvriezer op -20°C.

- Los de pellet op in 20 µl 0,1 mM EDTA met een vortex
- Verhit gedurende 2 min op 96°C
- Plaats de stalen in de koelkast op 4°C tot ze in de in de ABI Prism 3130 Genetic Analyser (Applied Biosystems[®]) geplaatst kunnen worden

A.7.3.3. Sequentiebepaling

De sequentie van de stalen wordt bepaald met de ABI Prism 3130 Genetic Analyser van Applied Biosystems[®]. Deze bevat vier capillairen en kan tot 950 bp lezen.

A.8. Opzuiveren van plasmide DNA op grote schaal (maxi-prep)

Voor de transfectie van de eukaryote cellen is een veel grotere concentratie recombinante expressievector nodig dan opgezuiverd kan worden met een mini-prep. Om grotere concentraties plasmide DNA op te zuiveren wordt gebruik gemaakt van de EndoFree[®] Plasmid Maxi Kit van Qiagen. Indien mogelijk wordt er gestreefd naar een concentratie van 500 ng/ μ l.

De cellen worden eerst overnacht opgegroeid. Vervolgens worden de cellen geogst, gehersuspendeerd in buffer P1 en gelyseerd met buffer P2. SDS verwijdert de lipide moleculen uit het celmembraan waardoor de cellen barsten (Brown, 2010). Na neutralisatie met buffer P3 wordt een witte neerslag gevormd. Deze neerslag bevat genomisch DNA, proteïnen, SDS en andere overblijfselen van de cel. Deze neerslag wordt er uitgefilterd door de QIAfilter. Buffer ER is een endotoxine verwijderende buffer. Endotoxines zijn lipopolysacchariden (LPS) die deel uitmaken van de celmembraan van Gram-negatieve bacteriën zoals *E. coli*. Endotoxines zullen de efficiëntie van de transfectie van eukaryote cellen verminderen. Na de incubatie op ijs wordt het mengsel overgebracht naar de QIAGEN-tip 500. In aanwezigheid van een lage zoutconcentratie en de juiste pH zal door anion-uitwisselingschromatografie het plasmide DNA binden aan de kolom. Vervolgens wordt het RNA, de overige proteïnen en onzuiverheden met een laag moleculair gewicht verwijderd door twee wasbeurten met buffer QC. Het DNA wordt geëlueerd door de hoge zoutoplossing van buffer QN. Het zout wordt verwijderd door het DNA neer te slaan met isopropanol. Na het wassen van de pellet met 70% ethanol wordt de pellet opgelost in TE.

Materiaal:

- Laminaire flowkast (Clean Air Technologies, Inc.)
- Sorvall RC 6 Plus centrifuge (Thermo Scientific)
- Sorvall centrifuge buis
- Schudincubator, 200 rpm en op 37°C (C25 Incubator/Shake, New Brunswick Scientific)
- Recombinante bacteriecultuur (zie hierboven)
- EndoFree[®] Plasmid Maxi Kit (Qiagen):
 - QIAGEN-tip 500
 - QIAfilter Maxi Cartridges
 - Dop voor de QIAfilter
 - Buffer P1 (resuspensiebuffer): 50 mM Tris-Cl (pH 8.0), 10 mM EDTA en 100 μ g/ml RNase A
 - Buffer P2 (lysisbuffer): 200 mM NaOH en 1% SDS (m/V)
 - Buffer P3 (neutralisatiebuffer): 3,0 M kaliumacetaat (pH 5,5)
 - Buffer QBT (equilibratiebuffer): 750 mM NaCl, 50 mM MOPS (pH 7,0), 15% isopropanol (V/V) en 0,15% Triton[®] X-100 (V/V)

- Buffer QC (wasbuffer): 1 M NaCl, 50 mM MOPS (pH 7,0) en 15% isopropanol (V/V)
- Buffer QN (elutiebuffer): 1,6 M NaCl, 50 mM MOPS (pH 7,0) en 15% isopropanol (V/V)
- Buffer ER: isopropanol, polyethyleen glycol octylfenyl ether
- TE: 10 mM Tris-Cl (pH 8,0) en 1 mM EDTA
- Endotoxine-vrij water voor 70% ethanol
- 70% ethanol (Voor 50 ml: 35 ml Desinfectol[®] (Chem-Lab nv) + 15 ml endotoxine-vrij water)
- Geautoclaveerde erlenmeyer (500 ml) met dop
- LB broth medium (zie A.5)
- Ampicilline (10 mg/ml) (500 mg ampicillin sodium salt (Sigma-Aldrich[®]) opgelost in 50 ml MilliQ[®] water (Millipore) en steriel gefilterd)
- TubeSpin[®] Bioreactor 50 (Techno Plastic Products AG)
- Isopropanol 100% (Sigma-Aldrich[®])
- NanoDrop[®] Spectrophotometer (ND-1000, NanoDrop Technologies)

Methode:

Zet Buffer 3 op voorhand in de koelkast op 4°C

- Ontsmet de laminaire flowkast met 70% ethanol
- Doe 100 ml LB Broth medium in een geautoclaveerde erlenmeyer
- Voeg 500 µl ampicilline (10 mg/ml) toe
- Voeg 100 µl van de getransformeerde bacteriecultuur toe
- Doe de dop op de erlenmeyer en incubeer overnacht in de schudincubator (200 rpm op 37°C)

De rest van de procedure moet niet meer uitgevoerd worden in een laminaire flowkast.

- Breng de cultuur over naar een Sorvall centrifuge buis
- Centrifugeer de cultuur 15 min aan 6000 x g op 4°C en verwijder het supernatans
- Resuspendeer de cellen in 10 ml buffer P1
- Voeg 10 ml buffer P2 toe, inverteer 6 keer en incubeer 5 min op KT

Niet vortexen want hierdoor breekt het genomisch DNA. Laat de reactie niet langer dan 5 min opgaan en sluit buffer P2 zo snel mogelijk om contact met CO₂ te vermijden.

- Doe het dopje op de QIAfilter Maxi Cartridge en plaats dit in een falcon (50 ml)
- Voeg 10 ml voorgekoelde buffer P3 toe en inverteer 6 keer
- Giet het lysaat in de QIAfilter Maxi Cartridge en incubeer 10 min op KT
- Verwijder de dop en duw het lysaat doorheen de filter met een ontstopper en vang het gefilterde cellysaat (gewoonlijk 25 ml) op in een falcon van 50 ml
- Voeg 2,5 ml buffer ER toe en inverteer 10 keer en incubeer 30 min op ijs

- Equilibreer de QIAGEN-tip 500 door 10 ml buffer QTB toe te voegen en laat de buffer doorheen de filter lopen onder invloed van de zwaartekracht, vang het eluaat op in een falcon (50 ml) en gooi het weg
- Breng het product in de QIAGEN-tip 500 en laat het eluaat doorlopen onder invloed van de zwaartekracht, vang het eluaat op in de falcon en gooi het weg
- Was de QIAGEN-tip 500 tweemaal met 30 ml Buffer QC en laat dit doorlopen onder invloed van de zwaartekracht, vang het eluaat op in de falcon en gooi het weg
- Elueer door 15 ml buffer QN toe te voegen en vang het eluaat op in een nieuwe falcon van 50 ml
- Voeg 10,5 ml isopropanol toe en schud krachtig met een vortex
- Centrifugeer 30 min aan 15000 x g op 4°C en verwijder voorzichtig het supernatans
- Was de pellet met 5 ml 70% ethanol
- Centrifugeer 10 min aan 15000 x g en verwijder voorzichtig het supernatans
- Laat de pellet drogen
- Los het plasmide DNA op in 500 µl buffer TE
- Meet de concentratie met de NanoDrop[®] Spectrophotometer
- Voeg buffer TE toe om een concentratie van 500 ng/µl te bekomen

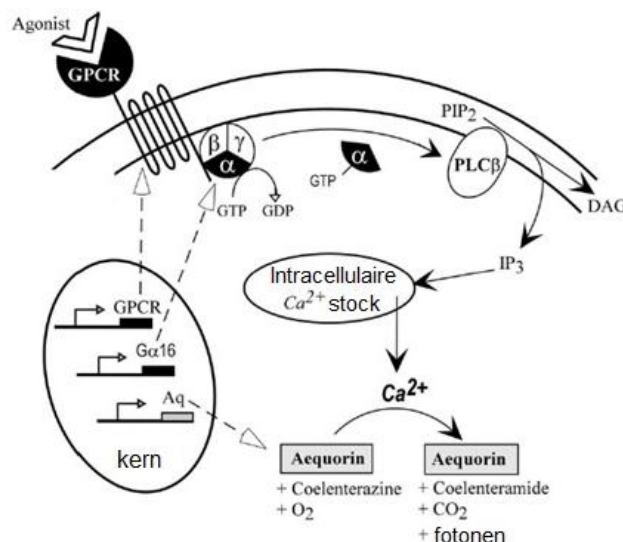
B. Karakterisatie van receptoren

Om na te gaan welk ligand aan de receptoren (ATR en OXR-achtig) bindt moeten deze receptoren eerst tot expressie worden gebracht in eukaryote cellijnen, omdat deze de juiste posttranslationale modificaties aanbrengen. Wij zullen gebruik maken van Chinese hamster ovarium (CHO) cellen en humane embryonale niercellen (HEK). Met de CHO cellen wordt een aequorine-bioluminescentie analyse uitgevoerd en met de HEK cellen wordt een luciferase reporter gen analyse uitgevoerd (Caers *et al.*, 2012; Horodyski *et al.*, 2011).

Met een aequorine-bioluminescentie analyse kunnen GPCR ligand-concentratie interacties gekwantificeerd worden onafhankelijk van hun initiële ‘pathway’. Deze techniek is gebaseerd op twee componenten: het promiscue $G_{\alpha 16}$ proteïne en aequorine (Knight *et al.*, 2003). Het humane promiscue $G_{\alpha 16}$ proteïne interageert met de meeste GPCRs en activeert PLC β . Bij binding van het ligand aan de GPCR wordt dan een signaal geproduceerd onafhankelijk van de initiële ‘pathway’ van de receptor (Offermanns en Simon, 1995). Aequorine is een fotoproteïne dat is opgezuiverd uit de kwal *Aequorea victoria* en is gekloneerd in 1985. Dit complex bestaat uit twee componenten: het apoproteïne apoaequorine en de chromofor cofactor coelenterazine. Bij de binding van Ca^{2+} aan aequorine in aanwezigheid van zuurstof wordt coelenterazine geoxideerd ter vorming van coelenteramide. Bij deze reactie worden tevens de bijproducten apoaequorine, CO_2 en fotonen gevormd. Deze fotonen worden gemeten met een luminometer bij een golflengte van 469 nm. Aequorine is niet toxisch en wordt niet geactiveerd door andere kationen. Het bevat drie bindingsplaatsen voor Ca^{2+} in de

vorm van EF handen maar enkel twee van deze bindingsplaatsen zijn functioneel. Door de hoge bindingsaffiniteit van aequorine voor Ca^{2+} is dit proteïne een goede Ca^{2+} sensor (Brough en Shah, 2009; Inouye *et al.*, 1985; Sheu *et al.*, 1993; Shimomura, 1995).

In Knight *et al.* wordt het principe van de aequorine-bioluminescentie analyse weergegeven in insect cellen met een stabiele expressie van het doelwitgen (GPCR), het promiscue $G_{\alpha 16}$ proteïne en apoaequorine (Fig. 2.3). Voor de vorming van een functioneel aequorine complex worden de cellen geïncubeerd met coelenterazine. Dit is een zeer hydrofoob molecule dat gemakkelijk doorheen het celmembraan kan dringen (Torfs *et al.*, 2002). Bij binding van een agonist aan de GPCR worden de $G_{\alpha 16}$ proteïne en de effector $\text{PLC}\beta$ geactiveerd. Hierbij wordt PIP_2 gehydrolyseerd tot IP_3 en DAG. Bij binding van IP_3 aan het IP_3 -afhankelijke Ca^{2+} kanaal in het membraan van de intracellulaire Ca^{2+} stock worden de Ca^{2+} ionen vrijgegeven in het cytosol (zie ook figuren 1.3 en 1.5). Bij binding van Ca^{2+} aan aequorine wordt blauw licht vrijgegeven. Deze wordt gemeten met een luminometer (Knight *et al.*, 2003).



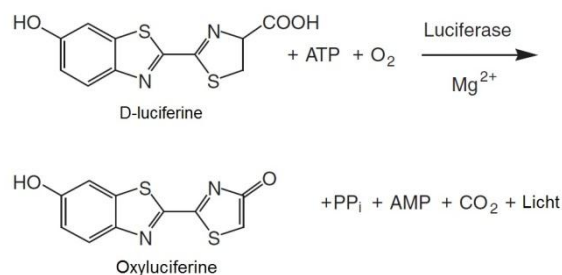
Figuur 2.3: Voorbeeld van een aequorine-bioluminescentie analyse. Bij de binding van een agonist aan de GPCR wordt het humane promiscue $G_{\alpha 16}$ proteïne geactiveerd. $G_{\alpha 16}$ activeert op zijn beurt fosfolipase C ($\text{PLC}\beta$) dat fosfatidylinositol 4,5 bisfosfaat (PIP_2) hydrolyseert tot inositol-1,4,5-trisfosfaat (IP_3) en diacylglycerol (DAG). Bij binding van IP_3 aan het IP_3 -afhankelijke Ca^{2+} kanaal in het membraan van de intracellulaire stock worden de Ca^{2+} ionen vrijgegeven in het cytosol. Bij binding van Ca^{2+} aan aequorine in aanwezigheid van zuurstof (O_2) wordt coelenterazine geoxideerd tot coelenteramide. Bij deze reactie worden tevens CO_2 en fotonen vrijgegeven. Het blauwe licht wordt gemeten door een luminescentiemeter bij 469 nm (aangepaste figuur uit Knight *et al.*, 2003).

Wij zullen de aequorine-bioluminescentie analyse uitvoeren met CHO-WTA11 en CHO-PAM28 cellen. In tegenstelling tot het voorbeeld gegeven in Knight *et al.* zijn dit zoogdiercellijnen en niet insectcellijnen maar het principe komt op hetzelfde neer. Bovendien brengen wij de receptoren niet stabiel tot expressie maar kiezen we voor een tijdelijke expressie aangezien de productie en het onderhoud van stabiele cellijnen arbeidsintensief is. De CHO-WTA11 cellen brengt het promiscue $G_{\alpha 16}$ en apoaequorine tot expressie. Dit geeft ons de mogelijkheid om het ligand te testen zonder dat de initiële ‘pathway’ gekend hoeft te

zijn. Om na te gaan via welke tweede boodschapper ATR en OXR-achtig koppelen, worden de receptoren ook in CHO-PAM28 cellen tot expressie gebracht. Deze cellen brengen apoaequorine stabiel tot expressie maar bevatten niet het promiscue $G_{\alpha 16}$. Hierdoor koppelt de receptor aan zijn originele tweede boodschapper. Met apoqueorine wordt dus nagegaan of de activatie van de receptor resulteert in een verhoogde intracellulaire Ca^{2+} concentratie (Beets *et al.*, 2011; Horodyski *et al.*, 2011).

Om na te gaan of adenylaat cyclase een effector is van ATR of OXR-achtig wordt een luciferase reporter gen analyse uitgevoerd met HEK293 cellen. Deze analyse maakt gebruik van het luciferase report gen. Dit gen werd geïsoleerd uit de vuurvlieg *Photinus pyralis* en werd voor het eerst in zoogdiercellen tot expressie gebracht in 1987 (de Wet *et al.*, 1987). Het luciferase ORF wordt downstream van een cAMP respons element (CRE) geplaatst (George *et al.*, 1997; Horodyski *et al.*, 2011).

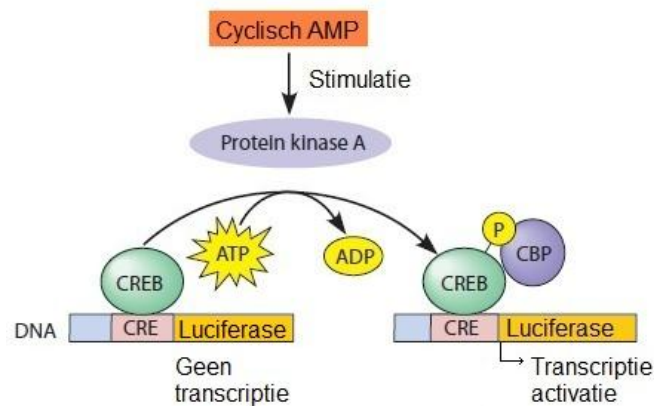
In aanwezigheid van luciferase, Mg^{2+} en ATP wordt D-luciferine omgezet in luciferyl-AMP en PP_i . In een tweede reactie katalyseert luciferase de oxidatie van luciferyl-AMP in aanwezigheid van O_2 ter vorming van oxyluciferin, AMP, CO_2 en licht (de Wet *et al.*, 1987). Een samenvatting van deze reactie wordt weergegeven in figuur 2.4.



Figuur 2.4: Algemeen schema van de reactie met luciferase. D-luciferine wordt in aanwezigheid van adenosinetrifosfaat (ATP), zuurstof (O_2) en magnesium ionen (Mg^{2+}) door luciferase omgezet naar inorganisch pyrofosfaat (PP_i), adenosinemonofosfaat (AMP), koolstofdioxide (CO_2) en licht (PerkinElmer®).

In de aanwezigheid van cAMP binden vier cAMP moleculen aan de twee regulatorische subeenheden van het cytosolische cAMP-afhankelijke kinase of ook wel proteïne kinase A (PKA) genoemd. Hieruit volgt een conformatieverandering van het proteïne waardoor de twee katalytische subeenheden dissociëren van de twee regulatorische subeenheden. De katalytische subeenheden diffunderen naar de nucleus waar ze de fosforylatie van het CRE-bindings proteïne (CREB) katalyseert. CREB is een transcriptiefactor die gebonden is aan het cAMP respons element (CRE). In gedefosforyleerde toestand is er geen transcriptie en wordt het luciferase gen niet tot expressie gebracht. Bij fosforylatie van CREB bindt de transcriptie coactivator CREB-bindings proteïne (CBP) aan het CREB. Hierdoor wordt transcriptie geactiveerd en wordt het luciferase gen tot expressie gebracht (Fig. 2.5) (George *et al.*, 1997; Hancock, 2010; Hardin *et al.*, 2011).

Indien de ATR of OXR-achtig adenylaat cyclase activeert, wordt de productie van cAMP gekatalyseerd waardoor het PKA het CREB fosforyleert en vervolgens het luciferase gen tot expressie wordt gebracht. In aanwezigheid van luciferase wordt licht geproduceerd dat gemeten kan worden met een luminometer. De hoeveelheid cAMP wordt zo gekwantificeerd.



Figuur 2.5: Schematische weergave van de activatie van het luciferase gen door cyclisch adenosinemonofosfaat (cAMP). In de aanwezigheid van cAMP wordt proteïne kinase A geactiveerd (PKA). Dit enzyme katalyseert de fosforylatie van het CRE-bindings proteïne (CREB) dat aan het cAMP respons element (CRE) gebonden is. Hierdoor bindt het CREB-bindingselement (CBP) aan CREB waardoor transcriptie van luciferase geactiveerd wordt (aangepaste figuur uit: Hardin *et al.*, 2011).

B.1. Celkweek

In deze studie wordt er gebruik gemaakt van CHO-WTA11, CHO-PAM28 en HEK293 cellen. Deze cellen worden *in vitro* gekweekt in een monolaag en worden tweemaal per week gesplitst in kweekflessen met een groeioppervlakte van 25 cm² (T25). Voor de transfectie worden de cellen afgesplitst in kweekflessen met een groeioppervlakte van 75 cm² (T75). Met Trypsine-EDTA worden de cellen losgemaakt die aan het groeioppervlak van de kweekfles kleven. Om de cellen niet te contamineren wordt in een laminaire flow gewerkt en is het dragen van handschoenen en het gebruik van steriel materiaal noodzakelijk.

Materiaal:

- Kweekflessen met een schroefdop, een verluchtingsopening en een groeioppervlakte van 25 cm² (T25) en 75 cm² (T75)
- CO₂ incubator op 37°C en 5% CO₂ (SANYO E&E Europe bv)
- CHO-WTA 11 cellen (M. Parmentier, Universiteit van Brussel en M. Detheux, Euroscreen SA in Brussel)
- CHO-PAM 28 cellen (M. Parmentier, Universiteit van Brussel en M. Detheux, Euroscreen SA in Brussel)
- HEK 293 cellen (Invitrogen™)
- Trypsin-EDTA solution 0.25% (Sigma-Aldrich®): 0.5 g/l trypsine 0.2 g/l EDTA•4Na in Hank's Balanced Salt Solution met fenol rood
- Celcultuur medium voor CHO-WTA 11 cellen:

- Dulbecco's Modified Eagle's Medium/Nutrient F-12 Ham (Sigma-Aldrich[®])
- 50 ml Fetal Bovine Serum, geïnactiveerd bij 65°C (finale concentratie 10%) (Gibco[®])
- 5 ml Penicillin-Streptomycin, Liquid (finale concentratie 1%) (10000 units/ml penicilline en 10 mg/ml streptomycine in 0.9% NaCl) (Gibco[®])
- 1,25 ml Zeocin[™] Selection Reagent (eindconcentratie 250 mg/ml) (Gibco[®])
- Celcultuur medium voor CHO-PAM 28 cellen:
 - Dulbecco's Modified Eagle's Medium/Nutrient F-12 Ham (Sigma-Aldrich[®])
 - 50 ml Fetal Bovine Serum, geïnactiveerd bij 65°C (eindconcentratie 10%) (Gibco[®])
 - 5 ml Penicillin-Streptomycin, Liquid (eindconcentratie 1%) (10000 units/ml penicilline en 10 mg/ml streptomycine in 0.9% NaCl) (Gibco[®])
 - 250 µl Puromycin dihydrochloride, Selection Antibiotic, Liquid (10 mg/ml) (eindconcentratie 5 µg/ml) (Gibco[®])
- Celcultuur medium voor HEK 293 cellen:
 - Dulbecco's Modified Eagle's Medium/Nutrient F-12 Ham (Sigma-Aldrich[®])
 - 5 ml Penicillin-Streptomycin, Liquid (eindconcentratie 1%) (10000 units/ml penicilline en 10 mg/ml streptomycine in 0.9% NaCl) (Gibco[®])
 - Ultrosert[™] Serum Substitute (Pall Life Sciences)
- Laminaire flowkast (Clean Air Technologies, Inc.)
- 70% ethanol (voor 1 l: 700 ml Desinfectol[®], Chem-Lab nv + 300 ml Milli-Q[®] water, Millipore)

Methode:

- Zet de media en de Trypsine-EDTA oplossing op KT gedurende minimum 30 min
- Ontsmet de laminaire flow met 70% ethanol
- Verwijder het oude medium uit het T25 kweekflesje
- Voeg 1 ml Trypsine-EDTA oplossing toe
- Als de cellen sfeervormig zijn: haal de Trypsine-EDTA oplossing van de cellen af
- Klop de cellen los door met de hand tegen het kweekflesje te tikken
- Los de cellen op in 5 ml vers celcultuur medium
- Voeg 5 ml celcultuur medium toe in een nieuw T25 kweekflesje
- Voeg 0.5 ml van de opgeloste cellen toe aan het nieuwe kweekflesje
- Voor de transfectie: voeg 1 ml opgeloste cellen toe aan 10 ml celcultuur medium in een T75 kweekfles
- Zet de kweekflessen in de CO₂ incubator (5%) op 37°C en draai de schroefdop open door de dop 90° te draaien in tegenwijzerzin

B.2. Transfectie van CHO cellen

De eukaryote cellen worden getransfecteerd met de recombinante expressievector, opgezuiverd zoals beschreven in A.8. Er wordt ook een transfectie uitgevoerd met een lege expressievector om na te gaan of het verkregen signaal werkelijk van de GPCR zelf komt.

Voor deze procedure worden CHO-WTA11 of CHO-PAM28 cellen twee dagen op voorhand gesplitst in een T75 kweekfles zoals beschreven in B.1. Het PLUS™ Reagent vormt pre-complexen met het DNA en zal de transfectie efficiëntie verbeteren. Vervolgens wordt Lipofectamine® LTX toegevoegd die de werkelijke transfectie van het DNA zal uitvoeren via de kationische lipide gemedieerde transfectie. De positieve ladingen van de kationische lipiden interageren met de negatief geladen DNA ruggengraat en het negatief geladen plasmamembraan. Hierdoor bevorderen ze DNA condensatie en bemiddelen ze de endocytotische opname van het transfectie complex. Eens opgenomen door de cel wordt het DNA overgebracht naar het cytoplasma en vervolgens getransporteerd naar de nucleus waar het gewenste gen tot expressie gebracht kan worden (Invitrogen™: URL-<http://www.invitrogen.com/site/us/en/home/Products-and-Services/Applications/Cell-Culture/Transfection/transfection-methods/Lipid-Transfection.html>).

Om contaminatie van de cellen te vermijden wordt in een laminaire flow gewerkt en is het dragen van handschoenen en het gebruik van steriel materiaal noodzakelijk.

Materiaal:

- Celcultuur medium voor CHO-WTA11 of CHO-PAM28 cellen (zie B.1.)
- CHO-WTA11 of CHO-PAM28 cellen gekweekt in een T75 kweekfles met een bedekking van ongeveer 60% (zie B.1)
- Recombinant plasmide DNA (zie A.8.)
- CO₂ incubator op 37°C en 5% CO₂ (SANYO E&E Europe bv)
- Laminaire flowkast (Clean Air Technologies, Inc.)
- 70% ethanol (voor 1 l: 700 ml Desinfectol®, Chem-Lab nv + 300 ml Milli-Q® water, Millipore)
- Gibco® Opti-MEM® I Reduced Serum Medium (Gibco®)
- Lipofectamine® LTX (Invitrogen™)
- PLUS™ Reagent (Invitrogen™)
- BD Falcon™ polystyrene Round-Bottom Tube 5 ml (BD Biosciences)

Methode:

- Zet het Opti-MEM® I Reduced Serum Medium en de celcultuur media op KT gedurende minstens 30 minuten
- Ontsmet de laminaire flowkast met 70% ethanol
- Breng 2,5 ml Opti-MEM® in een buisje met een ronde bodem

- Voeg 5 µg plasmide DNA en 12,5 µl PLUS™ Reagent toe
- Inverteer en incubeer 5 min op KT
- Voeg 30 µl LTX toe, inverteer en incubeer 30 min op KT
- Verwijder het medium van de cellen uit de 75T kweekfles
- Voeg het DNA/LTX mengsel druppelsgewijs toe samen met 3 ml celcultuur medium
- Draai de dop open en incubeer overnacht in de CO₂ incubator
- Voeg 15 ml celcultuur medium toe
- Draai de dop open en incubeer overnacht in de CO₂ incubator

B.3. Aequorine-bioluminescentie analyse

Met de getransfecteerde CHO-WTA11 en CHO-PAM28 cellen wordt een aequorine-bioluminescentie analyse uitgevoerd. Het aantal cellen per ml wordt gemeten met de NucleoCounter® NC-100™. De celkernen van de niet levensvatbare cellen worden gekleurd met propidium iodide (PI). Door eerst al de cellen te doden met Reagent A100 en Reagent B wordt het totaal aantal cellen gemeten. In een tweede meting worden de cellen gemeten zonder de reagentia toe te voegen. Door het eerste getal van het tweede af te trekken wordt het aantal levende cellen berekend. Triton® X-100 oplossing is een niet ionisch detergent dat de celmembranen verstoort waardoor alle Ca²⁺ ionen vrijkomen (100% controle).

De aequorine-bioluminescentie analyse met de CHO-WTA11 cellen wordt tweemaal onafhankelijk van elkaar in het drievoud uitgevoerd bij verschillende concentraties *Bomte-AT* (van 10⁻⁴ tot 10⁻¹⁵ M), in het tweevoud met *Manse-AT* (10⁻⁴ en 10⁻⁵ M), in het tweevoud met *Locmi-AT* (10⁻⁴ en 10⁻⁵ M) en in het tweevoud met *Trica-ATL* (10⁻⁴ en 10⁻⁵ M). De AZ sequentie van deze neuropeptiden wordt weergegeven in addendum S4. De analyse met CHO-PAM28 cellen wordt tweemaal onafhankelijk van elkaar uitgevoerd in het drievoud met verschillende concentraties *Bomte-AT* (van 10⁻⁶ tot 10⁻¹⁶ M). De luminescentie wordt weergegeven door Microwin software (Berthold Technologies). De resultaten worden geëxporteerd naar Excel (Microsoft® Office) en vervolgens geanalyseerd met GraphPad Prism 5 (GraphPad Software, inc).

Om steriel te werk te gaan, wordt het eerste deel van de proef uitgevoerd in een laminaire flowkast en worden gedurende de hele procedure handschoenen gedragen en met steriel materiaal gewerkt. Alle media met BSA en coelenterazine worden afgeschermd van het licht met aluminiumfolie.

Materiaal:

- Neuropeptiden:
 - Voor CHO-WTA11: *Bomte-AT* (van 10⁻⁴ tot 10⁻¹⁵ M), *Manse-AT* (10⁻⁴ en 10⁻⁵ M), *Locmi-AT* (10⁻⁴ en 10⁻⁵ M) en *Trica-ATL* (10⁻⁴ en 10⁻⁵ M)
 - Voor CHO-PAM28: *Bomte-AT* (van 10⁻⁶ tot 10⁻¹⁶ M)

- NucleoCounter[®] NC-100[™] (Chemometec)
 - NucleoCassettes[™] met PI (Chemometec)
 - Reagent A100 lysis buffer (pH 1,25) (Chemometec)
 - Reagent B stabiliserende buffer (Chemometec)
- Coelenterazine_h (Molecular Probes[®])
- PBS/EDTA medium: Phosphate buffered saline (PBS) met 0.2% EDTA (Sigma-Aldrich[®])
- Luminometer: Mithras LB 940 Multimode Microplate Reader (Berthold Technologies)
- Laminaire flowkast (Clean Air Technologies, Inc.)
- Dulbecco's Modified Eagle Medium: Nutrient Mixture F-12 (DMEM/F-12) zonder fenol rood, met L-glutamine en 15 mM Hepes (Gibco[®])
- 70% ethanol (voor 1 l: 700 ml Desinfectol[®], Chem-Lab nv + 300 ml Milli-Q[®] water, Millipore)
- 20 µl Triton[®] X-100 Detergent (Merck Millipore)
- Schudplaat (Heidolph Duomax 1080)
- 0,5 g Bovine Serum Albumin gevriesdroogd poeder (Sigma-Aldrich[®])
- TubeSpin[®] Bioreactor 15 (Techno Plastic Products AG)
- TubeSpin[®] Bioreactor 50 (Techno Plastic Products AG)
- Centrifuge (ROTANTA 46 RSC ROBOTIC, Hettich)
- Aluminiumfolie
- BD Falcon[™] Clear 96-well Microtest[™] Plate (BD Biosciences)
- Ethanol (EtOH)
- Natriumhydroxide (NaOH)
- Waterstofchloride (HCl)
- Milli-Q[®] water (Millipore)

Methode:

Vorbereiding en incubatie met Coelenterazine_h

- Zet de DMEM/F-12 en het PBS/EDTA medium op KT
- Ontsmet de laminaire flowkast met 70% ethanol
- Maak vers BSA medium (0,1%) door 0,5 g BSA toe te voegen aan 50 ml DMEM/F-12 en steriel te filteren in een falcon van 50 ml
- Maak een verse Triton[®] X-100 oplossing (0,3%) door 20 µl Triton[®] X-100 Detergent op te lossen in 10 ml BSA in een falcon van 15 ml
- Scherm de Triton[®] X-100 oplossing en het BSA medium af van het licht door aluminiumfolie rond de falcon te wikkelen
- Verwijder het medium van de cellen uit de 75T kweekfles
- Maak de cellen los met 3 ml PBS/EDTA (0,2%)

- Als de cellen sfeervormig zijn: haal de PBS/EDTA van de cellen af
- Klop de cellen los door met de hand tegen de kweekfles te tikken
- Los de cellen op in 10 ml DMEM/F-12 zonder fenolrood en breng ze over naar een falcon van 15 ml
- Centrifugeer de cellen 4 min aan 800 rpm bij 25°C en verwijder het supernatans
- Tel de cellen met de NucleoCounter® NC-100™ (Chemometec)
 - Totaal aantal cellen: 100 µl cellen + 100 µl Reagent A100 + 100 µl Reagent B. Laad het mengsel in de NucleoCassettes™ en plaats dit in de NucleoCounter®
 - Aantal dode cellen: 200 µl cellen. Laad het mengsel in de NucleoCassettes™ en plaats dit in de NucleoCounter®
- Verdun de cellen tot een concentratie van 5×10^6 cellen/ml met BSA medium
- Voeg 5 µl Coelenterazine_h per ml BSA medium toe (eindconcentratie 5 µM)
- Scherm de falcon af van het licht met aluminiumfolie
- Incubeer 4 uur op KT terwijl het mengsel zacht schudt op een schudplaat
- Verdun de cellen 10x met BSA medium 30 min voor de celmeting

Luminescentie screen

- Los de neuropeptiden op in BSA volgens concentratie
- Voeg 50 µl BSA toe aan het eerste welletje van elke rij van de 96-well plaat (blanco)
- Voeg 50 µl opgeloste neuropeptide toe aan de rest van de rij van de 96-well plaat
- Was de injectoren van de luminometer: 50 keer met EtOH, 99 keer met Milli-Q® water en ontlad 20 keer
- Prime de injectoren met Triton® X-100 oplossing (injector 1) en de cellen (injector 3)
- Plaats de 96-well plaat in de luminometer
- Start het volgende programma:
 - Injecteer 50 µl cellen (25000 cellen per welletje)
 - Meet de luminescentie gedurende 30 sec
 - Injecteer 50 µl Triton® X-100 oplossing
 - Meet de luminescentie gedurende 8 sec
- Was de injectoren van de luminometer: 30 keer met NaOH, 30 keer met HCl, 30 keer met Milli-Q® water, 30 keer met EtOH, 99 keer met Milli-Q® water en ontlad 50 keer

B.4. Co-transfectie van HEK293 cellen

De HEK293 cellen worden getransfecteerd met de recombinantie expressievector opgezuiverd zoals beschreven in A.8. Bovendien worden de cellen gecontransfecteerd met een CRE-luciferase construct. Ook hier wordt gekozen voor een tijdelijke transfectie met de ATR en OXR-achtig constructen en wordt ook een transfectie uitgevoerd met een lege expressievector om na te gaan of het verkregen signaal werkelijk van de GPCR zelf komt. Het

principe van de transfectie is hetzelfde zoals beschreven in B.2. Ook hier wordt steriel gewerkt met handschoenen en steriel materiaal in een laminaire flowkast.

Materiaal:

- CO₂ incubator op 37°C en 5% CO₂ (SANYO E&E Europe bv)
- HEK293 cellen gekweekt in een T75 kweekfles met een bedekking van ongeveer 60% (zie B.1)
- Celcultuur medium voor HEK293 cellen (zie B.1)
- BD Falcon™ polystyrene Round-Bottom Tube 5 ml (BD Biosciences)
- Lipofectamine[®] LTX (Invitrogen™)
- PLUS™ Reagent (Invitrogen™)
- Gibco[®] Opti-MEM[®] I Reduced Serum Medium (Gibco[®])
- Recombinant plasmide DNA (zie A.8.)
- CRE-Luciferase construct
- Laminaire flowkast (Clean Air Technologies, Inc.)
- 70% ethanol (voor 1 l: 700 ml Desinfectol[®], Chem-Lab nv + 300 ml Milli-Q[®] water, Millipore)

Methode:

- Zet het Opti-MEM[®] I Reduced Serum Medium en de celcultuur media op KT (minstens 30 min)
- Ontsmet de laminaire flowkast met 70% ethanol
- Breng 2,5 ml Opti-MEM[®] in een buisje met een ronde bodem
- Voeg 2,5 µg plasmide DNA, 2 µg CRE-luciferase construct en 12,5 µl PLUS™ Reagent toe
- Inverteer en incubeer 5 min op KT
- Voeg 30 µl LTX toe, inverteer en incubeer 30 min op KT
- Verwijder het medium van de cellen uit de 75T kweekfles
- Voeg het DNA/LTX mengsel druppelsgewijs toe en voeg 3 ml celcultuur medium toe
- Draai de dop open en incubeer overnacht in de CO₂ incubator
- Voeg 15 ml celcultuur medium toe
- Draai de dop open en incubeer overnacht in de CO₂ incubator

B.5. Luciferase reporter gen analyse

Met de getransfecteerde HEK293 cellen wordt een luciferase reporter gen analyse uitgevoerd. Deze analyse wordt in twee onafhankelijke metingen uitgevoerd (in het drievoud en in het achtvoud) per concentraties *Bomte*-AT (van 10⁻⁴ tot 10⁻¹⁴ M). De hoeveelheid licht die wordt geproduceerd bij de oxidatie van luciferine dat gekatalyseerd wordt door luciferase wordt versterkt door SteadyLite Plus™ substrate (PerkinElmer[®]). De hoeveelheid licht output is

proportioneel aan de concentratie luciferase dat proportioneel is aan de concentratie cAMP. De luminescentie wordt weergegeven door Microwin software (Berthold Technologies). De resultaten worden geëxporteerd naar Excel (Microsoft® Office) en vervolgens geanalyseerd met GraphPad Prism 5 (GraphPad Software, inc).

Het aantal cellen wordt volgens hetzelfde principe gemeten als in B.3. IBMX (3-isobutyl-1-methylxanthin) is een fosfodiësterase inhibitor en zorgt er dus voor dat het cAMP niet afgebroken wordt. Het 'DMEM/F-12 + IBMX medium' wordt gebruikt voor de blanco meting. Forskoline activeert adenylaat cyclase. Indien de receptor AC inhibeert wordt een lagere cAMP concentratie verwacht bij het toedienen van AT.

Om steriel te werk te gaan wordt in een laminaire flowkast gewerkt met steriel materiaal en wordt gedurende de hele procedure handschoenen gedragen.

Materiaal:

- Laminaire flowkast (Clean Air Technologies, Inc.)
- Getransfecteerde HEK293 cellen (zie B.4.)
- IBMX (0,1 M) (Sigma-Aldrich®)
- PBS/EDTA medium: Phosphate buffered saline (PBS) met 0.2% EDTA (Sigma-Aldrich®)
- Celcultuur medium voor HEK293 cellen (zie B.1)
- Dulbecco's Modified Eagle Medium: Nutrient Mixture F-12 (DMEM/F-12) zonder fenol rood, met L-glutamine en 15 mM HEPES (Gibco®) met 200 µM 3-isobutyl-1-methylxanthine (IBMX; 0,1 M) (Sigma-Aldrich®)
- NKH 477 (forskolin; 10 mM) (Sigma-Aldrich®)
- NucleoCounter® NC-100™ (Chemometec)
 - NucleoCassettes™ met PI (Chemometec)
 - Reagent A100 lysis buffer (pH 1,25) (Chemometec)
 - Reagent B stabiliserende buffer (Chemometec)
- CO₂ incubator op 37°C en 5% CO₂ (SANYO E&E Europe bv)
- Luminometer: Mithras LB 940 Multimode Microplate Reader (Berthold Technologies)
- Milli-Q® water (Millipore)
- BD Falcon™ Clear 96-well Microtest™ Plate (BD Biosciences)
- Neuropeptide *Bomte*-AT (10⁻⁴ - 10⁻¹⁴ M)
- SteadyLite Plus™ substrate (PerkinElmer®)
 - SteadyLite Plus™ Lyophilized Substrate
 - SteadyLite Plus™ Reconstitution Buffer
- TubeSpin® Bioreactor 15 (Techno Plastic Products AG)
- 70% ethanol (voor 1 l: 700 ml Desinfectol®, Chem-Lab nv + 300 ml Milli-Q® water, Millipore)

- Aluminiumfolie
- Schudplaat (Heidolph Duomax 1080)

Methode:

- Maak ‘DMEM/F-12 + IBMX medium’ en ‘DMEM/F-12 + IBMX + NKH 477 medium’:
 - ‘DMEM/F-12 + IBMX medium’ (200 μ M IBMX): 25,948 ml DMEM/F-12 + 52 μ l IBMX (0,1 M)
 - ‘DMEM/F-12 + IBMX + NKH 477 medium’ (200 μ M IBMX en 20 μ M NKH 477): 5,988 ml ‘DMEM/F-12 + IBMX medium’ + 12 μ l NKH 477 (10 mM)
- Zet de media ‘DMEM/F-12’, ‘DMEM/F-12 + IBMX medium’, ‘DMEM/F-12 + IBMX + NKH 477 medium’ en het PBS/EDTA medium op KT gedurende minstens 30 min
- Ontsmet de laminaire flowkast met 70% ethanol
- Verwijder het medium van de getransfecteerde cellen uit de 75T kweekfles
- Maak de cellen los met 3 ml PBS/EDTA 0,2%
- Als de cellen sfeervormig zijn: haal de PBS/EDTA van de cellen af
- Klop de cellen los door met de hand tegen de kweekfles te tikken
- Los de cellen op in 10 ml DMEM/F-12 zonder fenolrood en breng ze over naar een falcon van 15 ml
- Centrifugeer de cellen 5 min aan 900 rpm bij 25°C en verwijder het supernatans
- Tel de cellen met de NucleoCounter[®] NC-100[™] (Chemometec)
 - Totaal aantal cellen: 100 μ l cellen + 100 μ l Reagent A100 + 100 μ l Reagent B. Laad het mengsel in de NucleoCassettes[™] en plaats dit in de NucleoCounter[®]
 - Aantal dode cellen: 200 μ l cellen. Laad het mengsel in de NucleoCassettes[™] en plaats dit in de NucleoCounter[®]
- Verdun de cellen tot een concentratie van 5×10^6 cellen/ml met ‘DMEM/F-12 + IBMX medium’
- Maak de 96-well plaat klaar:
 - Voeg 50 μ l ‘DMEM/F-12 + IBMX medium’ toe aan de eerste kolom (blanco)
 - Voeg 50 μ l ‘DMEM/F-12 + IBMX + NKH 477 medium’ toe aan de laatste kolom
 - Voeg 50 μ l neuropetide toe in verschillende concentraties opgelost in ‘DMEM/F-12 medium+IBMX’ aan de andere welletjes
 - Voeg 50 μ l HEK293 cellen toe (25000 cellen per welletje)
- Incubeer 3-4 uur in de CO₂ incubator
- Voeg één flesje Steadylite Plus[™] Lyophilied Substrate bij 10 ml Steadylite Plus[™] Reconstitution Buffer (op KT)
- Voeg 100 μ l Steady plus[™] reagent toe aan elk welletje
- Bescherm de plaat van het licht met aluminiumfolie
- Incubeer 15 min op KT terwijl de plaat zacht schudt op de schudplaat
- Laad de 96-well plaat in de luminometer

- Meet de luminescentie op 0 en op 5 sec

C. Weefselverdeling analyse

Om na te gaan waar de receptoren ATR en OXR-achtig tot expressie worden gebracht wordt een kwantitatieve real-time PCR uitgevoerd (q-RT-PCR). Bovendien wordt hiermee de expressie gekwantificeerd. Hiervoor worden eerst de weefsels verzameld. Vervolgens wordt het RNA opgezuiverd en omgezet naar cDNA. Dit cDNA wordt 10 maal verdund en kan gebruikt worden voor de q-RT-PCR.

C.1. Verzamelen van de weefsels

Voor de weefselverdeling analyse worden darren gedissecteed afkomstig van Biobest nv (Westerlo, België). De verpopte darren worden gedurende 4 dagen op KT gehouden in een 'Masculino-System' in een 12/12 fotoperiode conditie terwijl suikerwater onbeperkt aanwezig is. De dissectie wordt uitgevoerd in 'Phosphate buffered saline' (PBS) om de cellen in een isotone omgeving te houden. Om de biologische onafhankelijkheid te garanderen worden 3 kolonies gedissecteed. Kolonie 1 bevat 13 darren, kolonie 2 bevat 9 darren en kolonie 3 bevat 8 darren.

Materiaal:

- MagNA Lyser Green Beads-centrifugeerbuisjes (Roche)
- Vloeibare stikstof
- Dissectiemateriaal
- PBS oplossing (pH 7,4)
 - 140 mM NaCl (Sigma-Aldrich®)
 - 27 mM KCl (Sigma-Aldrich®)
 - 8 mM Na₂HPO₄ (VEL nv)
 - 15 mM KH₂PO₄ (Sigma-Aldrich®)
 - MilliQ® water (Millipore)
- Zoom Microscope (Bausch & Lomb)
- Centrifuge (KL 1500 LCD, SCHOTT)

Methode:

- Bedwelm de hommels met CO₂
- Knip de kop en de poten los van het lichaam
- Verzamel de volgende weefsels in MagNA Lyser Green Beads-centrifugeerbuisjes (Roche): de hersenen, ventraal zenuwweefsel, vetweefsel uit het hoofd, de voordarm, de middendarm, de einddarm, de buisjes van Malpighi, vetweefsel uit het lichaam, de testes en de accessorische klieren
- Koel de weefsels snel af in vloeibare stikstof

- Bewaard de weefsels in de diepvriezer op -80 °C

C.2. RNA extractie

Met de RNeasy[®] Lipid Tissue Mini Kit van Qiagen kan het totaal RNA uit de weefsels worden geëxtraheerd. Deze procedure zal bestaan uit drie grote stappen. Eerst zal een bepaalde hoeveelheid weefsel gehomogeniseerd worden. Vervolgens wordt het totale RNA geëxtraheerd. Ten slotte wordt de concentratie van het RNA bepaald.

Gedurende de hele procedure wordt er gewerkt onder een RNase-vrije trekkast. Het werkblad van deze kast en de gebruikte rekjes en pipetten worden eerst behandeld met RNaseZAP[®] (Sigma-Aldrich[®]) om al het aanwezige RNase te verwijderen. Omdat RNA temperatuurgevoelig is, worden de RNA oplossingen zoveel mogelijk op ijs gehouden. Het is bovendien belangrijk dat de weefsels niet ontdooien.

C.2.1. Homogenisatie van het weefsel

De weefsels, verzameld in MagNA Lyser Green Beads-centrifugeerbuisjes (Roche), mogen maximaal een nettogewicht hebben van 100g. Deze buisjes bevatten keramische parels die ervoor zorgen dat, in combinatie met de MagNA Lyser[®] Instrument (Roche), de weefsels optimaal gehomogeniseerd worden. Het fenol, dat aanwezig is in de QIAzol[®] Lysis Reagent, vergemakkelijkt de lyse van vetweefsels en het guanine-thiocyanaat zal door haar denaturerende eigenschap de aanwezige RNasen verwijderen en de celmembranen afbreken.

Materiaal:

- RNaseZAP[™] (Sigma-Aldrich[®])
- MagNA Lyser[®] Instrument (Roche)
- QIAzol[®] Lysis Reagent (Qiagen)
- RNase-vrije trekkast

Methode:

- Voeg 1 ml QIAzol[®] Lysis Reagent toe aan de MagNA Lyser Green Beads-centrifugeerbuisjes
- Schud de buisjes gedurende 30 s aan 6500 rpm met behulp van de MagNA Lyser[®] Instrument

C.2.2. Totale RNA extractie

Door het toevoegen van chloroform en de stalen vervolgens te centrifugeren wordt het homogenaat in 3 fasen gescheiden. De bovenste kleurloze waterlaag bevat het totale RNA. Onderaan wordt een rode organische fase gevormd dat de proteïnen bevat. Tussen deze twee fasen zit een witte laag die het DNA bevat. In aanwezigheid van 70% ethanol zal het RNA aan het silica membraan binden. Met behulp van DNase I wordt het resterende DNA

afgebroken. Dit is een belangrijke stap om een accurate q-RT-PCR uit te voeren (Vandesompele *et al.*, 2002a).

Materiaal:

- RNeasy[®] Lipid Tissue Mini Kit (Qiagen)
 - RNeasy Mini Spin Columns in een verzamelbuisje van 2 ml
 - Buffer RW1
 - Buffer RWE opgelost in 70% ethanol
 - RNase-vrij water
- Centrifuge op 4°C (Heraeus Fresco 21 Centrifuge, Thermo Scientific)
- Chloroform (CHCl₃) (Vel nv)
- 70% ethanol (voor 50 ml: 35 ml Desinfectol[®], Chem-Lab nv + 15 ml Milli-Q[®] water, Millipore)
- Vortex
- DNase I-oplossing en RDD-buffer (Qiagen)
- SIGMA 1-13 Micro Centrifuge (Sigma)
- RNase-vrije trekkast

Methode:

- Incubeer het homogene mengsel gedurende 5 min op KT zodat de nucleoproteïne complexen dissociëren
- Voeg 200 µl chloroform toe
- Schud de buisjes onmiddellijk gedurende 15 sec met een vortex en incubeer 2 min op KT
- Centrifugeer de buisjes op 12000 x g gedurende 15 min op 4°C
- Breng de bovenste fase (≈ 600 µl) over naar een nieuw microcentrifuge buisje (1,5 ml)
- Breng een RNeasy[®] Mini Spin Column in een verzamelbuisje van 2 ml
- Voeg 600 µl 70% ethanol toe aan de verzamelde bovenste fase en schud met een vortex
- Breng onmiddellijk 600 µl van dit mengsel over naar de RNeasy[®] Mini Spin Column
- Centrifugeer aan een snelheid van 8000 x g gedurende 15 sec en verwijder het eluaat
- Vortex het buisje opnieuw en voeg het resterende volume toe aan de kolom
- Centrifugeer opnieuw aan een snelheid van 8000 x g voor 15 sec en verwijder het eluaat
- Breng 350 µl buffer RW1 op de kolom aan en centrifugeer bij 8000 x g gedurende 15 sec en verwijder het eluaat
- Voeg per staal 10 µl DNase I toe aan 70 µl RDD buffer in een microcentrifuge buisje (0,5 ml) en meng deze voorzichtig door het buisje enkele keren om te keren

Niet vortexen! DNase I is erg gevoelig aan fysische denaturatie.

- Pipetteer de 80 µl van de DNase I mix rechtstreeks op het membraan van de kolom en incubeer 15 min op KT

- Was de kolom opnieuw met 350 µl buffer RW1 en centrifugeer bij 8000 x g voor 15 sec en verwijder het eluaat
- Voeg 500 µl buffer RPE toe en centrifugeer 15 sec op 8000 x g en verwijder het eluaat
- Doe dit opnieuw maar centrifugeer deze keer 2 min
- Breng de kolom over naar een nieuwe verzamelbuisje (2 ml) en centrifugeer 1 min aan 8000 x g
- Breng de kolom over naar een steriel, RNase-vrij microcentrifuge buisje
- Pipetteer 30 µl RNase-vrij water rechtstreeks op het membraan en incubeer 1 min
- Centrifugeer 1 min bij 8000 x g op 4°C
- Breng het eluaat opnieuw aan op het membraan en centrifugeer 1 min bij 8000 x g op 4°C
- Bewaar het RNA in de diepvriezer op -80°C

C.2.3. RNA concentratie en zuiverheid

De concentratie en de zuiverheid van het RNA worden gemeten met de NanoDrop® Spectrophotometer (ND-1000, NanoDrop Technologies) (zie A.7.1.). Een lagere A_{260}/A_{230} waarde wijst op contaminatie met een stof die absorbeert bij 230 nm. In dit geval zou dit kunnen aangeven dat er nog fenol aanwezig is in het staal. Guanine-thiocyanaat absorbeert bij 260 nm. RNase-vrij water wordt bij deze metingen gebruikt als blanco.

C.3. cDNA synthese

Het opgezuiverde RNA wordt omgezet in enkelstrengig cDNA. Hierbij wordt gebruik gemaakt van willekeurige hexamere primers zodat het RNA maximaal wordt overgeschreven in cDNA. De RNA stalen moeten zo veel mogelijk op ijs gehouden worden. In een eerste stap worden de secundaire structuren verbroken. Nadat de enzymen zijn toegevoegd wordt het cDNA gesynthetiseerd.

Materiaal:

- RNase-vrij water (Qiagen)
- dNTPs (10 mM) (Invitrogen™)
- willekeurige hexamere primers (250 ng/µl)
- SuperScript™ III Reverse Transcriptase (Invitrogen™)
 - SuperScript® III RT (200 U/µL)
 - 5x First-Strand Buffer
 - DTT (0,1 M)
- Centrifuge 5415D (Eppendorf)
- Thermoblock (Biometra)
- RNaseOUT™ Recombinant Ribonuclease Inhibitor (Invitrogen™)

Methode:

- Bereken het volume dat per staal genomen moet worden om 1 µg RNA te bekomen en het volume RNase-vrij water dat genomen moet worden om een volume van 11.5 µl te bekomen
- Pipetteer het RNase-vrij water en het RNA in een microcentrifuge buisje (0,5 ml)
- Voeg 1 µl dNTPs en 1 µl willekeurige hexameer primers toe
- Draai het mengsel kort af met de centrifuge
- Verwarm de buisjes 5 min op tot 65°C in de thermoblock en koel af tot 4°C gedurende 1 min
- Draai kort af in de centrifuge
- Voeg 4 µl first strand buffer toe
- Voeg 1 µl DTT buffer toe

Draai de enzymen even af in de centrifuge voor ze worden toegevoegd

- Voeg 1 µl RNase OUT™ Recombinant Ribonuclease Inhibitor toe. Dit enzym inhibeert RNase A, RNase B en RNase C
- Voeg vervolgens 1 µl SuperScript® III RT toe
- Pipetteer het mengsel op en neer en draai kort af in de centrifuge
- Plaats de buisjes in de Thermoblock met de volgende temperaturen en tijden:

25°C	5 min	binding van de primers
50°C	60 min	cDNA synthese
70°C	15 min	inactivatie SuperScript® III RT
4°C	∞	pauze

- Centrifugeer kort
- Bewaar de stalen in de diepvriezer op -20°C

C.4. Kwantitatieve real-time PCR

Met een kwantitatieve real-time PCR (q-RT-PCR) wordt de genexpressie van de doelwitgenen (ATR en OXR-achtig) gemeten in verschillende weefsels van *B. terrestris* door de hoeveelheid mRNA te kwantificeren. De q-RT-PCR wordt uitgevoerd met cDNA omdat dit veel stabiel is dan RNA. Dit cDNA wordt in een aparte reactie aangemaakt om de vorming van primerdimeren te verminderen. Omdat niet alle metingen starten met eenzelfde hoeveelheid cDNA moeten de gemeten waarden genormaliseerd worden met huishoudgenen. Het is belangrijk dat deze genen in alle weefsels stabiel tot expressie komen. Op deze manier kunnen technische fouten, zoals pipetteerfouten, opgespoord worden (Vandesompele *et al.*, 2002a; Vandesompele *et al.*, 2002b).

Al de q-RT-PCR reacties worden uitgevoerd met de Fast SYBR® Green Master Mix (Applied Biosystems®). Het AmpliTaq® Fast DNA Polymerase vermenigvuldigt het DNA

exponentieel. Vervolgens bindt het fluorescente 'SYBR Green I dye' onmiddellijk aan het dsDNA. Hierdoor verhoogt de intensiteit van de fluorescentie proportioneel aan de hoeveelheid dsDNA en kan de hoeveelheid dsDNA dus gemeten worden. De waarden waarbij de stalen worden vergeleken, wordt vastgelegd met een drempelwaarde. Voor elke staal wordt dan de cyclische drempelwaarde (C_t) bepaald. Deze waarde geeft aan hoeveel cycli een staal moet doorlopen om een bepaalde hoeveelheid DNA te bekomen. De C_t waarden zijn proportioneel aan de hoeveelheid startmateriaal. Hoe vroeger de threshold bereikt wordt, hoe meer startmateriaal aanwezig is in het staal. Dus hoe meer cDNA er in het staal aanwezig is, hoe sneller de drempelwaarde bereikt wordt (Brown, 2010). Doordat de hoeveelheid cDNA proportioneel is aan de hoeveelheid mRNA wordt de transcriptie van de genen dus gekwantificeerd.

C.4.1 Selecteren van de kandidaat huishoudgenen

Een absolute voorwaarde voor een huishoudgen is dat dit gen stabiel tot expressie komt in alle weefsels. In de literatuur kan op zoek gegaan worden naar kandidaat huishoudgenen. Het is mogelijk dat er al primerparen voor deze genen ontworpen zijn.

C.4.2. Ontwerpen van de primers

Indien er nog geen primerparen ontworpen zijn, worden van de kandidaat huishoudgenen primers ontworpen. Enkele primers worden opnieuw ontworpen na de *in vitro* primertest en ook de primers van het ATR gen en het OXR-achtige gen moeten ontworpen worden. De primers voor de qT-PCR worden ontworpen met Primer express[®] Software v2.0 van Applied biosystems[®] en de verkregen primers worden nagekeken met Vector NTI Advance[™] 11.0 van Invitrogen[™].

Op basis van deze software programma's kan voorspeld worden of de primers hairpins, dimeren of palindromen vormen en of de primers eventueel ook niet specifiek gaan binden. Om zeker te zijn moeten de primers ook *in vitro* getest worden. De criteria waaraan de primers moeten voldoen zijn weergegeven in addendum S7.

C.4.3. *In vitro* primertest

De primers worden getest op vier concentraties cDNA van volledige hommels die elk een factor 10 van elkaar verschillen en waarbij 1000 de stockoplossing cDNA is. Contaminatie kan opgespoord worden in de 'non template control' (NTC). Aan dit staal wordt Milli-Q[®] water toegevoegd in plaats van cDNA. De primertest wordt in het tweevoud uitgevoerd met een mengsel RNA gemaakt van 4 abdomens, 1 kop en 3 thoraxen van darren. Van dit mengsel wordt cDNA geproduceerd met 2 µg RNA (zie C.2 en C.3). De resultaten worden weergegeven met de software StepOne[™] Real-Time PCR System (Applied Biosystems[®]). De criteria waar de primers aan moeten voldoen worden weergegeven in addendum S7.

Het q-RT-PCR programma start met een hot start procedure. Het DNA wordt gedenateerd bij 95°C. Het binden van de primers en de elongatie worden gecombineerd in één stap bij 60°C. Vervolgens wordt ook een smeltcurve gemaakt door te beginnen bij 60°C en deze temperatuur iedere cyclus te verhogen met 0,3°C.

Omdat q-RT-PCR zeer gevoelig is aan contaminatie is het noodzakelijk om steriel te werk te gaan. De laminaire flowkast wordt ontsmet met ethanol, UV licht en DNAZap. DNAZap wordt geleverd in twee producten (1 en 2) en wordt pas actief als de twee producten gemengd worden. Gedurende de hele procedure worden handschoenen gedragen en wordt er enkel met steriel materiaal gewerkt. Omdat SYBR[®] Green I Dye gevoelig is aan licht wordt dit product zoveel mogelijk afgeschermd van het licht.

Materiaal:

- Centrifuge (ROTANTA 46 RSC ROBOTIC, Hettich)
- Laminaire flowkast (Clean Air Technologies, Inc.)
- 70% ethanol (voor 1 l: 700 ml Desinfectol[®], Chem-Lab nv + 300 ml Milli-Q[®] water)
- Milli-Q[®] water (Millipore)
- Fast SYBR[®] Green Master Mix (2x) (Applied biosystems[®]): SYBR[®] Green I Dye, AmpliTaq[®] Fast DNA Polymerase, UP (Ultra Pure), Uracil-DNA Glycosylase (uracil-N-glycosylase of UDG), ROX[™] dye Passive Reference, dNTPs, Optimized buffer components
- cDNA van volledige hommels
- StepOne[™] Plus (Applied Biosystems[®])
- StepOne[™] Real-Time PCR System (Applied Biosystems[®])
- DNAZap (1 en 2) (Ambion[®])
- MicroAmp[®] Fast Optical 96-Well Reaction Plate (Applied Biosystems[®])
- MicroAmp[®] Optical Adhesive Film (Applied Biosystems[®])
- Forward primer
- Reverse primer
- Aluminiumfolie

Methode:

- Ontsmet de laminaire flowkast met 70% ethanol
- Ontsmet de rekjes en de pipetten onder UV-licht
- Verwijder de rest van het DNA met DNAZap
- Spoel de rekjes en de pipetten met Milli-Q[®] water en droog af
- Los de primers op in aangegeven hoeveelheid Milli-Q[®] water en vortex
- Maak een verdunde stockoplossing van de primers (20 µl primer + 180 µl Milli-Q[®] water) en vortex

- Verdun het cDNA (C.3) door aan de 20 µl cDNA 180 µl Milli-Q[®] water toe te voegen (cDNA stock)
- Maak een verdunningsreeks van het cDNA (1000-100-10-1) waarbij 1000 de concentratie van de cDNA stock is
- Maak een mastermix: voor 11 reacties:
 - 33 µl Milli-Q[®] water
 - 11 µl forward primer
 - 11 µl reverse primer
 - 110 µl Fast SYBR[®] Green Master Mix (2x)
- Voeg per per concentratie cDNA in twee welletjes: 15 µl mastermix en 5 µl cDNA toe
- NTC: voeg in twee welletjes 15 µl mastermix en 5 µl Milli-Q[®] water toe
- Dek de plaat af met de adhesieve folie
- Bescherm de plaat van het licht met aluminiumfolie
- Draai de plaat af in de centrifuge gedurende 2 min bij 1800 rpm op 4°C
- Plaats de plaat op 4°C tot de q-RT-PCR gestart kan worden
- Laad de plaat in de StepOne[™] Plus (Applied Biosystems[®])
- Start het volgende programma:

95°C	10 min	Hot Start	
95°C	3 sec	Denaturatie	x40
60°C	30 sec	Binden primers en elongatie	
60 °C	15 sec	Denaturatie	met ΔT= + 0,3°C tot 95°C
60°C	1 min	Binden primers en elongatie	
95°C	15 sec		

C.4.4. Selecteren van de stabielste huishoudgenen

Indien de primerparen goedgekeurd worden, kunnen de stabielste huishoudgenen geselecteerd worden met qbasePLUS (Biogazelle). qBase zal de geteste genen een M-waarde toekennen. De genen met de laagste M-waarde hebben de stabielste expressie. Bovendien geeft dit programma ook aan hoeveel huishoudgenen er gebruikt moeten worden om de resultaten van q-RT-PCR te normaliseren (Vandesompele *et al.*, 2002b). Voor meer uitleg en de resultaten van deze test zie addendum S9.

De primerparen van de genen worden op alle weefsels in tweevoud getest. Hiervoor wordt een mix gemaakt van het cDNA per weefsel van de drie kolonies samen. Voor elk gen wordt een NTC toegevoegd om contaminatie op te sporen en wordt een aparte mastermix gemaakt voor 25 reacties met 75 µl Milli-Q[®] water, 25 µl forward en 25 µl reverse primer en 250 µl Fast SYBR[®] Green Master Mix (2x). Elke reactie bevat 15 µl mastermix en 5 µl cDNA. Er wordt op dezelfde manier gewerkt zoals beschreven in C.4.3 maar het programma van C.4.5 wordt opgestart aangezien er geen smeltcurve moet worden opgesteld.

C.4.5. q-RT-PCR

Nadat de stabielste huishoudgenen geselecteerd zijn en het aantal huishoudgenen gekend zijn om de resultaten van de q-RT-PCR accuraat te normaliseren kan de q-RT-PCR uitgevoerd worden. Voor elk gen wordt een aparte plaat gepipetteerd. Elk weefsel van elke kolonie wordt in tweevoud gemeten. Aan elke plaat wordt ook een NTC toegevoegd.

Het programma start met de hot start procedure. Het DNA wordt gedenateerd bij 95°C. Het binden van de primers en de elongatie worden gecombineerd in één stap bij 60°C. De resultaten worden weergegeven in de software StepOne™ Real-Time PCR System (Applied Biosystems®).

Omdat q-RT-PCR zeer gevoelig is voor contaminatie is het noodzakelijk om steriel te werk te gaan. De laminaire flowkast wordt ontsmet met ethanol, UV licht en DNAZap. Gedurende de hele procedure worden handschoenen gedragen en wordt enkel met steriel materiaal gewerkt. Omdat SYBR® Green I Dye gevoelig is voor licht wordt dit zoveel mogelijk afgeschermd van het licht.

Materiaal:

- Centrifuge (ROTANTA 46 RSC ROBOTIC, Hettich)
- Laminaire flowkast (Clean Air Technologies, Inc.)
- 70% ethanol (voor 1 l: 700 ml Desinfectol®, Chem-Lab nv + 300 ml Milli-Q® water)
- Milli-Q® water (Millipore)
- Fast SYBR® Green Master Mix(2x) (Applied biosystems®) (zie C.5.3.)
- cDNA (zie C.3)
- StepOne™ Plus (Applied Biosystems®)
- MicroAmp® Fast Optical 96-Well Reaction Plate (Applied Biosystems®)
- MicroAmp® Optical Adhesive Film (Applied Biosystems®)
- Aluminiumfolie

Methode:

- Ontsmet de laminaire flowkast met 70% ethanol
- Ontsmet de rekjes en de pipetten onder de UV-licht
- Verwijder de rest van het DNA met DNAZap
- Spoel de rekjes en de pipetten met Milli-Q® water en droog af
- Maak voor elk gen (en dus elke plaat) een mastermix:
 - 204 µl Milli-Q® water
 - 68 µl forward primer
 - 68 µl reverse primer
 - 680 µl Fast SYBR® Green Master Mix (2x)
- Elke reactie wordt uitgevoerd met 15 µl mastermix en 5 µl cDNA (stock)

- NTC: voeg in twee welletjes 15 µl mastermix en 5 µl Milli-Q[®] water toe
- Dek de plaat af met de adhesieve folie
- Scherm de plaat af van het licht met aluminiumfolie
- Draai de plaat af in de centrifuge gedurende 2 min bij 1800 rpm op 4°C
- Plaats de plaat op 4°C tot de q-RT-PCR gestart kan worden.
- Laad de plaat in de StepOne[™] Plus (Applied Biosystems[®])
- Start het volgende programma:

95°C	10 min	Hot Start	
95°C	3 sec	Denaturatie	x40
60°C	30 sec	Binden primers en elongatie	

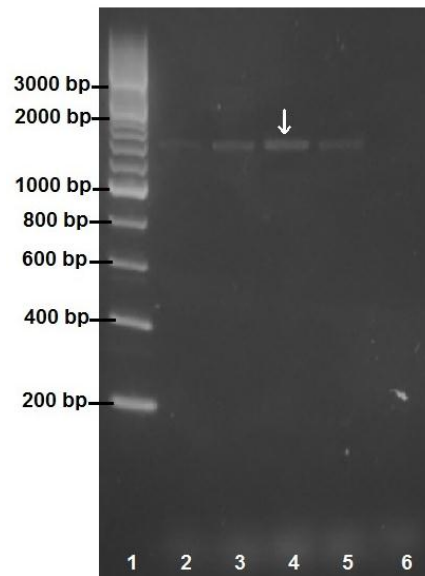
D. Fylogenetische en structurele analyse

De sequenties van de twee OXR-achtige receptoren (ATR en OXR-achtig) van *B. terrestris* worden vergeleken met de *Trica*-ATR (**XP_973738**) en de humane OXR sequenties (**AAC39602** en **NP_001516**). De sequenties worden gealigneerd in een ‘Multiple Alignment met Fast Fourier Transform’ (MAFFT) (Katoh *et al.*, 2002). Met Phobius worden de transmembrane domeinen voorspeld (phobius.sbc.su.se). De sequentie identiteit wordt berekend met BioEdit. Bovendien wordt ook een fylogenetische boom samengesteld met ‘neighbour-joining method’, met de AZ sequentie van de ATR en de OXR-achtige receptoren en OXR/ATR-achtige receptoren van andere insecten, de humane OXRs en de FMRFamide receptor van *D. melanogaster* (**AAF47700**), om de boom te wortelen (MEGA software vs. 5.1; Tamura *et al.*, 2007; 500-fold bootstrap resampling). Voor meer informatie over de genen gebruikt in de fylogenetische analyse zie addendum S11.

Hoofdstuk 3: Resultaten

1. Klonering

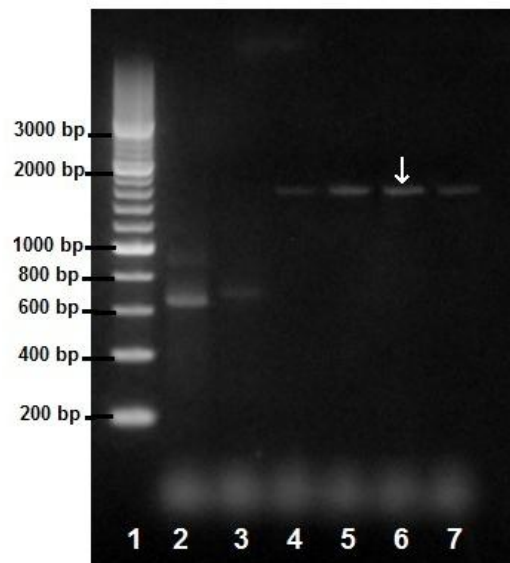
De genen worden opgepikt door middel van een gradiënt PCR met verschillende bindingstemperaturen van de primer (zie materiaal en methoden A.1). De PCR producten kunnen geanalyseerd worden met een agarose gelelektroforese (zie materiaal en methoden A.2). Het resultaat van het ATR gen is weergegeven in figuur 3.1. Aangezien het ATR gen 1323 bp groot is liggen de bandjes iets hoger dan verwacht ten opzichte van de 200 bp ladder; namelijk iets hoger dan 1400 bp. Maar pas na de sequentie bepaling is zeker geweten of in de PCR het juiste fragment is opgepikt. De primers binden niet meer bij 68°C (laan 6). Bij de andere temperaturen binden de primers wel. Bovendien is deze reactie specifiek aangezien er geen andere bandjes zichtbaar zijn. Het bandje is het sterkst bij 60°C (laan 4). Het PCR product van deze temperatuur wordt rechtstreeks gebruikt om te kloneren in de expressievector.



Figuur 3.1: Resultaat van de agarose gelelektroforese van de PCR producten van het ATR gen: in laan 1 de O'RangeRuler™ 200 bp DNA ladder (Fermentas) en in lanen 2-6 de PCR producten met verschillende bindingstemperaturen van de primers. De gebruikte temperaturen zijn: 50°C, 55°C, 60°C, 64°C en 68°C. De witte pijl verwijst naar het PCR product dat uitgekozen wordt om te ligeren in de pcDNA™3.1/V5-His TOPO® TA vector.

Ook de PCR producten van de gradiënt PCR van het OXR-achtige gen worden geanalyseerd met een agarose gelelektroforese. In figuur 3.2 is duidelijk te zien dat de primers niet specifiek binden bij 50,6°C en 54°C (laan 2 en 3). Bij de andere temperaturen, 57,7°C, 61,3°C, 63,6°C en 68,1°C (laan 4-7), binden de primers wel specifiek waardoor deze PCR producten rechtstreeks gebruikt kunnen worden om te kloneren. Ook hier liggen de bandjes iets hoger dan verwacht. Ondanks het feit dat het OXR-achtige gen ongeveer 1533 bp groot is liggen de bandjes ter hoogte van meer dan 1600 bp. Pas na de sequentie bepaling is er

zekerheid of het juiste fragment is opgepikt. Het bandje is het sterk bij 63,6°C. Bijgevolg wordt dit PCR product gekozen om te kloneren in de expressievector.

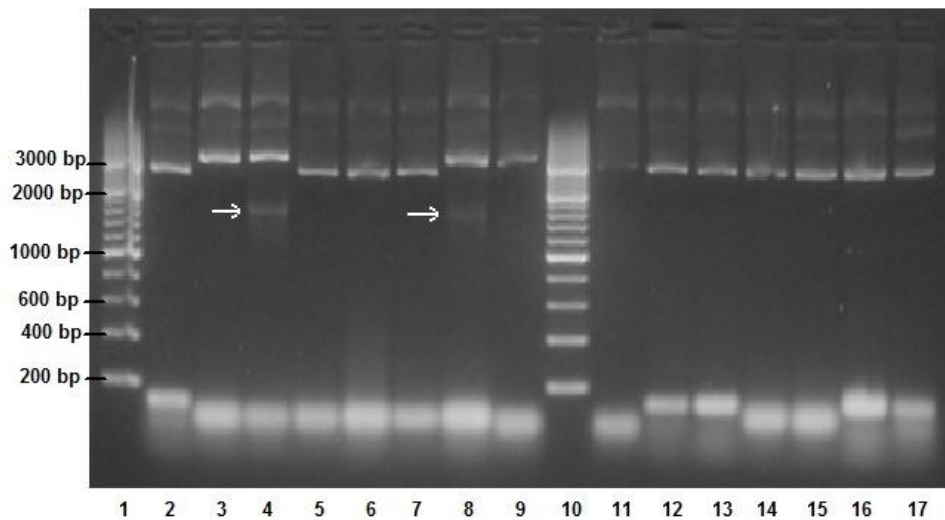


Figuur 3.2: Resultaat van de agarose gelelektroforese van de PCR producten van het OXR-achtige gen: in laan 1 de O'RangeRuler™ 200 bp DNA ladder (Fermentas) en in lanen 2-7 de PCR producten met verschillende bindingstemperaturen van de primers. De gebruikte temperaturen zijn: 50,6°C, 54,0°C, 57,7°C, 61,3°C, 63,6°C en 68,1°C. De witte pijl verwijst naar het PCR product dat uitgekozen wordt om te ligeren in de pcDNA™3.1/V5-His TOPO® TA vector.

De PCR producten worden rechtstreeks gekloneerd in de expressievector pcDNA™3.1/V5-His TOPO® TA van Invitrogen™ en vervolgens getransformeerd naar One Shot® TOP10 Chemically Competent Cells (Invitrogen™) (zie materiaal en methoden A.3 en A.4). Aangezien de cellen opgegroeid zijn op een medium dat ampicilline bevat, kunnen ze alleen groeien indien ze de vector met het ampicilline resistentie gen opgenomen hebben. Na het opgroeien van de cellen en de mini-prep van de 15 opgepikte kolonies wordt er met een PCR nagegaan bij welke kolonie de klonering van het OXR-achtige gen in de vector gelukt is (zie materiaal en methoden A.5, A.6 en A.7). Deze stap wordt overgeslagen bij het ATR gen. De resultaten van de concentratiemeting van de mini-prep worden niet weergegeven.

Doordat er in de PCR gebruik wordt gemaakt van een forward primer stroomopwaarts van het gen en een reverse primer in het gen wordt het gen alleen exponentieel geamplificeerd als het gen aanwezig is in de vector en als dit gen in de juiste richting ligt. Het resultaat wordt geanalyseerd met een agarose gelelektroforese (Fig. 3.3). Bovenaan is de vector in verschillende conformaties weergegeven. Aangezien de vector 5523 bp groot is en het insert 1537 bp zal de recombinantie vector 7123 bp groot zijn. In gecondenseerde toestand zal het bandje lager liggen dan 7000 bp. De vector is vooral aanwezig ter hoogte van de ladder bij 3000 bp. In laan 3, 4, 8 en 9 ligt de vector hoger dan bij de andere kolonies. Bij deze kolonies is de klonering in de vector waarschijnlijk gelukt. Alleen bij kolonie 3 en 7 (laan 4 en 8) zit het insert waarschijnlijk in de juiste richting. Alleen bij deze twee kolonies is een bandje te

zien ter hoogte van 1600 bp, wat ongeveer de grootte van het insert is. Van deze kolonies zal de sequentie van het insert bepaald worden.



Figuur 3.3: Resultaat van de agarose gelelektroforese van de PCR producten om na te gaan of het doelwitgen is opgenomen in de pcDNATM3.1/V5-His TOPO[®] TA vector. In laan 1 en laan 10 is de O'RangeRulerTM 200 bp DNA ladder weergegeven. In laan 2-9 en laan 11-17 is het PCR product weergegeven van de verschillende kolonies. De witte pijlen duiden de bandjes aan ter hoogte van de verwachte grootte van het insert.

Om een juiste expressie van de genen in de eukaryote cellen te garanderen moet de AZ sequentie van het insert in de pcDNATM3.1/V5-His TOPO[®] TA vector overeenkomen met de AZ sequentie zoals weergegeven op NCBI (**XP_003402490** en **XP_003394933**) (zie ook S1). De nucleotide sequentie van het insert wordt bepaald zoals beschreven in materiaal en methoden A.7.3. Deze sequentie wordt vergeleken met de nucleotide sequentie zoals weergegeven op NCBI (**XM_003402442** en **XM_003394885**) (zie ook S1) met behulp van Clustal W 2.1 in een sequentie alignering (Larkin *et al.*, 2007). Indien de sequentie op nucleotide niveau niet identiek is, wordt ook de sequentie op AZ niveau vergeleken.

De sequentie op nucleotide niveau van een kolonie met het ATR gen wordt weergegeven in addendum S2. De sequentie vertoont één transitie waarbij een C is vervangen door een T. Op aminozuurniveau (AZ niveau) bevat de kolonie wel de juiste sequentie (Fig 3.4).

De sequentie van kolonie 3 met het OXR-achtige gen komt zowel op nucleotide als op AZ niveau niet overeen met de sequentie zoals voorspeld op NCBI (resultaten niet weergegeven).

De sequentie alignering van de nucleotide sequentie van kolonie 7 met de sequentie zoals voorspeld op NCBI wordt weergegeven in addendum S3. In het begin van het gen zijn er enkele fouten zichtbaar. Omdat deze fouten niet weerlegd kunnen worden met de andere primers wordt het chromatogram bekeken met BioEdit Sequence Alignment Editor (Ibis Biosciences).

```

insert      MHPLELVIVGNLASVISILVDAIDYLDYSDAMDYIDESDDIDYNATNCTNSYGISNEEYVD 60
ATR         MHPLELVIVGNLASVISILVDAIDYLDYSDAMDYIDESDDIDYNATNCTNSYGISNEEYVD 60
*****

insert      RMINYIFFKFDWVLIASHSVFVWGLVGNALVCIAYVRNHSMTVIVNFIVNLAVADFL 120
ATR         RMINYIFFKFDWVLIASHSVFVWGLVGNALVCIAYVRNHSMTVIVNFIVNLAVADFL 120
*****

insert      VLLCLPFTVLWDITETWFLGLTLCKAVPYLQTVSVIVSILILTLFISIDRWYAIQFELRF 180
ATR         VLLCLPFTVLWDITETWFLGLTLCKAVPYLQTVSVIVSILILTLFISIDRWYAIQFELRF 180
*****

insert      KSTIGRAKSAIIGIWAALLFDIPDLVVLHTVPPTHIKIKTVLFTQCDISWSQRSQVAFI 240
ATR         KSTIGRAKSAIIGIWAALLFDIPDLVVLHTVPPTHIKIKTVLFTQCDISWSQRSQVAFI 240
*****

insert      IVKLIFLYTGELIFMSVAYWQIVKVLWRSNIPGHNLPBRASQMSQIPSTGGGNPEVQLRS 300
ATR         IVKLIFLYTGELIFMSVAYWQIVKVLWRSNIPGHNLPBRASQMSQIPSTGGGNPEVQLRS 300
*****

insert      RRKAAMLVIVVITFAICYFPVHLLSVLRVYTTITLESNKWINAISLIAHGLCYFNSAVNPL 360
ATR         RRKAAMLVIVVITFAICYFPVHLLSVLRVYTTITLESNKWINAISLIAHGLCYFNSAVNPL 360
*****

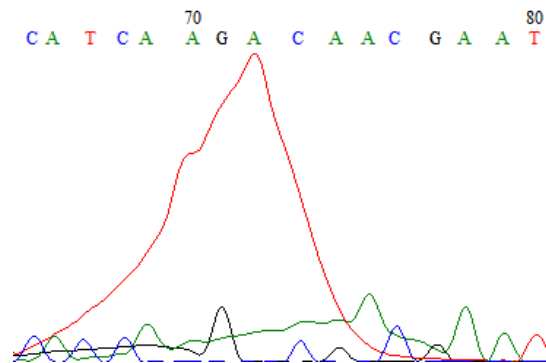
insert      IYNFMSGKFRKAFRRIFRCARENGSRIQRYLASTISNFPRIKSRITIIIRITFKINNNLQR 420
ATR         IYNFMSGKFRKAFRRIFRCARENGSRIQRYLASTISNFPRIKSRITIIIRITFKINNNLQR 420
*****

insert      NTEIIPLSAIIITIQNEKHD 440
ATR         NTEIIPLSAIIITIQNEKHD 440
*****

```

Figuur 3.4: Resultaat van de AZ sequentie alignering (Clustal W2.1) van het insert (ATR-gen) in de expressievector pcDNA™3.1/V5-His TOPO® TA (insert) en de sequentie zoals voorspeld op NCBI (XP_003402490) (ATR). De sequentie van het insert op AZ niveau is gelijk aan de voorspelde AZ sequentie op NCBI.

In figuur 3.5 is duidelijk te zien dat er fouten zijn gemaakt bij de automatische sequentie bepaling. De manueel bepaalde en juiste sequentie is **CACCATGTCGACGAAT** en komt dus overeen met de Kozak sequentie gevolgd door de sequentie zoals weergegeven op NCBI. Omdat de nucleotide sequentie van het insert identiek is aan de nucleotide sequentie op NCBI wordt er geen alignering uitgevoerd op AZ niveau.



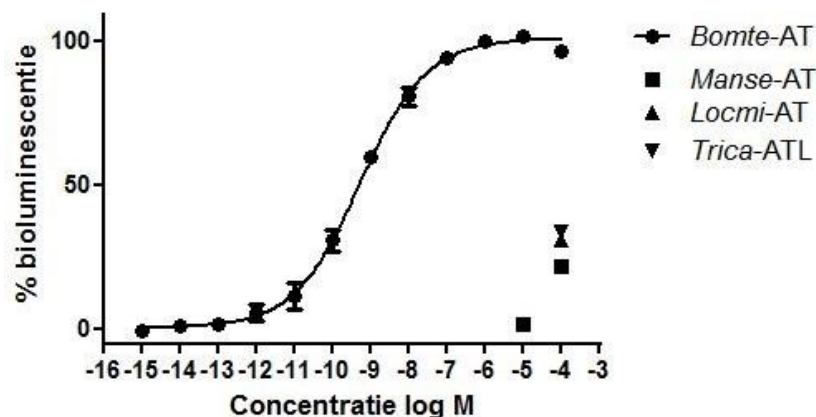
Figuur 3.5: Printscren van het chromatogram van nucleotide 1-16 van kolonie 7 (OXR-achtig) weergegeven in BioEdit Sequence Alignment Editor (Ibis Biosciences) met T in het rood, A in het groen, C in het blauw en G in het zwart.

De kolonie met het ATR gen en kolonie 7 met het OXR-achtige gen worden overnacht opgegroeid zodat de recombinantie expressievector op grote schaal geogst kan worden met de EndoFree® Plasmid Maxi Kit van Qiagen zoals beschreven in materiaal en methoden A.8.

2. Aequorine-bioluminescentie analyse

De resultaten van de aequorine-bioluminescentie analyse worden geanalyseerd met GraphPad Prism 5 (GraphPad Software, inc). De berekeningen die worden gemaakt met deze waarden zijn samengevat in addendum S5.1. Met de relatieve bioluminescentie wordt een dosis-respons curve opgesteld waaruit de half maximale effectieve concentratie waarde (EC_{50}) kan worden afgeleid. De maximale respons is de respons waarbij een plateau wordt bereikt. Een nulrespons komt overeen met de waarde gemeten in de blanco meting. De EC_{50} waarde geeft aan bij welke concentratie ligand 50% van de maximale respons wordt bereikt. Hoe hoger deze waarde ligt, hoe minder gevoelig de receptor voor het ligand is en hoe hoger de concentratie ligand moet zijn om een reactie uit te lokken. Bij een lagere EC_{50} waarde is er dus een lagere concentratie ligand nodig om een respons uit te lokken.

Bomte-ATR werd tot expressie gebracht in CHO-WTA11 cellen bij verschillende concentraties *Bomte-AT*, *Manse-AT*, *Locmi-AT* en *Trica-ATL* (zie materiaal en methoden B.3). *Bomte-AT* geeft een duidelijke dosis-respons curve met een EC_{50} waarde van $5,22 \times 10^{-10}$ M. In dit geval is de maximale respons de respons die gemeten is bij de hoogste concentratie *Bomte-AT*. De nulrespons komt overeen met de waarde gemeten in de blanco meting met BSA. Ook de andere AT en ATL neuropeptiden geven een een respons, maar deze is veel lager bij hoge concentraties (Fig. 3.6).

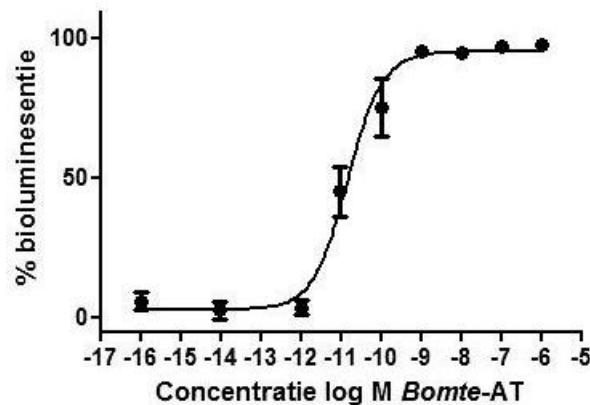


Figuur 3.6: Dosis-respons curve voor de bioluminescentie respons geïnduceerd in CHO-WTA11-*Bomte-ATR* cellen door *Bomte-AT* (● EC_{50} waarde $5,22 \times 10^{-10}$ M), *Manse-AT* (■), *Locmi-ATL* (▲) en *Trica-ATL* (▼). Het gemiddelde \pm SD wordt weergegeven van twee onafhankelijke metingen in drievoud (*Bomte-AT*) en in tweevoud (*Manse-AT*, *Locmi-ATL* en *Trica-ATL*) en wordt weergegeven in percentage van de maximale respons. Een nulrespons komt overeen met de blanco meting met BSA.

Om na te gaan of ATR in natuurlijke omstandigheden ook koppelt aan Ca^{2+} werd *Bomte-ATR* tot expressie gebracht in CHO-PAM28 cellen (zie materiaal en methoden B.3). *Bomte-AT* geeft een duidelijke dosis afhankelijke intracellulaire Ca^{2+} respons met een EC_{50} waarde van $1,48 \times 10^{-11}$ M (Fig. 3.7). Ook hier komt de maximale respons overeen met de respons bij de hoogste concentratie *Bomte-AT*. Een nulrespons komt overeen met de waarde gemeten in de blanco meting met BSA.

Er werd ook een aequorine-bioluminescentie analyse uitgevoerd met OXR-achtig in CHO-WTA11 en CHO-PAM28 cellen maar de receptor reageerde niet op de aanwezigheid van AT of ATL (resultaten niet weergegeven).

Een transfectie met de lege pcDNATM3.1/V5-His TOPO[®] TA vector in zowel de CHO-WTA11 als de CHO-PAM28 cellen gaf ook geen respons (resultaten niet weergegeven). De respons uitgelokt door de neuropeptiden is dus te wijten aan de ATR.



Figuur 3.7: Dosis-respons curve voor de bioluminescentie respons geïnduceerd in CHO-PAM28-Bomte-ATR cellen door Bomte-AT (● EC₅₀ waarde 1,48 x 10⁻¹¹ M). Het gemiddelde ± SD wordt weergegeven van twee onafhankelijke metingen in drievoud en wordt weergegeven in percentage van de maximale respons. Een nul-respons komt overeen met de blanco meting met BSA.

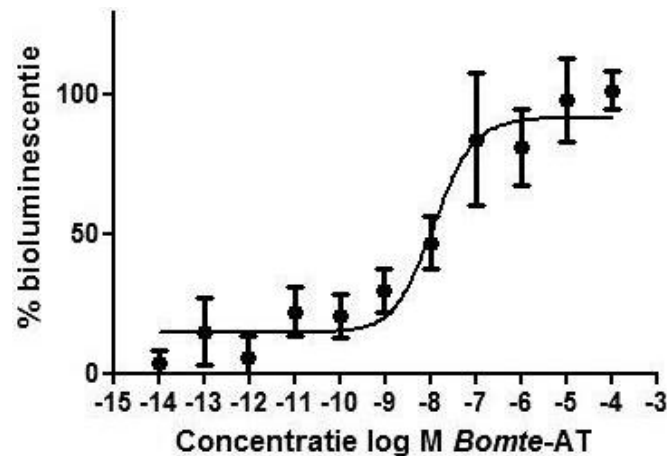
3. Luciferase reporter gen analyse

Om na te gaan of ATR ook een invloed heeft op AC wordt een luciferase reporter gen analyse uitgevoerd met HEK293 cellen (zie materiaal en methoden B.5). *Bomte-ATR* werd tot expressie gebracht bij verschillende concentraties *Bomte-AT* in aan- en afwezigheid van forskoline. Indien de receptor AC inhibeert wordt een lagere cAMP concentratie verwacht bij het toedienen van AT dan gemeten in aanwezigheid van forskoline omdat forskoline AC activeert.

De resultaten van de luciferase reporter gen analyse worden geanalyseerd met GraphPad Prism 5 (GraphPad Software, inc). In Addendum S5 wordt uitgelegd hoe de relatieve bioluminescentie wordt berekend. Ook hier wordt een dosis-respons curve opgesteld en wordt de EC₅₀ waarde berekend. Bij de hoogste concentratie *Bomte-AT* heeft de respons het plateau bereikt. Deze respons wordt als maximale respons genomen. Een nulrespons komt overeen met de waarde gemeten in de blanco meting met 'DMEM/F-12 + IBMX medium'.

Bomte-AT geeft een duidelijke dosis afhankelijke intracellulaire cAMP respons met een EC₅₀ waarde van 1,21 x 10⁻⁸ M (Fig 3.8). Ook bij forskoline wordt het plateau bereikt bij dezelfde respons (resultaten niet weergegeven).

De HEK-293 cellen getransfecteerd met de lege pcDNATM3.1/V5-His TOPO[®] TA vector gaf geen signaal (resultaten niet weergegeven).



Figuur 3.8: dosis-respons curve voor de luciferase reporter gen analyse geïnduceerd in HEK293-Bomte-ATR cellen door Bomte-AT (● EC₅₀ waarde $1,21 \times 10^{-8}$ M). Het gemiddelde \pm SD wordt weergegeven van twee onafhankelijke metingen (in drievoud en in achtvoud) en wordt weergegeven in percentage van de maximale respons. Een nul-respons komt overeen met de blanco meting met 'DMEM/F-12 + IBMX medium'.

4. Weefsel distributie analyse

Voor de q-RT-PCR werden de volgende weefsels verzameld: de hersenen, ventraal zenuwweefsel, vetweefsel uit het hoofd, de voordarm, de middendarm, de einddarm, de buisjes van Malpighi, vetweefsel uit het lichaam, de testes en de accessorische klieren uit 13 darren van kolonie 1, 9 darren van kolonie 2 en 8 darren van kolonie 3 (zie materiaal en methoden C.1). Het RNA werd geëxtraheerd en omgezet naar cDNA (zie materiaal en methoden C.2 en C.3). De resultaten van de concentratie en de zuiverheidsmetingen met de NanoDrop[®] Spectrophotometer worden weergegeven in addendum S6.

Voor de weefsel distributie analyse worden genen geselecteerd die als kandidaat huishoudgenen kunnen dienen. De kandidaat huishoudgenen worden gevonden in Horňáková *et al.* (2010) en Tobback *et al.* (2010). Een samenvatting van de primerparen wordt weergegeven in addendum S8. Deze primerparen worden *in vitro* getest. Indien de primers niet voldoen worden nieuwe primers ontworpen met Primer express[®] Software v2.0 van Applied biosystems[®] en de verkregen primers worden nagekeken met Vector NTI Advance[™] 11.0 van Invitrogen[™]. Ook van de doelwitgenen worden nieuwe primers ontworpen en getest volgens de criteria weergegeven in addendum S7.

Voor de *in vitro* primer test wordt een mengsel RNA gemaakt van 4 abdomens, 1 kop en 3 thoraxen van darren. Van dit mengsel wordt cDNA geproduceerd met 2 μ g RNA (zie materiaal en methoden C.2 en C.3).

De primerparen die uiteindelijk opgenomen worden in de q-RT-PCR om de stabielste huishoudgenen te selecteren worden weergegeven in tabel 3.1. Ook ATR wordt opgenomen in deze test. De stabielste huishoudgenen worden geselecteerd met qbasePLUS (Biogazelle). In addendum S9 wordt ingegaan op hoe deze genen worden geselecteerd en worden de resultaten weergegeven.

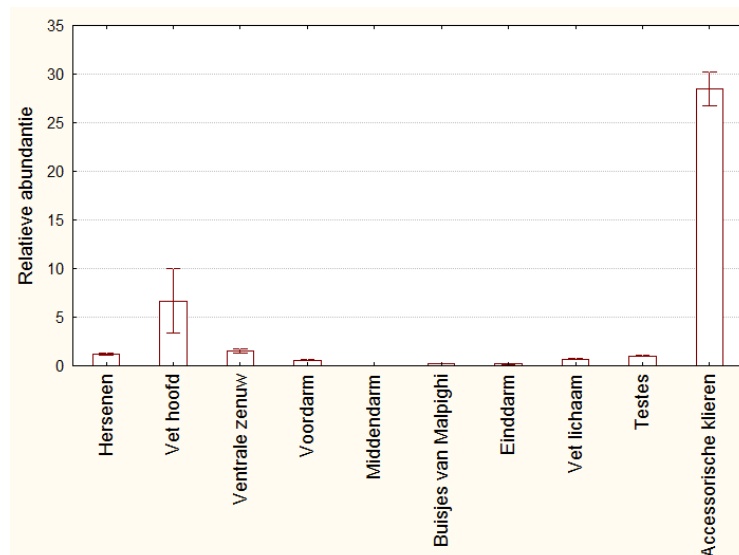
Tabel 3.1: Samenvatting van de gebruikte primers bij het testen van de huishoudgenen en de q-RT-PCR.

Het OXR-achtige gen wordt niet opgenomen in de test om na te gaan welke huishoudgenen het stabielst zijn. De q-RT-PCR wordt uitgevoerd met 6 huishoudgenen; namelijk β -Actin ($\text{Act}\beta$), Elongation factor 1 α (EF1 α), Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH), Phospholipase A2 (PLA2), Ribosomaal protein L13 (RPL13) en α -Tubulin (TUB). Arginine kinase (AK) wordt niet gebruikt als huishoudgen (onderlijnd). ATR en OXR-achtig zijn de doelwitgenen.

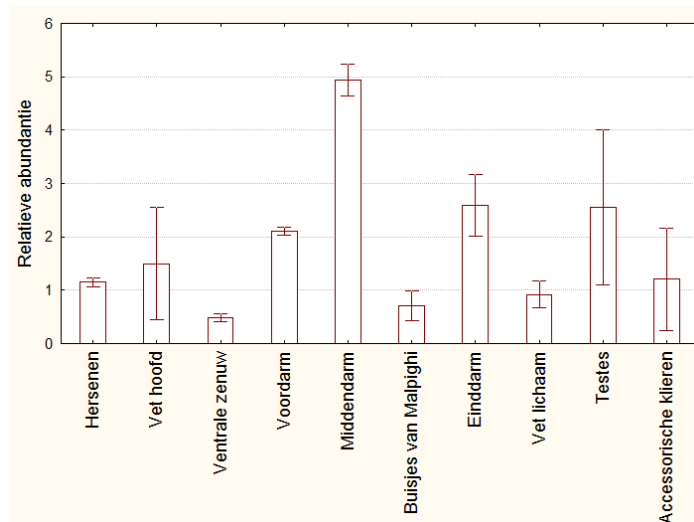
Gen	Forward primer	Reverse primer
ATR	5'-GGGCGGCAGCTCTTCTATTT-3'	5'-CGGTATGCAACACCACGAGAT-3'
OXR-achtige	5'-TCCTATTGCCTGTTTCTGGGA-3'	5'-TACGACAGGATTCATGCGC-3'
$\text{Act}\beta$	5'-ACAGCCGAACGTGAAATTGTT-3'	5'-GGTTGCCATTTCTGTTCGA-3'
<u>AK</u>	<u>5'-TGACAAGCATCCACCAAAGAC-3'</u>	<u>5'-AGGTTGCCAAGACTATCGACGT-3'</u>
EF1 α	5'-AGAATGGACAAACCCGTGAG-3'	5'-CACAAATGCTACCGCAACAG-3'
GAPDH	5'-TTTTGAAATCGTTGAGGGTCTT-3'	5'-CCATCACGCCATAACTTTCC-3'
PLA2	5'-GGTCACACCGAAACCAGATT-3'	5'-GAACCACATCCGTTACTTTGAGGT-3'
RPL13	5'-GGTTAACCAGCCAGCTAGAAA-3'	5'-CTCCACAGGTCTTGGTGCAA-3'
RPL13	5'-TGATCTTGCCAAGGTACAGC-3'	5'-ACGAATGCACGTTTAGCGTA-3'

De q-RT-PCR wordt uitgevoerd met zes huishoudgenen; namelijk $\text{Act}\beta$, EF1 α , GAPDH, PLA, RPL13 en RPL13. De resultaten worden genormaliseerd zoals beschreven in het addendum S9. De genormaliseerde resultaten van de q-RT-PCR en dus de relatieve abundantie van ATR en OXR-achtig worden grafisch weergegeven in STATISTICA™ (StatSoft®).

De expressie van *Bomte*-ATR is het hoogst in de accessorische klieren (Fig. 3.9). *Bomte*-OXR-achtig wordt in alle weefsels tot expressie gebracht. De hoogste expressie wordt gemeten in de middendarm (Fig. 3.10).



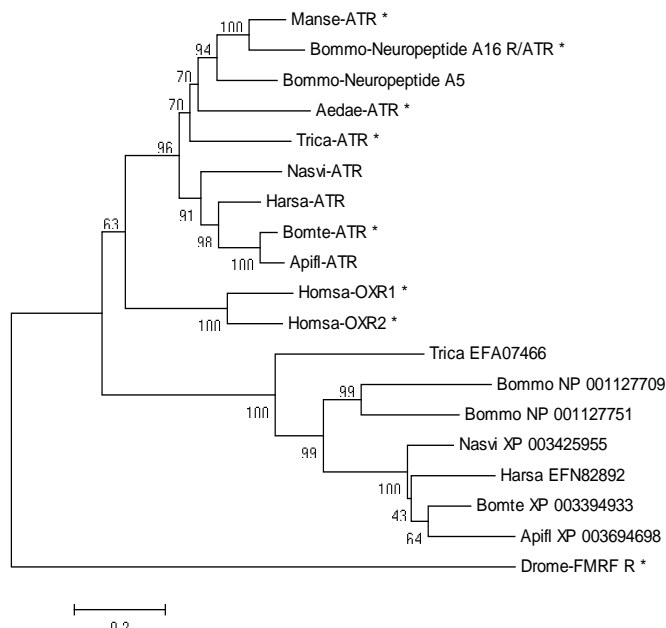
Figuur 3.9: Grafische weergave van de weefseldistributie analyse van *Bomte*-ATR. Transcriptiegehalte gemeten in 4 dagen oude darren van *B. terrestris*. De data geven een gemiddelde waarde van drie onafhankelijke metingen (resp. 13, 9 en 8 darren) in tweevoud gemeten \pm SE.



Figuur 3.10: Grafische weergave van de weefselverdeling analyse van Bomte-OXR-achtig. Transcriptiegehalte gemeten in 4 dagen oude darren van *B. terrestris*. De data geven een gemiddelde waarde van drie onafhankelijke metingen (resp. 13, 9 en 8 darren) in tweevoud gemeten \pm SE.

5. Fylogenetische en structurele analyse

Het resultaat van de structurele analyse wordt weergegeven in addendum S10. Het resultaat van de fylogenetische analyse wordt weergegeven in figuur 3.11. Een samenvatting van de gebruikte genen in deze analyse wordt weergegeven in addendum S11.



Figuur 3.11: Fylogenetische boom van insect ATR- en OXR-achtige receptoren (ADX66344, NP_001127714, NP_001127740, AEN03789, XP_973738, XP_001604582, EFN76143, XP_003402490, XP_003690070, EFA07466, NP_001127709, NP_001127751, XP_003425955, EFN82892, XP_003394933 and XP_003694698) en de humane OXRs (AAC39602 en NP_001516). De fylogenetische en moleculaire evolutionaire analyse werd uitgevoerd door MEGA versie 5.1. De FMRFamide-receptor van *D. melanogaster* werd gebruikt als buitengroep om de boom te wortelen (AAF47700). De gebruikte afkortingen zijn: *Manse*, *Manduca sexta*; *Bommo*, *Bombyx mori*; *Aedae*, *Aedes aegypti*; *Trica*, *Tribolium castaneum*; *Nasvi*, *Nasonia vitripennis*; *Harsa*, *Harpegnathos saltator*; *Bomte*, *Bombus terrestris*; *Apifl*, *Apis florea*; *Homsa*, *Homo sapiens* and *Drome*, *Drosophila melanogaster*. De proteïnen gemarkeerd met een sterretje zijn farmacologisch gekarakteriseerd. 'Bootstrap-support' waarden zijn gebaseerd op 500 replica's en worden geïndiceerd door knopen. De maatstreef 0,2 geeft een genetische afstand van 20% weer.

Hoofdstuk 4: Discussie

Bij de aequorine-bioluminescentie analyse wordt bij de *Bomte*-ATR een dosis-afhankelijke respons uitgelokt met *Bomte*-AT (Fig. 3.6) met een EC_{50} waarde van $5,22 \times 10^{-10}$ M. Ook AT en ATL, de neuropeptiden van andere insecten (*Manse*-AT, *Locmi*-AT en *Trica*-ATL), lokken een intracellulaire Ca^{2+} verhoging uit. Deze peptiden hebben een hogere concentratie neuropeptide nodig om een reactie uit te lokken. Deze resultaten liggen in lijn met de resultaten in de larven van *A. mellifera* in een eerdere studie. Bij deze larven werd door het *Manse*-AT (10^{-5} of 10^{-4} M) de biosynthese van JH in de CA gestimuleerd op een dosis-afhankelijke manier (Rachinsky en Feldlaufer, 2000). Ten opzichte van de concentratie neuropeptide nodig in *M. sexta* om de reactie uit te lokken, dat in de nanomolaire schaal zat (Kataoka et al., 1989), is dit een veel hogere concentratie *Manse*-AT om de reactie uit te lokken. Dit wijst op een specialisatie van de receptor op haar endogene neuropeptide. Omwille van hun afstamming reageert de receptor evenwel ook op AT van andere insecten.

Doordat *Bomte*-AT in de CHO-PAM28 cellen bovendien een dosis-afhankelijke respons uitlokt (Fig. 3.7) met een EC_{50} waarde van $1,45 \times 10^{-11}$ M kan hieruit geconcludeerd worden dat *Bomte*-ATR ook natuurlijk kan koppelen via Ca^{2+} . Tevens kan ATR een stijging veroorzaken in intracellulaire cAMP doordat in de HEK293 cellen, in afwezigheid van forskoline, een dosis-afhankelijke respons uitgelokt wordt uitgelokt door *Bomte*-AT met een EC_{50} waarde van $1,21 \times 10^{-8}$ M. In aanwezigheid van forskoline, dat AC activeert en dus de intracellulaire cAMP concentratie doet verhogen, wordt er geen dosis-afhankelijke effect van dat *Bomte*-ATR gemeten (resultaten niet weergegeven) Bijgevolg kunnen we concluderen dat de receptor geen daling in cAMP veroorzaakt en dus enkel positief koppelt via AC.

De metingen met de CHO-WTA11, CHO-PAM28 en HEK293 die getransfecteerd werden met een lege expressievector geven geen respons. Dit geeft aan dat de gemeten waarden uitgelokt worden door *Bomte*-ATR (resultaten niet weergegeven).

Onze resultaten komen overeen met de farmacologische karakterisatie van de AT receptoren in *M. sexta* en *T. castaneum*. Door activatie van het endogeen AT werd ook bij deze insecten een intracellulaire verhoging van Ca^{2+} en cAMP gemeten (Horodyski et al., 2011; Vuerinckx et al., 2011). In *T. castaneum* lokte *Manse*-AT en *Locmi*-AT echter wel een vergelijkbare dosis-afhankelijke respons uit met de respons van het endogene *Trica*-ATL (Vuerinckx et al., 2011), terwijl deze peptiden een veel lagere respons geven t.o.v het endogene *Bomte*-AT. De volgorde tussen de drie ATs komt wel overeen met de studie in *T. castaneum*. Ook *Bomte*-ATR heeft een hogere affiniteit met *Trica*-ATL dan voor *Locmi*-AT en heeft een lagere affiniteit voor *Manse*-AT.

Uit de weefseldistributie analyse is duidelijk gebleken dat het ATR gen duidelijk het meest tot expressie komt in de mannelijke accessorische klieren (Fig. 3.9). Deze waarden komen overeen met de waarden gemeten in *T. castaneum* waar het *Trica*-ATR het meest tot expressie

kwam in het mannelijke reproductieve systeem. Hierbij werd echter geen onderscheid gemaakt tussen de testes en de accessorische klieren (Vuerinckx *et al.*, 2011). In *A. aegypti* werd dit onderscheid wel gemaakt. De transcriptie van *Aedae-ATR* in deze studie, in tegenstelling tot onze resultaten, is desalniettemin in de accessorische klieren even hoog als in de testes. Bovendien was de expressie het hoogst in het vrouwelijke zenuwweefsel (Nouzova *et al.*, 2012). In de studie met *M. sexta* is het transcriptiegehalte niet gemeten in de mannelijke accessorische klieren (Horodyski *et al.*, 2011)

Er kan een verband worden gemaakt tussen de ATR, AT, de productie van JH en de mannelijke accessorische klieren doordat in *A. aegypti* is aangetoond dat de mannelijke accessorische klieren JH synthetiseren (Borovsky *et al.*, 1994) en dat deze synthese bovendien gestimuleerd wordt door AT (Li *et al.*, 2003). In een recentere studie is er zelfs een verband gevonden tussen het transcriptiegehalte van de ATR in de CA en veranderingen in het JH synthese. Hieruit werd besloten dat ofwel de transcriptie van ATR geregeld wordt door JH of dat ATR de synthese van JH reguleert. Hiervoor is echter meer onderzoek nodig (Nouzova *et al.*, 2012). In *L. migratoria* werd tevens AT-achtig peptide (nl. *Lom-AG-MT1*) opgemerkt in de mannelijke accessorische klieren (Paemen *et al.*, 1991) en in de kakkerlakken *Leucophaea maderae* en *Periplaneta americana* werd een hogere AT immunoreactie opgemerkt in de zenuwen die de mannelijke accessorische klieren stimuleren ten opzichte van de zenuwen die de vrouwelijke oviduct spieren innervieren (Rudwall *et al.*, 2000; Vuerinckx *et al.*, 2011). Door een weefseldistributie analyse uit te voeren met primers van het AT-precursor peptide (**XM_00398428**) kan er worden nagegaan of dit peptide ook tot expressie komt in de accessorische klieren van *B. terrestris*.

Bomte-OXR-achtig werd daarenboven tot expressie gebacht in CHO-WTA11 en CHO-PAM28 cellen. Hierbij werd geen bioluminescentie gemeten na het toevoegen van *Bomte-AT*, *Manse-AT*, *Locmi-AT* of *Trica-ATL*. Uit deze analyse alleen kan niet direct een besluit gevormd worden aangezien er geen bewijs is dat het construct ook daadwerkelijk werkt in de cellen. Dit is enkel mogelijk indien er een peptide wordt gevonden dat de receptor wel activeert.

Het weefseldistributiepatroon van het OXR-achtig gen (Fig. 3.10) verschilt duidelijk van het patroon van *Bomte-ATR* en de ATRs in *M. sexta*, *A. aegypti* en *T. castaneum* (Horodyski *et al.*, 2011; Nouzova *et al.*, 2012; Vuerinckx *et al.*, 2011). Het transcriptiegehalte van het OXR-achtig gen is het grootst in de middendarm. Er kan ook opgemerkt worden dat de receptor tot expressie wordt gebracht in het hele spijsverteringsstelsel. (Fig. 3.10).

Samen met het feit dat bij de expressie van *Bomte-OXR*-achtig in CHO-WTA11 cellen geen respons wordt uitgelokt door de aanwezigheid van *Bomte-AT* of AT van andere insecten kan dit een indicatie zijn dat OXR-achtig waarschijnlijk geen AT receptor is. De structurele en de fylogenetische analyses treden onze stelling bij. *Bomte-ATR* en *Bomte-OXR*-achtig komen

maar voor 18,4% overeen (addendum S10) en de fylogenetische boom plaatst deze twee genen in twee verschillende groepen (Fig. 3.11).

Net zoals allatotropine is orexine een pleiotroop eiwit dat in meerdere functionele processen betrokken is. In transgene muizen waar het gen verwijderd werd, blijkt orexine betrokken te zijn bij narcolepsie, hypofagia en obesitas (Hara *et al.*, 2001). Er werd al in eerdere studies verwezen naar de rol die orexines spelen bij het gedrag in voedsel (Sakurai *et al.*, 1998) maar werd ook in varkens gewezen op de rol van orexines in de endocriene modulatie van het gedrag bij voedsel en metabolische homeostase (Dall'aglio *et al.*, 2013). Bovendien werd in deze studie een weefseldistributie analyse uitgevoerd waarbij het transcriptie gehalte in verschillende delen van de darm bepaald werd. De orexine receptoren blijken over heel het spijsverteringsstelsel tot expressie te worden gebracht. Dit komt dus in grote lijnen overeen met onze resultaten. Dit kan er dus op wijzen dat het OXR-achtige gen een rol kan spelen in de metabolische homeostase en dus bij het gedrag bij voedsel.

Dit vermoeden kan pas bevestigd worden indien *Bomte*-OXR-achtig farmacologisch en functioneel wordt gekarakteriseerd en dus de agonist van de receptor gevonden wordt en dit niet AT blijkt te zijn. Een volgende logische stap zou zijn om deze receptor met een peptidebank van *B. terrestris* te testen. Helaas bestaat zo een peptidebank nog niet voor deze hommelmel. Daarbij is het maken van zo een bank erg duur waardoor het economischer zou zijn om deze receptor te karakteriseren bij een soort waarvan er wel een peptidebank beschikbaar is. Van *D. melanogaster* is zo een peptidebank wel beschikbaar maar aangezien er in dit insect geen receptor geïdentificeerd is die overeenkomt met de *Bomte*-OXR-achtige receptor, is de kans erg klein dat hierin een actief ligand gevonden wordt. We veronderstellen namelijk dat indien de receptor aanwezig is in een organisme, het ligand ook aanwezig moet zijn en vice versa. Neuropeptide-receptorsystemen zijn immers erg specifiek en men mag pas ervan uitgaan dat een organisme een neuropeptide-receptorsysteem heeft verloren in de evolutie als zowel het neuropeptide als de receptor afwezig zijn (Caers *et al.*, 2012).

De receptoren kunnen verder functioneel gekarakteriseerd worden met een RNA interference (RNAi) dat de expressie van het gen zal verlagen. Een andere mogelijkheid is om de genen te muteren of volledig uit het genoom te halen door homologe recombinatie. Het gen kan ook tot overexpressie gebracht worden met het GAL/UAS systeem (Caers *et al.*, 2012). Maar voorlopig zijn deze testen nog niet uitgevoerd in *B. terrestris*.

Samenvatting

Allatotropine (AT) is een pleiotroop neuropeptide dat meerdere functies bij verschillende soorten insecten uitoefent. Enkele van deze functies zijn: de stimulatie van de biosynthese van het juveniel hormoon (JH), opwekken van myotropische activiteit, de hartslag doen versnellen, inhiberen van het actief ion transport in de darm en darmmotiliteit stimuleren. Ook bij Mollusca en Annelida blijkt een verwant peptide een myotropische activiteit uit te oefenen. Er wordt tevens gesuggereerd dat de myotropische activiteit de oorspronkelijke rol is van AT en dat de stimulatie van JH pas secundair in de evolutie is ontstaan.

AT werd voor het eerst geïsoleerd in 1989 in *Manduca sexta*. Doordat er in het modelorganisme *Drosophila melanogaster* geen AT sequentie geïdentificeerd kon worden duurde het tot 2008 eer de eerste receptor (ATR) gekarakteriseerd werd in *Bombyx mori*. Al snel volgde de karakterisatie van andere ATRs bij *M. sexta*, *Tribolium castaneum* en *Aedes aegypti*. Initiëel werd er ook geen AT sequentie geïdentificeerd in de Hymenoptera *Apis mellifera* en *Nasonia vitripennis*. In 2012 echter, een jaar nadat een eerste versie van het genoom van *B. terrestris* en andere Hymenoptera werd vrijgegeven, werd toch een AT sequentie geïdentificeerd in verschillende Hymenoptera, waaronder *B. terrestris*.

Er zijn op dit moment twee orexine receptorachtige receptoren voorspeld bij *B. terrestris*. Eén van deze receptoren blijkt geactiveerd te worden door *Bomte*-AT. De andere receptor reageert niet op *Bomte*-AT en is nog steeds een weesreceptor. Ook het transcriptgehalte van beide genen werd vergeleken in verschillende weefsels met kwantitatieve real-time PCR (q-RT-PCR). De resultaten wijzen op een mogelijke rol van de AT-ATR pathway in de mannelijke fertiliteit terwijl de OXR-achtige pathway eerder een rol lijkt te vervullen binnen het spijsverteringsstelsel.

Summary

Allatotropin (AT) is a pleiotropic neuropeptide that exerts multiple functions in different insects species. A few of these functions are: the stimulation of the biosynthesis of the juvenile hormone (JH), the stimulation of myotrophic activity, acceleration of the heart rate, active inhibition of ion transport in the gut and stimulation of gut contractions. Also Mollusca and Annelida appear to have a related peptide that has myotrophic activity. It is suggested that the myotrophic activity is the ancestral role of AT and that the stimulation of JH evolved secondarily.

AT was isolated for the first time in 1989 in *Manduca sexta*. Because there is no AT sequence identified in the model organism *Drosophila melanogaster* it took until 2008 to characterize the first receptor (ATR) in *Bombyx mori*. It did not take long until other ATRs were characterized in *M. sexta*, *Tribolium castaneum* and *Aedes aegypti*. Initially there was no AT sequence identified in the Hymenoptera *Apis Mellifera* en *Nasonia Vitripennis*. However in 2012, one year after the first version of the genome of *B. terrestris* and other Hymenoptera was released, there was a AT sequence identified in several Hymenoptera after all, among which *B. terrestris*.

At this moment there are two orexine receptor-like receptors predicted in *B. terrestris*. One of these receptors appear to be activated by *Bomte*-AT. The other receptor does not respond to the *Bomte*-AT and is still an orphan receptor. The transcription levels of both genes were compared in different tissues by the use of quantitative real-time PCR (q-RT-PCR). The results indicate a role of the AT-ATR pathway in the male fertility while the OXR-like pathway may play a role in the digestive system.

Referenties

1. Literatuur

- ADAMS, M.D., Celniker, S.E., Holt, R.A., Evans, C.A., Gocayne, J.D., Amanatides, P.G., Scherer, S.E., Li, P.W., Hoskins, R.A., Galle, R.F., George, R.A., Lewis, S.E., Richards, S., Ashburner, M., Henderson, S.N., Sutton, G.G., Wortman, J.R., Yandell, M.D., *et al.* (2000) - The Genome Sequence of *Drosophila melanogaster*. *Science*, **287(5461)**: 2185-2195.
- BEETS, I., Lindemans, M., Janssen, T. and Verleyen, P. (2011) - Deorphanizing G protein-coupled receptors by a calcium mobilization assay. *Methods Mol Biol.* **789**: 377-391.
- BOROVSKY, D., Carlson, D.A., Hancock, R.G., Rembold, H. and van Handel, E. (1994) - *De novo* biosynthesis of juvenile hormone III and I by the accessory glands of the male mosquito. *Insect Biochem Mol Biol*, **24(5)**: 437-444.
- BOSHART, M., Weber, F., Jahn, G., Dorsch-Häsler, K., Fleckenstein, B. and Schaffner W. (1985) - A very strong enhancer is located upstream of an immediate early gene of human cytomegalovirus. *Cell*, **41(2)**: 521-531.
- BROUGH, S.J. and SHAH, P. 2009 - Use of aequorin for G protein-coupled receptor hit identification and compound profiling. *Methods Mol Biol*, **552**: 181-198.
- BROWN, T.A. (2010) - *Gene Cloning and DNA Analysis: An Introduction, 6th edition*. John Wiley & Sons: 336 pp.
- BUTTERMORE, R. E. (1997) - Observations of Successful *Bombus terrestris* (L.) (Hymenoptera: Apidae) Colonies in Southern Tasmania. *Australian Journal of Entomology*, **36(3)**: 251-254.
- CAERS, J., Verlinden, H., Zels, S., Vandersmissen, H.P., Vuerinckx, K. and Schoofs, L. (2012) - More than two decades of research on insect neuropeptide GPCRs: an overview. *Front Endocrinol*, **3(151)**: DOI=10.3389/fendo.2012.00151.
- CHALFIE, M. (1998) - Genome sequencing: The worm revealed. *Nature*, **396**: 620-621.
- DE WET, J.R., Wood, K.V., DeLuca, M., Helinski, D.R. and Subramani, S. (1987) - Firefly luciferase gene: structure and expression in mammalian cells. *Mol Cell Biol*, **7(2)**: 725-737.
- DALL'AGLIO, C., Zannoni, A., Forni, M., Bacci, M.L., Ceccarelli, P. and Boiti, C. (2013) - Orexin system expression in the gastrointestinal tract of pigs. *Res Vet Sci*, **95(1)**: 8-14
- DUVE, H., East, P.D. and Thorpe, A. (1999) - Regulation of lepidopteran foregut movement by allatostatins and allatotropin from the frontal ganglion. *J Comp Neurol.*, **413(3)**: 405-416.
- DUVE, H., Audsley, N., Weaver, R.J. and Thorpe, A. (2000) - Triple co-localisation of two types of allatostatin and an allatotropin in the frontal ganglion of the lepidopteran *Lacanobia oleracea* (Noctuidae): innervation and action on the foregut. *Cell Tissue Res.*, **300(1)**: 153-163.

- ELEKONICH, M. and HORODYSKI, F. (2003) - Insect allatotropins belong to a family of structurally-related myoactive peptides present in several invertebrate phyla. *Peptides*, **24(10)**: 1623-1632.
- GEORGE, S.E., Bungay, P.J. and Naylor, L.H (1997) - Evaluation of a CRE-Directed Luciferase Reportergene Assay as an Alternative to Measuring cAMP Accumulation. *J Biomol Screen*, **2(4)**: 234-240.
- GOODWIN, E.C. and ROTTMAN, F.M. (1992) - The 3'-flanking sequence of the bovine growth hormone gene contains novel elements required for efficient and accurate polyadenylation. *J Biol Chem*, **267(23)**: 16330-16334.
- GOULSON, D. (2010) –*Bumblebees: behaviour, ecology, and conservation*, 2nd edition. Oxford University Press (Oxford): 317 pp.
- GUREL, F., Gosterit, A. and Eren, Ö. (2008) - Life-cycle and foraging patterns of native *Bombus terrestris* (L.) (Hymenoptera, Apidae) in the Mediterranean region. *Insectes Sociaux*, **55**: 123-128.
- HANCOCK, J.T. (2010) – *Cell Signalling*, 3rd edition. Oxford University Press: 341 pp.
- HARA J., Beuckmann, C.T., Nambu, T., Willie, J.T., Chemelli, R.M., Sinton, C.M., Sugiyama, F., Yagami, K., Goto, K., Yanagisawa, M. and Sakurai, T. (2001) - Genetic ablation of orexin neurons in mice results in narcolepsy, hypophagia, and obesity. *Neuron*. **30(2)**: 345-354.
- HARADA, A., Yoshida, M., Minakata, H., Nomoto, K., Muneoka, Y. and Kobayashi, M. (1993) - Structure and function of the molluscan myoactive tetradecapeptides. *Zoolog Sci*, **10(2)**: 257-265.
- HARDIN, J., Bertoni, G.P. and Kleinsmith, L.J. (2011) – The regulation of gene expression. uit: *Becker's world of the cell*, 8th edition. Pearson Education, Inc: 709-757.
- HAUSER, F., Cazzamali, G., Williamson, M., Blenau, W. and Grimmelikhuijzen, C.J. (2006) - A review of neurohormone GPCRs present in the fruitfly *Drosophila melanogaster* and the honey bee *Apis mellifera*. *Prog Neurobiol*, **80(1)**: 1-19.
- HAUSER, F., Neupert, S., Williamson, M., Predel, R., Tanaka, Y. and Grimmelikhuijzen, C.J. (2010) - Genomics and peptidomics of neuropeptides and protein hormones present in the parasitic wasp *Nasonia vitripennis*. *J Proteome Res*, **9(10)**: 5296-5310.
- HEWES, R.S. and TAGHERT, P.H. (2001) - Neuropeptides and neuropeptide receptors in the *Drosophila melanogaster* genome. *Genome Res*, **11(6)**: 1126-1142.
- HORŇÁKOVÁ, D., Matoušková, P., Kindl, J., Valterová, I. and Pichová, I. (2010) - Selection of reference genes for real-time polymerase chain reaction analysis in tissues from *Bombus terrestris* and *Bombus lucorum* of different ages. *Biochemistry*, **397(1)**: 188-120.
- HORODYSKI, F.M., Verlinden, H., Filkin, N., Vandersmissen, H.P., Fleury, C., Reynolds, S.E., Kai, Z. and Vanden Broeck, J. (2011) - Isolation and functional characterization of an

- allatotropin receptor from *Manduca sexta*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, **41(10)**: 804-814.
- HORODYSKI, F.M. (2013) – Allatotropin. In: *Handbook of Biologically Active Peptides, 2nd Edition*. Elsevier Inc.: 197-202 pp.
- HUMMON, A.B., Richmond, T.A., Verleyen, P., Baggerman, G., Huybrechts, J., Ewing, M.A., Vierstraete, E., Rodriguez-Zas, S.L., Schoofs, L., Robinson, G.E. and Sweedler, J.V. (2006) - From the genome to the proteome: uncovering peptides in the *Apis* brain. *Science*, **314(5799)**: 647-649.
- INOUE, S., Noguchi, M., Sakaki, Y., Takagi, Y., Miyata, T., Iwanaga, S., Miyata, T. and Tsuji, F.I. (1985) – Cloning and sequence analysis of cDNA for the luminescent protein aequorin. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **82(10)**: 3154-3158.
- KATAOKA, H., Toschi, A., Li J.P., Carney, R.L., Schooley, D.A. and Kramer S.J. (1989) - Identification of an Allatotropin from Adult *Manduca Sexta*. *Science*, **243(4897)**: 1481-1483.
- KATOH, K., Misawa, K., Kuma, K. and Miyata, T. (2002) - MAFFT: a novel method for rapid multiple sequence alignment based on fast Fourier transform. *Nucleic Acids Res*, **30(14)**: 3059-3066.
- KNIGHT, P.J., Pfeifer, T.A. and Grigliatti, T.A. (2003) - functional assay for G-protein-coupled receptors using stably transformed insect tissue culture cell lines. *Analytical Biochemistry*, **320(1)**: 88-103.
- KOLADICH, P.M., Cusson, M., Bendena, W.G., Tobe, S.S. and McNeil, J.N. (2002) - Cardioacceleratory effects of *Manduca sexta* allatotropin in the true armyworm moth, *Pseudaletia unipuncta*. *Peptides*, **23(4)**: 645-651.
- KOZAK, M. (1986) - Point mutations define a sequence flanking the AUG initiator codon that modulates translation by eukaryotic ribosomes. *Cell*, **44(2)**: 283-292.
- LARKIN, M.A., Blackshields, G., Brown, N.P., Chenna, R., McGettigan, P.A., McWilliam, H., Valentin, F., Wallace, I.M., Wilm, A., Lopez, R., Thompson, J.D., Gibson, T.J and Higgins D.G. (2007) - Clustal W and Clustal X version 2.0. *Bioinformatics* **23(21)**: 2947-2948.
- LEE, K.Y., Horodyski, F.M. and Chamberlin, M.E. (1998) - Inhibition of midgut ion transport by allatotropin (*Mas*-AT) and *Manduca* FLRFamides in the tobacco hornworm *Manduca sexta*. *J Exp Biol*, **201(Pt 22)**: 3067-7304.
- LI, K.W., Holling, T., de With, N.D. and Geraerts, W.P. (1993) - Purification and characterization of a novel tetradecapeptide that modulates oesophagus motility in *Lymnaea stagnalis*. *Biochem Biophys Res Commun*, **97(3)**: 1056-1061.
- LI, X.J., Wolfgang, W., Wu, Y.N., North, R.A. and Forte, M. (1991) - Cloning, heterologous expression and developmental regulation of a *Drosophila* receptor for tachykinin-like peptides. *EMBO J*, **10(11)**: 3221-3229.

- LI, Y., Unnithan, G.C., Veenstra, J.A., Feyereisen, R. and Noriega, F.G. (2003) - Stimulation of JH biosynthesis by the corpora allata of adult female *Aedes aegypti* *in vitro*: effect of farnesoic acid and *Aedes* allatotropin. *J Exp Biol*, **206**(Pt 11): 1825-1832.
- LODISH, H., Berk, A., Kaiser, C.A., Krieger, M., Scott, M.P. Bretscher, A., Ploegh, H. and Matsudaira, P., (2008) – Cell signaling I: signal transduction and short-term cellular responses. In: *Molecular cell biology*, 6th edition. W.H. Freeman and Company: 623-664.
- MEEUSEN, T., Mertens, I., De Loof, A. and Schoofs, L. (2003) - G protein-coupled receptors in invertebrates: a state of the art. *Int Rev Cytol*. **230**: 189-261.
- MIRABEAU, O. and JOLY, J.S. (2013) - Molecular evolution of peptidergic signaling systems in bilaterians. *Proc Natl Acad Sci U S A*, [Epub ahead of print].
- MUNOZ-TORRES, M.C., Reese, J.T., Childers, C.P., Bennett, A.K., Sundaram, J.P., Childs, K.L., Anzola, J.M., Milshina, N. and Elsik, C.G. (2011) - Hymenoptera Genome Database: integrated community resources for insect species of the order Hymenoptera. *Nucleic Acids Research* **39**(1): D658-D662 doi: 10.1093/nar/gkq1145.
- NOUZOVA, M., Brockhoff, A., Mayoral, J.G., Goodwin, M, Meyerhof, W. and Noriega, F.G. (2012) - Functional characterization of an allatotropin receptor expressed in the corpora allata of mosquitoes. *Peptides*, **34**(1): 201-208.
- OFFERMANN, S. and SIMON, M.I. (1995) - G alpha 15 and G alpha 16 couple a wide variety of receptors to phospholipase C. *J. Biol. Chem.*, **270**: 15175-15180.
- PAEMEN, L., Tips, A., Schoofs, L., Proost, P., Van Damme, J. and De Loof, A. (1991) - Lom-AG-myotropin: a novel myotropic peptide from the male accessory glands of *Locusta migratoria*. *Peptides*, **12**(1): 7-10.
- PETRI, B., Homberg, U., Loesel, R. and Stengl, M. (2002) - Evidence for a role of GABA and Mas-allatotropin in photic entrainment of the circadian clock of the cockroach *Leucophaea maderae*. *J Exp Biol*, **205**(Pt 10): 1459-1469.
- RACHINSKY, A. and FELDLAUFER, M.F. (2000) - Responsiveness of honey bee (*Apis mellifera* L.) corpora allata to allatoregulatory peptides from four insect species. *J Insect Physiol*, **46**(1): 41-46.
- RASMONT, P., Coppée, A., Michez, D. and De Meulemeester, T. (2008) - An overview of the *Bombus terrestris* (L. 1758) subspecies (Hymenoptera: Apidae). *Annales de la Societe Entomologique de France*, **44**(2): 243–250.
- RUDWALL, A.J., Sliwowska, J. and Nässel, D.R. (2000) - Allatotropin-like neuropeptide in the cockroach abdominal nervous system: myotropic actions, sexually dimorphic distribution and colocalization with serotonin. *J Comp Neurol*, **428**(1): 159-173.
- SAKURAI, T., Amemiya, A., Ishii, M., Matsuzaki, I., Chemelli, R.M., Tanaka, H., Williams, S.C., Richardson, J.A., Kozlowski, G.P., Wilson, S., Arch, J.R., Buckingham, R.E., *et al.*,

- (1998) - Orexins and orexin receptors: a family of hypothalamic neuropeptides and G protein-coupled receptors that regulate feeding behavior. *Cell*, **92(4)**: 573-585.
- SANGER, F., Nicklen S. and Coulson R. (1977) - DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci USA*, **74(12)**: 5463-5467.
- SHEU, Y.A., Kricka, L.J. and Pritchett, D.B. (1993) - Measurement of intracellular calcium using bioluminescent aequorin expressed in human cells. *Anal Biochem*. **209(2)**: 343-724.
- SHIMOMURA, O. (1995) - Luminescence of aequorin is triggered by the binding of two calcium ions. *Biochem Biophys Res Commun*. **211(2)**: 359-363.
- SHUMAN, S. (1992) - DNA Strand Transfer Reactions Catalyzed by Vaccinia Topoisomerase I. *J. Biol. Chem*, **267(12)**: 8620-8627.
- SHUMAN, S. (1994) - Novel approach to molecular cloning and polynucleotide synthesis using vaccinia DNA topoisomerase. *J Bio. Chem*, **269(51)**: 32678-32684.
- SLADEN, F.W.L. (1912) - *The Humble-bee, its Life History and how to Domesticate it*. Macmillan and co., limited: 283 pp.
- TAMURA, K., Dudley, J., Nei, M. and Kumar, S. (2007) - MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Mol Biol Evol*, **24(8)**: 1596-1599.
- THE *C. ELEGANS* SEQUENCING CONSORTIUM (1998) - Genome Sequence of the Nematode *C. elegans*: A Platform for Investigating Biology. *Science*, **282(5396)**: 2012-2018.
- TOBBACK, J., Mommaerts, V., Vandersmissen, H.P., Smaghe, G. and Huybrechts, R. (2010) - Age- and task-dependent foraging gene expression in the bumblebee *Bombus terrestris*. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology*, **76(1)**: 30-42.
- TORFS, H., Poels, J., Detheux, M., Dupriez, V., Van Loy, T., Vercammen, L., Vassart, G., Parmentier, M. and Vanden Broeck, J. (2002) - Recombinant aequorin as a reporter for receptor-mediated changes of intracellular Ca²⁺ -levels in *Drosophila* S2 cells. *Invert Neurosci*, **4(3)**: 119-124.
- UKENA, K., Oumi, T., Matsushima, O., Ikeda, T., Fujita, T., Minakata, H. and Nomoto, K. (1995) - A novel gut tetradecapeptide isolated from the earthworm, *Eisenia foetida*. *Peptides*, **16(6)**: 995-999.
- VANDEN BROECK, J. (1996) - G-protein-coupled receptors in insect cells. *Int Rev Cytol*, **164**: 189-268.
- VANDEN BROECK, J., Poels, J., Simonet, G., Dickens, L. and De Loof, A. (1998) - Identification of G protein-coupled receptors in insect cells. *Ann N Y Acad Sci*, **15(839)**: 123-128.
- VANDEN BROECK, J. (2001a) - Neuropeptides and their precursors in the fruitfly, *Drosophila melanogaster*. *Peptides*, **22(2)**: 241-254.

- VANDEN BROECK, J. (2001b) - Insect G protein-coupled receptors and signal transduction. *Arch Insect Biochem Physiol*, **48(1)**: 1-12.
- VANDESOMPELE, J., De Paepe, A. and Speleman, F. (2002a) - Elimination of Primer-Dimer Artifacts and Genomic Coamplification Using a Two-Step SYBR Green I Real-Time RT-PCR. *Analytical Biochemistry*, **303(1)**: 95-98.
- VANDESOMPELE, J., De Preter, K., Pattyn, F., Poppe, B., Van Roy, N., De Paepe, A. and Speleman, F. (2002b) - Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biol*, **3(7)**: research0034.1-research0034.11.
- VAN WILGENBURG, E., Driessen, G. and Beukeboom, L. (2006) - Single locus complementary sex determination in Hymenoptera: an "unintelligent" design? *Front Zool* **3(1)**.
- VEENSTRA, J.A., Lehman, H.K., Davis, N.T. (1994) - Allatotropin is a cardioacceleratory peptide in *Manduca sexta*. *J Exp Biol*, **188**: 347-354.
- VEENSTRA, J.A., Rodriguez, L. and Weaver, R. (2012) - Allatotropin, leucokinin and AKH in honey bees and other Hymenoptera. *Peptides*, **35(1)**: 122-130.
- VUERINCKX, K., Verlinden, H., Lindemans, M., Vanden Broeck, J. and Huybrechts, R. (2011) - Characterization of an allatotropin-like peptide receptor in the red flour beetle, *Tribolium castaneum*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, **41(10)**: 815-822.
- WEAVER, R.J. and AUDSLEY, N. (2009) - Neuropeptide regulators of juvenile hormone synthesis: structures, functions, distribution, and unanswered questions. *Ann N Y Acad Sci*, **1163**: 316-329.
- WHITEHORN, P.R., Tinsley, M.C., Brown, M.J., Darvill, B. and Goulson, D. (2009) - Impacts of inbreeding on bumblebee colony fitness under field conditions. *BMC Evolutionary Biology*, **9**: 152.
- YAMANAKA, N., Yamamoto, S., Zitnan, D., Watanabe, K., Kawada, T., Satake, H., Kaneko, Y., Hiruma, K., Tanaka, Y., Shinoda, T. and Kataoka, H. (2008) - Neuropeptide receptor transcriptome reveals unidentified neuroendocrine pathways. *PLoS One*, **3(8)**: e3048.

2. Websites:

Beebase: URL: <http://hymenopteragenome.org/beebase/>

Clustal W 2.0: URL: <http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/>

Invitrogen: www.invitrogen.com

National Center for Biotechnology Information (NCBI) URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>

qbasePLUS (Biogazelle) http://medgen.ugent.be/~jvdesomp/genorm/geNorm_manual.pdf

Addendum

S1 Sequenties van de doelwitgenen

ATR

De nucleotidesequentie van **XM_003402442.1** (ATR) zoals weergegeven op NCBI (URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/XM_003402442.1) met het open leesraam onderlijnd.

```

1      gtcgcgttca catccctttc ccgaactggg accttttcta acaagtcgac gtgacacaca
61     tcacgcaaca tcttcgacaa accctgtgat acattctctt tatgaaacag tggtttcaca
121    ttgttattaa aatataaaac ttogaacatg cgggtgttta ccatthttatc cagacagttg
181    caaaattccg tgaaaattag tcaactogaat acgtagaata tttactacca gaaatttgca
241    ttaaacaacg atgaatagta attttcgtat gaaaaataat agttcgataa acgaatgchg
301    tgtgtaaaag caagtgactg tgatatgatt ttgaataaaa ttgchgatat agcgatgatg
361    acgchgatgt ttcaatgcca agtaataagt aagaaatagg cgatggtgaa ttaaaaggaa
421    tcataaaaat tgaataacaa atatgchgag taagggtgca cgcgctgcat ttaagacttt
481    acagaaaata ctchggtctt gcaaacctcg ttgaacaccg tgaatgaat agttggttgg
541    actaatacga gaacgaaggg aaaattttga tgatcgtaga atattttttc tctttttaga
601    ctttcgacga agcttgtagc cgatattagc tgcgaattga cccctttagt ttggtccgag
661    ggctacagag aaaaagttcg gtcagacgtc ggaagtataa ccgaaaaaag gagggaatcc
721    gtgggacaat actttcgttc gaacgagata aaacgtatcc caccgaggta cttctcgatt
781    ttccaattct cgtggacact gctttctttt tttcacgaag gaataaggca aaaacttacc
841    atggtatcga ctcgacagca aatttatcgt ctatccgchg actggaaaat ccgatagaag
901    aggagaaaaa ggagaggatc gaagcagggg gaactcaaga atcatcgatt ttctatttgt
961    cgagccatta gtcggaagaa attcattcag acaattcgac gtgacgacca aaactttctt
1021   tattagtcct gattctcatt ttggtgcca aaaaatttct ttctacggt agaaacaggg
1081   gaagaagaac gatccactca gtaatctatc taccattcta ccaagaatta agtgttcttg
1141   tggtttgchg tattaattgc atggaagcaa gcgtatcaat gatcaatggt agcagttgat
1201   gctgataatg aaattgtgat aaagaacaag gggagtcgtc tttaatatca tggaaatcag
1261   agataagtaa atgtcactcg gttacaacag aggaaacgag gchgaatcga ccgaagcgat
1321   aacttttccg cchggtatth ctcccttttc ttchgctccta aacgctaaat atttattgaa
1381   gaaacgchg aacttgagaac gttcgaaatg gagactgaaa gcagcagtaa tctgtaaaaa
1441   aagggagttg ttctttgaa tttccctagg aggggtcgtg cttttcgata tcaataacgt
1501   ataagggatc cttaacagag aaaaagaaag atgcatctc ttgagttagt gatcgtggga
1561   tggctggcat cgggtgatatc caggttgggc gatgccatcg attatttggg chgactactca
1621   gchgatggatt acaccgacga atcggacatc gattacaatg ccacgaattg taccatagtt
1681   tattgtatct caaacgaaga gtacgtggat cgtatgataa attatatatt cccaagttt
1741   tgggactggg tgttgatcgc gtcgcatagc gttgttttcg tggtcggcct agtcgggaat
1801   gchgtagttt gtatcgcagt ttacaggaac cattctatga gaacggtgac aaattatttt
1861   attgtcaatt tagctgtggc cgatttctta gttttattgc tttgtcttcc gttcacgcta
1921   ctgtgggaca tcaccgaaac ctggtttcta ggtttgacct tgtgcaaagc cgtgcatat
1981   ctccagacag tgtccgtgac cgtgagcata ttgaccctaa cttcatatc gatagatcga
2041   tggtagccta tatgctttcc cctgagatth aagtcacca ctggacgagc aaaaagtgcg
2101   atcatcgga tttgggchg agctcttcta tttgatattc cagatctcgt ggtgttgcac
2161   accgtcccac ctacgcacat caaaataaag accgttttat tcacgcaatg cgacatatcc
2221   tggagtcaaa ggagccaggt cgcctttact atcgtcaaac taattttctt ttataccgga
2281   cctttgatct tcatgagcgt ggcctattgg cagatcgtaa agtcctttg gaggagcaac
2341   attccaggac ataatttacc gtcacgagca tcccagatga gccagattcc atcgaccggt
2401   ggcggaatc cggaagtgca gctgagatct cgacgaaagg cggcaaaaat gttagtcaac
2461   gtggtcatca cgtttgchg ttgctatthc cctgtgcaact tactctcctg tttaaaggtat
2521   accaccacat taccatccaa taaatggata aacgcatca gcttaatcgc gcatggccta
2581   tgctatthca atagcchggt taatctctg atctacaact tcatgagchg aaaaattcgg
2641   aaggcgthta ggcgtacatt tcgctgtgct cgagagaatg gttctcgaat acagcgtgga

```

2701 tatcttggcga gcacatctaa ttccctcoga ataaaatctc ggaccacgac gatacgaacg
 2761 acgtttaaaga ataacaaataa tottcaacga aataccgaaa ttatacctct tagcgctata
 2821 accactattc agcagaatga aaaacacgat tgatcggatg catatacacc aataatatga
 2881 cttatcagac gcgcagtaag attcacaagt aatttattta catgtaattt gaattttaat
 2941 actaatgtag aatataaaaat gttacataaa tataacaaaa acgctatggt ccactcggta
 3001 gtattttaaa taataaaaaa tacttgttaa aacgattata tttagttccc aaattcataa
 3061 aaattggtag acactataaag ctccattgaa aaatggaatc atctgatata acaaaacatt
 3121 gaatattatt gaattaatat gtaaaatgta cttacaatat taaaaattac cacatagaag
 3181 ctcgatgttt attctcgcag agcgtaaaact ataacatagg cacatatgaa tttgtaaatc
 3241 attcttcgta atagaatgat tgtatttaga actatttatat tgtatgtaat cttcagacga
 3301 tacgtaaaagt tcgctgacaa aattgtacgt aaaaacttta ataggatata aataatatat
 3361 attatcgcta tgtcataaat atatgatgta aatcttatat tctgtacatt tctacttagca
 3421 cttcatataa tcttgaccga atztatcttc agtccacgaa aattacattt ttaccgcata
 3481 tgagaatcat ttaactgaaa gatcaatccc actgtttgta tgatatcaac actgttaatg
 3541 aaaattttat acaagttaaa attaattgat aggatccgta caattaaaagt ttatgcaaaa
 3601 cttaataagt taaaaagagg aaaataaat tagtcattta tggaaaaact tcttatcaat
 3661 atattatctt tccattccac cttgccagta acaaagcata tcttcataag cgtatttaaa
 3721 aaaaaagaat aatcgcgggt tggacttctc gtagctatta cgaaaagccg attaacattt
 3781 attaatgaca agtttaatag ttagtattac ttttgactta actagacttt aagatatagt
 3841 aaattatgta acgattattt cttcacgatg cagattaaag atctttttg ttctagtgta
 3901 atataagtaa aattaaagca ttaagtagtg gttctttatc taataaatgt acttcattca
 3961 tccaccgttt acttgaatcg cagtacaaat ttgtttatac acgaaaaaca atatataccg
 4021 aggttactga cctgattata tcctatttac aatagccggt ggtattaaaa agatatatcg
 4081 atttattagt cattttacca gccgatgctg catgcgttaa tactcgatat acaataatat
 4141 gtttaacact agttgcctct actaataatt aattattagt agacttcgta tatgaaaagga
 4201 gtttaacaat atagaaggat gacgtttaat gacagcaata gatcgatgga attcgtagtg
 4261 aaacattgat acaaatgta tccacgaaat atacaacaat atgctgaaat tagatactca
 4321 ttcaaaatat attttagaca cgcacacatc caattcctaa agtatctcac aaataatttg
 4381 tgaagatcat ttttctatac agattgcatg gtaacgtcaa taaaattaca cagtatcttt
 4441 atgatatata tgtactcata ctcacgaaat gtcacaatta tgtctttcgc aaggaacggt
 4501 acacgctgta cgatgttttt tcaagctgct gcttcttcaa caactgtact ttcagtcggt
 4561 gtattttcta ctttctttga atcattttca gccttttcaa tgactgggtg tatagcttta
 4621 agcgaaataa tattttcttc cttcgtaatg acttttgatg aattattagc acttatatcg
 4681 tctaattgat cggtagtagt atctcccaaa ttcactgggtg tttcgatatac aagaatttta
 4741 atatcttttt cggtattctc aaccacaaga ttcgtattg cactcgaacc gtcgattttc
 4801 tctgtttctt gagtttctgt ttgttcaatt tctatatattat cgaactgttc tggcacagtc
 4861 ttctgatcac tttctattga gttaatttta acttcttggt cagtctggtg tgtattacca
 4921 agttgatttg ttgttgtgg ctgtgtggtg ttgcctcttc ctcgactggg ctgatgttga
 4981 ttctctgggtg gtggaagaat tggaatagct gcttttgggtc gtctcattgg agctgattgt
 5041 tgttgttggt gctgctgctg cgctgga

De proteïne sequentie van **XP_003402490.1** zoals weergegeven op NCBI (URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/340728353>).

1 mhplelvivg wlasvistlv daidylddys amdytdesdi dynatnctns ycisneeyvd
 61 rminyifpkf wdwvliashs vfvvvglvgn alvciaavyrn hsmrtvtnyf ivnlavadfl
 121 vlllclpftv lwditetwfl gtlclckavpy lqtvsvtvsj ltltfisidr wyaicfplrf
 181 ksttgraksa iigiwaaall fdipdlvvlh tvppthikik tvlftqcdis wsqrsqvaft
 241 ivkliflytg plifmsvayw qivkvlwrsn ipghnlpsra sqmsqipstg ggnpevqlrs
 301 rrkaakmlvt vvitfaicyf pvhllsvlry tttlpsnkwi naisliahgl cyfnsavnpl
 361 iynfmsgkfr kafrrtfrca rengsriqrg ylastsnfpr iksrtttirt tfknnnlqr
 421 nteiiplsai ttiqqnekhd

OXR-achtig

De nucleotidesequentie van **XM_003394885.1** zoals weergegeven op (NCBI) (URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucore/XM_003394885.1) met het open leesraam onderlijnd.

```

1      ccgcttccga aacttatgtc gtgtattatt ctcgccgggt ggaaggtagt tcgatcgtaa
61     gtttcgattg tgcgcttcat cgaaaataga tacggaacga taaaaccgac gtataaacga
121    gttaagagtt aaccgaggaa gaaattcggg acacaagggt taagtatagt ggagataaaa
181    agtttacggc ccgctaataa ttgtggttta atcttctcgt ccattaatta tagtggatcg
241    taaaaacaat tgatagaatt cgcggaatat cgctgattag aaaatgttaa aaaggatagt
301    ctacctgata cgtatgagca agtgattcgg caaagctgca tttacttcca tttgaaaaag
361    taaatattta aagcgaacat ggtggaatth ttgtaaagtat acgtctaatt taaacagata
421    cactcaatgt ctcgctcaat gcaaaccctt tgccgggata agtggacgtc tcgtaacgtg
481    taagaactat tcatacgtat acttcttttg atctagccgt agcatgaaca tatgccgact
541    tgaaacagat cctcaaatta caattacacg attgatcgtg acagttttct ctgtccgagg
601    taaatgggtg atattctcta tgcccattga agccagaaat cactttcgtc tgcgttccat
661    tgcacgcaca agatcgtagc agagagcttg atattggatt ataaaaacga ggagatcatg
721    tcgacgaatg tatacaacga ctcaacgata tcttcaccag agtttaatag ctcatacaat
781    gggacgatgg tgtcttcaaa cgaaagcttc ggaatggata tcaccgggga tatactttgg
841    tacttttacg acaagtttca cagcgaact aattacttgt tgatcatcct ctatgttctc
901    gtgatggcac tcgcaataac ggccaacgtc ctcgatgattg cagtcgtatt caaataccac
961    tacatgcgta gcgtagacta ttatttcgtg gtcaacttgt cagtggcgga ccttttggtg
1021   actactatth gcatgcctgt ggctgtcagt caagcagtct ccatagtatg gatccacggc
1081   gaaataatgt gcaaactttc ctcttacctt caggggtgtg cagtcgctgc ttcggttttt
1141   accatcagcg cgatgagcat cgacagatac ttggcgataa ggagtcctat ggcatttcga
1201   cgagtgttca atcgaaggag cacgggtctc gtaatcgtgg ctctttgggt ggtcgtttha
1261   atcatctttg ctctgttct cagagcgatg accctccaca gtccgagtat ggaacttagc
1321   aacatatctt tccacggatc ctggacaatg acgaagaatt tttcacagaa tacctctcgt
1381   gtctctcacc taccacctgt tttctacatt tgttcggaag attttaagcc tctgggcatt
1441   cagggcctc ttttcgggtg tgtgtgcttt gtgctggttt atgctgattcc aggttctg
1501   gtaatactat ctactcgat gatgggtcga acactgtgcg cccgaaaacc accttctgac
1561   tgtgatagcg tcgaaggaag cgccagctcg caacagagtt tcaggctggt acgtgagaga
1621   aggcgaattg cttggatatt gcttcttttg cgggtgttct ttgctctgtg ttggttacca
1681   tataacgtct taatgctact gatagatctg ggcgcagttg ggggaaagac aacgagagat
1741   gctctttcct attgcctggt tctgggacac gcgaatagcg cattgaatcc tgtcgtatac
1801   tgtgttatga cccgtaatth tcggcggagt atatcggaga ttctttggtg tggatcccat
1861   gggttctact gtcgaaaacc ccgtcacagg agtgctcaag gaaccgccgt gatcgatgac
1921   atgtgtgcag ggtgtagtgc tagtagcacg ataagacgcg gattgtttcg caagcggacg
1981   atgttacctg gatgcagatg tgggctaccg attaacggcc atcacgcagt tttagccctc
2041   cgacgaacgg ctacaactag cagcggatac gacagctacc ttagcagaca cagtcctcat
2101   cgacgttggt acatgttacg gagtcttcgg ggaaggccgc aaatggggat ggaacaagtc
2161   caggtaaaca aaactcaaga gacctgtac aagaagaacg aagcaagtca acctcatatt
2221   aatatattca tcaccacgga cgaacaacat tgaacatagg aataaatgat ttaatttaag
2281   gattgattaa tgtcgattaa tttcttataa acacgtagaa tttcgggtgtc gtcacgtaaa
2341   gatatttgat gtgcatacat gaagatggac agaagagatg cagtgtcaat tacgatatct
2401   ctccatagaa tatttctgta tcgatttagt gattttcggg ctcgagttca ttgtagcttt
2461   cattaacgac caatatttat atcgttgata cggagtgaga taaagcggtc aatgatcttt
2521   aatatctttt cacgggggtg taagattaaa ggcttagggc acaaaaatga cttaagggtt
2581   gatttcttaa aacgaaaatt tttctaccgc gatctgcatt ccatctaccg agcaccgcca
2641   caaataataa acgagaaaag agtacataca gtagttaacg aggaaccaag caaaaggcta
2701   agttcgttaa gtgagactga gtggaggaga caaatagggc tgggctctca agggaaaatg
2761   ttgaaacagt gacaagtaat cgtatthtcc acgtaattta ttgcttgctg ttcacactcg
2821   ttcaactttg actgaaacaa tcttctgtag gaaggatggt aaaaaggtta tgcataacag

```

```
2881 ggccgcaact ataacgagag tgaatgaaca taaacggttt gcaaatattht gtgtatgttg
2941 agcaaacacg ttcgttatat gggctgacgt tgacgttatt atccggctca attaaattcg
3001 agttgaattg acctctttaa aaataggcac gaaaatatga cactgtttaa agatgaaagc
3061 caatggctcg cgagatatct ataatttttt gcattttttc caataagaaa tctcgaaatt
3121 gaacaaatta tatttcgggtt aggttagatt gtcgttctat cggggcatca aattctgggt
3181 aacctcctgt aatttggtcc gatttaatat gtgtattcca caaatgtaat atcgacgcat
3241 ttcgttcaaa catttcgagg gattaaataa gggatgacat aaatagtcga gacaaagaat
3301 ttctccccta ctacagaaa ttctcgaagt gttggacgtg aggcttgatc gaataaagat
3361 aggaatgttg atgtgataaa gagtgcgtgt atgtacgtat atgttgatgc ttacggtatg
3421 aatatccgcc cagttttgt aataaatcat gtatagtata cttgaaaaca atactttgaa
3481 atttctatac gaatatttat tttctcctaa ggcctagcgc gacaaacgac ga
```

De proteïne sequentie van **XP_003394933.1** zoals weergegeven op NCBI
(URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/340712780>)

```
1  mstnvyndst isspefnssy ngtmvssnes fgmditgdil wyfydkfhse tnylliilyv
61  pvmalaitan vlviavvfky hymrsvtnyf vvnlsvadll vtticmpvav sqavsivwih
121 geimcklssy lqgvavaasv ftisamsidr ylairspmaf rrvfnrrstv lvivalwlva
181 liifapvlra mtlhspmel snisfhgswt mtknfsqnts rvshlppvfy icsedfkplg
241 iqaplfgavc fvlvyaipgf vvilsysmmg rtlcarkppf dcdsvegsas sqqsfrlvre
301 rriawilll lavffalcwl pynvlmlid lgavggktrr dalsyclflg hansalnpvv
361 ycvmtrnfr siseilccgs hgftrrkprh rsaqgtavid dmcagcsass tirrglfrkr
421 tmlpgcrcgl pinghhavla lrrtattssg ydsylsrhsp hrrcymrlsl rgrpqmgmeq
481 vqvnktqetc ykkneasqph inifittdeq h
```

S2 Resultaten sequentiebepaling van het ATR insert op nucleotideniveau

Resultaten van de sequentie alignering uitgevoerd met Clustal W 2.1. De positie van de nucleotide sequentie wordt rechts aangegeven. De sterretjes geven aan waar de sequentie hetzelfde is. Een opening geeft aan waar de sequentie niet overeenkomt en een streepje wordt weergegeven indien de sequentie van die positie niet bepaald is. Het 'insert' is de nucleotide sequentie van het insert in de pcDNA™3.1/V5-His TOPO® TA vector en 'ATR' is de nucleotide sequentie van het ATR gen zoals voorspeld op NCBI (XM_003402442) en weergegeven in S1. De fouten weergegeven met een grijze achtergrond zijn waarschijnlijk fouten die gemaakt zijn bij het bepalen van de sequentie aangezien bij het gebruik van een andere primer deze fouten niet waargenomen worden. Fouten met een zwarte achtergrond zijn werkelijke verschillen in de sequentie aangezien bij het gebruik van een andere primer dezelfde fout wordt waargenomen.

Forward primer:

```

insert      CACCATGCATCCTCTTGAGTTAGTGATCGTGGGATGGCTGGCATCGGTGATATCCACGTT 60
ATR        ---ATGCATCCTCTTGAGTTAGTGATCGTGGGATGGCTGGCATCGGTGATATCCACGTT 56
          *****

insert      GGTCGATGCCATCGATTATTTGGACGACTACTCAGCGATGGATTACACCGACGAATCGGA 120
ATR        GGTCGATGCCATCGATTATTTGGACGACTACTCAGCGATGGATTACACCGACGAATCGGA 116
          *****

insert      CATCGATTACAATGCCACGAATTGTACCAATAGTTATTGTATCTCAAACGAAGAGTACGT 180
ATR        CATCGATTACAATGCCACGAATTGTACCAATAGTTATTGTATCTCAAACGAAGAGTACGT 176
          *****

insert      GGATCGTATGATAAATTATATATTCCCAAGTTTGGGACTGGGTGTTGATCGCGTCGCA 240
ATR        GGATCGTATGATAAATTATATATTCCCAAGTTTGGGACTGGGTGTTGATCGCGTCGCA 236
          *****

insert      TAGCGTTGTTTTTCGTGGTCGGCTAGTCGGGAATGCGCTAGTTTGTATCGCAGTTTACAG 300
ATR        TAGCGTTGTTTTTCGTGGTCGGCTAGTCGGGAATGCGCTAGTTTGTATCGCAGTTTACAG 296
          *****

insert      GAACCATTCTATGAGAACGGTGACAAATTATTTATTGTCAATTTAGCTGTGGCCGATTT 360
ATR        GAACCATTCTATGAGAACGGTGACAAATTATTTATTGTCAATTTAGCTGTGGCCGATTT 356
          *****

insert      CCTAGTTTTATTGCTTTGTCTTCCGTTCCCGTACTGTGGGACATCACCGBAACCTGGTT 420
ATR        CCTAGTTTTATTGCTTTGTCTTCCGTTCCCGTACTGTGGGACATCACCGBAACCTGGTT 416
          *****

insert      TCTAGGTTTGACCTTGTGCAAAGCCGTGCCATATCTCCAGACAGTGTCCGTGACCGTGAG 480
ATR        TCTAGGTTTGACCTTGTGCAAAGCCGTGCCATATCTCCAGACAGTGTCCGTGACCGTGAG 476
          *****

insert      CATATTGACCCTAACTTTTCATATCGATAGATCGATGGTACGCTATATGCTTTCCCTGAG 540
ATR        CATATTGACCCTAACTTTTCATATCGATAGATCGATGGTACGCTATATGCTTTCCCTGAG 536
          *****

insert      ATTTAAGTCCACCACTGGACGAGCAAAAAGTGCATCATCGGAATTTGGGCGGCAGCTCT 600
ATR        ATTTAAGTCCACCACTGGACGAGCAAAAAGTGCATCATCGGAATTTGGGCGGCAGCTCT 596
          *****

insert      TCTATTTGATATTCCAGATCTCGTGGTGTTCATACCGTCCCACCTACGCACAT----- 654
ATR        TCTATTTGATATTCCAGATCTCGTGGTGTTCATACCGTCCCACCTACGCACATCAAAT 656
          *****

```

insert -----
 ATR AAAGACCGTTTTATTTCACGCAATGCGACATATCCTGGAGTCAAAGGAGCCAGGTCGCCTT 716

insert -----
 ATR TACTATCGTCAAACCTAATTTTCCTTTATACCGGACCTTTGATCTTCATGAGCGTGGCCTA 776

insert -----
 ATR TTGGCAGATCGTAAAAGTCCTTTGGAGGAGCAACATTCCAGGACATAATTTACCGTCACG 836

insert -----
 ATR AGCATCCCAGATGAGCCAGATTCCATCGACCGGTGGCGGAAATCCGGAAGTGCAGCTGAG 896

insert -----
 ATR ATCTCGACGAAAGGCGGCAAAAATGTTAGTCACAGTGGTCATCACGTTTGGGATTTGCTA 956

insert -----
 ATR TTTCCCTGTGCACTTACTCTCCGTTTTAAGGTATACCACCACATTACCATCCAATAAATG
 1016

insert -----
 ATR GATAAACGCCATCAGCTTAATCGCGCATGGCCTATGCTATTTCAATAGCGCGGTTAATCC 1076

insert -----
 ATR TCTGATCTACAACCTTCATGAGCGGAAAATTTCGGAAGGCGTTTAGGCGTACATTTGCTG 1136

insert -----
 ATR TGCTCGAGAGAATGGTTCTCGAATACAGCGTGGATATCTTGCAGCACATCTAATTTCCC 1196

insert -----
 ATR TCGAATAAAATCTCGGACCACGACGATACGAACGACGTTTTAAGAATAACAATAATCTTCA 1256

insert -----
 ATR ACGAAATACCGAAATTATACCTCTTAGCGCTATAACCACTATTCAGCAGAATGAAAAACA 1316

insert -----
 ATR CGATTGA 1323

Interne forward primer:

insert -----
 ATR ATGCATCCTCTTGAGTTAGTGATCGTGGGATGGCTGGCATCGGTGATATCCACGTTGGTC 60

insert -----
 ATR GATGCCATCGATTATTTGGACGACTACTCAGCGATGGATTACACCGACGAATCGGACATC 120

insert -----
 ATR GATTACAATGCCACGAATTGTACCAATAGTTATTGTATCTCAAACGAAGAGTACGTGGAT 180

insert -----
 ATR CGTATGATAAATTATATATTTCCCAAGTTTTGGGACTGGGTGTTGATCGCGTCGCATAGC 240

```

insert -----
ATR GTTGTTTTCGTGGTCGGCCTAGTCGGGAATGCGCTAGTTTGTATCGCAGTTTACAGGAAC 300

insert -----
ATR CATTCTATGAGAACGGTGACAAATTATTTTATGTCAATTTAGCTGTGGCCGATTTCTTA 360

insert -----
ATR GTTTTATTGCTTTGTCTTCCGTTACCGTACTGTGGGACATCACCGAAACCTGGTTTCTA 420

insert -----
ATR GGTTTGACCTTGTGCAAAGCCGTGCCATATCTCCAGACAGTGCCGTGACCGTGAGCATA 480

insert -----
ATR TTGACCCTAACTTTCATATCGATAGATCGATGGTACGCTATATGCTTTCCCTGAGATTT 540

insert -----
ATR --GTC-----GTC TCGGA TTTGGGCGGCAGCTCTTCTA 31
AAGTCCACCCTGGACGAGCAAAAAGTGCATCG TCGGA TTTGGGCGGCAGCTCTTCTA 600
*** ** *****

insert TTTGATATTC AGATCTCGTGGTGTTCATACCGTCCCACCTACGCACATCAAAATAAAG 90
ATR TTTGATATTC AGATCTCGTGGTGTTCATACCGTCCCACCTACGCACATCAAAATAAAG 660
*****

insert ACCGTTTTATTCACGCAATGCGACATATCCTGGAGTCAAAGGAGCCAGGTGCGCTTTACT 150
ATR ACCGTTTTATTCACGCAATGCGACATATCCTGGAGTCAAAGGAGCCAGGTGCGCTTTACT 720
*****

insert ATCGTCAAACCTAATTTTCTTTATACCGGACCTTTGATCTTCATGAGCGTGGCCTATTGG 210
ATR ATCGTCAAACCTAATTTTCTTTATACCGGACCTTTGATCTTCATGAGCGTGGCCTATTGG 780
*****

insert CAGATCGTAAAAGTCCTTTGGAGGAGCAACATTCAGGACATAATTTACCGTCACGAGCA 270
ATR CAGATCGTAAAAGTCCTTTGGAGGAGCAACATTCAGGACATAATTTACCGTCACGAGCA 840
*****

insert TCCCAGATGAGCCAGATTCCATCGACCGGTGGCGGAAATCCGGAAGTGCAGCTGAGATCT 330
ATR TCCCAGATGAGCCAGATTCCATCGACCGGTGGCGGAAATCCGGAAGTGCAGCTGAGATCT 900
*****

insert CGACGAAAGGCGGCAAAAATGTTAGTCACAGTGGTCATCACGTTTGCATTTGCTATTTT 390
ATR CGACGAAAGGCGGCAAAAATGTTAGTCACAGTGGTCATCACGTTTGCATTTGCTATTTT 960
*****

insert CCTGTGCACCTACTCTCCGTTTAAAGGTATACCACCACATTACCATCCAATAAATGGATA 450
ATR CCTGTGCACCTACTCTCCGTTTAAAGGTATACCACCACATTACCATCCAATAAATGGATA 1020
*****

insert AACGCCATCAGCTTAATCGCGCATGGCCTATGCTATTTCAATAGCGCGGTTAATCCTCTG 510
ATR AACGCCATCAGCTTAATCGCGCATGGCCTATGCTATTTCAATAGCGCGGTTAATCCTCTG 1080
*****

insert ATCTAACTTCATGAGCGGAAAATTTTCGGAAGG CGTTTAGGCGTACATTTTCGCTGTGC 570
ATR ATCTAACTTCATGAGCGGAAAATTTTCGGAAGG CGTTTAGGCGTACATTTTCGCTGTGC 1139
*****

insert TCGAGAGAATGGTTCTCGAATACAGCGTGGATATCTTGCAGACATCTAATTTCCCTCG 630
ATR TCGAGAGAATGGTTCTCGAATACAGCGTGGATATCTTGCAGACATCTAATTTCCCTCG 1199
*****

insert AATAAAATCTCGGACCACGACGATACGAACGACGTTTAAGA TAC ATAATCTTCAACG 687
ATR AATAAAATCTCGGACCACGACGATACGAACGACGTTTAAGA TAAATAATCTTCAACG 1259
*****

```

insert AAATACCGAA TTATACCTCT AGCGCTATA CCACTATTCAGCAGA TGAAAAACACGA 743
 ATR AAATACCGAA TTATACCTCT AGCGCTATA CCACTATTCAGCAGA TGAAAAACACGA 1319

insert TTGA 751
 ATR TTGA 1323

Reverse primer:

insert -----
 ATR ATGCATCCTCTTGAGTTAGTGATCGTGGGATGGCTGGCATCGGTGATATCCACGTTGGTC 60

insert -----
 ATR GATGCCATCGATTATTTGGACGACTACTCAGCGATGGATTACACCGACGAATCGGACATC 120

insert -----
 ATR GATTACAATGCCACGAATTGTACCAATAGTTATTGTATCTCAAACGAAGAGTACGTGGAT 180

insert -----
 ATR CGTATGATAAATTATATATTTCCCAAGTTTTGGGACTGGGTGTTGATCGCGTCGCATAGC 240

insert -----
 ATR GTTGTTCGTTGGTCGGCCTAGTCGGGAATGCGCTAGTTTGTATCGCAGTTTACAGGAAC 300

insert -----
 ATR CATTCTATGAGAACGGTGACAAATTATTTTATTGTCAATTTAGCTGTGGCCGATTTCCCTA 360

insert -----
 ATR GTTTTATTGCTTTGTCTTCCGTTACCGTACTGTGGGACATCACCGAAACCTGGTTTCTA 420

insert -----
 ATR GGTTTGACCTTGTGCAAAGCCGTGCCATATCTCCAGACAGTGTCCGTGACCGTGAGCATA 480

insert -----
 ATR TTGACCCTAACTTTCATATCGATAGATCGATGGTACGCTATATGCTTTCCCTGAGATTT 540

insert -----
 ATR AAGTCCACCCTGGACGAGCAAAAAGTGCATCATCGGAATTTGGGCGGCAGCTCTTCTA 600

insert -----
 ATR TTTGATATTCCAGATCTCGTGGTGTGCATACCGTCCCACCTACGCACATCAAAATAAAG 660

insert -----AGAGCA GTCGCC TTAAC 21
 ATR ACCGTTTTATTACGCAATGCGACATATCCTGGAGTCAAAGAGCAGGTCGCC TTAAC 719
 ** * * * * * * * * *

insert CATCGTCAGACTAATT CCTTTATAC GAC CTTGATCTCCATGAGCGTGGC TATTG 76
 ATR CATCGTCAGACTAATT CCTTTATAC CCGGAC CTTGATCTTCATGAGCGTGGC TATTG 779

insert GCAG ATCGTAAAAGTCCTTTGGAGGAGCA CATTCAAGGACATAATT ACCGTCACGAG 134
 ATR GCAG ATCGTAAAAGTCCTTTGGAGGAGCA CATTCAAGGACATAATT ACCGTCACGAG 838
 **** *****


```

insert      CATCCCAGCATGAGCCAGATTCCATCGACCGGTGGCGGAAATCCGGGAAAGTGCAGCT 194
ATR        CATCCCAGATGAGCCAGATTCCATCGACCGGTGGCGGAAATCCGG--AAGTGCAGCT 893
*****

insert      GAGATCTCGACGAAAGGCCGGCAAAAATGTTAGTCACAGTGGTCATCACGTTTGCATT 254
ATR        GAGATCTCGACGAAAGGCCGGCAAAAATGTTAGTCACAGTGGTCATCACGTTTGCATT 951
*****

insert      TGCTATTTCCCTGTGCACTTACTCTCCGTTTTAAGGTATAACCACCACATTACCATCCA 314
ATR        TGCTATTTCCCTGTGCACTTACTCTCCGTTTTAAGGTATAACCACCACATTACCATCCA 1009
*****

insert      ATAAATGGATAAACGCCATCAGCTTAATCGCGCATGGCCTATGCTATTTCAATAGCGCGG 374
ATR        ATAAATGGATAAACGCCATCAGCTTAATCGCGCATGGCCTATGCTATTTCAATAGCGCGG 1069
*****

insert      TTAATCCTCTGATCTATAACTTCATGAGCGGAAAATTTTCGGAAGGCGTTTAGGCGTACAT 434
ATR        TTAATCCTCTGATCTATAACTTCATGAGCGGAAAATTTTCGGAAGGCGTTTAGGCGTACAT 1129
*****

insert      TTCGCTGTGCTCGAGAGAATGGTCTCGAATACAGCGTGGATATCTTGCGAGCACATCTA 494
ATR        TTCGCTGTGCTCGAGAGAATGGTCTCGAATACAGCGTGGATATCTTGCGAGCACATCTA 1189
*****

insert      ATTTCCCTCGAATAAAATCTCGGACCACGACGATACGAACGACGTTTAAAGAATAACAATA 554
ATR        ATTTCCCTCGAATAAAATCTCGGACCACGACGATACGAACGACGTTTAAAGAATAACAATA 1249
*****

insert      ATCTTCAACGAAATACCGAAATTATACCTCTTAGCGCTATAACCACTATTCAGCAGAATG 614
ATR        ATCTTCAACGAAATACCGAAATTATACCTCTTAGCGCTATAACCACTATTCAGCAGAATG 1309
*****

insert      AAAAAACACGATTGA 628
ATR        AAAAAACACGATTGA 1323
*****

```

S3 Resultaten sequentiebepaling van het OXR-achtig insert op nucleotideniveau

Resultaten van de sequentie aligering van kolonie 7 uitgevoerd met Clustal W 2.1. De positie van de nucleotide sequentie wordt rechts aangegeven. De sterretjes geven aan waar de sequentie hetzelfde is. Een opening geeft aan waar de sequentie niet overeenkomt en een streepje wordt weergegeven indien de sequentie van die positie niet bepaald is. Het 'insert' is de nucleotide sequentie van het insert in de pcDNATM3.1/V5-His TOPO[®] TA vector en OXR-achtig is de nucleotide sequentie van het OXR-achtig zoals voorspeld op NCBI (XM_003394885) en weergegeven in S1. De fouten weergegeven met een grijze achtergrond zijn waarschijnlijk fouten die gemaakt zijn bij het bepalen van de sequentie aangezien bij het gebruik van een andere primer deze fouten niet waargenomen worden. De fouten weergegeven met een zwarte achtergrond worden nagekeken in het chromatogram met behulp van BioEdit Sequence Alignment Editor (Ibis Biosciences). De positie van de nucleotide sequentie wordt rechts aangegeven.

Forward primer:

```

insert          CATCAAGACAACGAATGTATACAACGACTCAACGATATCTTCACCAGAGTTTAATAGCTC 60
OXR-achtig     ----ATGTCGACGAATGTATACAACGACTCAACGATATCTTCACCAGAGTTTAATAGCTC 56
                * * * *****

insert          ATACAATGGGACGATGGTGTCTTCAAACGAAAGCTTCGGAATGGATATCACCGGGGATAT 120
OXR-achtig     ATACAATGGGACGATGGTGTCTTCAAACGAAAGCTTCGGAATGGATATCACCGGGGATAT 116
                *****

insert          ACTTTGGTACTTTTACGACAAGTTTCACAGCGAAACTAATTACTTGTGATCATCCTCTA 180
OXR-achtig     ACTTTGGTACTTTTACGACAAGTTTCACAGCGAAACTAATTACTTGTGATCATCCTCTA 176
                *****

insert          TGTTCCCTGTGATGGCACTCGCAATAACGGCCAACGTCCCTCGTGATTGCAGTCGTATTCAA 240
OXR-achtig     TGTTCCCTGTGATGGCACTCGCAATAACGGCCAACGTCCCTCGTGATTGCAGTCGTATTCAA 236
                *****

insert          ATACCACTACATGCGTAGCGTGACTAATTATTTTCGTGGTCAACTTGTGAGTGGCGGACCT 300
OXR-achtig     ATACCACTACATGCGTAGCGTGACTAATTATTTTCGTGGTCAACTTGTGAGTGGCGGACCT 296
                *****

insert          TTTGGTGACTIONACTATTTGCATGCCTGTGGCTGTCAGTCAAGCAGTCTCCATAGTATGGAT 360
OXR-achtig     TTTGGTGACTIONACTATTTGCATGCCTGTGGCTGTCAGTCAAGCAGTCTCCATAGTATGGAT 356
                *****

Insert         CCACGGCGAAATAATGTGCAAACCTTTCCTCTTACCTTCAGGGTGTGTCAGTCGCTGCTTC 420
OXR-achtig     CCACGGCGAAATAATGTGCAAACCTTTCCTCTTACCTTCAGGGTGTGTCAGTCGCTGCTTC 416
                *****

insert          GGTTTTTTACCATCAGCGCGATGAGCATCGACAGATACTTGGCGATAAGGAGTCCATATGGC 480
OXR-achtig     GGTTTTTTACCATCAGCGCGATGAGCATCGACAGATACTTGGCGATAAGGAGTCCATATGGC 476
                *****

insert          ATTTTCGACGAGTGTTCAATCGAAGGAGCAGGTTCTCGTAATCGTGGCTCTTTGGTTGGT 540
OXR-achtig     ATTTTCGACGAGTGTTCAATCGAAGGAGCAGGTTCTCGTAATCGTGGCTCTTTGGTTGGT 536
                *****

insert          CGCTTTAATCATCTTTGCTCCTGTTCTCAGAGCGATGACCCCTCCACAGTCCGAGTATGGA 600
OXR-achtig     CGCTTTAATCATCTTTGCTCCTGTTCTCAGAGCGATGACCCCTCCACAGTCCGAGTATGGA 596
                *****

```

insert	ACTTAGCAACATATCTTTCCACGGATCCTGGACAATGACGAAGAATTTTTACAGAATAC	660
OXR-achtig	ACTTAGCAACATATCTTTCCACGGATCCTGGACAATGACGAAGAATTTTTACAGAATAC *****	656
insert	CTCTCGTGTCTCTCATCTAC-----	680
OXR-achtig	CTCTCGTGTCTCTCATCTACCACCTGTTTTCTACATTTGTTCGGAAGATTTTAAGCCTCT *****	716
insert	-----	
OXR-achtig	GGGCATTCAGGCGCCTCTTTTCGGTGTGTGTGCTTTGTGCTGTTTATGCGATTCCAGG	776
insert	-----	
OXR-achtig	TTTCGTCGTAATACTATCTTACTCGATGATGGGTGCAACACTGTGCGCCGAAAACCACC	836
insert	-----	
OXR-achtig	TTTCGACTGTGATAGCGTCAAGGAAGCGCCAGCTCGCAACAGAGTTTCAGGCTGGTACG	896
insert	-----	
OXR-achtig	TGAGAGAAGGCGAATTGCTTGATATTGCTTCTTTTGGCGGTGTTCTTTGCTCTGTGTTG	956
insert	-----	
OXR-achtig	GTTACCATATAACGTCTTAATGCTACTGATAGATCTGGGCGCAGTTGGGGAAAAGACAAC	1016
insert	-----	
OXR-achtig	GAGAGATGCTCTTTCCATTGCTTCTTTCTGGGACACGCGAATAGCGCATTGAATCCTGT	1076
insert	-----	
OXR-achtig	CGTATACTGTGTTATGACCCGTAATTTTCGGCGGAGTATATCGGAGATTCCTTTGTTGTGG	1136
insert	-----	
OXR-achtig	ATCCCATGGGTTCACTCGTCGAAAACCCCGTCACAGGAGTGCTCAAGGAACCGCGTGAT	1196
insert	-----	
OXR-achtig	CGATGACATGTGTGCAGGGTGTAGTGCTAGTAGCACGATAAGACGCGGATTGTTTCGCAA	1256
insert	-----	
OXR-achtig	GCGGACGATGTTACCTGGATGCAGATGTGGCTACCGATTAACGGCCATCACGCAGTTTT	1316
insert	-----	
OXR-achtig	AGCCCTCCGACGAACGGCTACAACACTAGCAGCGGATACGACAGCTACCTTAGCAGACACAG	1376
insert	-----	
OXR-achtig	TCCTCATCGACGTTGTTACATGTTACGGAGTCTTCGGGGAAGGCCGCAAATGGGGATGGA	1436
insert	-----	
OXR-achtig	ACAAGTCCAGGTAAACAAAACCTCAAGAGACCTGCTACAAGAAGAACAAGCAAGTCAACC	1496
insert	-----	
OXR-achtig	TCATATTAATATATTCATCACCACGGACGAACAACAT	1533

Interne forward primer:

insert	-----	
OXR-achtig	ATGTCGACGAATGTATACAACGACTCAACGATATCTTACCAGAGTTTAATAGCTCATAC	60

```

insert -----
OXR-achtig AATGGGACGATGGTGTCTTCAAACGAAAGCTTCGGAATGGATATCACCGGGGATATACTT 120

insert -----
OXR-achtig TGGTACTTTTACGACAAGTTTCACAGCGAAACTAATTACTTGTGATCATCCTCTATGTT 180

insert -----
OXR-achtig CCTGTGATGGCACTCGCAATAACGGCCAACGTCTCTCGTGATTGCAGTCGTATCAAATAC 240

insert -----
OXR-achtig CACTACATGCGTAGCGTGACTAATTATTTCTGGTCAACTTGTTCAGTGGCGGACCTTTTG 300

insert -----
OXR-achtig GTGACTACTATTTGCATGCCTGTGGCTGTCTAGTCAAGCAGTCTCCATAGTATGGATCCAC 360

insert -----
OXR-achtig GCGGAAATAATGTGCAAACCTTTCCTCTTACCTTCAGGGTGTTCAGTCGCTGCTTCGGTT 420

insert -----AAGGGATC----- 8
OXR-achtig TTTACCATCAGCGCGATGAGCATCGACAGATACTTGGCGATAAGGAGTCCATGGCATT 480
                **** **

insert -----GCGAGTGTTCATCGAAGGAGCACGGGC GGGGAAACGTGGCTCTTTGGTTGGTCGCT 64
OXR-achtig CGACGAGTGTTCATCGAAGGAGCACGGTTC GGTAAACGTGGCTCTTTGGTTGGTCGCT 540
                ***** **

insert -----TTCCTTGTCTCCTGTCTCAGAGCGATGACCCTCCACAGTCCGAGTATGGAACCT 122
OXR-achtig TTAATC-----TTCCTTGTCTCCTGTCTCAGAGCGATGACCCTCCACAGTCCGAGTATGGAACCT 600
                *****

insert -----AGCAACATATCTTTCCACGGATCCTGGACAATGACGAAGAATTTTTACAGAATACCTCT 182
OXR-achtig AGCAACATATCTTTCCACGGATCCTGGACAATGACGAAGAATTTTTACAGAATACCTCT 660
                *****

insert -----CGTGTCTCTCATCTACCACCTGTTTTCTACATTTGTTTCGGAAGATTTTAAGCCTCTGGGC 242
OXR-achtig CGTGTCTCTCATCTACCACCTGTTTTCTACATTTGTTTCGGAAGATTTTAAGCCTCTGGGC 720
                *****

insert -----ATTTCAGGCGCCTCTTTTCGGTGCTGTGTGCTTTGTGCTGGTTTATGCGATTCAGGTTTC 302
OXR-achtig ATTTCAGGCGCCTCTTTTCGGTGCTGTGTGCTTTGTGCTGGTTTATGCGATTCAGGTTTC 780
                *****

insert -----GTCGTAATACTATCTTACTCGATGATGGGTGCAACACTGTGCGCCCGAAAACCACTTTC 362
OXR-achtig GTCGTAATACTATCTTACTCGATGATGGGTGCAACACTGTGCGCCCGAAAACCACTTTC 840
                *****

insert -----GACTGTGATAGCGTCAAGGAAGCGCCAGCTCGCAACAGAGTTTCAGGCTGGTACGTGAG 422
OXR-achtig GACTGTGATAGCGTCAAGGAAGCGCCAGCTCGCAACAGAGTTTCAGGCTGGTACGTGAG 900
                *****

insert -----AGAAGGCGAATTGCTTGGATATTGCTTCTTTTGGCGGTGTTCTTTGCTCTGTGTGGTTA 482
OXR-achtig AGAAGGCGAATTGCTTGGATATTGCTTCTTTTGGCGGTGTTCTTTGCTCTGTGTGGTTA 960
                *****

insert -----CCATATAACGTCTTAATGCTACTGATAGATCTGGGCGCAGTTGGGGGAAAGACAACGAGA 542
OXR-achtig CCATATAACGTCTTAATGCTACTGATAGATCTGGGCGCAGTTGGGGGAAAGACAACGAGA 1020
                *****

insert -----GATGCTCTTTCTATTGCCTGTTTCTGGGACACGCGAATAGCGCATTGAATCCTGTCGTA 602
OXR-achtig GATGCTCTTTCTATTGCCTGTTTCTGGGACACGCGAATAGCGCATTGAATCCTGTCGTA 1080
                *****

```

```

insert      TACTGTGTTATGACCCGTAATTTTCGGCGGAGTATATCGGAGATTCTTTGTTGTGGCAT 662
OXR-achtig TACTGTGTTATGACCCGTAATTTTCGGCGGAGTATATCGGAGATTCTTTGTTGTGGAT 1138
*****

insert      CCCAATGGGTTCACTCGTCGAAAACCCCGTCACAGGAGTGCTCAAGGAACC GCCGTGAT 722
OXR-achtig CCCAATGGGTTCACTCGTCGAAAACCCCGTCACAGGAGTGCTCAAGGAACC GCCGTGAT 1196
****

insert      CGATGACATGTGTGCAGGGTGTAGTGCTATAACACGATAAGACGCGGATTGTTTC CAA 781
OXR-achtig CGATGACATGTGTGCAGGGTGTAGTGCTATAACACGATAAGACGCGGATTGTTTC CAA 1256
*****

insert      GCGGACGATG----- 791
OXR-achtig GCGGACGATGTTACCTGGATGCAGATGTGGCTACCGATTAACGGCCATCACGCAGTTTT 1316
*****

insert      -----
OXR-achtig AGCCCTCCGACGAACGGCTACAACACTAGCAGCGGATACGACAGCTACCTTAGCAGACACAG 1376

insert      -----
OXR-achtig TCCTCATCGACGTTGTTACATGTTACGGAGTCTTCGGGGAAGGCCGCAAATGGGGATGGA 1436

insert      -----
OXR-achtig ACAAGTCCAGGTAAACAAAACCTCAAGAGACCTGCTACAAGAAGAACGAAGCAAGTCAACC 1496

insert      -----
OXR-achtig TCATATTAATATATTCATCACCACGGACGAACAACAT 1533

Reverse primer:

insert      -----
OXR-achtig ATGTCGACGAATGTATAACAACGACTCAACGATATCTTACCAGAGTTTAATAGCTCATA 60

insert      -----
OXR-achtig AATGGGACGATGGTGTCTTCAAACGAAAGCTTCGGAATGGATATCACCGGGGATATACTT 120

insert      -----
OXR-achtig TGGTACTTTTACGACAAGTTTCACAGCGAACTAATTACTTGTGATCATCCTCTATGTT 180

insert      -----
OXR-achtig CCTGTGATGGCACTCGCAATAACGGCCAACGTCCTCGTGATTGCAGTCGTATTCAAATAC 240

insert      -----
OXR-achtig CACTACATGCGTAGCGTGACTAATTATTTTCGTGGTCAACTTGTGAGTGGCGGACCTTTTG 300

insert      -----
OXR-achtig GTGACTACTATTTGCATGCCTGTGGCTGTGAGTCAAGCAGTCTCCATAGTATGGATCCAC 360

insert      -----
OXR-achtig GGCGAAATAATGTGCAAACCTTCTCTTACCTCAGGGTGTGAGTCGCTGCTTCGGTT 420

insert      -----
OXR-achtig TTTACCATCAGCGGATGAGCATCGACAGATACTTGGCGATAAGGAGTCCATGGCATT 480

insert      -----
OXR-achtig CGACGAGTGTCAATCGAAGGAGCACGGTTCTCGTAATCGTGGCTCTTTGGTTGGTCGCT 540

```

```

insert -----
OXR-achtig TTAATCATCTTTGCTCCTGTTCTCAGAGCGATGACCCTCCACAGTCCGAGTATGGAAGT 600

insert -----
OXR-achtig AGCAACATATCTTTCCACGGATCCTGGACAATGACGAAGAATTTTTCACAGAATACCTCT 660

insert -----
OXR-achtig CGTGTCTCTCATCTACCACCTGTTTTCTACATTTGTTTCGGAAGATTTTAAGCCTCTGGGC 720

insert -----
OXR-achtig ATTCAGGCGCCTCTTTTCGGTGTCTGTGTGCTTTGTGCTGGTTTATGCGATTCCAGGTTTC 780

insert -----
OXR-achtig GTCGTAATACTATCTTACTCGATGATGGGTCGAACACTGTGCGCCCGAAAACCACCTTTC 840

insert -----
OXR-achtig GACTGTGATAGCGTCGAAGGAAGCGCCAGCTCGCAACAGAGTTTCAGGCTGGTACGTGAG 900

insert -----TTCTTTTGGCGGTGTTCTTTGCTCTGTGTTGGTTA 35
OXR-achtig AGAAGGCGAATTGCTTGGATATTGCTTCTTTTGGCGGTGTTCTTTGCTCTGTGTTGGTTA 960
                *****

insert -----
OXR-achtig CCATATAACGTCTTAATGCTACTGATAGATCTGGGCGCAGTTGGGGGAAAGACAACGAGA 95
                CCATATAACGTCTTAATGCTACTGATAGATCTGGGCGCAGTTGGGGGAAAGACAACGAGA 1020
                *****

insert -----
OXR-achtig GATGCTCTTTCCCTATTGCCTGTTTCTGGGACACGCGAATAGCGCATTGAATCCTGTCGTA 155
                GATGCTCTTTCCCTATTGCCTGTTTCTGGGACACGCGAATAGCGCATTGAATCCTGTCGTA 1080
                *****

insert -----
OXR-achtig TACTGTGTATGACCCGTAATTTTCGGCGGAGTATATCGGAGATTCTTTGTTGTGGATCC 215
                TACTGTGTATGACCCGTAATTTTCGGCGGAGTATATCGGAGATTCTTTGTTGTGGATCC 1140
                *****

insert -----
OXR-achtig CATGGGTTCACTCGTCGAAAACCCCGTCACAGGAGTGCTCAAGGAACCGCCGTGATCGAT 275
                CATGGGTTCACTCGTCGAAAACCCCGTCACAGGAGTGCTCAAGGAACCGCCGTGATCGAT 1200
                *****

insert -----
OXR-achtig GACATGTGTGCAGGGTGTAGTGCTAGTAGCACGATAAGACGCGGATTGTTTCGCAAGCGG 335
                GACATGTGTGCAGGGTGTAGTGCTAGTAGCACGATAAGACGCGGATTGTTTCGCAAGCGG 1260
                *****

insert -----
OXR-achtig ACGATGTTACCTGGATGCAGATGTGGGCTACCGATTAACGGCCATCACGCAGTTTTAGCC 395
                ACGATGTTACCTGGATGCAGATGTGGGCTACCGATTAACGGCCATCACGCAGTTTTAGCC 1320
                *****

insert -----
OXR-achtig CTCCGACGAACGGCTACAACCTAGCAGCGGATACGACAGCTACCTTAGCAGACACAGTCCT 455
                CTCCGACGAACGGCTACAACCTAGCAGCGGATACGACAGCTACCTTAGCAGACACAGTCCT 1380
                *****

insert -----
OXR-achtig CATCGACGTTGTTACATGTTACGGAGTCTTCGGGGAAGGCCGCAAATGGGGATGGAACAA 515
                CATCGACGTTGTTACATGTTACGGAGTCTTCGGGGAAGGCCGCAAATGGGGATGGAACAA 1440
                *****

insert -----
OXR-achtig GTCCAGGTAAACAAAACCTCAAGAGACCTGCTACAAGAAGAACGAAGCAAGTCAACCTCAT 575
                GTCCAGGTAAACAAAACCTCAAGAGACCTGCTACAAGAAGAACGAAGCAAGTCAACCTCAT 1500
                *****

insert -----
OXR-achtig ATTAATATATTCATCACCACGGACGAACAACAT 608
                ATTAATATATTCATCACCACGGACGAACAACAT 1533
                *****

```

S4 AZ sequenties van de getest neuropeptiden

Peptide:	Sequentie
<i>Bomte</i> -AT	GFKPEYMSTAYGF
<i>Manse</i> -AT	GFKNVEMMTARGF
<i>Locmi</i> -AT	GFKNVALSTARGF
<i>Trica</i> -ATL	GIEAKYHMDLTARGY

Sequentie alignering gemaakt met Clustal W 2.1 (Larkin *et al.*, 2007): Een sterretje geeft de AZ aan die identiek zijn tussen de verschillende AT sequenties. Een dubbel punt geeft de geconserveerde gesubstitueerde AZ aan. De streepjes geven openingen weer die ingebouwd zijn om de homologie te maximaliseren en het aantal AZ wordt rechts weergegeven.

<i>Manse</i> -AT	GFKNVEMM--TARGF	13
<i>Locmi</i> -AT	GFKNVALS--TARGF	13
<i>Bomte</i> -AT	GFKPEYMS--TAYGF	13
<i>Trica</i> -ATL	GIEAKYHMDLTARGY	15
	* : : * * * :	

S5 Berekeningen om de dosis-respons curve op te stellen

S5.1: CHO cellen

Voor elk welletje worden de volgende berekeningen gemaakt:

Gedurende de eerste 30 sec na het toevoegen van de cellen wordt de luminescentie gemeten. Deze waarden worden opgeteld (A). Na 30 sec wordt Triton[®] X-100 toegevoegd. De luminescentie wordt gedurende 8 sec gemeten en ook deze waarden worden opgeteld (B). Omdat niet in alle welletjes exact dezelfde hoeveelheid cellen wordt toegevoegd en dit een verschillende luminescentie kan geven worden deze waarden genormaliseerd met de volgende formule waarbij L de totale luminescentie is:

$$L = \frac{A}{A+B}$$

Van deze waarde wordt de waarde van de blanco meting met BSA afgetrokken. De luminescentie bij de hoogste concentratie (bij CHO-WTA11 *Bomte*-AT 10^{-4} M en bij CHO-PAM28 *Bomte*-AT 10^{-6} M) wordt op 100% gezet. Bij deze waarde is immers het plateau bereikt. De luminescentie gemeten bij de andere concentraties wordt omgerekend naar een relatieve luminescentie (L_r) ten opzichte van de luminescentie bij de hoogste concentratie met de volgende formule:

$$L_r = \frac{L \text{ bij } 10^{-4} \text{ M}}{R} \times 100$$

De blanco meting met BSA zonder toegevoegd neuropeptide is de nulrespons. Bij de dosis-respons curve wordt de relatieve bioluminescentie uitgezet ten opzichte van de concentratie neuropeptide.

S5.2: HEK cellen

De waarde van de luminescentie wordt gemeten op 0 en op 5 sec. Van deze waarde wordt de blanco meting met 'DMEM/F-12 + IBMX medium' afgetrokken. De relatieve luminescentie (L_r) wordt berekend ten opzicht van de luminescentie bij 10^{-4} M *Bomte*-AT met de volgende formule:

$$L_r = \frac{L \text{ bij } 10^{-4} \text{ M}}{R} \times 100$$

De maximale respons is de respons gemeten bij 10^{-4} M *Bomte*-AT omdat bij deze waarde het plateau is bereikt. De nulrespons is de respons gemeten met de blanco meting met 'DMEM/F-12 + IBMX medium'. In de dosis-respons curve wordt de relatieve bioluminescentie uitgezet t.o.v de concentratie *Bomte*-AT.

S6 Concentratie en zuiverheid opgezuiverd RNA

Tabel S6.1: Resultaten van de concentratie en de zuiverheids metingen van kolonie 1 (13 darren) met de NanoDrop® Spectrophotometer. De weefsels in het vet weergegeven worden tweemaal verdund alvorens het cDNA geproduceerd wordt. De concentratie wordt gegeven in ng/µl. De A_{260}/A_{230} en de A_{260}/A_{280} waarden zijn een maat voor de zuiverheid van de stalen.

Weefsel	Concentratie (ng/µl)	A_{260}/A_{230}	A_{260}/A_{280}
hersenen	1483,9	1,17	2,12
vetweefsel hoofd	902,46	1,96	1,99
testes	572,83	2,17	2,15
Accessorische klieren	2798,5	2,38	2,16
voordarm	100,52	0,93	1,83
middendarm	4194,6	1,92	1,84
einddarm	3485,4	1,76	2,10
Buisjes van malpighi	3438,9	2,35	2,12
zenuwweefsel	70,170	0,93	1,60
vet lichaam 1	4180,8	2,01	1,92
vet lichaam 2	4089,7	2,04	1,88

Tabel S6.2: Resultaten van de concentratie en de zuiverheids metingen van kolonie 2 (9 darren) met de NanoDrop® Spectrophotometer. De weefsels in het vet weergegeven worden tweemaal verdund alvorens het cDNA geproduceerd wordt. De concentratie wordt gegeven in ng/µl. De A_{260}/A_{230} en de A_{260}/A_{280} waarden zijn een maat voor de zuiverheid van de stalen.

Weefsel	Concentratie (ng/µl)	A_{260}/A_{230}	A_{260}/A_{280}
hersenen	2090,1	2,19	2,15
vetweefsel hoofd	286,42	1,62	2,13
testes	574,1	2,32	2,13
Accessorische klieren	1833,3	2,44	2,17
voordarm	729,31	2,32	2,15
middendarm	4400,3	1,73	1,65
einddarm	2276,8	2,40	2,19
buisjes van malpighi	3105	2,38	2,14
zenuwweefsel	79,09	0,77	1,99
vet lichaam 1	2554,9	2,42	2,18
vet lichaam 2	3598,9	2,19	2,05

Tabel S6.3: Resultaten van de concentratie en de zuiverheids metingen van kolonie 3 (8 darren) met de NanoDrop® Spectrophotometer. De weefsels in het vet weergegeven worden tweemaal verdund alvorens het cDNA geproduceerd wordt. De concentratie wordt gegeven in ng/µl. De A_{260}/A_{230} en de A_{260}/A_{280} waarden zijn een maat voor de zuiverheid van de stalen.

Weefsel	Concentratie (ng/µl)	A_{260}/A_{230}	A_{260}/A_{280}
hersenen	1647,2	2,29	2,18
vetweefsel hoofd	706,77	1,57	2,18
testes	533,14	2,09	2,10
Accessorische klieren	1331	1,80	2,18
voordarm	404,6	1,79	2,04
middendarm	4397,4	1,64	1,57
einddarm	2603,4	2,48	2,19
buisjes van malpighi	2938,9	2,44	2,17
zenuwweefsel	58,58	1,81	2,03
vet lichaam	4330,4	1,78	1,65

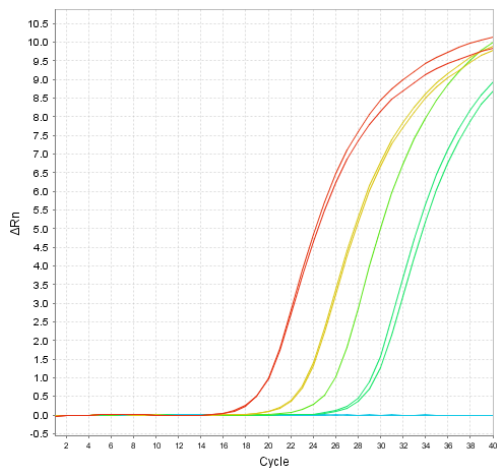
S7 Criteria primers q-RT-PCR

De primers voor de q-RT-PCR worden ontworpen met Primer express[®] Software v2.0 van Applied biosystems[®] en de verkregen primers worden nagekeken met Vector NTI Advance[™] 11.0 van Invitrogen[™]. De primers moeten de volgende eigenschappen hebben:

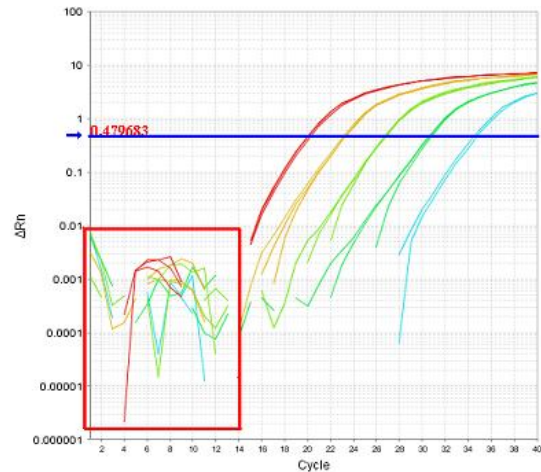
- De smelttemperatuur (T_m) van de forward en de reverse primer ligt tussen de 58°C en 60°C. Het is belangrijk dat de forward en de reverse primer dezelfde smelttemperatuur hebben
- De primers zijn tussen de 18 en de 25 nucleotiden lang
- De ampliconlengte is 50 tot 150 bp lang
- Het GC% ligt tussen de 30% en 80%.
- De primers mogen geen palindromen bevatten
- Eenzelfde nucleotide mag niet meer dan 4 keer achtereenvolgens herhaald worden ('repeats').
- De vorming van 'hairpins' of lussen moet vermeden worden. Een maximum van 5 bp die binden is toegelaten.
- De kans op dimeervorming moet vermeden worden. Ook hier is een maximum van 5 bp toegelaten. De mogelijke dimeren die gevormd kunnen worden zijn: forward-forward, reverse-reverse en forward-reverse dimeren. Alle drie de combinaties moeten nagegaan worden.
- Om te voorspellen of de primers ook niet specifiek gaan binden wordt een nucleotide blast uitgevoerd met de primers op NCBI (URL: <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

De ontworpen primers worden *in vitro* getest. De output van de qRT-PCR (StepOne[™] Real-Time PCR System (Applied Biosystems[®])) is een amplificatie curve met op de x-as het aantal cycli en op de y-as de abundantie van het DNA. De amplificatiecurves van dezelfde concentratie cDNA per primerpaar moeten op elkaar liggen (Fig. S7.1). Indien er uitschieters zijn, worden deze verwijderd. De amplificatiecurves van de verschillende concentraties cDNA moeten even ver uit elkaar liggen omdat het cDNA steeds tien maal verdund is.

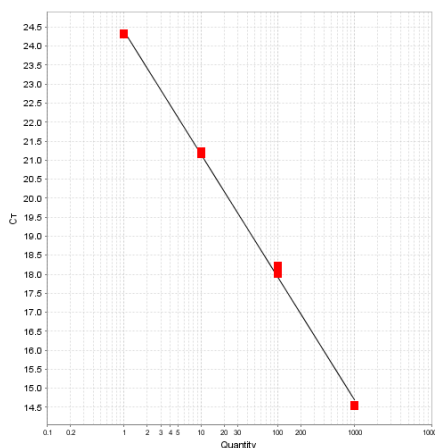
Wanneer de uitschieters verwijderd zijn wordt het logaritme van de amplificatie curve bekeken (Fig. S7.2). Het met rood omlinjnde heeft geen betekenis omdat het cDNA nog niet exponentieel geamplificeerd is. Er wordt een 'threshold' of een drempelwaarde getrokken (blauwe lijn) doorheen het lineaire gedeelte van de curve. Bij deze drempelwaarde wordt een standaardcurve opgesteld (Fig. S7.3). Doordat het verschil in concentratie steeds het tienvoud is en bij elke cyclus het cDNA verdubbeld wordt moet de helling van de curve ongeveer $-3,2$ ($-\log_2 10$) zijn. Bovendien moet de PCR efficiëntie tussen 90 en 110% liggen en moet R^2 groter zijn dan 98,5%.



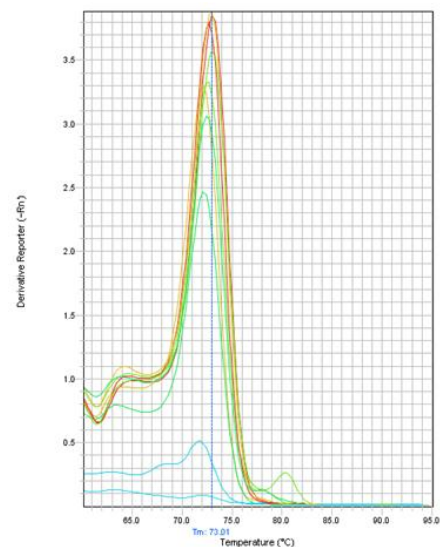
Figuur S7.1: Voorbeeld van de output van de primertest met op de x-as het aantal cycli en op de y-as de gemeten fluorescentie. Elke kleur is een verschillende concentratie cDNA (Figuur gemaakt met StepOne™ Real-Time PCR System (Applied Biosystems®)).



Figuur S7.2: Voorbeeld van het logaritme van de amplificatie curve met op de x-as het aantal cycli en op de y-as het logaritme van de fluorescentie (Figuur gemaakt met StepOne™ Real-Time PCR System (Applied Biosystems®)).



Figuur S7.3: Voorbeeld van een standard curve (Figuur gemaakt met StepOne™ Real-Time PCR System (Applied Biosystems®)).



Figuur S7.4: Voorbeeld van een smeltcurve (Figuur gemaakt met StepOne™ Real-Time PCR System (Applied Biosystems®)).

Ten slotte wordt de smeltcurve van het primerpaar geanalyseerd (Fig. S7.4). Bij de smeltcurves mag er slechts één piek aanwezig zijn. Indien er meerdere pieken aanwezig zijn betekent dit dat er ook andere delen van het cDNA geamplificeerd zijn of dat er primerdimeren gevormd zijn. Er wordt in dat geval een tweede test uitgevoerd met een nieuwe verdunning van het primerpaar. Indien er dan nog steeds meerdere pieken aanwezig zijn is het primerpaar waarschijnlijk niet specifiek genoeg. Als er slechts één piek aanwezig is bij de tweede test is de eerste verdunning waarschijnlijk gecontamineerd.

S8 Primers weefseldistributie

De primers uit Horňáková *et al.* (2010) en Tobback *et al.*, (2010) die *in vitro* getest worden, worden weergegeven in tabel S8.1. De primers die zelf ontworpen zijn met Primer express[®] Software v2.0 van Applied biosystems[®] en nagekeken met Vector NTI Advance[™] 11.0 van Invitrogen[™] worden weergegeven in tabel S8.2. Voor de doelwitgenen ATR (XM_003402442) en OXR-achtig (XM_003394885) worden ook primers ontworpen. De genen die worden uitgekozen als kandidaat huishoudgen zijn: AK (AF492888), EF1A (AF492955), PLA2 (FN391388), TUB (FN391382), GADPH (FN391384), ACT β (FN391379), RPL13(FN391387) en RPP2 (DN048379). De sequenties van de genen zijn te vinden op NCBI (URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/>). De sequentie van de doelwitgenen worden bovendien weergegeven in addendum S1. De primers die niet gebruikt zullen worden bij het selecteren van de meest stabiele huishoudgenen worden onderlijnd.

Tabel S8.1: Samenvatting van de oligonucleotide primers voor de q-RT-PCR uit de literatuur. De gebruikte afkortingen zijn: AK, Arginine kinase; EF1 α , Elongation factor 1 α ; PLA2, Phospholipase A2; TUB, α -Tubulin; GADPH; Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase; ACT β , β -Actin; RPL13, Ribosomal protein L13, RPP2 en Acidic ribosomal protein P2. De onderlijnde primers zijn niet goedgekeurd volgens de criteria weergegeven in S7. Voor ACT β wordt het primerpaar uit Tobback *et al.* Gekozen en voor EF1 α wordt het primerpaar uit Horňáková *et al.* gekozen.

Gen	Forward primer	Reverse primer	Paper
AK	<u>5'-TGTCGGTATCTACGCGCCTG-3'</u>	<u>5'-TTGGTGGATGCTTGTGTCAGTC-3'</u>	Horňáková <i>et al.</i> , 2010
EF1 α (1)	5'-AGAATGGACAAACCCGTGAG-3'	5'-CACAAATGCTACCGCAACAG-3'	Horňáková <i>et al.</i> , 2010
PLA2	<u>5'-GGTCACACCGAAACCAGATT-3'</u>	<u>5'-TCGCAACACTTCGTCATTTTC-3'</u>	Horňáková <i>et al.</i> , 2010
TUB	5'-TGATCTTGCCAAGGTACAGC-3'	5'-ACGAATGCACGTTTAGCGTA-3'	Horňáková <i>et al.</i> , 2010
GADPH	5'-TTTTGAAATCGTTGAGGGTCTT-3'	5'-CCATCACGCCATAACTTTCC-3'	Horňáková <i>et al.</i> , 2010
ACT β (1)	<u>5'-TGACGCAGATTATGTTTGAA-3'</u>	<u>5'-AGCGTATAGCGAAAGTACAGC-3'</u>	Horňáková <i>et al.</i> , 2010
RPL13	5'-GGTTTAACCAGCCAGCTAGAAA-3'	5'-CTTCACAGGTCTTGGTGCAA-3'	Horňáková <i>et al.</i> , 2010
RPP2	<u>5'-TTGGTGGTGGTGTAGCTGTT-3'</u>	<u>5'-TCAGATTCTTCTTTGCTGGT-3'</u>	Horňáková <i>et al.</i> , 2010
ACT β (2)	5'-ACAGCCGAACGTGAAATTGTT-3'	5'-GGTTGCCATTTCTGTTTCCA-3'	Tobback <i>et al.</i> , 2010
EF1 α (2)	<u>5'-GCATGGAGATAATATGTTGGAGTT-3'</u>	<u>5'-AGGCCTAGTAGGTGGAAGAATGG-3'</u>	Tobback <i>et al.</i> , 2010

Tabel S8.2: Samenvatting van de primers die zelf ontworpen zijn voor de q-RT-PCR met Primer express[®] Software v2.0 van Applied biosystems[®] en nagekeken met Vector NTI Advance[™] 11.0 van Invitrogen[™]. De gebruikte afkortingen zijn: AK, Arginine kinase; PLA2, Phospholipase A2; ATR, Allatotropine receptor en OXR-achtig, Orexine-achtige receptor.

Gen	Forward primer	Reverse primer
AK	5'-TGACAAGCATCCACCAAAAGAC-3'	5'-AGGTTGCCAAGACTATCGACGT-3'
PLA2	5'-GGTCACACCGAAACCAGATT-3'	5'-GAACCACATCCGTTACTTTGAGGT-3'
ATR	5'-GGGCGGCAGCTCTTCTATTT-3'	5'-CGGTATGCAACACCACGAGAT-3'
OXR-achtig	5'-TCCTATTGCCTGTTTCTGGGA-3'	5'-TACGACAGGATTCAATGCGC-3'

S9 Selectie van stabiele huishoudgenen

Voor het selecteren van de meest stabiele huishoudgenen wordt de cyclische drempelwaarde (C_t) bepaald. Deze C_t waarde is het aantal cycli dat doorlopen moet worden om een bepaalde hoeveelheid DNA te hebben. Deze hoeveelheid wordt bepaald met een threshold die getrokken wordt door de exponentiële fase van de amplificatie van het cDNA. Door een referentie aan te duiden die op alle platen aanwezig is wordt de relatie hoeveelheid (Q) bepaald met de volgende formule:

$$Q = 2^{-(C_t - C_{t\text{Ref}})} \quad (1)$$

In deze formule is C_t de gemiddelde C_t waarde van de twee stalen per weefsel en $C_{t\text{Ref}}$ de gemiddelde C_t waarde van de referentie. Deze Q -waarden worden ingegeven in qbasePLUS (Biogazelle). qbasePLUS zal hiermee een M -waarde toekennen aan de kandidaat huishoudgenen. De M -waarde weerspiegelt de variatie van een gen t.o.v. de andere genen. Hoe kleiner de M -waarde, hoe stabiel dit gen tot expressie komt in de weefsels (Vandesompele *et al.*, 2002b).

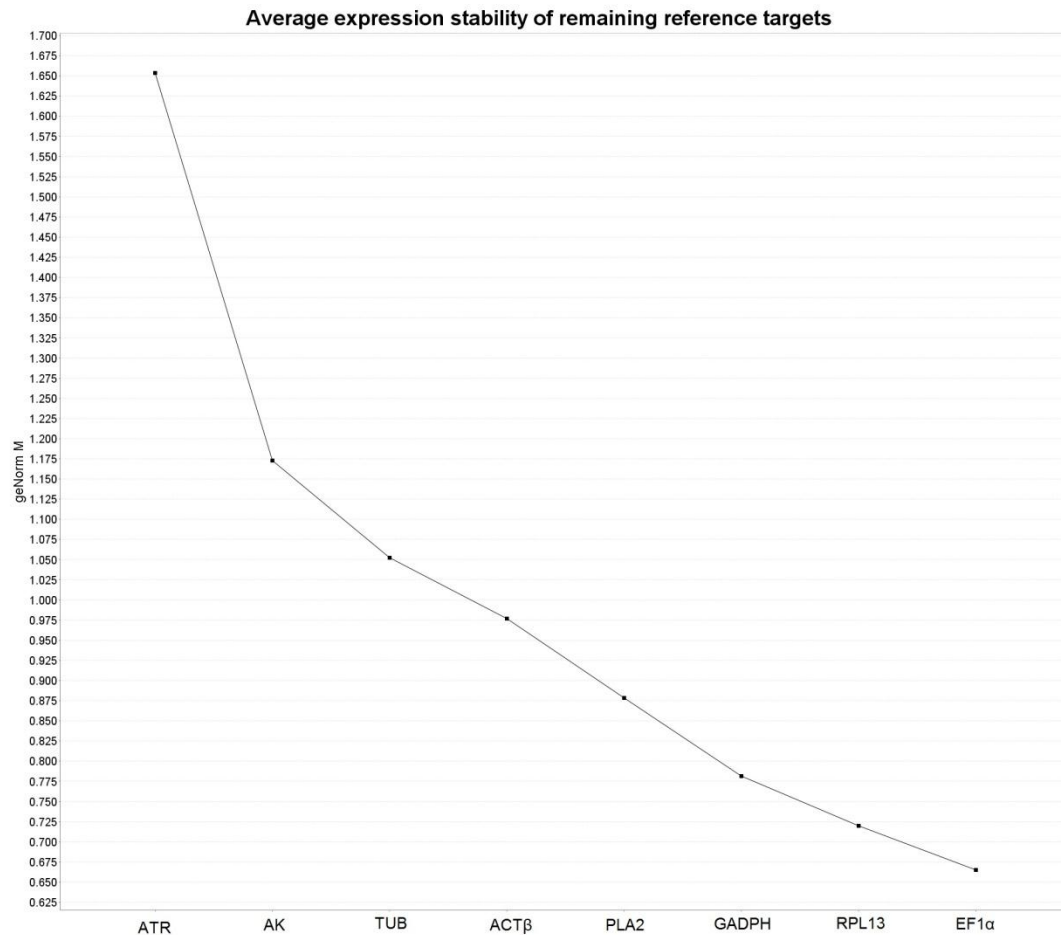
Door stapsgewijs het gen met de hoogste M -waarde te elimineren en de M -waarde opnieuw te berekenen wordt een volgorde van de genen bepaald op basis van de stabiliteit in expressie van het gen (Fig. S.9.1). Op basis van deze volgorde worden de normalisatiefactoren (NF_n) per gen berekend beginnend met de twee meest stabiele genen (NF_2) en stapsgewijs het volgende meest stabiele gen in te calculeren. De volgende normalisatiefactor (NF_3) zal de drie meest stabiele genen incalculeren enzovoort. De NF_n wordt door qbaseplus berekend met formule 2 door het geometrisch gemiddelde van de Q -waarden per staal (van n stalen) te delen door het geometrisch gemiddelde van alle ingecalculerde (x) Q -waarden (Vandesompele *et al.*, 2002b).

$$NF_n = \frac{\sqrt[n]{Q_1 \cdot Q_2 \cdot \dots \cdot Q_n}}{\sqrt[x]{Q_1 \cdot Q_2 \cdot \dots \cdot Q_x}} \quad (2)$$

De variatie ($V_{n/n+1}$) van twee opeenvolgende normalisatiefactoren (NF_n en NF_{n+1}) geeft het effect weer van het incalculeren van een extra huishoudgen. Aan de hand van deze gegevens kan worden afgeleid hoeveel huishoudgenen gebruikt moeten worden voor een accurate validering van de doelwitgenen en welke huishoudgenen dit zijn. Hierbij wordt gestreefd naar variatie van 0,15. Als het aantal (n) te gebruiken huishoudgenen gekend is wordt de NF_n per weefsel berekend met formule 2. Deze NF_n zal gebruikt worden voor het normaliseren van het mRNA niveau door het gemiddelde van de twee Q -waarden van de doelwitgenen te delen door de NF_n voor deze bij (formule 3) (Vandesompele *et al.*, 2002b).

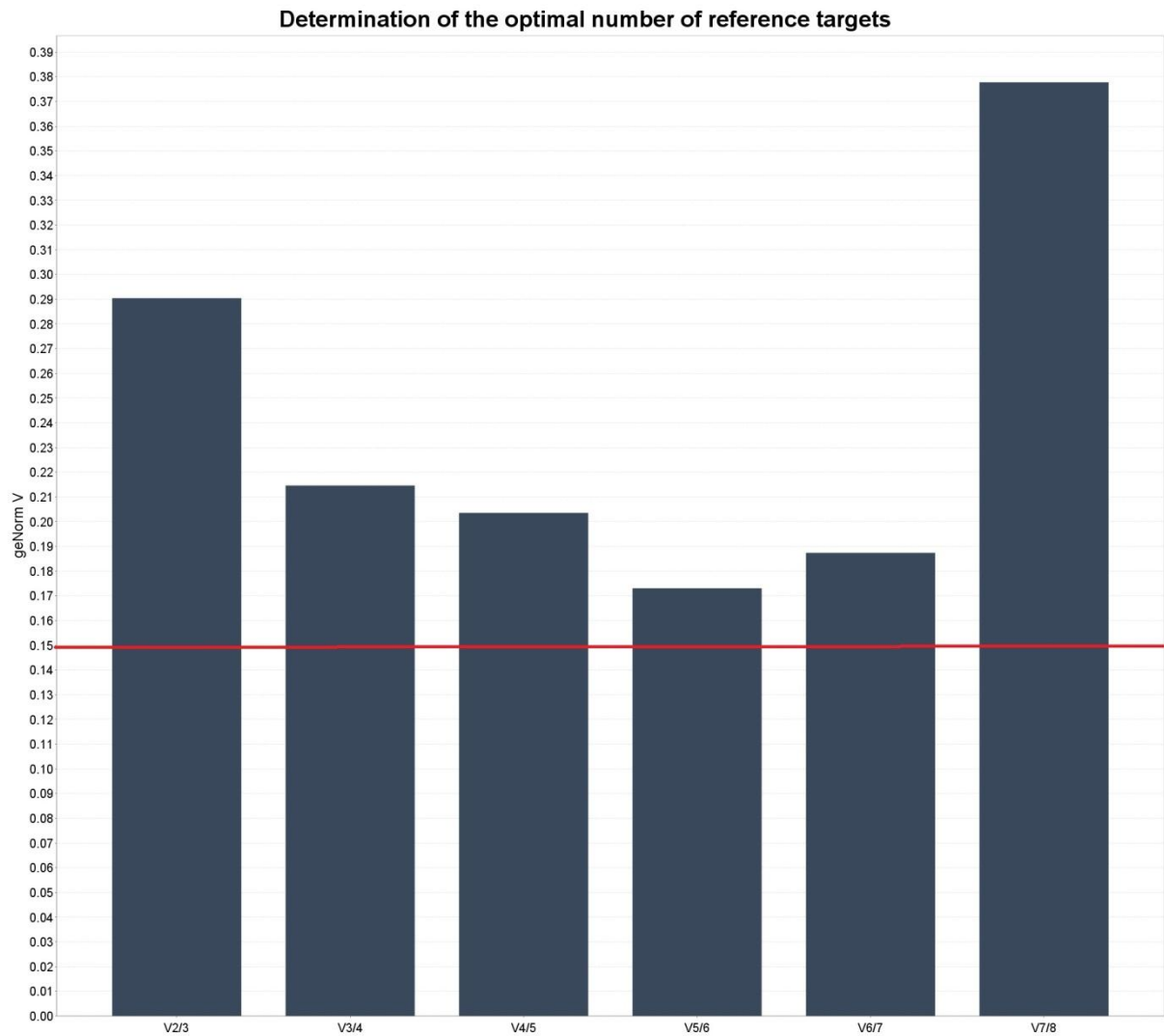
$$\text{Genormaliseerd mRNA niveau} = \frac{\sqrt[n]{Q_1 \cdot Q_2}}{NF_n} \quad (3)$$

(URL: http://medgen.ugent.be/~jvdesomp/genorm/geNorm_manual.pdf)



Figuur S9.1: Gemiddelde expressiestabiliteit van de kandidaat huishoudgenen met qbasePLUS (Biogazelle). Met rechts het meest stabiele gen met de laagste M-waarde en links het minst stabiele gen met de hoogste M-waarde. De gebruikte afkortingen zijn: ATR, allatotropin receptor; AK, arginine kinase; TUB, tubuline, ACT β , β -actine, PLA2, phospholipase A2, GAPDH, glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase; RPL13, ribosomal protein L13; EF1 α en elongation factor 1 α . (Figuur gemaakt in in qbasePLUS (Biogazelle))

De kandidaat huishoudgenen die getest worden, worden weergegeven in tabel 3.1. Bovendien wordt ook het doelwitgen ATR opgenomen in deze test om na te gaan of dit gen inderdaad het minst stabiel tot expressie komt in de weefsels. Zoals verwacht wordt het doelwitgen het minst stabiel tot expressie gebracht in de weefsels aangezien het gen links in de figuur wordt weergegeven en de hoogste M-waarde heeft (Fig. S9.1). EF1 α en RPL13 zijn de meest stabiele huishoudgenen. Aan de hand van figuur S9.2 wordt het aantal huishoudgenen gekozen. Deze figuur geeft de variatie weer bij het opnemen van een extra huishoudgen. De gepaarde variatie V2/3 geeft bijvoorbeeld de variatie weer bij de overgang van twee naar drie huishoudgenen. Omdat de variatie van vijf naar zes huishoudgenen het dichtst tegen de streefwaarde van 0,15 ligt worden zes huishoudgenen geselecteerd. Welke deze huishoudgenen zijn wordt bepaald aan de hand van figuur S9.1. De zes meest rechts gelegen genen in deze figuur hebben de laagste M-waarden en zijn de stabielste huishoudgenen. De gekozen huishoudgenen zijn dus: EF1 α , RPL13, GADPH, PLA2, ACT β en TUB.



Figuur S9.2: Gepaarde variatie voor de acht genen. De variatie wordt weergegeven bij het opnemen van een extra huishoudgen. V2/3 geeft bijvoorbeeld de variatie weer bij de overgang van twee naar drie huishoudgen. Hoe kleiner de variatie, hoe betrouwbaarder de uiteindelijk berekende NF_n waarde zal zijn. Met de rode lijn is de streefwaarde van 0,15 aangeduid. (Figuur gemaakt in in qbasePLUS (Biogazelle))

S10 Structurele analyse

Figuur S10.1: AZ sequentie alignering van de *Bomte*-ATR (XP_003402490), de *Trica*-ATR (XP_973738), de *H. sapiens* OXRs (AAC39602 en NP_001516) en de *Bomte*-OXR-achtige (*Bomte*-OXR-acht) receptor (XP_001604582). De positie van het AZ is rechts aangegeven. Residu's die identiek zijn tussen alle sequenties hebben een zwarte achtergrond, en conservatieve gesubstitudeerde residu's hebben een grijze achtergrond. De streepjes geven openingen weer die ingebouwd zijn om de homologie te maximaliseren. Vermoedelijke transmembrane regio's (TM1-TM7) zijn aangegeven met grijze balken.

<i>Bomte</i> -ATR	MHPLELVIVGWLASVISTLVDA-----IDYLDSDYSAMD	33
<i>Trica</i> -ATR	-----MLFFLLATILLSHAQAHDGLTSPHERANNSLFVSKPRPRNDTFIDQFDYLVLRD	54
<i>Homsa</i> -OXR1	-----MEPSATPGAQMGVP-----	14
<i>Homsa</i> -OXR2	-----MSGTKLE-----DSPPCR	14
<i>Bomte</i> -OXR-acht R	-----MSTNVYNDSTISSP-----	14
	TM1	
<i>Bomte</i> -ATR	YTDESDIDYNATNCTNSYCSNEEYVDRMI-NYIFPK---FWDVWVLIASHSVVFFVGLVG	89
<i>Trica</i> -ATR	KRDWDEDNASYINGSGNVTFSEQEFDISLW-ELIAPK---SWTWILVILHSLVFIIGIIG	110
<i>Homsa</i> -OXR1	-----PGSREPSVPDPYED-EFLRYLWRDYLYPK---QYEWVLIAYVAVFVVALVG	63
<i>Homsa</i> -OXR2	WSSASELNETQEPFLNPTDYDDEEFLRYLWREYLHPK---EYEWVLIAGYIIVFVVALIG	71
<i>Bomte</i> -OXR-acht R	---EFNSSYNGTMVSSNESFGMDITGDILW--YFYDKFHSETNYLLIILYVPMALAITA	69
	TM2	
<i>Bomte</i> -ATR	NALVCIAYVRNHSRMTVTNYFTVNLAVADEFLVLLCLPFTLWLDITETWFLGLTLCKAVP	149
<i>Trica</i> -ATR	NILVCAVAVRNHMTMTVTNYFTVNLAVADEFLVILFCLPPSVVWDVTVTWFFGVMTCKIVL	170
<i>Homsa</i> -OXR1	NTLVCLAVWRNHHMRTVTNYFTVNLVSLADVLVTAICLPASLLVDITESWLFHALCKVIP	123
<i>Homsa</i> -OXR2	NVLVCAVAVRNHMHMRTVTNYFTVNLVSLADVLVTTITCLPATLVVDITETWFFGQSLCKVIP	131
<i>Bomte</i> -OXR-acht R	NVLVIAVVFYHYMRSVTNYFTVNLVSLADVLVTTICMPVAVSQAVSIVWIHGEMCKLSS	129
	TM3	TM4
<i>Bomte</i> -ATR	YLQTVSVTSVLTTLTFISIDRMYAICFPLRFKSTTGRAKSAIGI--WAAALFDIPDLV	207
<i>Trica</i> -ATR	YFQSVSVTSVLTTLTFISIDRMYAICFPLRFKSTTGRAKTAIGI--WIVALACDIPEMI	228
<i>Homsa</i> -OXR1	YLQAVSVSVAVLTLSFIALDRMYAICHPLRFKSTARRARGSIIGI--WAVSLAIMVPOAA	181
<i>Homsa</i> -OXR2	YLQTVSVTSVLTLSLSCIALDRMYAICHPLRFKSTAKRARNSLVLI--WIVSCLIMIPQAI	189
<i>Bomte</i> -OXR-acht R	YLQGVAVASVFTIISAMSIDRMLAIRSPMAFRVFNRRSTVLVIVALWLVALIFAPVLR	189
<i>Bomte</i> -ATR	VLH--TVPPTHIKIKT-----VLFQCDDISWSQ-R-SQVAFTI	241
<i>Trica</i> -ATR	YVT--TI-PTVDEVDT-----VLLTQCAPTWTST-E-TDTIFFI	261
<i>Homsa</i> -OXR1	VMECSVLPPE-LANRT-----RLEFSVCDERWAD-DLYPKIYHS	217
<i>Homsa</i> -OXR2	VMECSVTFPG-LANKT-----TLFTVCDERWGG-EIYPKMYHI	225
<i>Bomte</i> -OXR-acht R	AMTLHSPSME-LSNISIFHGSWTMTKNFSQNTSRVSHLPPVFIYCSDFKPLGIQAPLFGA	248
	TM5	
<i>Bomte</i> -ATR	VKLIIFLYTGPIIFMSVAYWQIVKVLWRS-NIPG-----HNLPSRAS---	281
<i>Trica</i> -ATR	LKMVLFYLIPLLFMSIAYLQIIRVWLKSGNVPH-----QIMDASGGGGR	305
<i>Homsa</i> -OXR1	CFEIVTYLAPLGLMAMAYFQIRKWLGR-QIPGTTSSALVRNWK--RPSDQLGDLEQGLSG	274
<i>Homsa</i> -OXR2	CFEIVTYMPLCLMVLAYLQIRKWLGR-QIPGTTSSVQVRKWKPLQPVSSQ----PRGPGQ	280
<i>Bomte</i> -OXR-acht R	VCFVLYVATPQFVVVILSYSMGRTLCAR-KPEF-----DCDSVEGSAS	290
	TM6	
<i>Bomte</i> -ATR	QMSQIPSTGGGNPEVQLRSRRKAAKMLVTVVITFAICYFPVHLLSVLRYTTTLPSNKNWIN	341
<i>Trica</i> -ATR	QTNTFAMNMNASTEGQLRSRRKAAKMLVAVVVMFAFCYFPVHLLSILRKTVGLKNTDGNR	365
<i>Homsa</i> -OXR1	QPQ-RARAFLAEVKQMRARRKTAKMLVLLVFAICYLPISVNLVLRVFGMFRQASDR	333
<i>Homsa</i> -OXR2	PTKS-RMSAVAAEIKQIRARRKTARMLMVLLVFAICYLPISVNLVLRVFGMFAHTEDR	339
<i>Bomte</i> -OXR-acht R	SQQSFRLL-----VREERRIAWILLLLAVFFALCWLPIYNVLMLLIDLGAVGKTTTRD	341
	TM7	
<i>Bomte</i> -ATR	----AISLIAHGLCYFNNSANPLIYNFMSGKFRKAFRRTRFCA----REN-GSRIQRGY	391
<i>Trica</i> -ATR	----AFSLISHWLCYANSAANPLIYNFMSGKFRKEFHRAFEHCCQ---RSG-GHGFQFSA	417
<i>Homsa</i> -OXR1	EAVYACFTFSHWLVYANSAANPLIYNFMSGKFRQFKAAAFSCCLPGLGPCG-SLKAPSPR	392
<i>Homsa</i> -OXR2	ETVYAWFTFSHWLVYANSAANPLIYNFMSGKFRQFKAAAFSCCLGVHHRQ-EDRLTRGR	398
<i>Bomte</i> -OXR-acht R	ALSYCLF----LGHANSALNPVYCVMTNFRRSISEILCCGSHGFTRRKRPRHSAQGT	396
<i>Bomte</i> -ATR	LASTSNFPRIKSRTTTTIRTTFKNNNNLQRNTEIIPL-----SAITTIQQNEKHD----	440
<i>Trica</i> -ATR	VYRKTE----KDSGIASRTHSRTDLEIQRVNDFEPHNRKGTKTSMLLVET-----	464
<i>Homsa</i> -OXR1	SSA-SH----KSLSLQ-----SRCSISKISEHVVL-----TSVTTVLP-----	425
<i>Homsa</i> -OXR2	TSTESR----KSLTTQIS----NFDNISKLSEQVVL-----TSISTLPAANGAGPL--	441
<i>Bomte</i> -OXR-acht R	AVIDDMCAGCSASSTIRGLFRKRTMLPGRCRGLPINGHHAVALALRRTATTSSGYDSYLS	456

<i>Bomte</i> -ATR	-----	440
<i>Trica</i> -ATR	-----	464
<i>Homsa</i> -OXR1	-----	425
<i>Homsa</i> -OXR2	-----QNW	444
<i>Bomte</i> -OXR-acht	R RHSPHRRCYMLRSLRGRPQMGMEQVQVNKTQETCYKKNEASQPHINIFITTTDEQH	511

De AZ sequentie (identieke en conservatieve gesubstitudeerde residu's) tussen de humane OXRs komen voor 62.8% overeen en de ATRs komen voor 44,3% overeen. *Bomte*-OXR-achtig komt maar 18,4% overeen met *Bomte*-ATR, 19,4% met *Trica*-ATR, 20,6% met *Homsa*-OXR1 en 20,9% met *Homsa*-OXR2. *Bomte*-ATR en *Homsa*-OXR1 komen voor 33,1% overeen en *Bomte*-OXR-achtig en *Homsa*-OXR2 komen voor 36.2% overeen.

S11 Genen fylogenetische analyse

Een samenvatting van de genen gebruikt in de fylogenetische analyse wordt weergegeven in tabel S11.1. (URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)

Tabel S11.1: Samenvatting van de gebruikte genen in de fylogenetische analyse.

'Gene Accession' nummer	Beschrijving	Soort
ADX66344	allatotropin receptor	<i>Manduca sexta</i>
NP_001127714	neuropeptide receptor A16	<i>Bombyx mori</i>
NP_001127740	neuropeptide receptor A5	<i>Bombyx mori</i>
AEN03789	allatotropin receptor	<i>Aedes aegypti</i>
XP_973738	voorspeld: soortgelijk aan OXR-2	<i>Tribolium castaneum</i>
XP_001604582	voorspeld: soortgelijk aan OXR-2	<i>Nasonia vitripennis</i>
EFN76143	Orexin receptor type 2	<i>Harpegnathos saltator</i>
XP_003402490	voorspeld: soortgelijk aan OXR-2	<i>Bombus terrestris</i>
XP_003690070	voorspeld: soortgelijk aan OXR-2	<i>Apis florea</i>
EFA07466	hypotetisch proteïen TcasGA2	<i>Tribolium castaneum</i>
NP_001127709	neuropeptide receptor A12	<i>Bombyx mori</i>
NP_001127751	neuropeptide receptor A35	<i>Bombyx mori</i>
XP_003425955	Voorspeld: soortgelijk aan OXR-1	<i>Nasonia vitripennis</i>
EFN82892	Orexine receptor type 2	<i>Harpegnathos saltator</i>
XP_003394933	voorspeld: soortgelijk aan OXR-2	<i>Bombus terrestris</i>
XP_003694698	Voorspeld: ongekaracteriseerd proteïne	<i>Apis florea</i>
AAC39602	Orexin receptor-2	<i>homo sapiens</i>
NP_001516	Orexin receptor type 1	<i>homo sapiens</i>

AFDELING DIERENFYSIOLOGIE EN NEUROBIOLOGIE

Naamsestraat 59
3000 LEUVEN, BELGIË
Tel. +32 16 32 42 60
Fax +32 16 32 39 02
els.lismont@student.kuleuven.be
www.kuleuven.be

