

Institut für Biochemie und Biologie
Abteilung Zoophysiology

Charakterisierung der Serotonin-Rezeptoren der
Honigbiene *Apis mellifera*

Von den Genen zum Verhalten

-Dissertation-

zur Erlangung des akademischen Grades

„*doctor rerum naturalium*“

(Dr. rer. nat.)

in der Wissenschaftsdisziplin

„Molekulare Zoophysiology“

eingereicht an der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der Universität Potsdam

von

MARKUS THAMM

Potsdam, den 07.10.2009

Online veröffentlicht auf dem
Publikationsserver der Universität Potsdam:
URL <http://opus.kobv.de/ubp/volltexte/2010/4073/>
URN <urn:nbn:de:kobv:517-opus-40736>
<http://nbn-resolving.org/urn:nbn:de:kobv:517-opus-40736>

Zusammenfassung

Das serotonerge System besitzt sowohl bei Invertebraten als auch bei Vertebraten eine große Bedeutung für die Kontrolle und Modulation vieler physiologischer Prozesse und Verhaltensleistungen. Bei der Honigbiene *Apis mellifera* spielt Serotonin (5-Hydroxytryptamin, 5-HT) eine wichtige Rolle bei der Arbeitsteilung und dem Lernen. Die 5-HT-Rezeptoren, die überwiegend zur Familie der G-Protein gekoppelten Rezeptoren (GPCRs) gehören, besitzen eine Schlüsselstellung für das Verständnis der molekularen Mechanismen der serotonergen Signalweiterleitung. Ziel dieser Arbeit war es, 5-HT-Rezeptoren der Honigbiene zu charakterisieren. Dazu zählt die Identifizierung der molekularen Struktur, die Ermittlung der intrazellulären Signalwege, die Erstellung von pharmakologischen Profilen, die Ermittlung der Expressionsmuster und die Ermittlung der physiologischen Funktionen der Rezeptoren.

Mit Hilfe der Informationen aus dem *Honey Bee Genome Project*, konnten drei Rezeptor-cDNAs kloniert werden. Vergleiche der abgeleiteten Aminosäuresequenzen mit den Aminosäuresequenzen bereits charakterisierter Rezeptoren legten nahe, dass es sich dabei um einen 5-HT₁- (Am5-HT₁) und zwei 5-HT₂-Rezeptoren (Am5-HT_{2α} und Am5-HT_{2β}) handelt. Die strukturelle Analyse der abgeleiteten Aminosäuresequenz dieser Rezeptoren postuliert das Vorhandensein der charakteristischen heptahelikalen Architektur von GPCRs und zeigt stark konservierte Motive, die bedeutend für die Ligandenbindung, die Rezeptoraktivierung und die Kopplung an G-Proteine sind. Für die beiden 5HT₂-Rezeptoren konnte zudem alternatives Spleißen nachgewiesen werden.

Mit den cDNAs des Am5-HT₁- und des Am5-HT_{2α}-Rezeptors wurden HEK293-Zellen stabil transfiziert und anschließend die Rezeptoren funktionell und pharmakologisch analysiert. Am5-HT₁ hemmt bei Aktivierung abhängig von der 5-HT-Konzentration die cAMP-Produktion. Die Substanzen 5-Methoxytryptamin (5-MT) und 5-Carboxamidotryptamin konnten als Agonisten identifiziert werden. Methiothepin dagegen blockiert die 5-HT-Wirkung vollständig. Prazosin und WAY100635 stellen partielle Antagonisten des Am5-HT₁-Rezeptors dar. Der Am5-HT_{2α}-Rezeptor stimuliert bei Aktivierung die Synthese des sekundären Botenstoffs Inositoltrisphosphat, was wiederum zu einer messbaren Erhöhung der intrazellulären Ca²⁺-Konzentration führt. 5-MT und 8-OH-DPAT zeigen eine deutliche agonistische Wirkung auf Am5-HT_{2α}. Dagegen besitzen Clozapin, Methiothepin, Mianserin und Cyproheptadin die Fähigkeit, die 5-HT-Wirkung um 51-64 % zu vermindern. Die bereits erwähnte alternative Spleißvariante von Am5-HT_{2α} wurde ebenfalls in HEK293-Zellen exprimiert und analysiert, scheint jedoch eigenständig nicht funktionell zu sein.

Gegen die dritte cytoplasmatische Schleife (CPL3) wurde ein polyklonales Antiserum generiert. Dieses erkennt in Western-Blot-Analysen ein Protein mit einer Masse von ca. 50 kDa. Durch immunhistochemische Analysen am Bienenhirn wurde die Verteilung des Rezeptors genauer untersucht. Dabei zeigten die optischen Neuropile, besonders die Lamina und die Ocellarnerven, stets eine starke Markierung. Außerdem wird der Rezeptor in den α- und β-Loben sowie der Lippe, dem Basalring und dem Pedunculus der Pilzkörper exprimiert. Doppelmarkierungen zeigen stets eine enge Nachbarschaft von serotonergen Fasern und dem Am5-HT₁-Rezeptor.

Weiterhin konnte gezeigt werden, dass der Am5-HT₁-Rezeptor sehr wahrscheinlich an der Regulation des phototaktischen Verhalten der Honigbiene beteiligt ist. Verfütterung von 5-HT hat eine deutlich negative Wirkung auf das phototaktische Verhalten. Diese kann durch den Am5-HT₁-Rezeptor-Agonisten 5-CT imitiert werden. Schließlich konnte gezeigt werden, dass der Am5-HT₁-Antagonist Prazosin die 5-HT-Wirkung deutlich vermindern kann.

Abstract

The serotonergic system plays an important role in the control and modulation of many physiological and behavioral processes in both vertebrates and invertebrates. In the honeybee *Apis mellifera*, serotonin (5-hydroxytryptamine, 5-HT) has been implicated in the control and regulation of division of labor as well as learning and memory. A key role in understanding the serotonergic system plays the molecular and functional characterization of 5-HT receptor subtypes. In most cases, serotonin receptors represent G protein-coupled receptors (GPCRs). This work describes the characterization of honeybee serotonin receptors. This comprises the identification of their molecular structure, intracellular second messenger pathways, pharmacological properties, expression profiles and functions.

By screening the honeybee genome, we found three candidate genes encoding for putative serotonin receptors. The cDNAs of these genes were cloned and the deduced amino acid sequences were analysed. The sequence information was used to isolate the cDNAs encoding for these three receptors. Comparison of the deduced amino acid sequences with sequences of other known receptors suggests that one receptor belongs to the 5-HT₁ (Am5-HT₁) and the other two receptors to the 5-HT₂ receptor class (Am5-HT_{2α} and Am5-HT_{2β}). Major characteristics common to all GPCRs (e.g. the heptahelical architecture) were confirmed by structural analyses of the deduced amino acid sequences. Furthermore, truncated receptor transcripts representing alternative splice variants of both 5-HT₂ receptors could be detected. HEK293 cells were stably transfected with the cDNAs of Am5-HT₁ or Am5-HT_{2α} and functionally and pharmacologically analysed. The activation of Am5-HT₁ by 5-HT results in the dose dependent attenuation of adenylyl cyclase activity. 5-methoxytryptamine (5-MT) and 5-carboxamidotryptamine are able to imitate the 5-HT effect. In contrast, methiothepin is able to block the entire 5-HT effect, whereas prazosine and WAY100635 block the 5-HT effect only partially. The Am5-HT_{2α} receptor stimulates the synthesis of the second messenger inositol trisphosphate which in turn mediates an increase in the intracellular Ca²⁺. The substances 5-MT and 8-OH-DPAT were identified as agonists of the Am5-HT_{2α} receptor. In contrast, clozapine, methiothepine, mianserine, and cyproheptadine show strong antagonistic actions. A truncated alternative splice variant of the Am5-HT_{2α}-receptor was also analysed but didn't show any functional coupling by itself.

An antiserum was raised against the third cytoplasmic loop (CPL3) of the Am5-HT₁ receptor. This antiserum detects a protein with a molecular mass of 50 kDa in western blot analyses. The expression of the Am5-HT₁ receptor was studied in detail using immunohistochemistry. Strong Am5-HT₁-like immunofluorescence was observed in the ocellar nerve, in the three optic ganglia and in the α- and β-lobes, the pedunculi, the lip and the basal ring of the mushroom bodies. Furthermore, co-labeling with an antibody against 5-HT showed that this receptor is expressed in close vicinity to serotonergic neurons.

Finally, behavioral experiments suggest a possible role of the Am5-HT₁ receptor in phototactic behavior. Feeding of 5-HT to worker honeybees results in a decrease of phototactic behavior. This 5-HT action could be mimiced by feeding of the Am5-HT₁ agonist 5-CT. In contrast, the Am5-HT₁ antagonist prazosine prevents the 5-HT-induced decrease in phototaxis.

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	v
Abbildungsverzeichnis	vii
Tabellenverzeichnis	vii
1 Einleitung	1
1.1 Das biogene Amin Serotonin	2
1.1.1 Synthese, Wirkung und Abbau von Serotonin	2
1.1.2 Die Funktion von Serotonin bei der Honigbiene	3
1.2 G-Protein-gekoppelte Rezeptoren	4
1.2.1 Struktur von GPCRs	4
1.2.2 Klassifizierung von GPCRs	6
1.2.3 Die Signaltransduktion von GPCRs	6
1.2.4 Inaktivierung von GPCRs	8
1.2.5 Konstitutive Aktivität und G-Protein-unabhängige Aktivierung	8
1.2.6 G-Protein-gekoppelte Serotonin-Rezeptoren	9
1.3 Zielsetzung der Arbeit	11
2 Material und Methoden	12
2.1 Bezugsquellen	12
2.2 Standardlösungen	14
2.3 Versuchstiere	14
2.4 Präparation	14
2.5 Molekularbiologische Methoden	15
2.5.1 RNA-Extraktion	15
2.5.2 cDNA-Synthese	16
2.5.3 Polymerase-Kettenreaktion	17
2.5.4 Agarose-Gelelektrophorese	18
2.5.5 DNA-Fragment-Reinigung	18
2.5.6 DNA-Restriktionsverdau	19
2.5.7 Ligation	19
2.5.8 Transformation von <i>Escherichia coli</i>	19
2.5.9 Präparation von Plasmid DNA	20
2.5.10 RNA/DNA-Konzentrationsbestimmung	21
2.6 Biochemische Methoden	21
2.6.1 Proteinbestimmung nach Bradford	21
2.6.2 Isolierung der Membranproteinfraktion	21
2.6.3 Deglykosylierung von Membranproteinen	21
2.6.4 SDS-PAGE nach Laemmli	22
2.6.5 Western-Blot	22

2.6.6	Immundetektion	23
2.6.7	Expression und Reinigung von Maltose-Bindeprotein-Fusionsproteinen . .	24
2.6.8	Expression und Reinigung von His-Tag-Fusionsproteinen	24
2.6.9	Generierung und Affinitätschromatographie polyklonaler Antiseren	26
2.6.10	Generierung monoklonaler Antikörper	27
2.6.11	Immunhistochemische Analysen	28
2.6.12	Immuncytochemische Analysen an fixierten HEK293-Zellen	28
2.6.13	Antikörper	29
2.6.14	Mikroskopische Auswertung und Bildbearbeitung	29
2.7	Heterologe Expression in HEK293-Zellen und Funktionalitätsnachweis	30
2.7.1	Konstruktion eines Expressionsvektors	30
2.7.2	Herstellung stabiler HEK293-Zelllinien	30
2.7.3	cAMP-Bestimmung an transfizierten HEK293-Zellen	31
2.7.4	Ca ²⁺ -Imaging an transfizierten HEK293-Zellen	31
2.8	Bioinformatische Analysen	32
2.9	Verhaltensversuche zur phototaktischen und lokomotorischen Aktivität	33
3	Ergebnisse	34
3.1	Der Am5-HT ₁ -Rezeptor	34
3.1.1	Isolierung und Charakterisierung der Am5-HT ₁ -Rezeptor-cDNA	34
3.1.2	Eigenschaften der abgeleiteten Aminosäuresequenz	36
3.1.3	Immunologischer Nachweis des Am5-HT ₁ -Proteins	39
3.1.4	Funktionelle und pharmakologische Charakterisierung von Am5-HT ₁	46
3.2	Der Am5-HT _{2α} -Rezeptor	49
3.2.1	Isolierung und Charakterisierung der Am5-HT _{2α} -Rezeptor-cDNA	49
3.2.2	Eigenschaften der abgeleiteten Aminosäuresequenz	51
3.2.3	Generierung eines monoklonalen Antikörpers gegen Am5-HT _{2α}	52
3.2.4	Funktionelle und pharmakologische Charakterisierung von Am5-HT _{2α} . . .	56
3.3	Der Am5-HT _{2β} -Rezeptor	59
3.3.1	Isolierung und Charakterisierung der Am5-HT _{2β} -Rezeptor-cDNA	59
3.3.2	Eigenschaften der abgeleiteten Aminosäuresequenz	60
3.4	Der Einfluss von Serotonin und 5-HT-Rezeptorliganden auf das phototaktische Verhalten von Bienen	62
4	Diskussion	65
4.1	Strukturelle Eigenschaften der 5-HT-Rezeptoren der Honigbiene	66
4.1.1	Genomische Organisation und die Annotierung von Genen	66
4.1.2	Eigenschaften der abgeleiteten Aminosäuresequenz	67
4.2	Alternatives Spleißen	70
4.3	Funktionelle Charakterisierung der 5-HT-Rezeptoren der Honigbiene	72
4.3.1	Das heterologe Expressionssystem	72
4.3.2	Am5-HT ₁ ist ein funktioneller Serotoninrezeptor	73

4.3.3	Pharmakologische Charakterisierung von Am5-HT ₁	73
4.3.4	Am5-HT _{2α} ist ein funktioneller Serotoninrezeptor	74
4.3.5	Pharmakologische Charakterisierung von Am5-HT _{2α}	75
4.4	Lokalisation der 5-HT-Rezeptoren der Honigbiene	76
4.4.1	Lokalisation von Am5-HT ₁	76
4.4.2	Lokalisation von Am5-HT _{2α}	78
4.5	Die physiologische Funktion der 5-HT-Rezeptoren der Honigbiene	80
4.6	Ausblick	84
Literatur		86
Anhang		105
	Abkürzungsverzeichnis	105
	Nukleotid-Sequenzen der untersuchten Rezeptoren	107
	Übersicht über die verwendeten Oligo-Nukleotide	109
	Lebenslauf	110
	Publikationen	111
	Tagungsbeiträge	111
	Teilnahme an nationalen und internationalen Konferenzen	111
	Danksagung	112
	Eidesstattliche Erklärung	113

Abbildungsverzeichnis

1	Biosynthese von Serotonin.	2
2	Topographie eines G Protein-gekoppelten Rezeptors.	5
3	Signalwege G-Protein-gekoppelter Rezeptoren.	7
4	Ausschnitt aus dem eukaryotischen Expressionsvektor pcDNA3.1+ zur Verdeutlichung der Klonierungsstrategie.	30
5	Alignment der abgeleiteten Aminosäuresequenz von 5-HT ₁ -Rezeptoren	35
6	Strukturelle Eigenschaften der abgeleiteten Aminosäuresequenz des Am5-HT ₁ -Rezeptors.	36
7	Stammbaumrekonstruktion von Serotonin-Rezeptoren verschiedener Organismen.	37
8	Schema zur Strategie der Herstellung des polyklonalen Antikörpers und Western-Blot-Analysen mit anti-Am5-HT ₁	39
9	Western-Blot-Analyse mit Membranproteinen von HEK293-Zellen.	40
10	Western-Blot-Analyse zur Verteilung des Am5-HT ₁ -Rezeptor-Proteins.	40
11	Immunhistochemische Lokalisation von Am5-HT ₁ im Bienenhirn.	41
12	Präabsorptionsexperiment zur Untersuchung der Spezifität des anti-Am5-HT ₁ -Antikörpers in immunhistochemischen Analysen.	42
13	Immunhistochemische Analyse zur räumlichen Beziehung von Am5-HT ₁ und Serotonin.	43
14	Immuncytochemischer Nachweis von Am5-HT ₁ in stabil transfizierten HEK293-Zellen.	45
15	Wirkung biogener Amine auf die intrazelluläre cAMP-Konzentration Am5-HT ₁ -exprimierender HEK293-Zellen.	47
16	Dosis-abhängige Wirkung verschiedener Substanzen auf die intrazelluläre cAMP-Konzentration Am5-HT ₁ -exprimierender HEK293-Zellen.	48
17	Alignment der abgeleiteten Aminosäuresequenz von orthologen 5-HT ₂ -Rezeptoren.	50
18	Strukturelle Eigenschaften der abgeleiteten Aminosäuresequenz des Am5-HT _{2α} -Rezeptors.	51
19	Western-Blot-Analysen mit dem anti-Am5-HT _{2α} DD3-Antikörper.	53
20	Immuncytochemischer Nachweis des Am5-HT _{2α} -Rezeptorproteins in stabil transfizierten HEK293-Zellen.	54
21	Wirkung biogener Amine auf die intrazelluläre Ca ²⁺ -Konzentration Am5-HT _{2α} -exprimierender HEK293-Zellen.	56
22	Dosisabhängige Wirkung verschiedener Agonisten auf die intrazelluläre Ca ²⁺ -Konzentration Am5-HT _{2α} -exprimierender HEK293-Zellen.	57
23	Dosis-abhängige Wirkung verschiedener Substanzen auf die intrazelluläre Ca ²⁺ -Konzentration Am5-HT _{2α} -exprimierender HEK293-Zellen.	58
24	Strukturelle Eigenschaften der abgeleiteten Aminosäuresequenz des Am5-HT _{2β} -Rezeptors.	60
25	Ausschnitt aus dem Verlauf eines Phototaxisexperiments.	62

26	Wirkung verschiedener 5-HT-Rezeptor-Liganden auf das phototaktische Verhalten sowie die motorische Aktivität.	63
27	Schema zur Verdeutlichung der axonalen und dendritischen Verzweigungen im Pilzkörperkelch und im α -Lobus	78

Tabellenverzeichnis

1	G-Protein-gekoppelte Serotonin-Rezeptoren verschiedener Insektenpezies.	10
2	Eigenschaften der Leuchtdioden.	33
3	Genomische Organisation des Am5- <i>ht</i> ₁ -Gens.	34
4	Konservierte Aminosäurreste im Am5-HT ₁ -Rezeptor.	36
5	Genomische Organisation des Am5- <i>ht</i> _{2α} -Gens.	49
6	Konservierte Aminosäurereste im Am5-HT _{2α} -Rezeptorprotein.	52
7	Eigenschaften der wirksamen Am5-HT _{2α} -Antagonisten.	58
8	Genomische Organisation des Am5- <i>ht</i> _{2β} -Gens.	59
9	Konservierte Aminosäurreste im Am5-HT _{2β} -Rezeptor.	61

1 Einleitung

Aus Sicht der Neuroethologie besetzt die Honigbiene *Apis mellifera* eine Sonderstellung unter den Insekten. Sie ist als ökonomisch bedeutsames, staatenbildendes Nutzinsekt nicht nur in großer Zahl verfügbar, sondern besitzt auch ein riesiges Repertoire ausgesprochen gut untersuchter Verhaltensweisen. So zeigen Honigbienen ein hochentwickeltes Interaktions- und Kommunikationssystem (SELEY, 1995). Die Brutpflege die sie betreiben, erfordert eine komplexe Arbeitsteilung (PAGE & ERBER, 2002). Zum Beispiel verrichten Ammenbienen ihre Arbeit im Stock. Sie bauen neue Brutwaben und versorgen die Brut mit Nahrung. Dagegen gehen Sammlerbienen außerhalb des Stockes auf Futtersuche. Sie können dabei im Umkreis von bis zu 5 km nach Nahrungsquellen suchen, problemlos zum Stock zurück navigieren und die Information an andere Individuen im Stock weitergeben (FRISCH, 1967). Sie lernen jedoch nicht nur, wo das Futter zu finden ist, sondern auch sehr genau die Details der Futterquelle. Dazu gehören die Form, die Farbe, der Duft und die Textur der besuchten Blüten sowie die Art und Weise, wie sie den Nektar oder den Pollen spezifischer Blüten erreichen können (FRISCH, 1967). Dieses spezialisierte und gut angepasste Gedächtnis lässt sich nicht nur unter Freilandbedingungen, sondern auch sehr gut unter Laborbedingungen untersuchen. Verbindet man einen (für die Biene ursprünglich neutralen) Duft mit einem belohnenden Reiz (i.d.R. Zuckerwasser), so führt bereits eine einzige Paarung dieser Reize zu einem mehr als eine Stunde anhaltenden olfaktorischen Gedächtnis (BITTERMAN ET AL., 1983). Wenige Reizpaarungen reichen aus, damit ein Langzeitgedächtnis etabliert wird. Gut untersucht sind bei der Honigbiene auch weitere wichtige Verhaltens- und Sinnesleistungen wie zum Beispiel der Sonnenkompass (LINDAUER, 1959) und die circadiane Uhr (SASAGAWA ET AL., 2003). Im Vergleich zu Vertebraten besitzt die Honigbiene außerdem ein kleines und einfach gebautes Gehirn und ist daher zu einem idealen Modellorganismus geworden, um die neuronalen Mechanismen von Verhalten, insbesondere dem Lernen und der Gedächtnisbildung, zu erforschen (MENZEL & MÜLLER, 1996; GIURFA, 2003a,b; HAMMER & MENZEL, 1995). Weiterhin wurde die genomische DNA der Honigbiene komplett sequenziert (THE HONEYBEE GENOME SEQUENCING CONSORTIUM, 2006), wodurch die Möglichkeiten der Erforschung der molekularen Grundlagen der beschriebenen Phänomene erheblich verbessert wurden.

In vielen Studien zum Verhalten der Honigbiene konnte gezeigt werden, dass die biogenen Amine Dopamin, Tyramin, Octopamin und Serotonin verschiedene physiologische und Verhaltensleistungen steuern oder modulieren können (BICKER & MENZEL, 1989; ERBER ET AL., 1993; BICKER, 1999; SCHEINER ET AL., 2006). Diese kleinen organischen Verbindungen haben diverse Funktionen im Organismus und können als Neurotransmitter, Neuromodulatoren und Neurohormone wirken. Im folgenden soll auf das biogene Amin Serotonin, seine Rezeptoren sowie seine Wirkungen bei der Honigbiene näher eingegangen werden.

1.1 Das biogene Amin Serotonin

Serotonin (5-Hydroxytryptamin, 5-HT) ist eines der phylogenetisch ältesten Signalmoleküle für die chemische Kommunikation innerhalb eines mehrzelligen Organismus (PEROUTKA & HOWELL, 1994). Es konnte sowohl bei Vertebraten als auch bei Invertebraten nachgewiesen werden (BLENAU & BAUMANN, 2001) und kontrolliert und moduliert eine Vielzahl physiologischer Prozesse sowie Verhaltensleistungen (WEIGER, 1997).

1.1.1 Synthese, Wirkung und Abbau von Serotonin

Biogene Amine werden in ein- bis mehrstufigen Reaktionswegen aus essentiellen Aminosäuren synthetisiert. Bei 5-HT ist dies ein zweistufiger Prozess (Abb. 1). Dabei wird der Aminosäure L-Tryptophan durch das Enzym Tryptophan-Hydroxylase (TRH) eine Hydroxylgruppe an den Indolring addiert (LIVINGSTONE & TEMPEL, 1983; NECKAMEYER & QUINN, 1989). Es konnte in *D. melanogaster* nachgewiesen werden, dass das Enzym Tryptophan-Phenylalanin-Hydroxylase (TPH) ebenfalls diese Hydroxylierung katalysieren kann (COLEMAN & NECKAMEYER, 2005). Es entsteht 5-Hydroxytryptophan, welches durch die DOPA-Decarboxylase (DDC) decarboxyliert wird (HIRSH & DAVIDSON, 1981; LIVINGSTONE & TEMPEL, 1983).

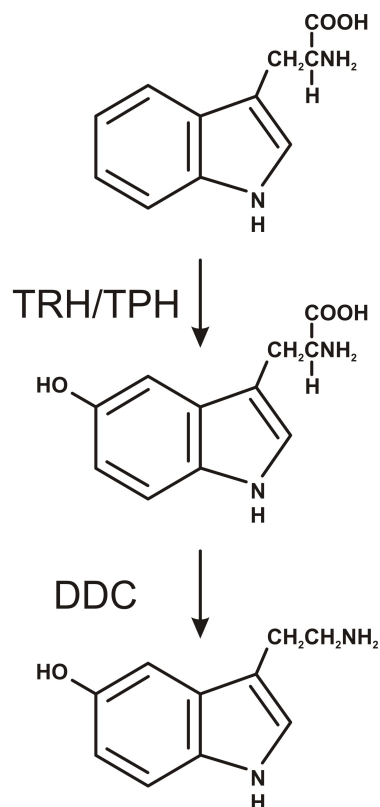


Abb. 1: Biosynthese von Serotonin. Erläuterungen im Text. **TRH** Tryptophan-Hydroxylase, **TPH** Tryptophan-Phenylalanin-Hydroxylase, **DDC** DOPA-Decarboxylase

Wird 5-HT ausgeschüttet, so entfaltet es seine Wirkung über die Bindung und Aktivierung spezifischer plasmamembranständiger Rezeptoren. Auf diese Weise ändert sich das Verhalten der Zelle, da sich ihr Membranpotential ändert oder spezifische intrazelluläre Signalwege ausgelöst werden. Bei Vertebraten kennt man sieben Klassen von 5-HT-Rezeptoren. Diese gehören, mit einer Ausnahme, zur Proteinfamilie der G-Protein-gekoppelten Rezeptoren. Nur die Klasse der 5-HT₃-Rezeptoren repräsentiert Liganden-gesteuerte Ionenkanäle. Bei Invertebraten konnten bisher nur 5-HT₁-, 5-HT₂- und 5-HT₇-Rezeptoren nachgewiesen werden (vgl. Abschnitt 1.2.6, Seite 9).

Die Signalwirkung hält in der Regel nicht lange an, da der Neurotransmitter nur kurze Zeit am Zielort verweilt. Dies ist zum einen durch die Diffusion zu erklären. Zum anderen existiert eine lokale Aufnahme von 5-HT. Diese kann sowohl durch prä- und postsynaptische Zellen, als auch durch umliegende Glia-Zellen geschehen, welche spezielle Oberflächenproteine, die Neurotransmitter-Transporter, besitzen. Für die 5-HT-Aufnahme sind Na⁺/Cl⁻-abhängige Transporter verantwortlich, welche sowohl bei Vertebraten als auch bei Invertebraten nachgewiesen wurden (COREY ET AL., 1994; DEMCHYSHYN ET AL., 1994; CAVENEY ET AL., 2006). Nach der Wiederaufnahme wird das 5-HT recycelt oder durch die Monoaminoxidase zu 5-Hydroxy-Indolyl-Acetaldehyd abgebaut. Ein weiteres Enzym, die Aldehyddehydrogenase-2, baut dieses Aldehyd weiter zu 5-Hydroxy-Indolyl-Essigsäure ab. Jedoch spielt diese Art des Abbaus bei Insekten eine eher untergeordnete Rolle (SLOLEY, 2004). Vielmehr geschieht die Inaktivierung von biogenen Aminen bei Insekten durch Acetylierungs- und Methylierungsreaktionen (WRIGHT, 1987; ROEDER ET AL., 2003) sowie durch *Ebony*-Proteine (PÉREZ ET AL., 2002; RICHARDT ET AL., 2003; PÉREZ ET AL., 2004).

1.1.2 Die Funktion von Serotonin bei der Honigbiene

ELOFSSON & KLEMM (1972) konnten erstmals biogene Amine im Gehirn von verschiedenen Arthropoden, darunter die Honigbiene, nachweisen. Seitdem wurde eine Vielzahl von Arbeiten publiziert, welche im Detail beschreiben, welches biogene Amin wo in welcher Invertebratenspezies vorkommt und welche Wirkungen durch diese Amine verursacht werden (Reviews: MERCER, 1987; HOMBERG, 1994; ROEDER, 1994).

Das biogene Amin Serotonin konnte anhand der *high performance liquid chromatography* (HPLC) im zentralen Nervensystem der Honigbiene nachgewiesen werden (MERCER ET AL., 1983). In quantitativen Analysen konnte ein 5-HT-Gehalt von 6-21 pmol im Bienenhirn festgestellt werden (TAYLOR ET AL., 1992; WAGENER-HULME ET AL., 1999). Dabei zeigen sich deutliche Unterschiede in Abhängigkeit vom Alter und der Kaste der Biene. Ältere Bienen zeigen deutlich höhere 5-HT-Konzentrationen als jüngere, speziell in den Pilzkörpern und den Antennalloben (HARRIS & WOODRING, 1992; SCHULZ & ROBINSON, 1999). TAYLOR ET AL. (1992) konnten zeigen, dass Sammlerbienen eine deutlich höhere 5-HT-Konzentration im Gehirn aufweisen als jüngere Bienen, welche ihre Arbeit im Stock verrichten. Von Juni bis September sind die höchsten 5-HT-Konzentrationen zu messen (HARRIS & WOODRING, 1992). Stress führt zu einem schnellen Anstieg der 5-HT-Konzentration im Gehirn der Honigbiene (HARRIS & WOODRING, 1992).

Mit spezifischen Antikörpern war es möglich, 5-HT im Nervensystem der Biene nachzuweisen (SCHÜRMAN & KLEMM, 1984; SCHÄFER & BICKER, 1986; SEIDEL & BICKER, 1996). Es konnten 75 Serotonin-immunreaktive Zellkörper im Deuto- und Protocerebrum der Honigbiene nachgewiesen werden. Diese Zahl erscheint vergleichsweise gering. Jedoch verzweigen diese Neuronen in fast alle Bereiche des Gehirns. Dies deutet darauf hin, dass 5-HT eine Vielzahl neuronaler Prozesse modulieren kann.

In der Tat konnten in den elektrophysiologischen- und Verhaltens-Experimenten Wirkungen von 5-HT gezeigt werden. Es reduziert konditionierte wie unkonditionierte Reaktionen auf olfaktorische und gustatorische Reize (MERCER & MENZEL, 1982; ERBER ET AL., 1993). Nach 5-HT-Injektion in die optischen Loben ist eine Abnahme der Richtungsspezifität der Antennenreaktionen auf visuelle Reize (ERBER & KLOPPENBURG, 1995) sowie eine Reduktion der Antworten und der Hintergrundaktivität von bewegungsempfindlichen Lobula-Neuronen zu verzeichnen (KLOPPENBURG & ERBER, 1995). 5-HT-Injektionen in den Dorsallobus reduzieren die antennale Abtastsequenz (PRIBBENOW & ERBER, 1996). Weiterhin konnte gezeigt werden, dass 5-HT-Injektionen in die Pilzkörper die Gedächtnisbildung und den Abruf von Gedächtnisinhalten blockieren (BICKER & MENZEL, 1989; MENZEL & MÜLLER, 1996).

1.2 G-Protein-gekoppelte Rezeptoren

G-Protein-gekoppelte Rezeptoren (*G-protein coupled Receptors*, GPCR) stellen die größte und vielseitigste Familie von Membranrezeptoren dar. Ihre Gene repräsentieren 1-5 % aller Gene von Vertebraten wie Invertebraten (BOCKAERT & PIN, 1999). Sie werden auch metabotrope Rezeptoren genannt, da sie externe Signale über Aktivierung von GTP-bindenden Proteinen in das Zellinnere weiterleiten. Sie unterscheiden sich damit deutlich von den sogenannten ionotropen Rezeptoren, welche ligandengesteuerte Ionenkanäle darstellen. GPCRs sind zu einem frühen Zeitpunkt in der Evolution entstanden und man kann sie in vielen Organismengruppen nachweisen. Dazu gehören Archae-Bakterien, Hefen, Pflanzen und Tiere (DOHLMAN ET AL., 1991; NEW & WONG, 1998; STEFAN ET AL., 1998; KROEZE ET AL., 2003). Doch nicht nur die Lebewesen, in denen GPCRs nachgewiesen werden konnten, sondern auch die GPCRs selbst sind außerordentlich divers. Dies zeigt sich unter anderem an der Vielfalt der Liganden. So können Photonen, Ionen, kleine Moleküle (Aminosäuren, biogene Amine, Nukleotide u. v. a.), Duftstoffe und Proteine als Liganden für GPCRs dienen (BOCKAERT & PIN, 1999; JACOBY ET AL., 2006).

1.2.1 Struktur von GPCRs

Trotz dieser großen Vielfalt weisen alle GPCRs wichtige Gemeinsamkeiten bezüglich ihrer Architektur auf (STRADER ET AL., 1995; GETHER, 2000; KROEZE ET AL., 2002; JACOBY ET AL., 2006). Sie bestehen aus einer Polypeptidkette. Diese bildet sieben α -Helices aus, welche eine hohe Hydrophobizität aufweisen und es daher ermöglichen, die Rezeptoren in der Zellmembran zu verankern. Stark konservierte Aminosäurereste (AS) in diesen Transmembrandomänen (TM) besitzen zudem wichtige Funktionen für die dreidimensionale Struktur der GPCRs, die einen hohen Grad an Konservierung in den unterschiedlichen Klassen der GPCRs aufweist (DAVIES

ET AL., 2007). Zudem spielen diese AS eine wichtige Rolle bei der Liganden-Bindung, der Konformationsänderung nach Aktivierung durch Liganden und der Di- und Oligomerisierung von Rezeptorproteinen. Die Bereiche zwischen den TM weisen dagegen einen sehr geringen Grad an Konservierung auf (LUTTRELL, 2008).

Der N-Terminus ist extrazellulär lokalisiert. Seine Bedeutung liegt unter anderem darin, dass er für den korrekten Transport und Einbau des Rezeptors in die Membran wichtig ist. Dafür kann er bei einigen Rezeptoren ein Signalpeptid aufweisen, welches nach dem Einbau in die Membran abgespalten wird (KAISER ET AL., 1987; CIOFFI ET AL., 1989; PAETZEL ET AL., 2002), oder glykosyliert sein. Weiterhin kann der N-Terminus spezielle Strukturen aufweisen, welche für die Bindung des Liganden verantwortlich sind. Außer dem N-Terminus sind noch drei Schleifen extrazellulär lokalisiert (*extracellular loop*, ECL), welche die TM2 und TM3, TM4 und TM5 bzw. TM6 und TM7 miteinander verbinden. Die ECL2 weist konservierte Cysteinreste auf, welche mit einem weiteren Cysteinst in der TM3 Disulfidbrücken ausbilden und damit die dreidimensionale Struktur des Rezeptors stabilisieren.

Die intrazellulären Schleifen (*cytoplasmic loop*, CPL) verbinden die TM1 und TM2, TM3 und TM4 bzw. die TM5 und TM6. Zusammen mit dem ebenfalls intrazellulär lokalisierten C-Terminus sind diese Bereiche an der Interaktion mit dem G-Protein beteiligt. Oft weisen diese Domänen Konsensusstellen für posttranslationale Modifikationen auf, wie zum Beispiel der Phosphorylierung bestimmter Aminosäurereste, welche der Regulation des Rezeptors dienen. Der C-Terminus wird häufig an einem konservierten Cysteinst rest palmitoyliert. Dadurch kann das Rezeptorprotein am C-Terminus ein weiteres Mal in der Membran verankert werden (O'DOWD ET AL., 1989; JIN ET AL., 1999; CHINI & PARENTI, 2009).

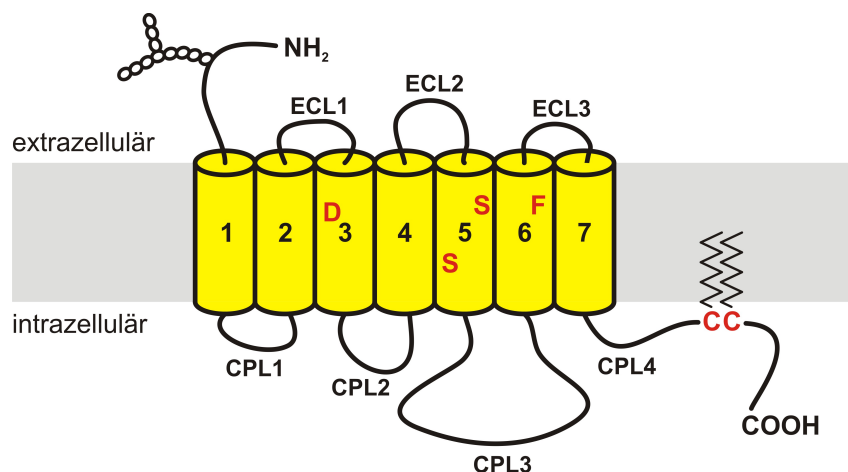


Abb. 2: Topographie eines G Protein-gekoppelten Rezeptors (verändert nach Blenau & Baumann, 2001). GPCRs besitzen einen extrazellulären N-Terminus welcher glykosyliert sein kann. Diesem schließen sich sieben hydrophobe transmembranale Segmente (TM 1-7) an, welche durch drei hydrophile extrazelluläre (ECL 1-3) und drei intrazelluläre Schleifen (CPL 1-3) verbunden sind. Der C-Terminus befindet sich auf der intrazellulären Seite der Membran. Durch die Insertion palmitoylierter Cysteinreste in die Membran kann eine vierte intrazelluläre Schleife (CPL 4) entstehen.

1.2.2 Klassifizierung von GPCRs

Aufgrund phylogenetischer Studien unterteilen FREDRIKSSON ET AL. (2003) die GPCRs in fünf Familien. Dass diese 5 Familien einen gemeinsamen Vorfahren besitzen, wie es durch SCHIÖTH & FREDRIKSSON (2005) postuliert wird, kann derzeit nicht sicher gesagt werden, da nur geringe Gemeinsamkeiten zwischen den Sequenzen der einzelnen Gruppen bestehen.

Die erste Familie, zu der unter anderem die metabotropen Glutamatrezeptoren gehören, zeichnet sich durch den Besitz eines großen N-Terminus aus, welcher den Liganden bindet (FREDRIKSSON ET AL., 2003). Zu den Liganden für diese Rezeptoren zählen neben Glutamat auch γ -Aminobuttersäure, Calcium und Geschmacksstoffe. Die zweite Familie bilden die sogenannten Adhäsions-GPCRs. Der N-Terminus ist bei diesen Rezeptoren ebenfalls verlängert und weist Domänen auf, welche bei anderen Proteinen gut charakterisiert sind. Dort besitzen diese Domänen wichtige Funktionen bei Protein-Protein-Interaktionen und der Zell-Adhäsion (YONA ET AL., 2008). Trotz geringer Gemeinsamkeiten auf struktureller und funktioneller Ebene wird die dritte Familie von den Glykoprotein-bindenden *Frizzled*-Rezeptoren und den Geschmacksrezeptoren der *taste2*-Gruppe gebildet. Das verbindende Merkmal der *frizzled/taste2*-Familie scheinen wenige gemeinsame, jedoch stark konservierte Motive zu sein, welche in keiner anderen der GRAFS-Gruppen vorkommen (FREDRIKSSON ET AL., 2003). Der Familie der Secretin-Rezeptoren dienen eher große Proteine als Liganden. Die Liganden weisen große Sequenzhomologien auf und wirken in der Regel parakrin.

Die weitaus größte Familie (90 % aller GPCRs) wird von den Rhodopsin-ähnlichen Rezeptoren gebildet. Allen Rezeptoren dieser Gruppe ist das stark konservierte E/DRY/F-Motiv an der Grenze der TM3 und der CPL2 sowie das NSxxNPxxY-Motif in der TM7 gemein. Die Rezeptoren dieser Familie besitzen sowohl endogene (biogene Amine, Peptide, Glykoproteine, Lipide, Chemokine u. v. a.) als auch exogene Liganden (Photonen, Geschmacks- und Duftstoffe, Pheromone). Die Rhodopsin-ähnlichen GPCRs lassen sich in vier weitere Gruppen unterteilen: die α -, die β -, die γ - und die δ -Gruppe. Von diesen vier Gruppen ist besonders die α -Gruppe zu erwähnen. Zu dieser zählen die aminergen GPCRs. Dieser Gruppe dienen strukturverwandte kleine Aminmoleküle als Liganden.

1.2.3 Die Signaltransduktion von GPCRs

Die Signaltransduktion von G-Protein-gekoppelten Rezeptoren umfasst mehrere große Schritte: die Bindung des Liganden, die Konformationsänderung des Rezeptors, die Aktivierung des G-Proteins, die Aktivierung weiterer Proteine durch das G-Protein und die G-Protein-Inaktivierung (BALLESTEROS ET AL., 2001; SHAPIRO ET AL., 2002).

Zunächst muss der Ligand den Rezeptor binden. Je nach Rezeptortyp kann dies an den unterschiedlichsten Domänen stattfinden. So können sich eine oder mehrere Bindungsstellen, abhängig von Art des Liganden und des Rezeptors, in Domänen im extrazellulären N-Terminus und den ECLs oder in den TMs befinden. Zudem können Proteinasen extrazelluläre Teile eines Rezeptors abspalten, woraufhin das gespaltene Rezeptorfragment an eine transmembranale Bindungsstelle bindet. Im zweiten Schritt der Signaltransduktion kommt es durch die Ligandenbindung zu einer Konformationsänderung des Rezeptors. Dabei ändert sich die relative Lage der TMs zueinander

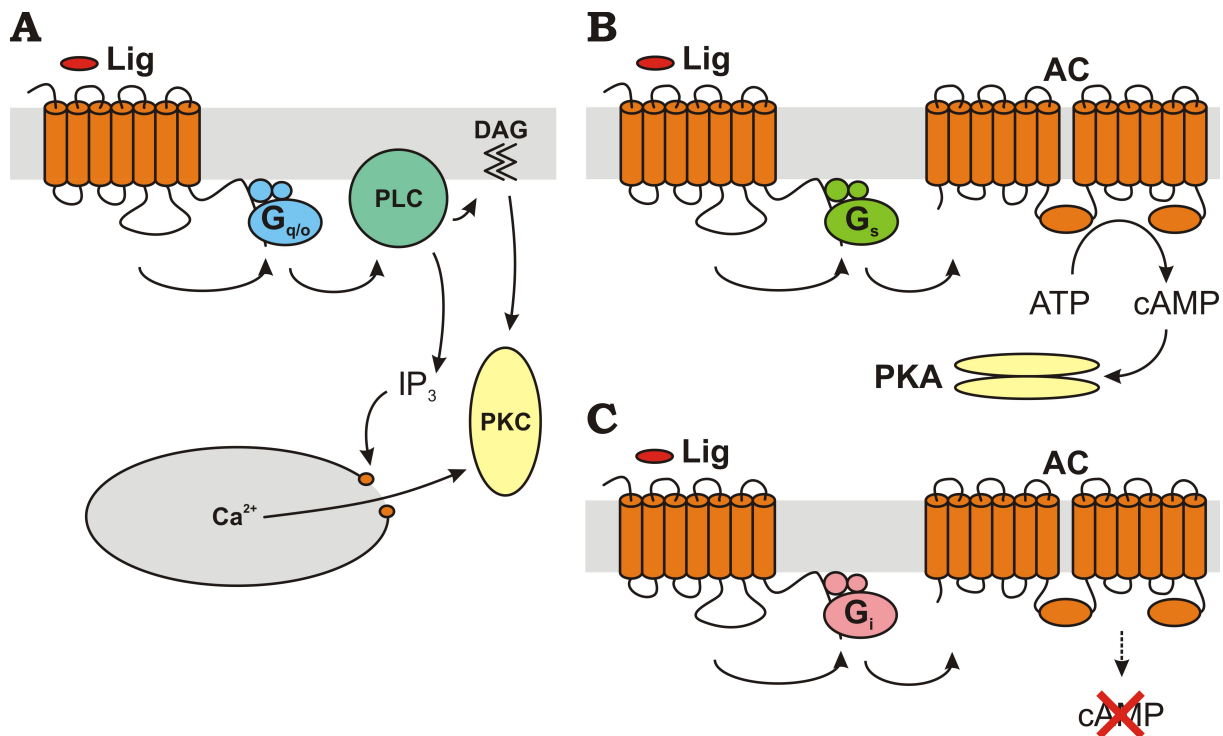


Abb. 3: Signalwege G-Protein-gekoppelter Rezeptoren. (nach BLENAU & BAUMANN, 2001)

A Nach der Bindung eines Liganden (Lig) an einen Rezeptor wird ein heterotrimeres G-Protein ($G_{q/o}$) aktiviert. Dies führt zur Stimulation der Phospholipase C (PLC), welche PIP_2 zu IP_3 und DAG hydrolysiert. IP_3 bindet intrazelluläre Rezeptoren, worauf die Freisetzung von Ca^{2+} erfolgt. Daraufhin wird die Proteinkinase C stimuliert.

B Die rezeptorvermittelte Aktivierung eines G_s -Proteins führt zur Stimulierung der Adenylylzyklase (AC). Das Enzym synthetisiert cAMP aus ATP. Der Anstieg der intrazellulären cAMP-Konzentration ($[cAMP]_i$) aktiviert die cAMP-abhängige Proteinkinase A (PKA).

C Die rezeptorvermittelte Aktivierung eines G_i -Proteins führt zur Inhibition der AC.

und es wird die Aktivierung des G-Proteins möglich (BALLESTEROS ET AL., 2001; SHAPIRO ET AL., 2002). Im Grundzustand liegen G-Proteine membranassoziiert vor und werden aus den Untereinheiten α , β und γ gebildet. Die α -Untereinheit besitzt eine Bindungsstelle für Guanosin-triphosphat (GTP) bzw. Guanosindiphosphat (GDP). In der inaktiven Form ist GDP gebunden. Wird nun in Folge der Konformationsänderung des Rezeptors das G-Protein aktiviert, so ändert sich die Affinität für GDP und es wird gegen GTP ausgetauscht (BRANDT & ROSS, 1985; HIGASHIJIMA ET AL., 1987). Das G-Protein wird instabil und es dissoziiert in die α -Untereinheit und das $\beta\gamma$ -Dimer (JACOBY ET AL., 2006; MILLIGAN & KOSTENIS, 2006). Sowohl die α -Untereinheit als auch der $\beta\gamma$ -Komplex sind in der Lage, Enzyme in ihrer Aktivität zu beeinflussen (z.B. Adenylylzyklase oder Phospholipase C). In der Folge ändert sich die Konzentration von *second messenger*-Molekülen (z. B. cAMP, IP_3 ; LUTTRELL, 2008). Der letzte Schritt beinhaltet die G-Protein-Inaktivierung. Die α -Untereinheit des G-Proteins besitzt eine intrinsische GTPase-Aktivität. GTP wird in GDP und P_i gespalten. Die dissoziierten Untereinheiten des G-Proteins können reassoziieren und an einen Rezeptor binden (WESS, 1997).

Es konnte gezeigt werden, dass verschiedene Isoformen der jeweiligen Untereinheiten existieren, welche sich in unterschiedlichen Kombinationen zusammenlagern können (DOWNES & GAUTAM, 1999; HERMANS, 2003; WONG, 2003). Dies hat Folgen für die Signalwege, welche durch die

G-Proteine aktiviert werden. Hier sollen die wichtigsten kurz erläutert werden. G_s - und G_i -Proteine interagieren mit Adenylzyklasen (adenyl cyclase, AC). G_s -Proteine aktivieren die AC, worauf es zu einem Anstieg der cAMP-Konzentration in der Zelle kommt (Abb. 3 B). Dagegen wirken G_i -Proteine inhibierend auf die AC (Abb. 3 C). G_q -Proteine stimulieren die PLC (Abb. 3 A). Dadurch kommt es zur Synthese von Inositol-1,4,5-trisphosphat (IP_3) und Diacylglycerol (DAG). Der Anstieg der intrazellulären IP_3 -Konzentration führt wiederum über die Bindung an spezifische Rezeptoren in der Membran des endoplasmatischen Retikulums, zu einem Anstieg der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration. Die beschriebenen sekundären Botenstoffe (*second messenger*) führen durch die Modulation ausgewählter Proteine zur Fortsetzung der Signalkaskade.

Im Endeffekt führt die Aktivierung eines GPCR zur Änderung des Phosphorylierungsmusters in einer Zelle und damit zum Beispiel der Veränderung der elektrischen Leitfähigkeit der Zellmembran (Phosphorylierung von Ionenkanälen) oder der Genexpression in der Zelle (Phosphorylierung von Transkriptionsfaktoren).

1.2.4 Inaktivierung von GPCRs

Für die Inaktivierung von GPCRs stehen verschiedene Rückkopplungs-Mechanismen zur Verfügung. Es besteht die Möglichkeit, Serin- oder Threoninreste intrazellulärer Bereiche des Rezeptorproteins zu phosphorylieren, wodurch eine Konformationsänderung verursacht wird. Diese hat zur Folge, dass die Bindung des Liganden oder G-Proteins beeinträchtigt wird (CARMAN & BENOVIC, 1998). Zu den Enzymen, welche diese Modifizierung katalysieren, gehören unter anderem die cAMP-abhängige Proteinkinase A (PKA) und die DAG- und Ca^{2+} -aktivierte Proteinkinase C (PKC) (RAYMOND, 1991; FREEDMAN ET AL., 1995; WILLETS ET AL., 2003). Desweiteren können GPCRs durch spezielle Rezeptorkinasen (G-Protein-gekoppelte Rezeptorkinasen, GRKs) phosphoryliert werden. Dadurch wird die Affinität der Rezeptorproteine für β -Arrestin erhöht (LEURS ET AL., 1998). β -Arrestin-Bindung blockiert die Wechselwirkung des Rezeptors mit dem G-Protein, wodurch die Signaltransduktion unterbrochen wird. Außerdem vermittelt β -Arrestin die Bindung von Clathrin, wodurch die Internalisierung des Rezeptors initialisiert werden kann. Es lagern sich viele Clathrin-Moleküle zusammen und es kommt zur Abschnürung von Vesikeln (*Clathrin coated vesicles*). Die Rezeptorproteine können nach der Abspaltung der Phosphatreste durch Phosphatasen recycelt und wieder in die Membran eingebaut oder mittels Proteasen abgebaut werden (LEURS ET AL., 1998; OAKLEY ET AL., 2001).

1.2.5 Konstitutive Aktivität und G-Protein-unabhängige Aktivierung

Die geschilderte Abfolge der Signalübertragung bei der als Folge der Ligandenbindung das G-Protein aktiviert wird, ist nicht die einzige Möglichkeit, wie ein GPCR wirken kann.

In einer Vielzahl jüngerer Arbeiten konnte gezeigt werden, dass GPCRs, sollte kein Ligand anwesend sein, nicht zwingend inaktiv sind. Man spricht in diesem Fall von Agonist-unabhängiger oder konstitutiver Aktivität. Unabhängig von der Anwesenheit eines Agonisten, befinden sich diese Rezeptoren in einem thermodynamischen Gleichgewicht zwischen aktiver und inaktiver Form. Bindet ein Agonist, so stabilisiert er den aktiven Zustand des Rezeptors und es kommt zur

Aktivierung des G-Proteins (s. o.). Der inaktive Zustand kann ebenfalls stabilisiert werden. Liganden welche dies vermitteln, nennt man inverse Agonisten. Ein neutraler Antagonist dagegen verhindert sowohl die Bindung von Agonisten als auch von inversen Agonisten.

Desweiteren existieren neben der Kopplung an G-Proteine weitere Interaktionsmöglichkeiten mit intrazellulären Proteinen. Die bereits erwähnten β -Arrestine vermitteln nicht nur die Internalisation von GPCRs, sondern sind auch an der Aktivierung von G-Protein-unabhängigen Signalwegen beteiligt (SMITH & LUTTRELL, 2006; DEFEA, 2008). Viele weitere Proteine können an intrazelluläre Domänen binden und eröffnen damit die Möglichkeit weiterer Interaktionen. Dazu gehören zum Beispiel monomere G-Proteine und Proteine mit SH2-, SH3- oder PDZ-Domänen (HALL ET AL., 1999).

Auch die Oligomerisierung von GPCRs wird mit zunehmendem Interesse untersucht (CANALS ET AL., 2003; PARK ET AL., 2004; PARK & PALCZEWSKI, 2005). Durch die Zusammenlagerung gleicher oder verschiedener GPCRs zu einer funktionellen Einheit, können neue strukturelle und pharmakologische Eigenschaften entstehen.

1.2.6 G-Protein-gekoppelte Serotonin-Rezeptoren

GADDUM & PICARELLI (1957) konnten erstmals zeigen, dass Serotonin-Wirkungen in verschiedenen Geweben durch unterschiedliche Pharmaka geblockt werden können. Daraus schlossen sie, dass Serotonin unterschiedliche Rezeptoren anspricht. Bis heute konnte eine Vielzahl verschiedener Gene isoliert werden, welche für G-Protein-gekoppelte 5-HT-Rezeptoren kodieren (RAYMOND ET AL., 2001). Diese werden nach strukturellen, pharmakologischen und funktionellen Charakteristika in 6 Gruppen unterteilt (HOYER ET AL., 1994, 2002; NICHOLS & NICHOLS, 2008). 5-HT₁-Rezeptoren sind an G_i-Proteine gekoppelt und hemmen somit bei Aktivierung die AC. Die 5-HT₂-Rezeptoren stimulieren über die Kopplung an G_q-Proteine die PLC. Die Kopplung an G_s-Proteine ist bei allen Vertretern der 5-HT₄-, 5-HT₆- und 5-HT₇-Rezeptoren zu finden, wobei sich die einzelnen Gruppen deutlich in ihren molekularen und pharmakologischen Eigenschaften unterscheiden (GERHARDT & VAN HEERIKHUIZEN, 1997; HANNON & HOYER, 2008). Diverse Arbeiten deuten darauf hin, dass die 5-HT₅-Rezeptoren verschiedene *second-messenger*-Systeme ansprechen, da sie die AC hemmen, aber auch Wirkungen hervorrufen, welche auf einem intrazellulären Ca²⁺-Anstieg beruhen. Über die beteiligten G-Proteine herrscht bisher noch keine Klarheit (RAYMOND ET AL., 2001; NODA ET AL., 2004). Dieser hohe Grad an Diversität und Komplexität unter den Rezeptoren wird durch Mechanismen wie alternatives Spleißen und Rezeptoroligomerisation weiter erhöht.

Bei Vertebraten konnten bis heute 13 verschiedene Gene identifiziert werden, welche sich auf die beschriebenen Gruppen aufteilen (RAYMOND ET AL., 2001). Hohe Rezeptordichten sind zum Beispiel im ZNS, im Gastrointestinaltrakt, im Herz-Kreislaufsystem und im Blut zu finden (HOYER ET AL., 2002). Ist die Signaltransduktion der Serotonin-Rezeptoren gestört, so kann sich dies durch Krankheiten wie Migräne, Depression, Schizophrenie und Essstörungen äußern (HEDLUND & SUTCLIFFE, 2004; MELTZER ET AL., 2003; SAVITZ ET AL., 2009; GEYER & VOLLENWEIDER, 2008).

Die ersten konkreten Hinweise auf das Vorkommen von Serotonin-Rezeptoren bei Invertebraten lieferten Bindungsstudien bei Schaben (NATHANSON & GREENGARD, 1974), elektrophysiologische Untersuchungen bei *Aplysia* (GERSCHENFELD & PAUPARDIN-TRITSCH, 1974) und physiologische Untersuchungen an der Speicheldrüse von *Calliphora vicina* (BERRIDGE & HESLOP, 1981). WITZ ET AL. (1990) konnten mit 5-HT-dro1 (Umbenennung in Dm5-HT₇; TIERNEY, 2001) den ersten 5-HT-Rezeptor eines Insekts klonieren. Bis heute konnten viele weitere 5-HT-Rezeptoren aus Insekten isoliert und charakterisiert werden. Darunter befindet sich auch der Am5-HT₇-Rezeptor (SCHLENSTEDT ET AL., 2006), welcher den ersten charakterisierten 5-HT-Rezeptor der Honigbiene darstellt.

Tab. 1: Charakterisierte G-Protein-gekoppelte 5-HT-Rezeptoren verschiedener Insekten-spezies.

Insektenspezies	Rezeptor	Signalweg	Referenz
<i>Aedes aegypti</i>	Aa5-HT ₇	[cAMP] _i ↑	LEE & PIETRANTONIO (2003)
<i>Apis mellifera</i>	Am5-HT ₇	[cAMP] _i ↑	SCHLENSTEDT ET AL. (2006)
<i>Bombyx mori</i>	Bm5-HT ₁	[cAMP] _i ↓	VON NICKISCH-ROSENEGK ET AL. (1996)
<i>Drosophila melanogaster</i>	Dm5-HT _{1A}	[cAMP] _i ↓	SAUDOU ET AL. (1992)
	Dm5-HT _{1B}	[cAMP] _i ↓	OBOSI ET AL. (1996)
	Dm5-HT ₂	[Ca ²⁺] _i ↓	COLAS ET AL. (1995)
	Dm5-HT ₇	[cAMP] _i ↓	WITZ ET AL. (1990)
<i>Heliothes virescens</i>	Hv5-HT ₁	nicht untersucht	VON NICKISCH-ROSENEGK ET AL. (1996)
<i>Manduca sexta</i>	Ms5-HT _{1A}	nicht untersucht	DACKS ET AL. (2006)
	Ms5-HT _{1B}	nicht untersucht	DACKS ET AL. (2006)
<i>Papilio xuthus</i>	Bm5-HT ₁	[cAMP] _i ↓	ONO & YOSHIKAWA (2004)
<i>Periplaneta americana</i>	Pea5-HT ₁	[cAMP] _i ↓	TROPFMANN ET AL. (2009)

1.3 Zielsetzung der Arbeit

Serotonin ist ein wichtiges Signalmolekül beim Modellorganismus Honigbiene. Hier beeinflusst Serotonin verschiedene physiologische Prozesse, Sinnesleistungen, das Verhalten (z.B. Lernen und Gedächtnisbildung) und Entwicklungsprozesse. In einem deutlichen Missverhältnis zur Bedeutung des serotonergen Systems steht dagegen das lückenhafte Wissen über die G-Protein-gekoppelten Serotonin-Rezeptoren der Honigbiene. Im Gegensatz dazu sind Rezeptoren für Dopamin (BLENAU ET AL., 1998; HUMPHRIES ET AL., 2003; MUSTARD ET AL., 2003; BEGGS ET AL., 2005), für Tyramin (BLENAU ET AL., 2000) und Oktopamin (GROHMANN ET AL., 2003) bereits charakterisiert. Bisher ist dagegen lediglich ein Serotonin-Rezeptor (Am5-HT₇, SCHLENSTEDT ET AL., 2006) der Honigbiene molekular und pharmakologisch charakterisiert worden. Das wird der enormen Bedeutung des serotonergen Systems und der enormen Diversität der Serotonin-Rezeptoren nicht gerecht. Die Rezeptoren stellen einen wichtigen Bestandteil des serotonergen Systems dar. Für das Verständnis der Komplexität des serotonergen Systems ist es daher unumgänglich, diese Rezeptoren zu charakterisieren. Mit dieser Arbeit sollte der Kenntnisstand über die Serotonin-Rezeptoren der Honigbiene entscheidend erweitert werden.

In einem ersten Schritt sollten bioinformatische und molekularbiologische Methoden genutzt werden, um die cDNAs weiterer G-Protein-gekoppelter Serotonin-Rezeptoren zu isolieren. Die Informationen, die daraus gewonnen werden können, sollen zur Klassifikation der Rezeptoren beitragen. Identifizierte Rezeptoren sollten in einem heterologen Expressionssystem exprimiert und ihre funktionelle Kopplung an intrazelluläre Signalwege untersucht werden. Zugleich sollten pharmakologische Profile für die einzelnen Rezeptoren erstellt werden. Weiterhin sollten Analysen durchgeführt werden, welche dazu dienen die Expressionsmuster der einzelnen RezeptormRNAs und -Proteine zu ermitteln. Hierfür sollten Antikörper gegen spezifische Bereiche der Rezeptorproteine generiert werden und in immunhistochemischen Analysen eingesetzt werden. Die gesammelten Informationen sollen schließlich genutzt werden, um Hypothesen über die physiologischen Funktionen der Rezeptoren aufzustellen und zu überprüfen.

2 Material und Methoden

2.1 Bezugsquellen

Chemikalien

Chemikalien wurden von den Firmen Sigma (München), Roth (Karlsruhe) und Merck (Darmstadt) bezogen. Bei hiervon betroffenen Ausnahmen ist die Bezugsquelle der Substanz im Text genannt. Sofern nicht anders erwähnt, wurden die verwendeten Lösungen mit sterilem, bidestilliertem Wasser (ddH₂O) angesetzt.

Verbrauchsmaterialien

Pipettenspitzen (0,1-10 µl)	VWR (Darmstadt)
Pipettenspitzen (5-200 µl)	Roth (Karlsruhe)
Pipettenspitzen (100-1.000 µl)	VWR (Darmstadt)
Pipettenspitzen (1.000-5.000 µl)	Roth (Karlsruhe)
Thermo-Tube (0,5 ml)	ABgene (Epsom)
Reaktionsgefäß (0,5 ml)	Eppendorf (Hamburg)
Reaktionsgefäß (1,5 ml)	Eppendorf (Hamburg)
Reaktionsgefäß (2,0 ml)	Eppendorf (Hamburg)
Reaktionsgefäß (15 ml)	VWR (Darmstadt)
Reaktionsgefäß (50 ml)	VWR (Darmstadt)
UV-Küvette (70 µl)	Brand (Wertheim)
UV-Küvette (1,5 ml)	Roth (Karlsruhe)

Enzyme

PNGase F	New England Biolabs (Frankfurt am Main)
Taq-Polymerase	roboklon (Berlin)
Bioline-X-ACT Short	Bioline (Luckenwalde)
T4-DNA-Ligase	Bioline (Luckenwalde)
RNase-Cocktail	Ambion (Austin)
DNase I	Sigma (Taufkirchen)
Restriktionsendonukleasen	New England Biolabs (Frankfurt am Main)

Antikörper

anti-5-HT	Chemicon - Millipore (Billerica)
anti-HA	Roche Applied Science (Mannheim)
anti-rabbit HRP	Jackson ImmunoResearch Laboratories (Suffolk)
anti-rabbit Alexa568	Molecular Probes - Invitrogen (Karlsruhe)

anti-rabbit Alexa488	Molecular Probes - Invitrogen (Karlsruhe)
anti-rat HRP	American Qualex Antibodies (La Mirada)
anti-rat Cy3	Jackson ImmunoResearch Laboratories (Suffolk)
anti-mouse HRP	Jackson ImmunoResearch Laboratories (Suffolk)
anti-mouse Alexa568	Molecular Probes - Invitrogen (Karlsruhe)

Vektoren

pBluescript SK-	Stratagene (Amsterdam)
pcDNA 3.1(+)	Invitrogen (Karlsruhe)
pET-30a	Novagen (Darmstadt)
pGEM-T	Promega (Mannheim)
pMal-c2X	New England Biolabs (Frankfurt am Main)

Bakterienstämme

<i>E. coli</i> JM109	Stratagene (Amsterdam)
<i>E. coli</i> BL21(DE3)pLysS	Novagen (Darmstadt)

Vom Hersteller bezogene Chemikalienszusammenstellungen (Kits)

Micro-FastTrack™ 2.0	Invitrogen (Karlsruhe)
Superscript™ First-Strand Synthesis System for RT-PCR	Invitrogen (Karlsruhe)
AccuScript™ High Fidelity ^{1st} Strand cDNA Synthesis	Stratagene (Amsterdam)
High Pure PCR Product Purification Kit	Roche Applied Science (Mannheim)
peqGOLD Plasmid Miniprep Kit I	peqLab (Erlangen)
cyclic AMP [³ H] Assay System	GE Healthcare (München)

Geräte

Mixer UZUSIO VTX-3000L	Laboratory & Medical Supplies (Tokyo)
Variomag Electronicrührer Mono	H&P Labortechnik (Minden)
Thermomixer comfort	Eppendorf (Hamburg)
Electrophoresis Power Supply - EPS 600	Pharmacia Biotech (Düßeldorf)
PCR-Maschine T3 Thermocycler	Biometra (Göttingen)
Gel-Dokumentation Gelsystem 8Entry	Biostep (Jahnsdorf)
UV-Illuminator	Vilber Lourmat (Marne La Vallée)

Agarose-Horizontalgelelektrophorese	Amersham Bioscience (Freiburg)
Hofer TM HE33 PAGE-Elektrophorese im Vertikalsystem	Bio-Rad (München)
Mini Protean IITM Protein-Transfer Trans Blot SD	Bio-Rad (München)
GeneQuant 1300	GE-Healthcare (Uppsala)
Tischzentrifuge UECI	UniEquip (Martinsried)
Tischzentrifuge Biofuge pico	Heraeus (Hanau)
Kühlzentrifuge Biofuge 15R	Heraeus (Hanau)
Vakuumbzentrifuge	Bachofer (Reutlingen)
Warmluftschüttler Shaker ES-70	Peqlab (Erlangen)
Gefriermikrotom HM 500 OM	Microm (Walldorf)
konfokales Mikroskop LSM710	Zeiss (Jena)
Milli-Q Reference Ultrapure Water Purification System	Millipore (Schwalbach)
Fluoreszenz-Lesegerät FluoStarGalaxy	BMG Labtech (Offenburg)

2.2 Standardlösungen

Tris-EDTA(TE)-Puffer	10 mM Tris-HCl (pH 7,4) 1 mM EDTA
Phosphat-gepufferte Salzlösung (PBS)	140 mM NaCl 2,6 mM KCl 8,1 mM Na ₂ HPO ₄ 1,5 mM KH ₂ PO ₄ pH 7,4

2.3 Versuchstiere

Bienen der Unterart *Apis mellifera carnica* POLLMANN wurden freundlicherweise von Prof. Dr. Joachim Erber (Technische Universität Berlin) zur Verfügung gestellt.

2.4 Präparation

Präparation von Gehirn und Unterschlundganglion

Die Bienen wurden durch Herunterkühlen immobilisiert und anschließend in Metallröhrchen mit Gewebeband fixiert. Die Unterseite des Kopfes wurde zusätzlich mit Hilfe von Bienenwachs an dem Metallröhrchen und der Hinterrand des Kopfes am Gewebeband fixiert. Die Antennen wurden entfernt. Die Kopfkapsel wurde durch Schnitte an der Kopfperipherie und überhalb des Antennenansatzes geöffnet. Drüsen- und Tracheengewebe, sowie der Oesophagus wurden sorgfältig entfernt. Das Gehirn und das Unterschlundganglion wurden mit einer gebogenen Pinzette entnommen und in ein mit eiskaltem Ringer gefülltes Blockschälchen überführt. Das Gehirn wurde von Tracheen und weiterem anhängenden Gewebe befreit und konnte direkt weiterverwendet oder in flüssigem Stickstoff eingefroren werden.

Präparation von Organen und Geweben in Thorax und Abdomen

Einer dekapitierten Biene wurden die Extremitäten entfernt. Die Präparation fand in einem mit Bienenwachs gefülltem Blockschälchen statt. Das Bienenwachs wurde lokal verflüssigt und die Biene an der Unterseite von Thorax und Abdomen fixiert. Anschließend erfolgte die Öffnung des Thorax durch einen beiderseitigen Schnitt von anterior nach posterior unterhalb des Flügelansatzes. Jetzt lag der Thorax eröffnet vor und die Organe/Gewebe konnten entnommen werden. Das Abdomen wurde durch einen beiderseitigen medianen Schnitt eröffnet und die Organe/Gewebe konnten entsprechend entnommen werden. Die Organe/Gewebe wurden direkt weiterverwendet oder in flüssigem Stickstoff eingefroren.

2.5 Molekularbiologische Methoden

2.5.1 RNA-Extraktion

Die RNA wurde mittels zweier verschiedener Methoden aus Gewebe isoliert. Die Gesamt-RNA-Extraktion mit TRIZOL™ wurde verwendet, wenn viel Gewebe vorlag und eine hohe Ausbeute erzielt werden sollte. Da für die Untersuchungen in der vorliegenden Arbeit die mRNA benötigt wurde, schloss sich die Extraktion der mRNA mittels Micro-FastTrack™ 2.0 an. Die zweite Methode (Micro-FastTrack™ 2.0) wurde genutzt, wenn direkt aus einem einzigen Bienenhirn isoliert werden sollte.

Gesamt-RNA-Extraktion mit TRIZOL™ LS Reagent (GIBCO-BRL)

Je 50 Bienenhirne wurden mit 750 µl TRIZOL™ versetzt, homogenisiert und 5 min bei RT inkubiert. Es folgte die Zugabe von 200 µl Chloroform je 750 µl TRIZOL™. Nach 10 min Inkubation bei RT, erfolgte eine Phasentrennung mittels Ultrazentrifugation (15 min, 12.000 x g, 4 °C). Die wässrige Phase (RNA-haltig) wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt, mit 500 µl Isopropanol versetzt und 10 min bei RT stehen gelassen. Die RNA wurde bei 12.000 x g (10 min, 4 °C) präzipitiert. Das dabei entstandene RNA-Pellet wurde mit 1 ml eiskaltem 75 % EtOH gewaschen. Abschließend wurde das Pellet getrocknet und in 50 µl DEPC-H₂O gelöst. Es schloss sich die Isolierung der poly(A)⁺-mRNA an.

Aufarbeitung des Gewebes für die direkte mRNA-Extraktion mit Micro-FastTrack

Das gefrorene Gewebe wurde in einem Reaktionsgefäß zerkleinert und sofort mit 1 ml 45 °C warmem *Lysis Buffer* versetzt. Durch wiederholtes Aufziehen mit der Pipette erfolgte die Homogenisation des Gewebes. Es folgte die Lyse für 20 min bei 45 °C. Mittels Sedimentieren (5 min, 4.000 x g, RT) wurden die löslichen von den nicht löslichen Bestandteilen getrennt. Der Überstand (RNA-haltig) wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt, mit 63 µl 5 M NaCl-Lösung versetzt und gut durchmischt. Es schloss sich die Isolierung der poly(A)⁺-mRNA an.

mRNA-Extraktion mit Micro-FastTrack

Im Fall der mittels TRIZOL™ extrahierten Gesamt-RNA wurden 500 µg RNA in 1 ml *Binding Buffer* gelöst. Es folgt die Inkubation für 5 min bei 65 °C und 1 min auf Eis. Danach wird die Lösung in ein oligo(dT)-enthaltendes Reaktionsgefäß überführt. Im Fall der Gesamt-RNA aus

einem Dronengehirn wurde das Lysat in ein oligo(dT)-enthaltendes Reaktionsgefäß überführt. Alle weiteren Schritte sind für beide Methoden identisch.

Nach dem Schwellen der oligo(dT)-Cellulose erfolgte die Inkubation bei RT für 20 min auf der Schüttelplattform (Binden der poly(A)⁺-mRNA an die oligo(dT)-Cellulose). Danach wurde 5 min bei 4.000 x g zentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Pellet wurde in 1,3 ml *Binding Buffer* resuspendiert und anschließend 5 min bei 4.000 x g zentrifugiert. Dieser Waschschrift wurde wiederholt, bis der Überstand nicht mehr trüb war. Anschließend wurde das Pellet in 300 µl *Binding Buffer* resuspendiert und in die *Spin-column* überführt. Nach 10 s sedimentieren bei 4.000 x g wurden 500 µl *Binding Buffer* zugegeben und nochmals 10 s bei 4.000 x g zentrifugiert. Das Waschen wurde wiederholt bis die optische Dichte des Durchflusses bei OD₂₆₀ < 0,05 lag. Danach wurde die oligo(dT)-Cellulose in 200 µl *Low Salt Wash Buffer* vorsichtig resuspendiert und für 10 s bei 4.000 x g zentrifugiert. Der letzte Schritt wurde einmal wiederholt. Die *Spin-Column* wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Die poly(A)⁺-mRNA wurde durch zweimalige Zugabe von 100 µl *Elution Buffer* und anschließender Ultrazentrifugation (10 s, 4.000 x g, RT) gelöst. Die mRNA konnte sofort weiterverwendet werden oder mittels 10 µl *Glycogen-Carrier* (2 mg/ml), 30 µl Natriumacetat (2 M) und 600 µl Ethanol (100 %) gefällt und bei -80 °C aufbewahrt werden.

2.5.2 cDNA-Synthese

cDNA Synthese mittels SuperscriptTM First-Strand Synthesis System for RT-PCR

Die cDNA-Synthese wurde immer in Doppelansätzen durchgeführt. Dabei kamen in einem Ansatz Oligo(dT)-Primer zum Einsatz (Ansatz I_{oligo}) und in dem anderen *Random*-Primer (Ansatz II_{random}). Folgende Reagenzien wurden zusammengegeben und gut vermischt:

Reagenz	I _{oligo}	II _{random}
RNA (0,5 µg/µl)	1 µl	1 µl
dNTP mix (10 mM je dATP, dCTP, dGTP, dTTP)	1 µl	1 µl
Oligo(dT)-Primer (12-18-mer, 0,5 µg/µl)	1 µl	-
<i>Random</i> -Primer (6-mer, 50 ng/µl)	-	1 µl
DEPC-H ₂ O	7 µl	7 µl

Jetzt erfolgte nacheinander die Inkubation bei 65 °C für 5 min und auf Eis für 1 min. Anschließend wurde jedem Ansatz folgendes zugegeben:

Reagenz	je Ansatz
Reverse-Transkriptase-Puffer (10 x)	2 µl
MgCl ₂ (25 mM)	4 µl
DTT (0,1 M)	2 µl
RNase out TM (40 U/µl)	1 µl

Es folgten 2 min bei 42 °C für Ansatz I_{oligo} und 2 min bei 25 °C für Ansatz II_{random}. Im Anschluss daran wurde je 1 µl SuperscriptTM II Reverse Transkriptase (50 U/µl) zugegeben. Die reverse Transkription wurde unter folgenden Bedingungen durchgeführt:

Ansatz I_{oligo}:	42 °C, 50 min	Ansatz II_{random}:	25 °C, 10 min
	70 °C, 15 min		42 °C, 50 min
			70 °C, 15 min

Abschließend wurde jeder Ansatz mit 1 µl RNase H (2 U/µl) versetzt und die RNA für 20 min bei 37 °C verdaut. Die cDNA konnte sofort weiterverwendet werden oder wurde bei -20 °C aufbewahrt.

cDNA Synthese mittels AccuScript™ High Fidelity 1st Strand cDNA Synthesis

Die Accuscript™-Reverse-Transkriptase wurde eingesetzt um Basenaustausche während der reversen Transkription möglichst gering zu halten. Bei dieser Art der cDNA-Synthese wurden ebenfalls Oligo(dT)-Primer und *Random*-Primer eingesetzt. Folgende Reagenzien wurden zusammengesetzt und gut vermischt:

Reagenz	I _{oligo}	II _{random}
RNA (0,2 - 5 µg/µl)	1 µl	1 µl
dNTP mix (25 mM je dATP, dCTP, dGTP, dTTP)	1 µl	1 µl
Oligo(dT)-Primer (18-mer, 0,5 µg/µl)	1 µl	-
<i>Random</i> -Primer (9-mer, 0,1 µg/µl)	-	1 µl
DEPC-H ₂ O	11,2 µl	11,2 µl
AccuScript-RT-Puffer (10 x)	2 µl	2 µl

Jetzt erfolgte die Inkubation bei 65 °C für 5 min und anschließend bei 20 °C für 5 min. Danach wurde jedem Ansatz folgendes zugegeben:

Reagenz	je Ansatz
Accuscript-Reverse-Transkriptase	0,5 µl
DTT (0,1 M)	2 µl
RNase-Block (40 U/µl)	0,5 µl

Die reverse Transkription wurde unter folgenden Bedingungen durchgeführt:

Ansatz I_{oligo}:	42 °C, 60 min	Ansatz II_{random}:	25 °C, 10 min
	70 °C, 10 min		42 °C, 50 min
			70 °C, 10 min

Abschließend erfolgte der Verdau der RNA-Matrize durch die Zugabe von 1 µl RNase H (2 U/µl) und anschließender Inkubation bei 37 °C für 20 min. Die cDNA wurde sofort weiterverwendet oder bei -20 °C aufbewahrt.

2.5.3 Polymerase-Kettenreaktion

Mit Hilfe der Polymerase-Kettenreaktion (*Polymerase Chain Reaction*, PCR) konnten definierte DNA-Abschnitte amplifiziert werden. Als Matrize diente hierbei Bienen-cDNA (siehe Seite 16, Abschnitt 2.5.2). Folgende Reagenzien wurden in einem Reaktionsgefäß vereinigt:

Reagenz	ohne <i>proofreading</i>	mit <i>proofreading</i>
cDNA	0,5-5 µl	0,5-5 µl
10 x Amplibuffer B (roboklon)	5 µl	-
10 x Optibuffer (BIOLINE)	-	5 µl
dNTPs (25 mM je dATP, dCTP, dGTP, dTTP)	0,5 µl	0,5 µl
<i>Forward</i> -Primer (10 µM)	1 µl	1 µl
<i>Reverse</i> -Primer (10 µM)	1 µl	1 µl
Taq-Polymerase (5 U/µl, roboklon)	0,5 µl	-
BIO-X-ACT Short (4 U/µl, BIOLONE)	-	1 µl
ddH ₂ O	ad 50 µl	ad 50 µl

Die Reaktionen wurden unter folgenden Bedingungen durchgeführt:

Denaturierung		94 °C, 150 s	94 °C, 150 s
Denaturierung		94 °C, 40 s	94 °C, 40 s
Hybridisierung) 35 Zyklen	55 - 65 °C, 40 s	55 - 65 °C, 40 s
Elongation		72 °C, 150 s	68 °C, 150 s
Finale Elongation		72 °C, 600 s	68 °C, 600 s

2.5.4 Agarose-Gelelektrophorese

Die Auftrennung und Identifizierung von DNA-Fragmenten erfolgte in 0,8-1,5 %igen Agarosegelen. Hierfür wurde die entsprechende Menge Agarose in 1 x TAE-Puffer durch Erhitzen gelöst. Das flüssige Gel und der Laufpuffer (1 x TAE-Puffer) wurden mit Ethidiumbromid (1 µg/ml) versetzt, um die DNA unter UV-Licht-Anregung (300-365 nm) sichtbar machen zu können. Die DNA wurde mit 0,2 Vol Gelladepuffer versetzt und auf das Gel aufgetragen. Als Größenstandards dienten 100 bp DNA-*Ladder* und 1 kb DNA-*Ladder* (jeweils New England Biolabs). Die Auftrennung erfolgte bei einer Spannung von 70-80 V.

50 x TAE Puffer: 1,5 M Tris-Base; 60 mM EDTA; 5,71 % (v/v) Essigsäure

Gelladepuffer: 0,25 % (w/v) Bromphenolblau; 0,25 % (w/v) Xylencyanol; 30 % (v/v) Glycerol

2.5.5 DNA-Fragment-Reinigung

Mit Hilfe des *High Pure PCR Product Purification*-Kit (Roche Applied Science) konnten DNA-Fragmente sowohl aus PCR-Reaktionen als auch aus Agarose-Gelen aufgereinigt werden.

50 µl PCR-Produkt wurden mit 250 µl *Binding-Buffer* versetzt, gut vermischt und auf den *High-Pure*-Filter überführt. Für 100 mg Agarose-Gel wurden 300 µl *Binding-Buffer* verwendet. Die Auflösung des Gelstücks erfolgte bei 56 °C. Anschließend wurde die Lösung mit 150 µl Isopropanol je 100 mg Agarose-Gel versetzt, gut durchmischt und auf den *High-Pure*-Filter überführt. Von diesem Schritt an sind die Protokolle für die Reinigung von PCR-Produkten und DNA-Fragmenten aus Agarose-Gelen identisch. Es folgte die Ultrazentrifugation für 1 min bei 13.000 UpM. Der Durchfluss wurde verworfen. Danach wurde der High Pure Filter mit 500 µl *Wash-Buffer* versetzt und 1 min bei 13.000 UpM sedimentiert. Der Waschschriff wurde einmal mit 200 µl *Wash-Buffer* wiederholt. Der High Pure Filter wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Durch Zugabe von 50 µl *Elution-Buffer* und anschließender Ultrazentrifugation

(1 min, 13.000 UpM) wurde die gereinigte DNA eluiert.

2.5.6 DNA-Restriktionsverdau

Die zu verdauenden DNA-Fragmente (100-1.000 ng) wurde mit dem entsprechenden Enzym und dem jeweiligen Puffer laut Herstellerangaben zusammengegeben und vermischt. Der Ansatz wurde bei 37 °C bzw 50 °C (je nach Enzym) für 2 h inkubiert. Anschließend erfolgte die Analyse bzw. die Isolierung der geschnittenen DNA-Fragmente mittels Agarose-Gelelektrophorese (siehe Seite 18, Abschnitt 2.5.4 - 2.5.5).

2.5.7 Ligation

Ligationen wurden, je nach Konstrukt mit einem Vektor:Insert-Verhältnis von 3:1, 1:1 oder 1:3 durchgeführt. Zur entsprechenden Berechnung wurde folgende Formel verwendet:

$$\text{Masse Insert (ng)} = \frac{\text{Länge Vektor (kb)}}{\text{Länge Insert (kb)}} * \text{Masse Vektor (ng)}$$

Gereinigte PCR-Produkte wurden direkt mit Hilfe des *pGEM[®]-T and pGEM[®]-T-Easy-Vector-Systems* in den pGEM[®]-T Vektor ligiert. Insert und Vektor wurden im entsprechenden Verhältnis vermischt. Anschließend wurden 5 µl *Rapid-Ligation-Buffer* (2x) und 1 µl T4-DNA-Ligase (3 Weiss units/µl) zugegeben und mit ddH₂O auf ein Endvolumen von 10 µl aufgefüllt.

Durch Restriktion erhaltene Vektoren und Fragmente (siehe Seite 19, Abschnitt 2.5.6) mit passenden kohäsiven Enden wurden im entsprechenden Verhältnis zusammengegeben. Ein Ligationsansatz mit einem Gesamtvolumen von 20 µl enthielt zudem 2 µl T4-Ligase-Reaction-Buffer (10x), 2 µl ATP-Solution (10x) und 10 U T4-DNA-Ligase. Alle Ligationsreaktionen verliefen bei 4 °C über Nacht.

2.5.8 Transformation von *Escherichia coli*

Je Ligationsansatz wurden 100 µl kompetente *E.coli* JM109/*E. coli* BL21 zugegeben und anschließend 30 min auf Eis inkubiert. Darauf folgten 45 s bei 42 °C und 2 min auf Eis. Die Zellen wurden mit 900 µl LB-Medium versetzt und 45 min unter Schütteln bei 37 °C inkubiert. Danach erfolgte die Sedimentation des Ansatzes bei 6.000 UpM für 2 min. Das Zellpellet wurde in 100 µl LB-Medium resuspendiert und auf LB-Agar-Platten mit entsprechenden Antibiotika-Zusätzen ausgestrichen. Den LB-Agar-Platten wurde 0,5 mM IPTG (Isopropyl-Thio-D-Galaktopyranosid) und 80 µg/ml X-Gal zugegeben, um Blau-Weiss-Selektion zu ermöglichen.

Antibiotikazusätze: Carbenicillin 100 g/ml; Kanamycin 34 g/ml; Chloramphenicol 50 g/ml

2.5.9 Präparation von Plasmid DNA

Minipräp mittels peqGOLD Plasmid Miniprep Kit I

5 ml LB-Medium mit entsprechendem Antibiotikazusatz wurden mit Bakterienzellen einer Kolonie beimpft und über Nacht im Warmluftschüttler (185 UpM) bei 37 °C inkubiert. Die Übernachtskultur wurde bei 10.000 UpM sedimentiert und das Zellpellet in 200 µl *Solution I*/RNase A resuspendiert. Anschließend wurden 200 µl *Solution II* zugegeben und die Lösungen durch mehrfaches Invertieren vermischt. Nach 2-minütiger Inkubation bei RT erfolgte die Zugabe von 280 µl *Solution III*. Die Lösungen wurden durch mehrfaches Invertieren vermischt und das entstehende Präzipitat wurde bei 15.000 UpM und RT für 15 min sedimentiert. Der Überstand (DNA-haltig) wurde in eine HiBind[®] miniprep-Säule überführt. Nach 1 min bei 15.000 UpM und RT wurde der Durchfluss verworfen und die HiBind[®] miniprep-Säule mit 500 µl *HB-Buffer* gewaschen (15.000 UpM, RT, 1 min). Es folgte ein zweimaliger Waschschrift mit 600 µl *Wash Buffer* (15.000 UpM, RT, 1 min) die Trocknung der Membran der HiBind[®] miniprep-Säule in der Zentrifuge (15.000 UpM, RT, 1 min). Abschließend wurde die gebundene DNA durch Zugabe von 50 µl ddH₂O und anschließender Sedimentation (15.000 g, RT, 1 min) eluiert.

Präparation von Plasmid DNA - mittels LiCl

50 ml LB-Medium wurden mit 100 µl einer Übernachtskultur beimpft und über Nacht im Warmluftschüttler (185 UpM) bei 37 °C inkubiert. Die Kulturflüssigkeit wurde in ein Falconröhrchen (FR) überführt und 10 min bei 5.000 UpM und 4 °C sedimentiert. Der Überstand wurde verworfen. Das Pellet wurde in 5 ml Lösung I resuspendiert. Die Suspension wurde mit 10 ml Lösung II versetzt und vermischt. Anschließend wurde die klare, viskose Lösung mit 10 ml Lösung III versetzt und durchmischt. Es folgte die Sedimentation bei 5.500 UpM und 4 °C für 10 min. Der Überstand wurde durch ein Faltenfilter in ein sauberes FR filtriert und 12 ml 2-Propanol zugeben. Nach erneuter Sedimentation bei 5.500 UpM und 4 °C für 10 min wurde der Überstand verworfen. Danach wurde das Pellet in 1,45 ml ddH₂O gelöst und mit 2,5 ml LiCl (4 M) sowie 50 µl 1 M Tris-HCl (pH 7,5) versetzt. Auf eine Inkubation auf Eis für 10 min folgte die Sedimentation bei 5.500 UpM und 4 °C für 10 min. Der Überstand wurde auf zwei FR verteilt, mit je 5 ml Ethanol versetzt und 1 h bei - 20 °C inkubiert.

Danach erfolgte eine erneute Sedimentation bei 5.500 UpM und 4 °C für 10 min. Der Überstand wurde verworfen. Das Pellet wurde in 500 µl TE-Puffer resuspendiert, 2 µl RNase-Cocktail (Ambion) zugeben und in ein Reaktionsgefäß überführt. Es folgte die Inkubation bei 37 °C für 30 min. Danach wurde jeder Ansatz mit 1 Vol Phenol/CHCl₃ versetzt und gut durchmischt. Nach der Sedimentation für 2 min bei 14.000 UpM und RT erfolgte die Phasentrennung. Die wässrige Phase (DNA-haltig) wurde in ein sauberes Reaktionsgefäß überführt. Die Phenol/CHCl₃-Extraktion wurde einmal wiederholt. Anschließend wurde die wässrige Phase auf 2 Reaktionsgefäße verteilt und mit je 25 µl 3 M LiCl und 800 µl Ethanol versetzt und gut durchmischt. Jeder Ansatz wurde für 5 min bei 14.000 UpM und RT sedimentiert und der Überstand verworfen. Danach wurde das Pellet mit 200 µl Ethanol (70 %) gewaschen. Nach erneuter Sedimentation bei 14.000 UpM und RT für 1 min wurde das Pellet getrocknet. Abschließend wurde die getrocknete, sedimentierte DNA in 100 µl TE-Puffer aufgenommen.

Lösung I: 50 mM Glukose; 25 mM Tris-HCl (pH 8,0); 10 mM EDTA

Lösung II: 0,2 M NaOH; 1 % SDS

Lösung III: 3 M KAc; 11,5 % Essigsäure; pH 4,8

2.5.10 RNA/DNA-Konzentrationsbestimmung

Das charakteristische Absorptionsspektrum von Nukleinsäuren liegt im UV-Bereich und weist ein Maximum bei 260 nm (OD_{260}) auf. Durch die Bestimmung des OD-Quotienten ($OD_{260/280}$) können Verunreinigungen durch Proteine (Absorptionsmaximum bei 280 nm, OD_{280}) abgeschätzt werden. 50 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ dsDNA, bzw. 40 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ RNA entsprechen einer $OD_{260}=1$. Der $OD_{260/280}$ nicht kontaminierter dsDNA liegt zwischen 1,5 und 2. Die Bestimmung der RNA/DNA-Konzentration erfolgte gegen eine Referenz-Lösung am UV-Spektrometer (GeneQuant 1300).

2.6 Biochemische Methoden

2.6.1 Proteinbestimmung nach Bradford

In saurer Lösung bildet der Farbstoff Coomassie-Brillant-Blau G-250 mit den kationischen und den nichtpolaren, hydrophoben Seitenketten von Proteinen Komplexe. Dadurch verschiebt sich sein Absorptionsmaximum auf 595 nm. Bei dieser Wellenlänge kann die Zunahme der Absorption als Maß der Proteinkonzentration gemessen werden. Das Roti-Quant-Reagenz (Roth) wurde nach Angaben des Herstellers für die Proteinbestimmung verwendet. Zur Kalibrierung diente in H_2O verdünntes BSA (1 μg - 10 μg). Die OD_{595} wurde am UV-Spektrometer bestimmt.

2.6.2 Isolierung der Membranproteinfraktion

Mit Hilfe dieser Methode konnten Proteine aus HEK293-Zellen oder Bienengewebe isoliert werden, welche in Membranen lokalisiert sind. Die Zellen bzw. das Gewebe wurde in 500 μl Puffer A homogenisiert und anschließend 10 min auf Eis inkubiert. Danach erfolgte die Sedimentation der Zellen bei 15.000 UpM und 4 °C für 30 min. Das Zellpellet wurde in 30-100 μl (je nach Anzahl der Zellen/Menge an Gewebe) Puffer B resuspendiert und anschließend tropfenweise mit 1 Vol einer 3 %igen (v/v) Triton-X-100 Lösung versetzt. Es folgte die Inkubation auf Eis für 10 min und anschließender Sedimentation bei 10.100 UpM und 4 °C für 10 min. Der Überstand (enthält Membranproteine) wurde in ein sauberes Reaktionsgefäß überführt und konnte sofort weiterverwendet bzw. bei -20 °C aufbewahrt werden.

Puffer A: 10 mM NaCl; 25 mM HEPES (pH 7,5); 2 mM EDTA; 1 % (v/v) Protease-Inhibitor-Cocktail (Sigma)

Puffer B: 200 mM NaCl; 50 mM HEPES (pH 7,5); 1 % (v/v) Protease-Inhibitor-Cocktail (Sigma)

2.6.3 Deglykosylierung von Membranproteinen

Posttranslationale Modifikationen können das Wanderungsverhalten eines Proteins in der SDS-PAGE beeinflussen. Eine bei GPCRs häufig auftretende Modifikation ist die N-terminale N-Glykosylierung. Diese Seitenketten können enzymatisch mit Peptid-N-Glykosidase F (PNGaseF, New England Biolabs) abgebaut werden.

20 µg Membranproteine wurden in zwei Reaktionsgefäße überführt und mit H₂O auf jeweils 22,5 µl aufgefüllt. Zu jeder Probe wurden 2,5 µl Denaturierungspuffer gegeben und anschließend 10 min bei RT inkubiert. Danach wurden jeweils 3 µl G7-Puffer und 3 µl NP-40 (10%) zugegeben. Jetzt wurde eine Probe mit 1 µl PNGase F, die andere mit 1 µl H₂O versetzt. Der Abbau der Seitenketten fand bei 37 °C für 2 h statt.

2.6.4 SDS-PAGE nach Laemmli

Proteine wurden unter denaturierenden Bedingungen in einem SDS-Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese-System (SDS-PAGE) nach Laemmli (1970) aufgetrennt. Hierfür wurden diskontinuierliche Gele verwendet:

Trenngel	10 %	12 %	14 %	Sammelgel	3 %	4,5 %
Acrylamidlösung	4 ml	4,8 ml	5,6 ml	Acrylamidlösung	0,4 ml	0,6 ml
Trenngelpuffer	3 ml	3 ml	3 ml	Sammelgelpuffer	1 ml	1 ml
ddH ₂ O	5 ml	4,2 ml	3,4 ml	ddH ₂ O	2,6 ml	2,4 ml
TEMED	12 µl	12 µl	12 µl	TEMED	4 µl	4 µl
APS	70 µl	70 µl	70 µl	APS	30 µl	30 µl

Die aufzutrennenden Proteine wurden mit 1 Vol LöA-Puffer versetzt, 10 min bei RT inkubiert und anschließend auf das Gel aufgetragen. Die Auftrennung erfolgte in 1 x Kammerpuffer, im Sammelgel bei einer Spannung von 80 V und im Trenngel bei 140 V. Nach erfolgter Trennung konnten die Gele direkt mit Coomassie G250 (Serva) gefärbt (30 min Coomassie-Lösung; 2 x 30 min Entfärber-Lösung) oder die Proteine auf eine PVDF-Membran übertragen werden (siehe Seite 22, Abschnitt 2.6.5).

Trenngelpuffer:	375 mM Tris/HCl; 0,2 % (w/v) SDS; pH 8,8
Sammelgelpuffer:	125 mM Tris/HCl; 0,2 % (w/v) SDS; pH 6,8
TEMED:	N,N,N',N'-Tetramethylethan-1,2-diamin (Serva)
APS:	10 % (w/v) Ammoniumpersulfat
LöA-Puffer:	9 M Harnstoff; 10 % (w/v) SDS; 5 % (v/v) β-Mercaptoethanol; 0,2 % (w/v) Bromphenolblau
Kammerpuffer:	25 mM Tris; 250 mM Glycin; 0,1 % (w/v) SDS; pH 8,8
Coomassie-Lösung:	0,1 % (w/v) Coomassie G250; 50 % (v/v) Methanol; 20 % (v/v) Essigsäure
Entfärber-Lösung:	10 % (v/v) Methanol; 7 % (v/v) Essigsäure

2.6.5 Western-Blot

Bei der Western-Blot-Methode werden Proteine, welche mittels SDS-PAGE getrennt wurden, auf die Oberfläche einer Membran übertragen, wodurch sie Antikörpern zugänglich werden. Es wurde das *Semi-Dry-Blot*-Verfahren in einem diskontinuierlichen Puffersystem angewendet. Der elektrophoretische Transfer der Proteine erfolgte auf eine PVDF-Membran. Auf der Anodenplatte beginnend wurden übereinander aufgeschichtet:

- 6 Filterpapiere getränkt in Anodenpuffer I
- 3 Filterpapiere getränkt in Anodenpuffer II
- PVDF-Membran
- SDS-Gel mit den aufgetrennten Proteinen
- 9 Filterpapiere getränkt in Kathodenpuffer

Die Blotkammer wurde mit der Kathodenplatte abgeschlossen. Der Proteintransfer erfolgte für 90 min bei 54 mA pro Gel. Durch Färbung mit Ponceau-Rot (Serva) wurde die Effizienz des Transfers überprüft. Nach erfolgreichem Western-Blot, konnte die PVDF-Membran direkt weiterverwendet werden oder wurde bei 4 °C gelagert.

Anodenpuffer I: 300 mM Tris-Base; 20 % (v/v) Methanol; pH 10,4

Anodenpuffer II: 25 mM Tris-Base; 2 % (v/v) Methanol; pH 10,4

Kathodenpuffer: 40 mM 6-Amino-n-Hexansäure; 20 % (v/v) Methanol; pH 7,6

2.6.6 Immundetektion

Unspezifische Bindungstellen wurden durch 30 minütige Inkubation bei RT in 5 % (w/v) Trockenmilch in TBST-Puffer abgesättigt. Der primäre Antikörper wurde in TBST-Puffer gelöst und gegen die Blockierlösung ausgetauscht. Es folgte die Inkubation auf der Schüttelplattform bei 4 °C.

Der Blot wurde 3 x 5 min in TBST-Puffer, 1 x 3 min in Harnstoff-Puffer und ein weiteres Mal 5 min in TBST-Puffer gewaschen. Danach erfolgte für 1 h die Inkubation mit dem sekundären Antikörper (in TBST-Puffer) bei RT. Es schlossen sich 3 Waschschrte in TBST-Puffer für 5 min und 1 Waschschrte für 10 s in ddH₂O an. Jetzt erfolgte die Detektion der gebundenen Antikörper. Hierfür wurde der Blot 5 min in einem ECL-System inkubiert (Super Signal West Pico Chemiluminescent Substrate, Pierce). Danach erfolgte die Entwicklung auf X-OMAT-AR-Filmen (Kodak).

Die verschiedenen Antikörper wurden wie folgt eingesetzt:

Antikörper	Konzentration	eingesetzte Verdünnung
anti-Am5-HT ₁	0,27 mg/ml	1:2.500
anti-Am5-HT _{2α} DD3	1,6 mg/ml	1:10
anti-HA	0,1 mg/ml	1:5.000
anti-rabbit HRP	2 mg/ml	1:10.000
anti-rat HRP	1,5 mg/ml	1:10.000
anti-mouse HRP	1,5 mg/ml	1:10.000

TBST-Puffer (*Tris-buffered saline plus Tween 20*): 0,1 % (w/v) Tween 20; 10 mM Tris-Base; 150 mM NaCl; pH 7,5

Harnstoff-Puffer: 2 M Harnstoff; 0,1 M Glycin; 1 % (v/v) Triton-X-100

2.6.7 Expression und Reinigung von Maltose-Bindeprotein-Fusionsproteinen

Mit Hilfe des Vektors pMAL-c2X wurden in *E. coli*-Zellen Fusionsproteine exprimiert, welche aus einem spezifischen Rezeptorteil und dem Maltose-Bindeprotein (MbP) bestanden. Durch die Möglichkeit, das Maltosebindeprotein an Amylose zu binden, konnten diese Fusionsproteine gereinigt werden.

Expression von Maltose-Bindeprotein-Fusionsproteinen

Es wurden 250 ml LB-Medium (enthielt Chloramphenicol (50 g/ml) und Carbenicillin (100 g/ml) zusammengegeben. Diese Lösung wurde mit 200 μ l einer Übernachtskultur, bestehend aus *E. coli*-BL21-Zellen, welche ein pMAL-c2X-Plasmid mit entsprechendem Insert besitzen, beimpft. Der Kulturansatz wurde bei 37 °C und 185 UpM bei 37 °C inkubiert bis die Lösung eine optische Dichte $OD_{600} = 0,6-0,9$ aufwies. Danach erfolgte die Induktion der Synthese des Maltosebindeproteins durch die Zugabe von IPTG (Endkonzentration = 1 mM). Der Kulturansatz wurde über Nacht bei 185 UpM und 17-30 °C (je nach Anspruch des zu exprimierenden Proteins) inkubiert.

Reinigung von Maltose-Bindeprotein-Fusionsproteinen

250 ml Übernachtskulturansatz wurden 10 min bei 5.500 UpM und 4 °C sedimentiert und der Überstand verworfen. Das Zellpellet wurde in 1 ml TE-Puffer resuspendiert. Die Zellen wurden mit Hilfe von Ultraschall (5 x 30 s,) aufgeschlossen. Anschließend wurden die nicht-löslichen Zell-Bestandteile bei 15.000 UpM und 4 °C sedimentiert. Der Überstand (enthält das Maltosebindeprotein) wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und mit 5 Vol Säulenpuffer versetzt. Eine BioRad-Fertigsäule (Poly-Prep Chromatography Columns, BIO-RAD) wurde mit 6 ml 50 %igem Amylosegranulat (New England Biolabs) befüllt. Das Säulenmaterial wurde mit 15 ml Säulenpuffer äquilibriert. Das Solubilisat wurde auf die Säule aufgetragen. Danach wurde die Säule mit 25 ml Säulenpuffer gewaschen. Abschließend wurde das gebundene Fusionsprotein mit 5 ml Elutionspuffer eluiert.

Säulenpuffer: 200 mM NaCl; 20 mM Tris-HCl (pH 7,4); 10 mM β -Mercaptoethanol; 1 mM EDTA

Elutionspuffer: 200 mM NaCl; 20 mM Tris-HCl (pH 7,4); 10 mM β -Mercaptoethanol; 1 mM EDTA; 20 mM Maltose

2.6.8 Expression und Reinigung von His-Tag-Fusionsproteinen

Der Vektor pET30a wurde genutzt um Proteine zu exprimieren, welche einen spezifischen Teil des jeweiligen Rezeptors darstellen. Zudem tragen diese Proteine N-terminal sechs Histidine, was die Aufreinigung über eine Ni-Chelat-Säule ermöglicht.

Expression von His-Tag-Fusionsproteinen

Es wurden 250 ml LB-Medium und 1,25 ml Kanamycin (34 g/ml) zusammengegeben. Anschließend wurde die Lösung mit 200 μ l einer Übernachtskultur, bestehend aus *E. coli*-BL21-Zellen welche ein pET30a-Plasmid mit entsprechendem Insert besitzen, beimpft. Der Kulturansatz wurde bei

185 UpM und 37 °C inkubiert, bis die Lösung eine optische Dichte $OD_{600} = 0,6-0,9$ aufwies. Danach erfolgte die Induktion der Synthese des His-Tag-Fusionsproteins durch die Zugabe von IPTG (Endkonzentration = 1 mM). Der Kulturansatz wurde über Nacht bei 185 UpM und 17-30 °C (je nach Anspruch des zu exprimierenden Proteins) inkubiert.

Reinigung von His-Tag-Fusionsproteinen

Das folgende Protokoll beschreibt die Reinigung löslicher His-Tag-Fusionsproteine.

250 ml Übernacht-Kultur wurden 10 min bei 5.500 UpM und 4 °C sedimentiert. Das Zellpellet wurde in 5 Vol Lysispuffer resuspendiert und 30 min auf Eis inkubiert. Danach erfolgte die Zugabe von 50 µl Protease-Inhibitor (*Protease-Inhibitor-Cocktail for use in purification of Histidine tagged protein*, Sigma). Die Zellen wurden zusätzlich mit Hilfe von Ultraschall (5 x 30 s) aufgeschlossen. Es folgte die Zugabe von 10 µl DNase und $MgCl_2$ (Endkonzentration = 2 mM) mit anschließender Inkubation für 30 min bei 4 °C. Die unlöslichen Bestandteile wurden 30 min bei 15.000 UpM und 4 °C sedimentiert und der Überstand in ein neues 15 ml Falconröhrchen überführt.

Jetzt musste zunächst das Säulenmaterial (*HIS-SelectTM-HF-Nickel-Affinity-Gel*, Sigma) äquilibriert werden. Hierfür wurden 2 ml Säulenmaterial (50 % Suspension in 30 % EtOH) 3 min bei 5.300 UpM und 4 °C sedimentiert und der Überstand verworfen. Das Säulenmaterial wurde nacheinander in 2 ml ddH₂O und 5 ml Waschpuffer resuspendiert, jeweils 3 min bei 5.300 UpM und 4 °C sedimentiert und der Überstand verworfen. Anschließend wurde das Säulenmaterial mit dem Solubilat resuspendiert und 1 h bei 4 °C auf Kippschüttler inkubiert. Im Anschluss daran wurde das Säulenmaterial für 3 min bei 5.300 UpM und 4 °C sedimentiert und der Überstand verworfen. Das Säulenmaterial wurde 3 x mit 10 ml Waschpuffer versetzt, für 3 min bei 5.300 UpM und 4 °C sedimentiert und der Überstand verworfen. Der Überstand wurde resuspendiert (5 ml Waschpuffer) und auf eine BioRad-Fertigsäule (Poly-Prep Chromatography Columns, BIO-RAD) gegeben.

Mittels 2 ml Elutionspuffer wurde das Säulenmaterial kurz aufgewirbelt und der Durchfluss aufgefangen (enthält His-Tag-Fusionsprotein). Es schloss sich die Dialyse des Eluats gegen 1 l Kopplungspuffer an.

Im Falle unlöslicher His-Tag-Fusionsproteine war der Ablauf identisch. Lysis-, Wasch- und Elutionspuffer unterschieden sich jedoch durch den Zusatz von 8 M Harnstoff.

Lysispuffer:	10 mM Imadizol; 50 mM NaH_2PO_4 ; 300 mM NaCl; 1 mg/ml <i>Lysozyme from Chicken Egg White</i> (Sigma); pH 8,0
Waschpuffer:	20 mM Imadizol; 50 mM NaH_2PO_4 ; 300 mM NaCl; pH 8,0
Elutionspuffer:	250 mM Imadizol; 50 mM NaH_2PO_4 ; 300 mM NaCl; pH 8,0
Kopplungspuffer:	200 mM $NaHCO_3$; 500 mM NaCl; pH 8,3

2.6.9 Generierung und Affinitätschromatographie polyklonaler Antiseren

Für die Generierung eines polyklonalen Antiserums gegen den Am5-HT₁-Rezeptor wurden zwei Fusionsproteine benötigt. Eines, um Kaninchen zu immunisieren, und ein weiteres, um die spezifischen Antikörper aus den Immunsereen aufzureinigen.

Generierung polyklonaler Antiseren

Für die Immunisierung von Kaninchen wurden Maltosebindeprotein-Fusionsproteine, welche die dritte cytoplasmatische Schleife (CPL3), einen spezifischen Teil des Am5-HT₁-Rezeptors aufweisen, verwendet. Die Immunisierung und Versorgung der Tiere wurde bei der Firma Pineda (<http://www.pineda-abservice.de>, Berlin) in Auftrag gegeben. Vor der Immunisierung wurden Immunsereen von 6 Tieren getestet und jene 3 Tiere für die Immunisierung ausgewählt, deren Immunsereen in Immunoblot-Analysen die geringste Hintergrundaktivität aufwiesen. Der Verlauf der Immunisierung wurde an dem 61., 90. und 120. Tag nach der ersten Immunisierung mit Hilfe von Immunoblotanalysen überprüft.

Affinitätschromatographie polyklonaler Antiseren

Polyklonale Antiseren wurden mittels Affinitätschromatographie gereinigt. Als Antigen dienten hierbei die His-Tag-Fusionsproteine, welche an eine *HiTrap-NHS-activated-HP*-Säule (Amersham) gebunden wurden.

Die Ventilkappe der Säule wurde entfernt und 1 Tropfen eiskaltes 1 mM HCl auf die Säule gegeben. Anschließend wurde das gereinigte Antigen (1 mg/ml, in Kopplungspuffer) auf die Säule aufgebracht. Jetzt wurden je 6 ml Puffer A, Puffer B und Puffer A auf die Säule gebracht. Danach wurde die Säule 30 min bei RT inkubiert. Es folgte die Injektion von je 6 ml Puffer B, Puffer A, Puffer B und Bindungspuffer. Unspezifisch gebundene Liganden wurden mit Hilfe von 2 ml Elutionspuffer ausgewaschen. Danach wurde die Säule mit 13 ml Bindungspuffer aquilibriert. Die Bindung der spezifischen Antikörper erfolgte über Nacht. Mit Hilfe einer Peristaltikpumpe wurde ein Kreislauf geschaffen, über welche das Antiserum (gelöst in 10 Vol Bindungspuffer) über die Säule gepumpt wurde.

Die Säule wurde mit 10 ml Bindungspuffer gewaschen. Durch die Zugabe von 2 ml Elutionspuffer wurden die spezifisch gebundenen Antikörper von der Säule gewaschen. Der Lösung wurde sofort, bis ein neutraler pH-Wert erreicht wurde, tropfenweise Neutralisationspuffer zugegeben.

Puffer A:	0,5 M Monoethanolamin; 0,5 M NaCl, pH 8,3
Puffer B:	0,1 M Acetat; 0,5 M NaCl; pH 4
Bindungspuffer:	10 mM Tris-HCl; pH 4,5
Elutionspuffer:	100 mM Glycin-HCl; 0,5 M NaCl; pH 2,7
Neutralisationspuffer:	1 M Tris-HCl; pH 9

2.6.10 Generierung monoklonaler Antikörper

Gegen die CPL3 des Am5-HT_{2α}-Rezeptorproteins sollte ein monoklonaler Antikörper hergestellt werden. Diese Arbeiten fanden in Kooperation mit der AG Biotechnologie (Nachwuchsgruppe Antikörpertechnologien) der Universität Potsdam statt.

Immunisierung und Generierung von Hybridomazellen

Den ersten Schritt stellte die Immunisierung von Mäusen mit geringen Dosen eines Maltosebindeprotein-Fusionsproteins dar, welches die CPL3 des Am5-HT_{2α}-Rezeptors enthielt. Vier Tage nach der letzten Immunisierung wurde dem Tier die Milz entnommen und mittels Dichtegradientenzentrifugation die B-Zellen gewonnen. Anschließend wurden die B-Zellen mit Myelomazellen zusammengebracht und mit Hilfe elektrischer Pulse zum Fusionieren gebracht. Danach wurden in einem speziellen Medium nur jene Hybridomazellen selektiert, welche monoklonale Antikörper produzieren. Diese wurden weiter in Zellkultur gehalten und vereinzelt bis Zellkulturen entstanden, welche jeweils auf eine einzelne Zelle zurückgingen (monoklonal). Diese Arbeiten wurden von der AG Biotechnologie (Nachwuchsgruppe Antikörpertechnologien) der Universität Potsdam durchgeführt.

Das Testen der Kulturüberstände

Die Hybridomazellen sezernieren die Antikörper in das Kulturmedium, so dass dieses zum Testen der Spezifität der Antikörper genutzt werden konnte. Im ersten Schritt wurden die Überstände in ELISA-Tests gegen das His-Tag-Fusionsprotein, welches die CPL3 des Am5-HT_{2α}-Rezeptors enthielt, getestet (durchgeführt von der AG Biotechnologie). Anschließend wurden die Kulturüberstände in Western-Blot-Analysen gegen die CPL3 (Positivkontrolle), einmal gekoppelt an das MBP-Fusionsprotein und einmal an das His-Tag-Fusionsprotein, und gegen die zweite cytoplasmatische Schleife (CPL2, Negativkontrolle, Kopplung wie CPL3) getestet. Die positiv getesteten Kulturüberstände wurden in einem nächsten Schritt in Western-Blot-Analysen gegen die Membranproteinfraktion von Am5-HT_{2α} exprimierenden HEK293-Zellen getestet. Diese Tests wurden so lange durchgeführt, bis monoklonale Hybridomazellkulturen entstanden waren, welche die gewünschten Antikörper produzierten. Diese wurden weiter in Zellkultur genommen und aus den Kulturüberständen die IgG-Fraktion der gewünschten Antikörper aufgereinigt (durchgeführt von der AG Biotechnologie).

2.6.11 Immunhistochemische Analysen

Kryofixierung von Gewebeproben und Immundetektion

Das zu untersuchende Gewebe wurde präpariert, sofort in 4 %iges (w/v) Paraformaldehyd (gelöst in PBS) überführt und 2 h bei 4 °C inkubiert. Danach wurde das Gewebe 4 x 15 min in PBS bei RT gewaschen. Die sich anschließende Kryoprotektion umfasste 1 h in 10 % (w/v) Saccharose (gelöst in PBS) und über Nacht in 25 % (w/v) Saccharose (gelöst in PBS) bei 4 °C. Jetzt konnte das Gewebe mittels Tissue-TEK[®] (SAKURA) auf einem gefrorenen Leberblöckchen fixiert und bei -155 °C in Isopenthan eingefroren werden. Das kryofixierte Präparat wurde am Gefriermikrotom geschnitten (Schnittdicke = 25 µm) und auf Poly-L-Lysin- (0,01 % (w/v) POLY-L-LYSINE SOLUTION, Sigma) beschichtete Deckgläschen übertragen.

Die Gefrierschnitte wurden 5 min mit PBS bei RT gewaschen und anschließend 20 min in 0,1 % (w/v) Natriumborhydrid (gelöst in PBS) bei RT inkubiert. Danach schlossen sich 4 x 5 min PBS, 5 min in 0,01 % (v/v) Tween[®] 20-Lösung und 5 min PBS bei RT an. Unspezifische ungesättigte Bindungsstellen wurden abgesättigt durch 1-stündige Inkubation mit Blockierlösung (RT). Danach wurde die Blockierlösung durch den in Blockierlösung gelösten primären Antikörper ersetzt und über Nacht bei 4 °C in einer feuchten Kammer inkubiert. Es folgten 4 x 5 min PBS bei RT, um die Gefrierschnitte von nicht bzw. unspezifisch gebundenem Antikörper zu befreien. Anschließend erfolgte die Zugabe des sekundären Antikörpers (gelöst in Blockierlösung) und die Inkubation für 1 h bei RT. Nach weiteren 4 x 5 min PBS bei RT wurden die Gefrierschnitte in Mowiol eingedeckelt und analysiert.

Blockierlösung: 1 % (w/v) *normal goat serum*; 0,8 % (v/v) BSA; 0,5 % (w/v) Triton-X-100

2.6.12 Immuncytochemische Analysen an fixierten HEK293-Zellen

Diese Methode wurde verwendet, um in eukaryotischen Wirtszellen (HEK293-Zellen) heterolog exprimierte Proteine nachzuweisen. Hierfür wurden die Zellen in 24-Loch-Mikrotiterplatten ausgesät. Nachdem die Zellen herangewachsen waren, wurde das Zellkultur-Medium abgesaugt und die Zellen 2 x 10 min mit 500 µl PBS gewaschen. Anschließend wurden die Zellen durch Zugabe von 4 % (w/v) Paraformaldehyd-Lösung mit anschließender 15 minütiger Inkubation bei RT fixiert. Nach dreimaligem Waschen für 10 min bei RT mit 500 µl PBS wurden die Zellen mit 300 µl Präinkubationslösung versetzt und 30 min bei RT inkubiert. Anschließend erfolgte die Inkubation mit dem primären Antikörper (in Inkubationslösung-Lösung gelöst, 200 µl) für 1 h bei RT. Danach wurden die Zellen 3 x 15 min bei RT mit PBS gewaschen. Der sekundäre Antikörper (in Inkubationslösung-Lösung gelöst, 200 µl) wurde zugegeben und es wurde 1 h bei RT inkubiert. Es schlossen sich drei weitere Waschstschritte (PBS, 15 min, RT) an, bevor die Zellen in MOWIOL eingedeckelt und analysiert werden konnten.

Präinkubationslösung: 10 % (w/v) *normal goat serum*; 0,125 % (w/v) Triton-X-100, gelöst in PBS

Inkubationslösung: 5 % (w/v) *normal goat serum*; 0,125 % (w/v) Triton-X-100, gelöst in PBS

2.6.13 Antikörper

Folgende Antikörper wurden für immunhisto- und immunocytochemischen Analysen eingesetzt:

Antikörper	Konzentration	eingesetzte Verdünnung
anti-Am5-HT ₁	0,27 mg/ml	1:1.000
anti-Am5-HT _{2α} DD3	1,6 mg/ml	1:100
anti-5-HT	-	1:200
anti-HA	0,1 mg/ml	1:5.000
anti-rabbit Alexa488	2 mg/ml	1:50
anti-rabbit Alexa568	2 mg/ml	1:200
anti-rat Cy3	1,5 mg/ml	1:200
anti-mouse Alexa568	5 mg/ml	1:200

2.6.14 Mikroskopische Auswertung und Bildbearbeitung

Die Hellfeld- und Immunfluoreszenz-Aufnahmen wurden an einem konfokalen Laser-Rastermikroskop (LSM710) gemacht. Der *bleed through*-Effekt bei Doppelmarkierungen sollte durch sequentielle Aufnahmen verhindert werden. In der Regel wurden Bildstapel aufgenommen. Die erste Stufe der Bildbearbeitung erfolgte mit Hilfe des Programms ZEN Light Edition 2009. Die weitere Bildbearbeitung erfolgte mit dem Programm CorelDRAW[®] X4 (Version 14.0.0.567).

2.7 Heterologe Expression in HEK293-Zellen und Funktionalitätsnachweis

Für die funktionelle und pharmakologische Charakterisierung der 5-HT-Rezeptoren der Honigbiene, wurden die Rezeptoren in HEK293-Zellen exprimiert. Diese Arbeiten (speziell die Herstellung stabiler Zelllinien, die Zellkultur, die cAMP-Bestimmungen und das Ca²⁺-Imaging) fanden in Kooperation mit Prof. Dr. Arnd Baumann (Forschungszentrum Jülich, Institut für Strukturbiologie und Biophysik 1) statt.

2.7.1 Konstruktion eines Expressionsvektors

Die Rezeptor-cDNA wurde speziell für die heterologe Expression in eukaryotischen Zellen modifiziert. Zunächst wurde in einer PCR-Reaktion mittels entsprechender Primer eine Kozak-Konsensus-Sequenz (KOZAK, 1984) vor dem Start-Codon eingefügt, das Stop-Codon entfernt und an den 5'- und 3'-Enden Endonuklease-Schnittstellen angefügt. Des Weiteren wurden zwei komplementäre Oligonukleotide synthetisiert, welche für einen Haemagglutinin A (HA)-Tag (abgeleitete Aminosäuresequenz: YPYDVPDYA) und ein sich anschließendes Stop-Codon kodieren und an 5'- und 3'-Ende Endonuklease-Schnittstellen aufweisen. Diese beiden Nukleotide wurden in äquimolaren Konzentrationen in Hybridisierungspuffer vereint und 5 min auf 95 °C erhitzt. Anschließend erfolgte die Hybridisierung beider Nukleotide bei langsamen Abkühlen auf RT. Die modifizierte Rezeptor-cDNA und das Nukleotid wurden zusammen in den eukaryotischen Expressionsvektor pcDNA3.1(+) ligiert (siehe Abb. 4).

Hybridisierungspuffer: 10 mM Tris (pH 7,5); 50 mM NaCl; 1 mM EDTA

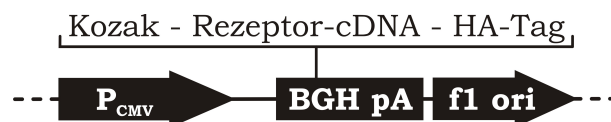


Abb. 4: Ausschnitt aus dem eukaryotischen Expressionsvektor pcDNA3.1+ zur Verdeutlichung der Klonierungsstrategie. Die Rezeptor-cDNA mitsamt HA-Tag wurde in dargestellter Reihenfolge in die *Multiple Cloning Site* ligiert.

2.7.2 Herstellung stabiler HEK293-Zelllinien

2 x 10⁵ HEK293-Zellen wurden ausgesät (5 cm-Petrischale) und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Die Zellen wurden durch Calciumphosphatpräzipitation mit 8 µg Expressionsvektor (pcDNA3.1(+) + modifizierte Rezeptor-cDNA) transfiziert und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Die Präzipitate wurden entfernt und die Zellen abgelöst. 2 x 10⁴ Zellen wurden in 9 cm Schalen zunächst ohne Selektionschemikalien neu ausgesät. An den nächsten 3 Tagen erfolgte jeweils ein Mediumwechsel, am ersten Tag gegen Medium mit 1 mg/ml G418 (Geneticin), am zweiten Tag gegen Medium mit 1,2 mg/ml G418 und am dritten Tag gegen Medium mit 1 mg/ml G418. Über die nächsten 14 Tage erfolgte die Selektion der Zellklone (Mediumwechsel im Abstand von 3 Tagen). Waren vereinzelte Zellklone angewachsen, wurden diese abgelöst

und in Multiwellplatten überführt. Sobald stabile Zelllinien herangewachsen waren, wurde die G418-Konzentration auf 0,8 mg/ml gesenkt. Die stabile Expression der erwünschten Proteine wurde mittels Western-Blot-Analyse der Membranproteine und immunocytochemischen Analysen an fixierten transfizierten HEK293-Zellen überprüft. Hierfür standen zum einen ein kommerziell erhältlicher anti-HA-Antikörper, zum anderen spezifische Rezeptorantikörper zur Verfügung.

2.7.3 cAMP-Bestimmung an transfizierten HEK293-Zellen

Die Messung der Änderung der cAMP-Konzentration als Folge der Aktivierung eines $G_{i/o}$ -gekoppelten Rezeptors erfolgte in zwei Schritten. Zunächst wurden die Zellen mit den zu untersuchenden Liganden inkubiert. Anschließend erfolgte die cAMP-Bestimmung der Zellysate.

Inkubation der Zellen

Stabil transfizierte HEK293-Zellen sowie nicht transfizierte HEK293-Zellen (Kontrolle) wurden in 6er Multiwellplatten (1×10^5 /Well) ausgesät und 2 Tage bei 37 °C inkubiert. Die Zellen wurden mit Butyrat (Endkonzentration=3 mM) versetzt und eine weitere Nacht bei 37 °C inkubiert. Das Kulturmedium wurde abgesaugt und 2 x mit PBS/IBMX (100 μ M) bei RT gewaschen. Anschließend wurden die Zellen mit den zu testenden Liganden (in PBS gelöst) versetzt und 30 min bei 37 °C inkubiert. Die Ligandenlösung wurde gegen 1 ml eiskaltes Ethanol (100 %) ausgetauscht und für 2 h bei 4 °C unter Schütteln inkubiert. Dadurch wurden die Zellen lysiert und das cAMP wurde im Ethanol gelöst. Die Lösung wurde in ein Reaktionsgefäß überführt und in der Vakuumzentrifuge lyophilisiert. Das entstehende Präzipitat wurde entweder sofort zur cAMP-Bestimmung eingesetzt oder bei -20 °C gelagert.

cAMP-Bestimmung mittels cyclic-AMP- ^3H -Assay-System

Je Probe wurden 50 μ l TE-Puffer, 50 μ l ^3H cAMP und 100 μ l ^3H cAMP-Bindeprotein zugegeben. Die Proben wurden gut vermischt und 2 h bei 4 °C inkubiert. Jeder Ansatz wurde mit 100 μ l Aktivkohle versetzt, gut vermischt und 3 min bei 15.300 UpM und 4 °C sedimentiert. 200 μ l des Überstandes wurden in ein Gläschen mit Szintillationsflüssigkeit überführt und anschließend im Beckman Counter analysiert. Anhand einer parallel aus Standardkonzentrationen von ^3H cAMP erstellten Eichkurve, konnten die intrazellulären cAMP-Konzentrationen der Ly-sate ermittelt werden. Die Daten wurden mit der Software PRISM (Version 4.01; GraphPad, San Diego, USA) ausgewertet.

2.7.4 Ca^{2+} -Imaging an transfizierten HEK293-Zellen

Diese Methode wurde verwendet, um Änderungen der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) als Folge der Aktivierung eines G_q -gekoppelten Rezeptors zu verfolgen. Dabei wurde der Ca^{2+} -sensitive Farbstoff Fluo-4 (Molecular Probes) verwendet.

Die zu untersuchenden Zellen wurden in 96er Multiwellplatten bis zu einer Dichte von 4×10^4 Zellen pro Well vermehrt. Anschließend erfolgte die Inkubation der Zellen mit 50 μ l Beladelösung für 30 min bei RT. Die Beladelösung wurde gegen ES-Lösung ersetzt und die Multiwellplatten in das Fluoreszenz-Lesegerät überführt. Der Farbstoff Fluo-4 wurde bei 485 nm angeregt und

die emittierte Fluoreszenz bei 520 nm gemessen. Die basale Fluo-4 Fluoreszenz wurde ermittelt. Sobald das Fluoreszenzsignal konstant war, erfolgte die Zugabe der Testlösungen. Die Aufzeichnung der Änderungen der Fluoreszenz erfolgte automatisch. Anschließend wurden die Zellen mit Triton-X-100 lysiert (Endkonzentration 1 % (v/v)), um zu testen, ob die Ca^{2+} -Ionen in der Testlösung noch mit dem Farbstoff reagieren oder ob dieser gesättigt war.

ES-Lösung: 120 mM NaCl; 5 mM KCl; 2 mM MgCl_2 ; 2 mM CaCl_2 ; 10 mM HEPES; 10 mM Glucose; pH 7,4

Belade-Lösung: 3 mM Probenecid; 2 μM Fluo-4 AM; 0,02 % (w/v) Pluronic[®] F127; in ES-Lösung

2.8 Bioinformatische Analysen

Sequenzbearbeitung

Contig-Sequenzen sowie annotierte Sequenzen von Genen der Honigbiene wurden über http://www.ncbi.nlm.nih.gov/mapview/map_search.cgi?taxid=7460 bezogen. Sofern die Sequenzierung der klonierten cDNAs erfolgreich war, wurde durch Vergleichen der Sequenz mit allen in der Genbank (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) enthaltenen Sequenzen ermittelt, ob es sich um das entsprechende Gen aus dem entsprechenden Organismus handelt. Die Sequenzen wurden anschließend anhand der Original-Chromatogramme mit Hilfe des Programms BioEdit 7.0.9.0 (HALL, 1999) korrigiert. Die Ableitung der Aminosäuresequenz der cDNAs, die Motivsuche und die Alignments (ClustalW, THOMPSON ET AL., 1994) wurden ebenfalls mit Hilfe von BioEdit durchgeführt. Struktur-Analysen erfolgten außerdem mittels TMHMM Server v. 2.0 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/>) und ProtScale (<http://www.expasy.ch/tools/protscale.html>).

Stammbaumrekonstruktion

Für die Stammbaumrekonstruktion wurde die *Neighbor-Joining*-Methode (SAITOU & NEI, 1987) verwendet. Dabei handelt es sich um ein distanzbasiertes Clusterverfahren unter Beachtung von Evolutionsmodellen. Zuerst wird eine Matrix aller paarweisen Distanzen der terminalen Taxa erstellt. Die paarweisen Distanzen werden anschließend korrigiert, um von benachbarten terminalen Taxa die mittlere Distanz zu allen anderen Taxa zu berechnen. Damit lässt sich für T Arten der gemittelte Distanzwert M aller Arten berechnen:

$$M_{ij} = d_{ij} - \frac{r_i + r_j}{T - 2}$$

Dabei ist r_i die Summe aller paarweisen Distanzen der Art i und r_j die Summe aller paarweisen Distanzen der Art j. Die Arten mit den negativsten M-Werten bilden jeweils ein Cluster. Die Neighbor-Joining-Analysen wurden mit Hilfe des Programms MEGA 4.0.2 (TAMURA ET AL., 2007) erstellt.

2.9 Verhaltensversuche zur phototaktischen und lokomotorischen Aktivität

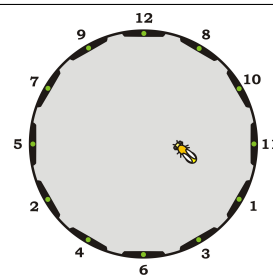
In Verhaltensversuchen wurde der Einfluss verschiedener Rezeptorliganden auf die lokomotorische und phototaktische Aktivität untersucht. Frisch geschlüpfte Bienen wurden von einer Brutwabe abgelesen und in Käfigen separiert. In einem ersten Versuch wurden die Tiere 7 Tage mit einer 50 %igen Saccharose-Lösung gefüttert, welche 0,01 M 5-HT enthielt. In allen darauffolgenden Versuchen wurden frisch-geschlüpfte Tiere nur mit der 50 %igen Saccharose-Lösung gefüttert. Waren sie 5 Tage alt, wurde der 50 %igen Saccharose-Lösung der zu untersuchende Ligand zugegeben. In der Kontrollgruppe wurde die reine 50 %ige Saccharose-Lösung beibehalten. Nach weiteren 2 Tagen wurden das Verhalten der Tiere untersucht.

Untersuchung zum phototaktischen Verhalten

Untersuchungen zum phototaktischen Verhalten erfolgten in einer speziellen kreisrunden Arena. Diese konnte komplett abgedunkelt werden. Es waren insgesamt 12 Dioden angebracht, wobei Dioden gleicher Intensität entgegengesetzt angeordnet waren. Die Lichtintensitäten der einzelnen Dioden sind Tab. 2 zu entnehmen. Die Bienen wurden aus den Käfigen geholt und 10 min lang dunkel-adaptiert. Anschließend wurden sie in die Arena entlassen. Den Bienen wurde das Licht einer Diode niedrigster Intensität präsentiert. Ist sie zu dieser gelaufen, so wurde sie ausgeschaltet und dafür sofort die gegenüberliegende Diode gleicher Intensität angeschaltet. Von jetzt an wurde vier mal die Zeit gemessen, welche das Tier benötigt, um von einer Diode gleicher Intensität zu der anderen zu laufen. Anschließend wurde zur nächsten Intensität übergegangen. Wurden die Dioden aller 6 Intensitäten je vier mal angelaufen, so galt ein Versuch als erfolgreich beendet. Das Verhalten der Tiere wurde für die Auswertung per Kamera aufgenommen.

Tab. 2: Eigenschaften der Leuchtdioden. Für jede Intensität waren zwei Leuchtdioden in der Phototaxisarena angebracht. Das Schema soll die Arena von oben darstellen. Die grünen Punkte repräsentieren die Dioden.

Intensität	Diode - Helligkeit	Diode - Helligkeit
1	1 - 0,48 lx	7 - 0,53 lx
2	2 - 1,03 lx	8 - 1,16 lx
3	3 - 2,10 lx	9 - 2,01 lx
4	4 - 3,35 lx	10 - 3,95 lx
5	5 - 6,69 lx	11 - 6,74 lx
6	6 - 14,5 lx	12 - 13,6 lx



Untersuchung zur lokomotorischen Aktivität

Diese Untersuchungen dienten als Kontrollexperiment. Es sollte untersucht werden, ob Effekte auf das phototaktische Verhalten durch einen Einfluss der Rezeptorliganden auf die lokomotorische Aktivität zu begründen sind. Die Versuche erfolgten in der selben Arena wie in Abschnitt 26. 1 min wurden die Bienen in völliger Dunkelheit laufen gelassen und auf Video aufgenommen. Mit Hilfe des Programms GrenTrack V1.0 erfolgte die Auswertung der Dunkelläufe. Die in 1 min zurückgelegte Strecke wurde gemessen und als Maß für die Aktivität notiert.

3 Ergebnisse

3.1 Der Am5-HT₁-Rezeptor

3.1.1 Isolierung und Charakterisierung der Am5-HT₁-Rezeptor-cDNA

Durch das Durchmustern des Genoms der Honigbiene *Apis mellifera* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/guide/bee/>) mit den Sequenzen bereits bekannter Arthropoden-5-HT₁-Rezeptoren, konnte ein Gen entdeckt werden, welches für einen 5-HT₁-Rezeptor kodiert. Mit Hilfe dieser Sequenz-Informationen wurden spezifische Primer entwickelt. Der 5'-Primer lag im Bereich des putativen Start-Codons und der 3'-Primer entsprechend im Bereich des Stop-Codons. In einem PCR-Experiment wurde die vollständige Rezeptor-cDNA amplifiziert. Anschließend wurde diese in den pGEM-Vektor ligiert und sequenziert.

Die Nukleotidsequenz besitzt einen offenen Leserahmen von 1209 bp. Dieser wird aus insgesamt sechs Exons gebildet, welche sich vollständig in 5'→3'-Richtung auf dem Contig4802 (Sequenzierabschnitt, Acc.No. AADG0500480) des Chromosomen LG13 befinden. Die Exon/Intron-, bzw. Intron/Exonübergänge befinden sich in den Regionen, welche für die TM1, die ECL1 und 2 und die CPL2 und 3 kodieren (siehe Tab. 3).

Tab. 3: Genomische Organisation des Am5-*ht*₁-Gens. Die Tabelle listet die Merkmale der Exons des Am5-*ht*₁-Gens sowie des Exons I des annotierten Rezeptorgens (*I*_{annot}, XM_393915) auf. Die Exonsequenzen sind in Groß- und die Intronsequenzen in Kleinbuchstaben dargestellt. Das Schema dient der Verdeutlichung der genomischen Struktur. Die Boxen repräsentieren die Exons und die abgewinkelten Linien die Introns. Die Lage der für die Transmembrandomänen kodierenden Bereiche wird durch schwarze Kästen angezeigt.

Exon	Länge	cDNA-Position	Contig-Position	Spleiß-Akzeptor	Spleiß-Donor
I	121 bp	1 - 121	11880 - 12000	-	TGTTCG/gtaag
II	134 bp	122 - 255	21022 - 21155	tccag/GGAAT	ACGAG/gtatt
III	144 bp	256 - 399	39618 - 39761	tacag/ATAAA	TACAG/gttaa
IV	156 bp	400 - 555	40491 - 40646	tccag/GCGAG	ACCAG/gtacc
V	161 bp	556 - 716	40877 - 41037	tgcag/ATCTT	AAAAG/gtccc
VI	493 bp	717 - 1209	41348 - 41840	tgcag/ACCGA	-
<i>I</i> _{annot}	51 bp	-	20831 - 20882	-	ATTTCG/atgga

Schema:

Der Vergleich der annotierten Am5-*ht*₁-Sequenz (Acc.No. XM_393915) mit dem klonierten Rezeptor und der genomischen DNA zeigt deutliche Unterschiede. Das erste Exon der annotierten Sequenz weist keine Gemeinsamkeiten mit dem ersten Exon des klonierten Am5-*ht*₁-Rezeptors auf. Vielmehr liegt das erste Exon der annotierten Sequenz an einer anderen Stelle im Genom, nämlich innerhalb des ersten Introns des klonierten Rezeptors. Zudem weist es keine konservierte Spleiß-Donor-Konsensussequenz auf. Desweiteren fällt das erste Intron in den Bereich der TM1. Das erste Exon der klonierten Am5-*ht*₁-Rezeptor-cDNA kodiert für den vorderen Teil der TM1, das des annotierten Rezeptors dagegen nicht.

Am5-HT1	-----	0
Dm5-HT1A	MAHETSPNDALDYIYIANSMNDRAPFLIAEPHPQPNVGGQDDAELEELDDMAVTDGQLEDTNNNNNSKRYSSGKRRAFDFIGSLAKPPPTDANTTT	100
Dm5-HT1B	-----MHTLTRPQP-----RFIYT-----EYSRIYIYYITSEMLKTV	33
Pea5-HT1	-----MDLLSATEFPTESEANEAEYYPDEQLT-----VKPLYDTVK-----LTVAEKPSDNDVFIQ-----	50
Pem5-HT1	MGRENTTSDDWNYTLPNLLLEYLDGLLEGGGQPHSNPLPNPKDAEAP-----ATTLWGALTSSSTPPTTTTTTTPAPINKPMFVMNFTL	84
Pxu5-HT1	-----	0
▼		
Am5-HT1	-----MEEHVNOTSR-----	10
Dm5-HT1A	TTAGSPLATAALAAAAASVAAAAARITAKAAHWLTTKQDATSSPASPALQLIDMNNYTNVAVGLGAMLLNDTLLLEGNDSSFLGEMLANRSGHLD	200
Dm5-HT1B	TTA-----MAAGDDVPASILEIELPAILLNESLFIELNGNLT-----QLVDTSN-----LSQIVVNRSVNGNGN-----SNTFD	99
Pea5-HT1	-ASEEDEVLTDLVMDPPTTASSLLANNSPNSLVYFEDIIVGR-----VACNTTINSTGVYSSSILECYNSTFIGDLFSNAS-----GNG	131
Pem5-HT1	RTTVDVTLQTRVNLKALDPLTSPAAAGGSVLGLDVTSDVGLGLGVATLSSASSTSSASSSSSSPAASSASTPDLLLAGNDSLVTLDDSFVLGGND	184
Pxu5-HT1	-----MND-----SRLTRTFN-----NTNDVTVSSTSDWYSGNCSWADAVSWG-----NST	43
▼		
Am5-HT1	-----NSSSDGLVFTDASTILRLTLVGLLILVIVVGNLIFVIAAILLERNLQSVANYLIVSLAVADLMVACLVMPLGAVYEINSEWISLGPGLCD	98
Dm5-HT1A	LINGTGGLVNVTSSKVAEDDFTQLLRMAVTSVLLGLMILVTLIGNVFVIAAILLERNLQNVANYLVAFLAVADLFVACLVMPLGAVYEISQGWILGPGLCD	300
Dm5-HT1B	LVD-----DEQERAAVEFWLLVRMIAMAVLGLMILVTLIGNVFVIAAILLERNLQNVANYLVAFLAVADLFVACLVMPLGAVYEISNGWILGPGLCD	132
Pea5-HT1	SA-----IGGRGDEPDLTDVILMGVTSVILGLMILVTLIGNVFVIAAILLERNLQNVANYLIVSLAVADLMVACLVMPLGAVYEISKGWILGPGLCD	223
Pem5-HT1	SANQS-----HFGNETSDGLIVDTVGMVITSVILGLMILVTLIGNVFVIAAILLERNLQNVANYLIVSLAVADLMVACLVMPLGAVYISKDWILGPGLCD	281
Pxu5-HT1	RG-----AGTNTTDDTDTSLVLMVAVTSVILGLMILVTLIGNVFVIAAILLERNLQNVANYLVAFLAVADLMVACLVMPLGAVYISQGWILGPGLCD	135
▼		
Am5-HT1	MWTSSDVLCCTASILHLVAIAVDRYWAVTNLDNYIQARNPRRIGMILVAVVWVSLGILSLAPQLGWKDPDYLDRLADG-TCLVSDPAYQIFATCCTFFVPL	197
Dm5-HT1A	IWTSQDVLCCCTASILHLVAIAVDRYWAVTNIDYIHSRSTSNRVFMIFQVWTAAVIVSLAPQFGWKDPDYLDRLADG-KCMVSDVSYQVFATCCTFFVPL	399
Dm5-HT1B	IWTSQDVLCCCTASILHLVAIAVDRYWAVTNIDYNNLRTPRRVFLMIFQVWFAALIVSLAPQFGWKDPDYLDRLADG-HCMVSDVSYQVFATCCTFFVPL	291
Pea5-HT1	MWTSSDVLCCTASILHLVAIAVDRYWAVTNVDYIHTNRGTRIGMILVAVVWVSLGILSLAPQFGWKDPDYLDRLADG-TCLVSDPAYQIFATCCTFFVPL	323
Pem5-HT1	MWTSSDVLCCTASILHLVAIAVDRYWAVTNVDYIHSRNGTRIGMILVAVVWVSLGILSLAPQFGWKDPDYLDRLADG-TCLVSDPAYQIFATCCTFFVPL	381
Pxu5-HT1	MWTSSDVLCCTASILHLVAIAVDRYWAVTNVDYIHSRNEKRIPTMILVAVVWVSLGILSLAPQFGWKDPDYLDRLADG-TCLVSDPAYQIFATCCTFFVPL	235
▼		
Am5-HT1	LVIIILVYKIFQARAKRIARRR-PGT-----IVQPARERRGILR-----YVTKR-----PREESTA-----FTITRS-----TPDHSSISP	261
Dm5-HT1A	MVILDALVYKIFQARAKRIARRRPRPVDAAVNNNQPDGGAATDTKHLRLRLGRFSTAKSKTGSAVGVSGPASPGRALGLVDGNSTNTVNTVEDTEFSSS	498
Dm5-HT1B	LVIIILVYKIFQARAKRIARRRQAKSFNVTLTETDCDSA-VRELKKEKSKRAERKRL--EAGERTPVGDGMGG-----QLQRRTRKRMRI-CFGRNNTA	383
Pea5-HT1	LVIIILVYKIFQARAKRIARRRQQRSTVAGHNAPSGGTGNKTSNNPPASISTSKFITKRFRMRKSNKSSAA-----EALVSSLVLVEGHSTASV	416
Pem5-HT1	TAIILVYKIFQARAKRIARRRPNRPG-----KKEAKKGNRR-----TNR-----AKANRGGGG-----GGGETK	442
Pxu5-HT1	AVIILVYKIFQARAKRIARRRREPP-----PPRPTSDAGATPSGRPVQASARDRRFVKR--FLNLKCKNQRTRA-----ETIAAALLLLEGGSTSTV	320
▼		
Am5-HT1	EKSSSYNGAN-----ATQSTTITVTPS-----	281
Dm5-HT1A	NVDSKSRAGVEAPSTSGNQIATVSHLVALAKQQKSTAKSSAAVNGMAPSGRQEDDQGRPEHGEQEDRELELDQDEQVGPPTTASATTAAGTNESEDQ	559
Dm5-HT1B	NVVAGSEGAVAR-----SMAAIVDFASLAIT-----RETEFSTSNYDNKSHAGTELTITVS--SDADDY	441
Pea5-HT1	DVVGEDDGTVDENQKSSDTSGASGGGVVGGGTGG-----GGGSVGEKDNLRNDRSIDDGVDDDDGKVVITAFITISKSLEAASG	495
Pem5-HT1	NGVAEH-----SPDK-----ISNNGAVS5SSVSEVSRLEMLPKPPP-----CCTAFTTVNSG-----GGGETK	459
Pxu5-HT1	DTLDEEPR-----VSPEKSSSTVITN-GSKPERAIVPALS-----TTAFTTNEKVPSS--	341
▼		
Am5-HT1	-----TVSTTTTTTTTTVTPNSSSHSHSSSKR-----	307
Dm5-HT1A	CKANGVEVLDDPQLQQLQEQVQKSVKSGGGGASTSNATTITISALSPTQTSQGVGIAAAAAGPMTAKTSTLTSCNOSHPLCGTANESPTPEPR	698
Dm5-HT1B	RTSNANEIITVSVQVAHAHQHHLIASHLN---AITPLAQSIAMGVGLTTTTPEKALSGAGTVAGAVAGSSG-----SGSGEGAGT---	522
Pea5-HT1	LGVGVGTVGARGDVGPMATSNVSPKSSATTTNNGSASHQSHISDMRVELQREATNNTKDV-----	562
Pem5-HT1	-----SPDK-----ISNNGAVS5SSVSEVSRLEMLPKPPP-----CCTAFTTVNSG-----GGGETK	480
Pxu5-HT1	-----VSPEKSSSTVITN-GSKPERAIVPALS-----	368
▼		
Am5-HT1	-----TRDTIISKREKKAAKTLAIITGAFVVCWLPFFVVALLRATCOACEPPELIASVFLWLYGFNST	373
Dm5-HT1A	SRQPTTPQQPHQQAHQQQQQQLSSIANPMQVKNRKTLEAKRERKAAKTLAIITGAFVVCWLPFFVVALLRATCOACEPPELIASVFLWLYGFNST	798
Dm5-HT1B	-----BGKNAGVGLGGVLAISANPHQKLAKRRLQLLEAKRERKAAKTLAIITGAFVVCWLPFFVVALLRATCOACEPPELIASVFLWLYGFNST	610
Pea5-HT1	-----NVVGGNVKEKLLINNQRDKKETLEAKRERKAAKTLAIITGAFVVCWLPFFVVALLRATCOACEPPELIASVFLWLYGFNST	644
Pem5-HT1	-----KTKKETLEAKRERKAAKTLAIITGAFVVCWLPFFVVALLRATCOACEPPELIASVFLWLYGFNST	556
Pxu5-HT1	-----QREKKKLEAKRERKAAKTLAIITGAFVVCWLPFFVVALLRATCOACEPPELIASVFLWLYGFNST	433
▼		
Am5-HT1	LNPVIYTIFFSPEPFAFKRMLCC-----GSRIR-----	402
Dm5-HT1A	LNPVIYTIFFSPEPFAFKRILFC---GHRPVHYRSGKL-----	834
Dm5-HT1B	LNPVIYTIFFSPEPFAFKRILFC---RKAARARSAKI-----	645
Pea5-HT1	LNPVIYTIFFSPEPFAFKRILCCGGRRSRPRNRPFGKLR-----	683
Pem5-HT1	LNPVIYTIFFSPEPFAFKRILFC---RKAQRYRPGKVR-----	591
Pxu5-HT1	LNPVIYTIFFSPEPFAFKRILFC---THRRGRNKKF-----	466

Abb. 5: Alignment der abgeleiteten Aminosäuresequenz von 5-HT₁-Rezeptoren aus *A. mellifera* (AM5-HT₁), *Drosophila melanogaster* (Dm5-HT_{1A}, CAA77570), Dm5-HT_{1B} (CAA77571), *Peperiplaneta americana* (Pea5-HT₁, FN298392), *Papilio xuthus* (Pxu5-HT₁, BAD72868) und *Pe-naeus monodon* (Pem5-HT₁, AAV48573). Putative Transmembranregionen sind durch graue Boxen (TM1-7) markiert. Identische AS (≥ 80 %) sind schwarz hinterlegt. Konservativ substituierte AS sind grau hinterlegt. Konsensusstellen für N-Glykosylierung sind mit ▼ gekennzeichnet, für Phosphorylierung via PKC mit • und jene für C-Palmitoylierung mit *. Unterstrichene AS repräsentieren jenen Bereich der CPL3, welcher als Antigen für die Antikörpergenerierung genutzt wurde.

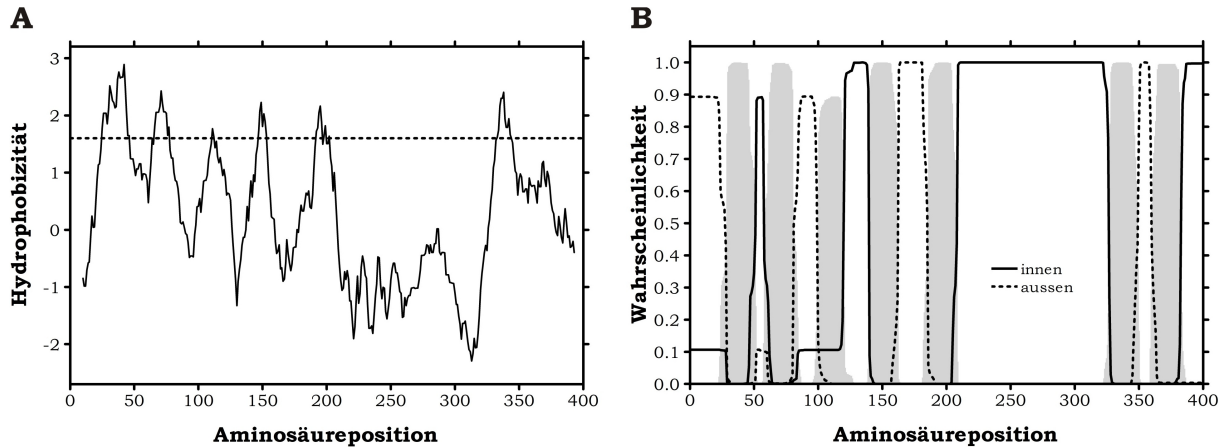


Abb. 6: Strukturelle Eigenschaften der abgeleiteten Aminosäuresequenz des Am5-HT₁-Rezeptors.

A: Hydrophathieprofil nach KYTE & DOOLITTLE (1982). Die Fensterweite betrug 19 AS. Bereiche mit Hydrophobizitätswerten größer als 1,6 deuten auf Transmembrandomänen hin.

B: Die Transmembrantopologie wurde mit Hilfe des TMHMM-Servers 2.0 erstellt (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/>). Die grauen Bereiche repräsentieren die Transmembrandomänen.

3.1.2 Eigenschaften der abgeleiteten Aminosäuresequenz

Der offene Leserahmen (*open reading frame*, ORF) der Am5-*ht*₁-cDNA kodiert für ein 402 AS langes und 44,5 kDa schweres Protein - Am5-HT₁ (vgl. Abb. 5). Hydrophathieprofil (nach KYTE & DOOLITTLE, 1982) und Transmembrandomänenvorhersage (Abb. 6) zeigen einen 29 AS langen extrazellulären N-Terminus. Diesem folgen sieben Domänen, welche sowohl hydrophob, als auch ausreichend lang sind, um die Zellmembran zu durchspannen (Transmembrandomänen). Die Transmembrandomänen sind alternierend durch intrazelluläre und extrazelluläre Schleifen miteinander verbunden. Dabei ist die CPL3 mit 121 Aminosäureresten besonders lang. An die TM7 schließt sich der intrazellulär lokalisierte C-Terminus von 20 AS an.

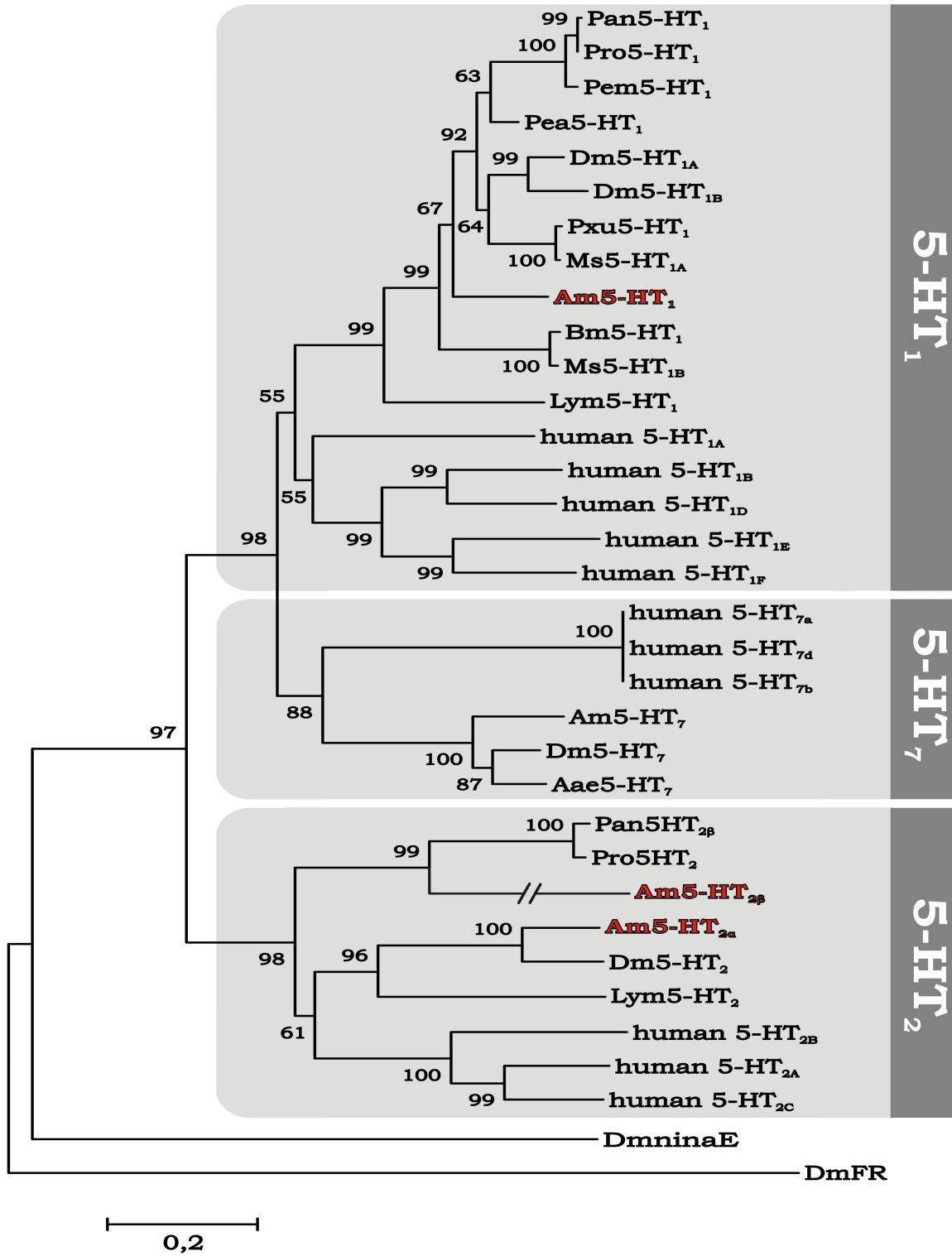
Tab. 4: Konservierte Aminosäurereste im Am5-HT₁-Rezeptor. Nomenklatur der Aminosäurereste innerhalb der Transmembrandomänen nach BALLESTEROS & WEINSTEIN (1995). **TM** Transmembrandomäne, **ECL** extrazelluläre Schleife, **CPL** cytoplasmatische Schleife.

Domäne	AS/-Motiv	AS-Position	Domäne	AS/-Motiv	AS-Position
TM1	G _{1.49} N _{1.50}	41-42	TM5	F _{5.47} xxP _{5.50}	193-196
TM2	S _{2.45} L _{2.46} A _{2.47}	65-67		Y _{5.58}	204
	D _{2.50}	70	CPL3	ExKAxxxL	320-327
	V _{2.57} M _{2.58} P _{2.59}	77-79	TM6	F _{6.44}	334
ECL1	W	90		W _{6.47}	338
	C	97		P _{6.49} F _{6.50} F _{6.51}	340-342
TM3	D _{3.32}	104	ECL3	C	351
	S _{3.39} I _{3.40}	111-112	TM7	W _{7.40} L _{7.42} G _{7.42}	366-368
	D _{2.49} R _{2.50} Y _{2.51}	121-123		Y _{7.43}	369
TM4	W _{4.50}	148		S _{7.46}	372
ECL2	C	176		N _{7.49} P _{7.50} xxY _{7.53}	375-379

Außerdem findet man für 5-HT-Rezeptoren typische, in Tab. 4 aufgelistete hoch-konservierte Aminosäuren. Innerhalb der wenig konservierten Strukturen, dem N- und C-Terminus sowie der CPL3, sind einige Motive zu finden, welche posttranslational modifiziert werden können. Im N-Terminus sind mit NQT (6-8) und NSS (11-13) zwei Konsensusstellen für N-Glykosylierung (N-x-S/T) zu finden. Innerhalb der CPL3 sind 4 Konsensusstellen für die Phosphorylierung durch die Proteinkinase C (S/T-x-R/K) lokalisiert: TKR (237-239), SSK (307-309) und SKR (308-310 und 317-319). Außerdem befindet sich in der CPL3 eine 9 AS lange Poly-Threonin-Sequenz (285-294). Im C-Terminus ist ein Cysteinrest (395) lokalisiert, welcher möglicherweise palmitoyliert und somit in der Zellmembran verankert werden kann. Dadurch würde eine vierte cytoplasmatische Schleife entstehen. Dagegen ist über die gesamte Sequenz kein Bereich zu entdecken, welcher für die Phosphorylierung durch die Proteinkinase A in Frage kommt.

Im Vergleich der AS-Sequenzen verschiedener Serotonin-Rezeptoren von sowohl Vertebraten als auch Invertebraten, bildet der Am5-HT₁-Rezeptor mit allen anderen 5-HT₁-Rezeptoren eine gemeinsame Gruppe (Abb. 7). Innerhalb dieser Gruppe, bildet er eine gemeinsame Gruppe mit den 5-HT₁-Rezeptoren von *Panulirus interruptus*, *Procambarus clarkii*, *Penaeus monodon*, *Periplaneta americana*, *Drosophila melanogaster*, *Papilio xuthus* und *Manduca sexta*.

Abb. 7 (nächste Seite): Stammbaumrekonstruktion von Serotonin-Rezeptoren verschiedener Organismen. In der *Neighbor-Joining*-Analyse wurden die konservierten Regionen (N- und C-Terminus sowie die CPL3 wurden ausgeschlossen) der Aminosäure-Sequenzen verwendet. Die nachfolgenden Sequenzen wurden für die Analyse verwendet: *Panulirus interruptus* (Pan5-HT₁, AY528822); *Procambarus clarkii* (Pro5-HT₁, ABX10973), *Penaeus monodon* (Pem5-HT₁, AAV48573), *Periplaneta americana* (Pea5-HT₁, FN298392), *Drosophila melanogaster* (Dm5-HT_{1A}, CAA77570), Dm5-HT_{1B} (CAA77571), *Papilio xuthus* (Pxu5-HT₁, BAD72868), *Manduca sexta* (Ms5-HT_{1A}, DQ840515), *A. mellifera* (Am5-HT₁), *Bombyx mori* (Bm5-HT, CAA64862), (Ms5-HT_{1B}, DQ840516), *Lymnaea stagnalis* (Lym5-HT₁, L06803), *Homo sapiens* (human 5-HT_{1A}, NP 000515), human 5-HT_{1B} (NP 000854), human 5-HT_{1D} (NP 000855), human 5-HT_{1E} (NP 000856), human 5-HT_{1F} (NP 000857), human 5-HT_{7a} (NP 000863), human 5-HT_{7d} (NP 062873), human 5-HT_{7b} (NP 062874), Am5-HT₇ (AM076717), Dm5-HT₇ (A38271), *Aedes aegypti* (Aae5-HT₇, AAG49292), Pan5-HT_{2β} (AY550910), Pro5-HT₂ (ABX10972), Am5-HT_{2β}, Am5-HT_{2α}, Dm5-HT₂ (CAA57429), Lym5-HT₂ (U50080), human 5-HT_{2B} (NP 000858), human 5-HT_{2A} (NP 000612), human 5-HT_{2C} (NP 000859), *D. melanogaster* ninaE-encoded Rhodopsin 1 (DmninaE, NM 079683) und *D. melanogaster* FMRFamide Rezeptor (DmFR, AAF47700). Das Alignment wurde mittels ClustalW erstellt und die *Neighbor-Joining*-Analyse erfolgte mit dem Programm Mega 4.0.2. Die Nummern an den Verzweigungen repräsentieren die *Bootstrap*-Werte in % aus 10.000 *Bootstrap*-Replikationen.



3.1.3 Immunologischer Nachweis des Am5-HT₁-Proteins

Nachweis der Funktionalität des polyklonalen Antiserums gegen das Am5-HT₁-Rezeptorprotein in Western-Blot-Analysen

Für den immunologischen Nachweis des Am5-HT₁-Rezeptorproteins wurde ein polyklonales Antiserum (anti-Am5-HT₁) generiert und affinitätsgereinigt (siehe Abschnitt 2.6.9, Seite 26). Hierfür wurde ein Fusionsprotein hergestellt, welches einem Teil der CPL3 entspricht (vgl. Abb. 5). Der Immunisierungsverlauf ist in Abb. 8 B dargestellt. Man erkennt eine verstärkte Immunantwort mit zunehmender Dauer der Immunisierung. Das affinitätsgereinigte Antiserum markiert ein Protein in der Größe von etwa 50 kDa. Damit weicht das Molekulargewicht des markierten Proteins leicht von dem vorhergesagten Molekulargewicht von Am5-HT₁ ab (44,5 kDa). In weiteren Western-Blot-Experimenten sollte die Spezifität von anti-Am5-HT₁ überprüft werden. Hierbei wurde in einem von zwei parallelen Ansätzen der Antikörper anti-Am5-HT₁ gegen das zur Immunisierung eingesetzte Fusionsprotein (MBP-Am5-HT₁CPL3) präadsorbiert. Nach der Präadsorption ist keine Markierung mehr auszumachen (Abb. 8 C).

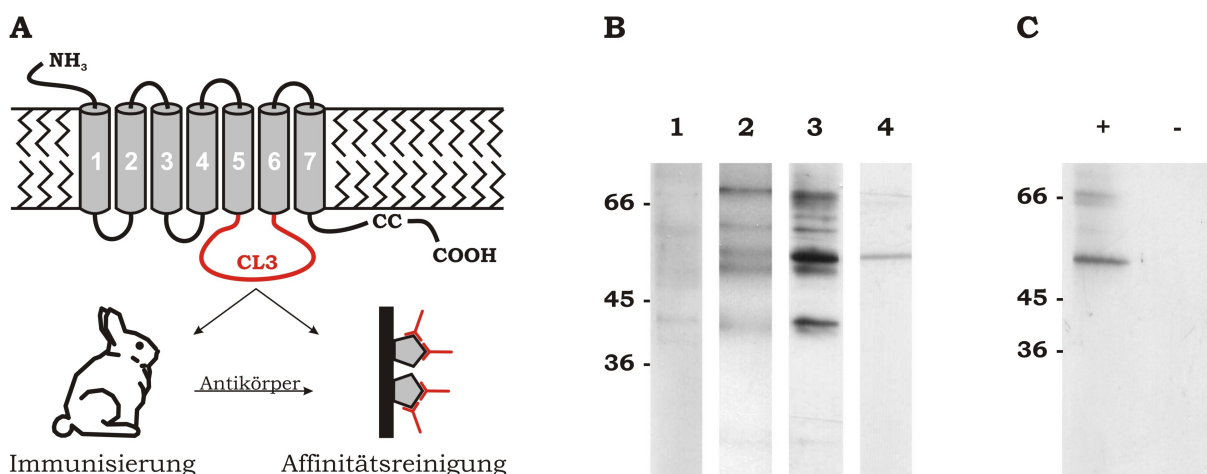


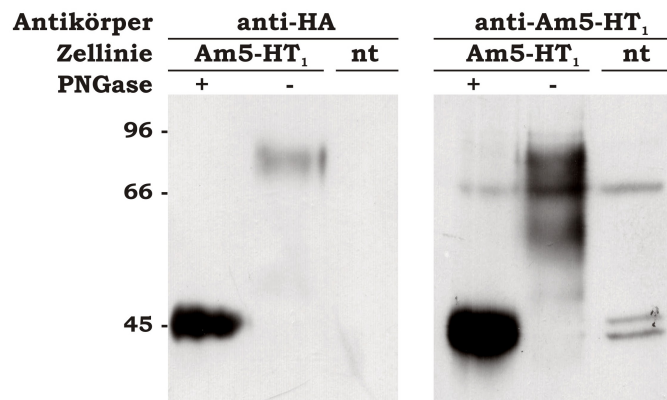
Abb. 8: **A:** Schema zur Strategie der Herstellung des polyklonalen Antikörpers.

B: Western-Blot-Experiment zur Untersuchung des Immunisierungsverlaufs. In jeder Bahn sind 5 μ l Homogenat des Gehirns einer Sammlerbiene aufgetragen. Jede Spur wurde mit einem anderem Serum behandelt: 1 - Präimmuneserum (1:1.000), 2 - Serum vom 61. Tag (1:5.000), 3 Serum vom 90. Tag (1:5.000), 4 - gereinigtes Serum vom 120. Tag (1:1.000). Als sekundärer Antikörper kam *goat-anti-rabbit*-HRP (1:10.000) zum Einsatz. Der Molekulargewichtsstandard (in kDa) ist links angegeben.

C: Western-Blot-Experiment zum Nachweis der Spezifität von anti-Am5-HT₁. In jeder Bahn sind 10 μ l Homogenat des Gehirns einer Sammlerbiene aufgetragen. Die Abbildung zeigt Western-Blots mit Membranproteinen vom Gehirn der Honigbiene, welche mit dem anti-Am5-HT₁-Antikörper (1:1.000) inkubiert wurden: + unbehandelt, - präadsorbiert (gegen MBP-Am5-HT₁CPL3, 15 μ g/ml). Als sekundärer Antikörper kam *goat-anti-rabbit*-HRP (1:10.000) zum Einsatz. Der Molekulargewichtsstandard (in kDa) ist links angegeben.

Weiterhin wurden Western-Blot-Experimente mit Membranproteinen von Am5-HT₁-exprimierenden HEK293-Zellen durchgeführt (Abb. 9). Während der Antikörper auf nicht deglykosylierten Membranproteinen der Am5-HT₁-Zelllinie lediglich einen großen Bereich (50-96 kDa) unscharf markiert, markiert er auf mittels PNGase F deglykosylierten Membranproteinen der

Abb. 9: Western-Blot-Analyse mit Membranproteinen von HEK293-Zellen. Auf jeder Bahn wurden 10 μg der entsprechenden Proteinfraction eingesetzt. Je eine der Proben wurde mit PNGase F behandelt (+), die andere nicht (-). Die Inkubation des Western-Blots erfolgte mit anti-HA (1:5.000), bzw. anti-Am5-HT₁ (1:1.000) und dem sekundären Antikörper *goat-anti-rat* HRP (1:20.000), bzw. *goat-anti-rabbit* HRP (1:20.000). Der Molekulargewichtsstandard (in kDa) ist links angegeben. **nt** nicht transfiziert.



gleichen Zelllinie prominent ein Protein im Größenbereich von 45 kDa (erwartetes Molekulargewicht = 44,5 kDa). Dagegen sind diese Markierungen auf nicht-transfizierten HEK293-Zellen nicht zu erkennen. Zur Überprüfung der Spezifität des anti-Am5-HT₁-Antikörpers wurden parallel Experimente durchgeführt, in welchen der anti-HA-Antikörper verwendet wurde. Dieser erkennt einen HA-Tag, welcher dem Rezeptorprotein in den HEK293-Zellen gentechnisch angefügt wurde. In diesem Experiment wurden vergleichbare Ergebnisse wie mit dem anti-Am5-HT₁-Antikörper erzielt.

Gewebsspezifischer Nachweis des Am5-HT₁-Rezeptorproteins auf Western-Blots

Für den gewebsspezifischen Nachweis von Am5-HT₁, wurde das Gehirn der Honigbiene freipräpariert und in Zentralgehirn, Antennalloben, optische Loben, Ocellen (mitsamt Ocellarnerv) und Unterschlundganglion geteilt. Zudem wurden dem Thorax und dem Abdomen verschiedene Organe entnommen und separiert. Mit den Membranproteinen dieser Gewebe bzw. Organe wurden Western-Blot-Experimente durchgeführt (Abb. 10).

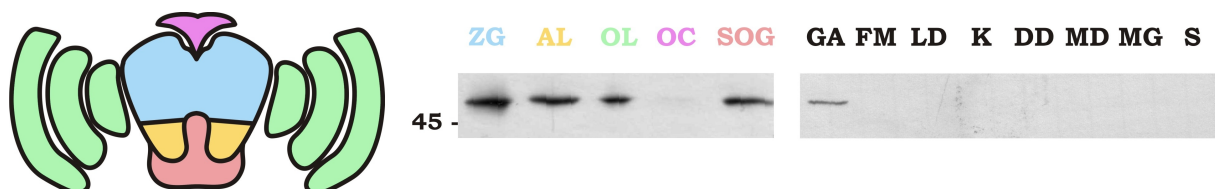


Abb. 10: Western-Blot-Analyse zur Verteilung des Am5-HT₁-Rezeptor-Proteins in verschiedenen Geweben adulter Honigbienen-Arbeiterinnen.

Auf jeder Bahn wurden 5 μg Membranproteine aufgetragen. Die Inkubation der Western-Blots erfolgte mit anti-Am5-HT₁ (1:1.000) und dem sekundären Antikörper *goat-anti-rabbit* HRP (1:20.000). Der Molekulargewichtsstandard (in kDa) ist links angegeben. **ZG** Zentralgehirn, **AL** Antennalloben, **OL** optische Loben, **OC** Ocellen/Ocellarnerv, **SOG** Subösophagialganglion (Farben entsprechen den Gehirnregionen im Schema). **GA** Bauchmark, **FM** Flugmuskulatur, **LD** Labialdrüse, **K** Kropf, **DD** Dünndarm, **MD** Mitteldarm, **MG** Malpighische Gefäße, **S** Stachelapparat/Giftdrüse.

Auffallend ist, dass der anti-Am5-HT₁-Antikörper nur Proteine in Nervengewebe markiert. In den Ocellarnerven ist auch auf den original Kodak-Filmstreifen nur eine schwache Bande auszumachen, welche in den eingescannten Grafiken so gut wie nicht zu erkennen ist.

Immunhistochemische Lokalisation des Am5-HT₁-Rezeptorproteins

Die Verteilung des Am5-HT₁-Rezeptorproteins sollte im Bienenhirn genauer untersucht werden. Hierfür wurden Gefrierschnitte des Gehirns von Sammlerbienen angefertigt und mit dem anti-Am5-HT₁-Antikörper inkubiert. In mehreren unabhängigen Experimenten (n=5) wurden die gleichen Neuropile markiert. Repräsentative Markierungen sind in Abb. 11 dargestellt.

Auffällig ist die starke Immunreaktivität in den optischen Neuropilen. In den Ocellarnerven kann eine starke Immunfluoreszenz detektiert werden. Es ist wahrscheinlich, dass es sich bei den markierten Neuronen um die L- bzw. LD-Neurone handelt (PAN & GOODMAN, 1977; MOBBS, 1985). Diese ziehen, entsprechend der Am5-HT₁-Immunreaktivität, in großen Trakten von den Ocellen in das dorsale Protocerebrum. Es kann jedoch nicht ausgeschlossen werden, dass auch S-Neuronen markiert sind. In der Lamina, dem ersten optischen Ganglion, werden die Eingänge von den Photorezeptorzellen mit den Neuronen zweiter Ordnung synaptisch verbunden. Die Lamina wird von drei Schichten gebildet (A,B und C, vgl. RIBI, 1975). Mit Ausnahme der C-Schicht weist die Lamina eine stark ausgeprägte Am5-HT₁-ähnliche Immunreaktivität auf. Dabei unterscheiden sich A- und C-Schicht nicht in der Intensität der Immunfluoreszenz. Das äußere optische Chiasma weist keine Immunfluoreszenz auf.

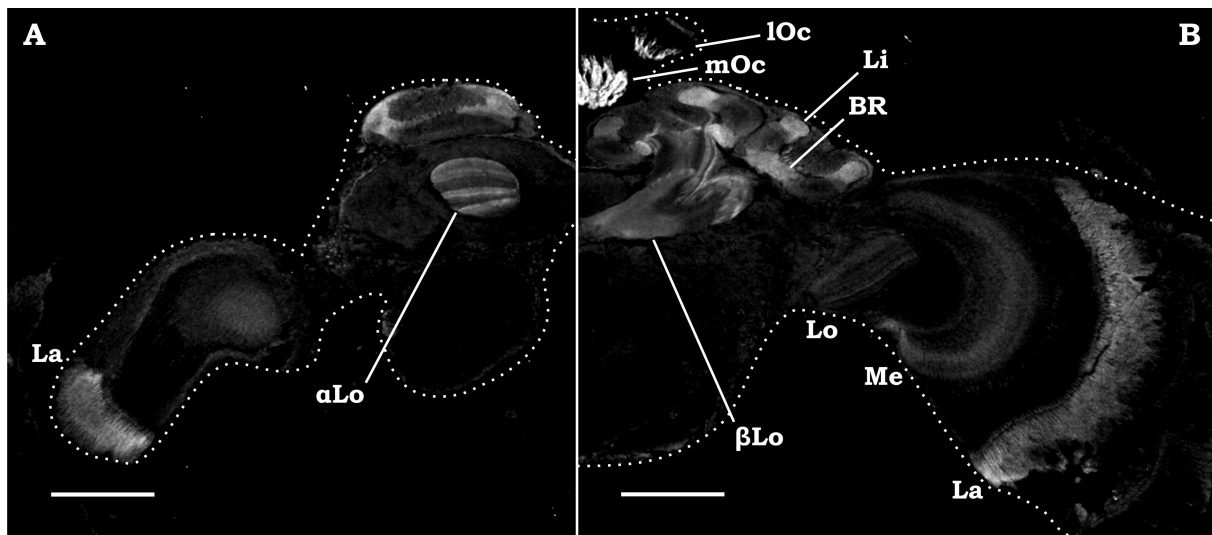


Abb. 11: Immunhistochemische Lokalisation von Am5-HT₁ im Bienenhirn.

A Frontalschnitt in der Ebene der α -Loben des Bienenhirnes.

B Frontalschnitt in der Ebene der β -Loben des Bienenhirnes.

Dargestellt sind Aufnahmen von Gefrierschnitten des Gehirns von Sammlerbienen, markiert mit anti-Am5-HT₁ (1:1.000) und *goat-anti-rabbit-Alexa568* (1:200, durch Grünlichtanregung sichtbar gemacht). Die Aufnahmen repräsentieren Projektionen von Bildstapeln mit einer Gesamtdicke von jeweils 20 μ m. Der Maßstabsbalken entspricht 250 μ m. α Lo α -Lobus der Pilzkörper, β Lo β -Lobus der Pilzkörper, La Lamina, Me Medulla, Lo Lobula, mOc medianer Ocellarnerv, IOc lateraler Ocellarnerv, Li Lippe, BR Basalring.

In der Medulla ist die Rezeptormarkierung in den verschiedenen Schichten (1-6, vgl. RIBI & SCHEEL, 1981) unterschiedlich stark ausgeprägt. Die distalen Schichten 1a und 1b zeigen Immunreaktivität, die sich kaum von Hintergrundsignal abhebt. Die Schichten 2, 3 und 4 weisen innerhalb der Medulla die höchsten Immunfluoreszenzsignale auf. Zudem hebt sich in einigen der Präparate das Signal der Schichten 3 und 4 von dem der Schicht 2 ab. Die Schichten 5 und 6 zeigen nur ein schwaches Signal, was auf eine geringe des Am5-HT₁-Rezeptordichte deutet. Das innere optische Chiasma ist ebenfalls frei von Immunreaktivität. Im dritten optischen Ganglion, der Lobula, weist jede der von RIBI & SCHEEL (1981) beschriebenen 6 Schichten Am5-HT₁-ähnliche Markierungen auf. Von diesen heben sich die Schichten 2 und 3 sowie 5 und 6 bezüglich der Intensität ihres Fluoreszenzsignals etwas von den Schichten 1 und 4 ab.

Weiterhin bindet der anti-Am5-HT₁-Antikörper an Strukturen in bestimmten Teilen der Pilzkörper. Die Eingangsregionen der Pilzkörper, die Pilzkörperkelche, weisen Rezeptormarkierungen in der Lippe und dem Basalring auf. Der Kragen sowie die Somata der Kenyon-Zellen zeigen dagegen keine Immunreaktivität. Im Pedunculus, welcher von den Axonen der Kenyon-Zellen gebildet wird, ist stets eine geschichtete Rezeptormarkierung zu finden. Auch die Ausgangsregionen der Pilzkörper, α - und β -Lobus, werden durch den anti-Am5-HT₁-Antikörper markiert. Dabei ist im α -Lobus ein deutliches horizontales Streifenmuster zu erkennen.

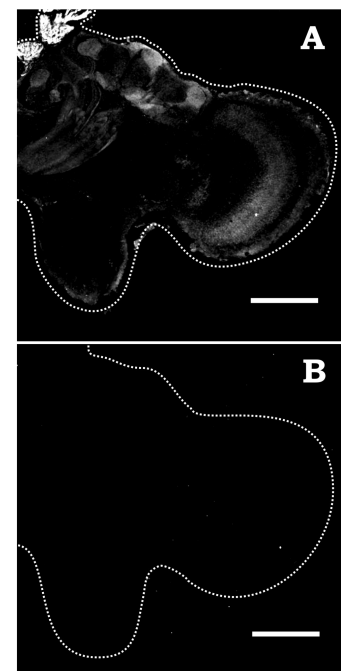
Innerhalb der Antenalloben ist in einem Teil der Experimente eine schwache Markierung der Glomeruli aufgetreten, welche jedoch von der Intensität nicht an die der anderen Gehirnteile heranreichte, sondern sich nur gering vom Hintergrundsignal abhob. Im Zentralkomplex und im Subösophagealganglion konnte keine Immunreaktivität nachgewiesen werden.

Abb. 12: Präabsorptionsexperiment zur Untersuchung der Spezifität des anti-Am5-HT₁-Antikörpers in immunhistochemischen Analysen.

A Frontalschnitt eines Bienenhirnes inkubiert mit anti-Am5-HT₁ (1:1.000).

B Direkt auf **A** folgender Frontalschnitt inkubiert mit präadsorbiertem (gegen MBP-Am5-HT₁CPL3, 15 μ g/ml) anti-Am5-HT₁ (1:1.000).

Dargestellt sind Aufnahmen von Gefrierschnitten des Gehirns von Sammlerbienen. Als sekundärer Antikörper kam *goat-anti-rabbit*-Alexa568 (1:200, durch Grünlichtanregung sichtbar gemacht) zum Einsatz. Die Aufnahmen repräsentieren Projektionen von Bildstapeln mit einer Gesamtdicke von jeweils 20 μ m. Der Maßstabsbalken entspricht 250 μ m.



Die Spezifität der für die immunhistochemischen Analysen verwendeten Antikörper, wurde in Kontrollexperimenten überprüft. In Experimenten, bei denen die Gefrierschnitte nur mit dem sekundären Antikörper inkubiert wurden (= Kontrolle für Kreuzreaktivität des sekundären Antikörpers), kann lediglich ein schwaches Hintergrundsignal des Gewebes detektiert werden (nicht gezeigt). Außerdem wurde die Spezifität des anti-Am5-HT₁-Antikörpers durch Präabsorptionsexperimente überprüft. Sind die Gefrierschnitte eines Bienenhirns mit einer Lösung inkubiert worden, welche den unbehandelten Antikörper enthielt, so bekam man die bereits beschriebenen Markierungen innerhalb der Pilzkörper, der optischen Neuropile sowie der Ocellarnerven (Abb. 12 A). Inkubierte man dagegen einen entsprechenden Gefrierschnitt mit einer Lösung, in welcher der Antikörper mit dem zur Immunisierung eingesetzten Fusionsprotein (MPB-Am5-HT₁CPL3) präadsorbiert wurde, so ist keine Immunreaktivität nachweisbar (Abb. 12 B).

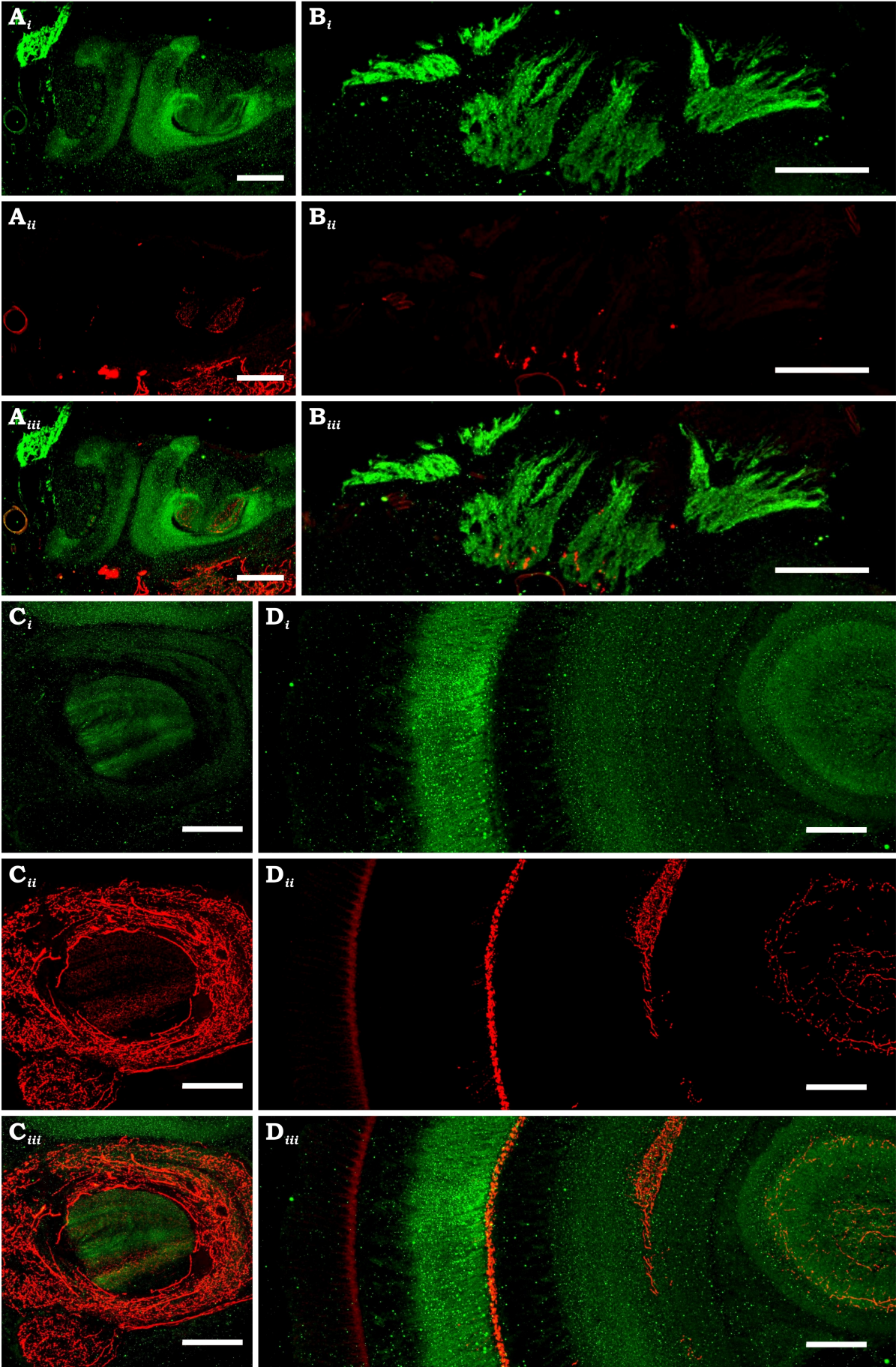
Weiterhin sollte untersucht werden, ob das Am5-HT₁-Rezeptorprotein in der Nähe von serotonergen Fasern zu finden ist, bzw. ob Serotonin und der Am5-HT₁-Rezeptor kolokalisiert oder in enger Nachbarschaft lokalisiert sind. Hierfür wurden Doppelmarkierungen mit anti-Am5-HT₁ und anti-5-HT durchgeführt (Abb. 13). 5-HT-ähnliche und Am5-HT₁-ähnliche Immunreaktivität sind nicht Regel nicht kolokalisiert. Sie sind jedoch in räumlicher Nähe zueinander zu finden. In der Lamina ist der Rezeptor, wie bereits beschrieben, in den Laminaschichten A und B lokalisiert. In der C-Schicht, welche keine Rezeptormarkierung aufweist, sind serotonerge Fasern lokalisiert (Abb. 13 D). Von Neuronen dieser Schicht ziehen vereinzelte Fortsätze in die Am5-HT₁-immunreaktive Schicht B. In der Medulla kann man eine Kolokalisation von Rezeptormarkierung und 5-HT-ähnlicher Immunreaktivität in den Medulla-Schichten 2 und 3 ausmachen (Abb. 13 D). Innerhalb der Lobula-Schichten 2, 5 und 6, welche eine hohe Am5-HT₁-Rezeptordichte aufweisen, sind ebenfalls Geflechte von 5-HT-immunreaktiven-Fasern vorhanden (Abb. 13 D).

Weiterhin findet man überlappende Am5-HT₁- und 5-HT-ähnliche Immunreaktivität am Basalring der Pilzkörperkelche (Abb. 13 A) und in den Ocellarnerven (Abb. 13 B). Im α -Lobus ist die 5-HT-ähnliche Immunfluoreszenz ebenfalls in horizontalen Streifen ausgebildet. Jedoch weisen die Bereiche, in denen der Rezeptor nicht bzw. nur in geringer Dichte vorkommt, die stärksten Signale 5-HT-ähnlicher Immunfluoreszenz auf (Abb. 13 C). Der α -Lobus ist zusätzlich von einem starken Geflecht serotonerger Fasern umgeben.

Abb. 13 (nächste Seite): Immunhistochemische Analyse zur räumlichen Beziehung von Am5-HT₁ und 5-HT.

A Ausschnitt aus den Pilzkörpern. **B** Detailaufnahme der Ocellarnerven.
C Detailaufnahme des α -Lobus. **D** Ausschnitt aus den optischen Loben.

Die Aufnahmen repräsentieren Projektionen von Bildstapeln von Frontalschnitten des Gehirns von Sammlerbienen mit einer Gesamtdicke von jeweils 25 μm . In den Analysen kamen anti-Am5-HT₁ (1:1.000) und *goat-anti-rabbit-Alexa488* (1:50, durch Blaulichtanregung sichtbar gemacht, in der Abbildung grün, X_i) sowie anti-5-HT (1:200) und *goat-anti-rat-Cy3* (1:200, durch Grünlichtanregung sichtbar gemacht, in der Abbildung rot, X_{ii}) zur Anwendung. In X_{iii} sind X_i und X_{ii} zusammengelegt. Der Maßstabsbalken entspricht 100 μm .



Immuncytochemische Analyse zum Nachweis der Expression des Am5-HT₁-Rezeptorproteins in HEK293-Zellen

Den Am5-HT₁-Rezeptor stabil exprimierende sowie nicht-transfizierte HEK293-Zellen wurden fixiert und sowohl mit dem anti-Am5-HT₁-Antikörper, als auch mit dem anti-HA-Antikörper inkubiert (Abb. 14). Beide Antikörper erkennen in der Am5-HT₁-Zelllinie das Rezeptorprotein und markieren Bereiche in der Zellperipherie. Kontrollexperimente, bei denen jeweils der primäre Antikörper weggelassen bzw. welche auf nicht-transfizierten HEK293-Zellen durchgeführt wurden, zeigen bei identischen Aufnahmebedingungen keine vergleichbaren Markierungen.

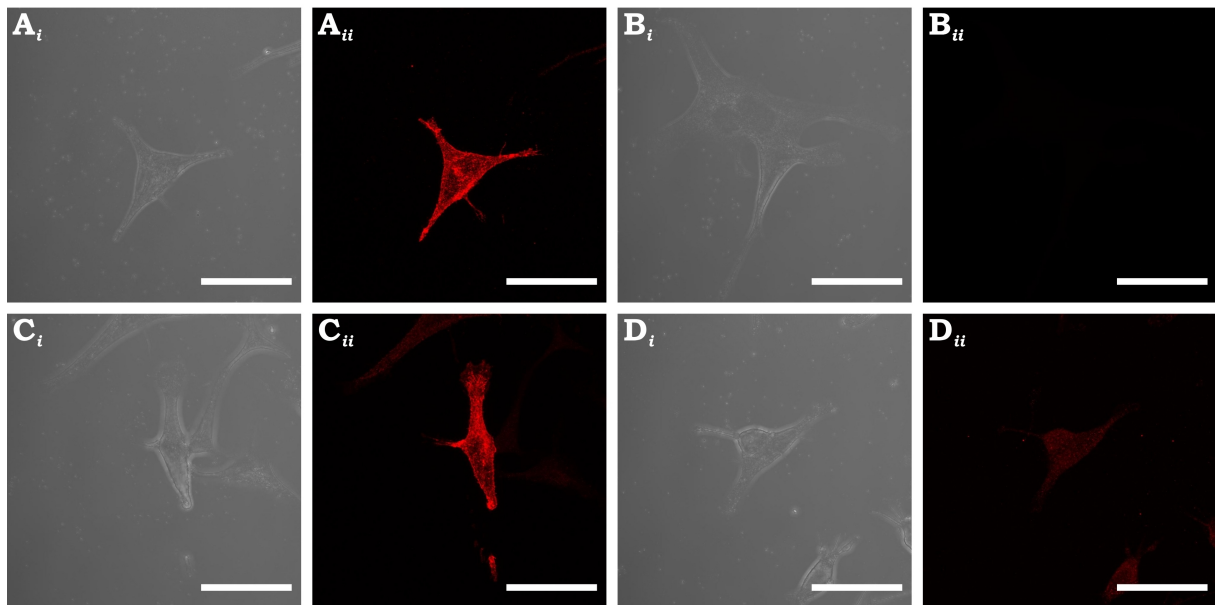


Abb. 14: Immuncytochemischer Nachweis von Am5-HT₁ in stabil transfizierten HEK293-Zellen.

A Zellen der Am5-HT₁-Zelllinie wurden mit anti-Am5-HT₁ (1:1.100) und *anti-rabbit*-Alexa568 (1:200) inkubiert.

B Kontrollexperiment zu A, ohne primären Antikörper.

C Zellen der Am5-HT₁-Zelllinie wurden mit anti-HA (5.000) und *anti-rat*-Cy3 (1:200) inkubiert.

D Kontrollexperiment mit nicht-transfizierten HEK293-Zellen. Diese wurden mit anti-Am5-HT₁ (1:1.000) und *anti-rabbit*-Alexa568 (1:200) inkubiert.

Die Abbildungen zeigen identisch fixierte HEK293-Zellen im differentiellen Interferenzkontrast (X_i) und Immunfluoreszenz-Aufnahmen (X_{ii}). Die Cy3- bzw. Alexa568-konjugierten sekundären Antikörper wurden durch Grünlichtanregung sichtbar gemacht. Der Maßstabsbalken entspricht 40 μm .

3.1.4 Funktionelle und pharmakologische Charakterisierung von Am5-HT₁

G-Protein-gekoppelte Rezeptoren bewirken bei Aktivierung über die Kopplung an G-Proteine eine Konzentrationsänderungen intrazellulärer Botenstoffe. Von 5-HT₁-Rezeptoren weiß man, dass sie negativ an die AC koppeln und somit bei Aktivierung eine Verminderung der intrazellulären cAMP-Konzentration ($[cAMP]_i$) bewirken. Für die funktionelle und pharmakologische Charakterisierung des Am5-HT₁-Rezeptors wurden HEK293-Zellen stabil mit dem Expressionsvektor pcDNA-Am5-*ht*₁ transfiziert. Die Expression des Am5-HT₁-Rezeptorproteins wurde sowohl an Membranproteinen in Western-Blot-Analysen (Abb. 9), als auch immunocytochemisch an fixierten Zellen der verwendeten Zelllinie nachgewiesen (Abb. 14). Die hohe strukturelle Ähnlichkeit zu homologen 5-HT₁-Rezeptoren führte zu der Annahme, dass sich der Am5-HT₁-Rezeptor funktionell kongruent zu diesen verhält. Für die funktionelle Untersuchung musste die AC stimuliert werden. Dies geschah mit dem hydrophilen Forskolin-Analogen NKH477. Dabei wurde untersucht, ob 5-HT bzw. andere Liganden die NKH477-stimulierte cAMP-Produktion durch die Aktivierung/Blockierung des Am5-HT₁-Rezeptors beeinflussen.

Endogen exprimierte Rezeptoren

HEK293-Zellen sind in der Lage unter bestimmten Umständen endogen Rezeptoren zu exprimieren. In nicht-transfizierten HEK293-Zellen konnte gezeigt werden, dass Dopamin- und Octopamin-Applikation (je 10 μ M) zu einer signifikanten $[cAMP]_i$ -Erhöhung führt, welche wahrscheinlich durch die Aktivierung endogener Amin-Rezeptoren verursacht wird.

Funktionalitätsnachweis und die Wirkung biogener Amine auf die $[cAMP]_i$

Die Funktionalität des Am-HT₁-Rezeptors sollte durch die Inkubation von HEK293-Zellen mit 5-HT und die sich anschließende Bestimmung der $[cAMP]_i$ nachgewiesen werden (Abb. 15 A). In der Am5-HT₁-Zelllinie ist eine signifikante Erniedrigung der $[cAMP]_i$ nach 5-HT-Inkubation (10 μ M) zu verzeichnen. Die NKH477 vermittelte cAMP-Produktion wird auf 40 % gedrosselt. Diese Wirkung von 5-HT ist in nicht-transfizierten HEK293-Zellen nicht zu beobachten. Die Dosisabhängigkeit der Blockierung der cAMP-Synthese durch die Aktivierung des Am5-HT₁-Rezeptors, wurde mit 5-HT-Konzentrationen von 10^{-9} bis 3×10^{-5} M untersucht (Abb. 15 B). Die Auswertung der Dosis-Wirkungs-Kurve ergab die halbmaximale Verminderung der NKH477-induzierten cAMP-Produktion (EC_{50} -Wert) bei 16,9 nM 5-HT ($\log EC_{50} = -7,77 \pm 0,08$, Mittelwert \pm Standardfehler). Bei einer Konzentration von $\geq 3 \mu$ M 5-HT ist die maximale Blockierung der NKH-induzierten cAMP-Produktion erreicht. In nicht-transfizierten HEK293-Zellen konnte durch keine dieser 5-HT-Konzentrationen eine signifikante $[cAMP]_i$ -Erniedrigung nachgewiesen werden.

Durch die Inkubation von HEK293-Zellen mit biogenen Aminen (Abb. 15 A) wurde die Ligandenspezifität des Am5-HT₁-Rezeptors überprüft. Dopamin und Octopamin (je 10 μ M) führen sowohl in nicht-transfizierten HEK293-Zellen, als auch in der Am5-HT₁-Zelllinie zu einer signifikanten $[cAMP]_i$ -Erhöhung, welche auf endogene Rezeptoren der HEK293-Zellen zurückzuführen ist. Die biogenen Amine Tyramin und Histamin (je 10 μ M) zeigen in beiden Zelllinien keine signifikante Wirkung.

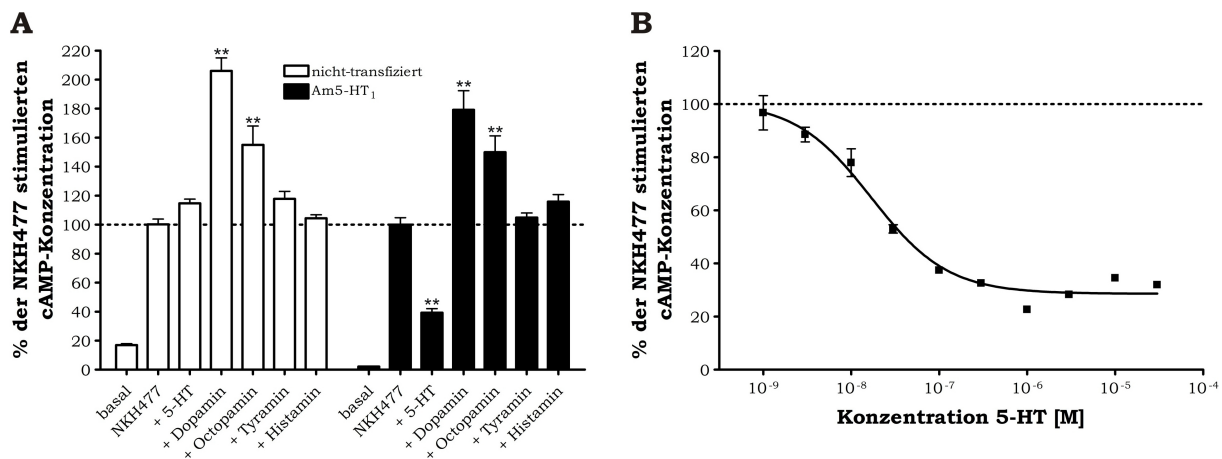


Abb. 15: Wirkung Biogener Amine auf die intrazelluläre cAMP-Konzentration Am5-HT₁-exprimierender HEK293-Zellen.

A: Nicht-transfizierte und Am5-HT₁-exprimierende HEK293-Zellen wurden mit biogenen Aminen (je 10 μ M) inkubiert. Signifikante Unterschiede zur NKH477-stimulierten [cAMP]_i der jeweiligen Zelllinie sind durch ** gekennzeichnet (*one-way ANOVA*, gefolgt von *Dunnett's multiple comparison Test*, $p < 0,01$).

B: Dosis-abhängige Wirkung von Serotonin auf die [cAMP]_i in den Am5-HT₁-exprimierenden HEK293-Zellen.

Alle Messungen erfolgten in Gegenwart von IBMX (100 μ M). Die Ermittlung der basalen [cAMP]_i erfolgte mit 100 μ M IBMX in Abwesenheit jeglicher Liganden. Die Bestimmung einer möglichen Liganden-abhängigen Erniedrigung der [cAMP]_i erfolgte in Gegenwart von NKH477 (10 μ M). Alle Werte sind auf die [cAMP]_i bei Inkubation mit IBMX und NKH477 (gestrichelte Linie) normiert. Die dargestellten Werte sind Mittelwerte aus Vierfachbestimmungen. Die Fehlerbalken stellen die Standardfehler dar.

Wirkung von Agonisten und Antagonisten auf die [cAMP]_i

Für die pharmakologische Charakterisierung des Am5-HT₁-Rezeptors, wurde der Einfluss verschiedener bekannter 5-HT₁-Rezeptor Agonisten und Antagonisten auf die NKH477-stimulierte [cAMP]_i getestet.

Bei den Experimenten stellte sich heraus, dass 5-Methoxytryptamin (5-MT) und 5-Carboxamidotryptamin (5-CT) den vorher beschriebenen 5-HT-Effekt imitieren, und die NKH477-induzierte [cAMP]_i auf 50 bzw. 40 % reduzieren können (Abb. 16 A). Die Effekte dieser beiden Substanzen lassen sich ebenfalls in einer sigmoidalen Dosis-Wirkungs-Kurve beschreiben. Der EC₅₀-Wert für 5-MT liegt bei 3,63 μ M ($\log EC_{50} = -5,44 \pm 0,22$, Mittelwert \pm Standardfehler) bzw. für 5-CT bei 700,5 nM ($\log EC_{50} = -6,15 \pm 0,15$, Mittelwert \pm Standardfehler). Auf nicht-transfizierten HEK293-Zellen konnten für beide Agonisten keine Effekte festgestellt werden (Daten nicht gezeigt). Die Substanzen 8-OH-DPAT, Buspiron und Sumatriptan zeigten keine Wirkung auf die Am5-HT₁-Zelllinie.

Drei Substanzen, welche als potentielle Antagonisten getestet wurden, zeigen deutliche Effekte auf die Am5-HT₁-Zelllinie (Abb. 16 B). Auf nicht transfizierten HEK293-Zellen waren diese jedoch wirkungslos. Methiothepin stellte sich als vollwertiger Antagonist heraus, welcher im Stande ist, die 5-HT-induzierte Wirkung komplett aufzuheben. Für Methiothepin wurde eine dosis-abhängige Wirkung festgestellt und ein EC₅₀-Wert von 10,6 μ M ($\log EC_{50} = -4,97 \pm 1,14$,

Mittelwert \pm Standardfehler) ermittelt. Allerdings war es in diesen Messungen nicht immer möglich, den Methiothepin-Effekt bei 100 μM zu messen. Prazosin und WAY100635 können als partielle Agonisten angesehen werden, da sie den 5-HT-Effekt in etwa zur Hälfte blockieren. Die EC_{50} -Werte liegen bei 1,5 μM ($\log\text{EC}_{50} = -5,83 \pm 0,23$, Mittelwert \pm Standardfehler) für Prazosin und 4,8 μM ($\log\text{EC}_{50} = -5,32 \pm 0,40$, Mittelwert \pm Standardfehler) für WAY100635. Für Spiperon konnte weder auf der Am5-HT₁-Zelllinie noch auf nicht-transfizierten HEK293-Zellen eine Wirkung nachgewiesen werden.

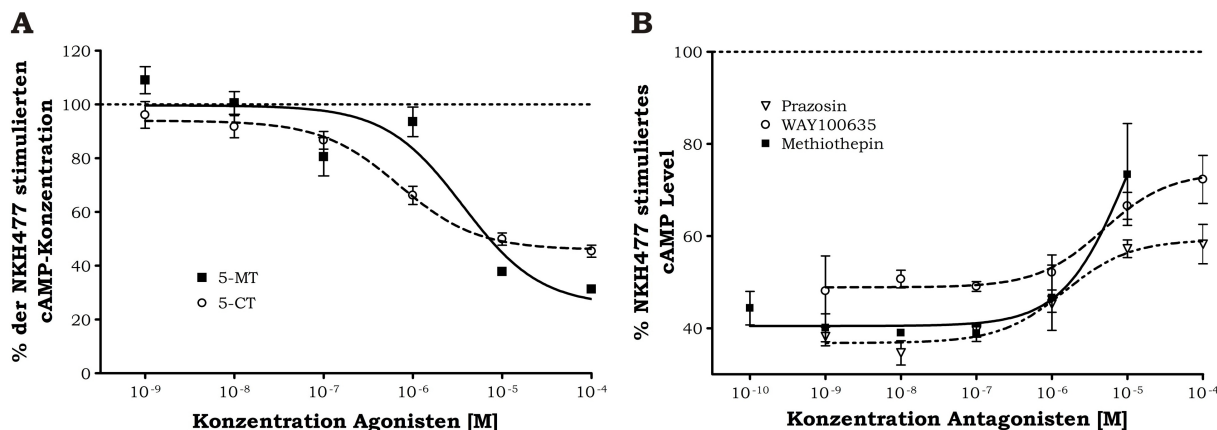


Abb. 16: Dosis abhängige Wirkung verschiedener Substanzen auf die $[\text{cAMP}]_i$ Am5-HT₁-exprimierender HEK293-Zellen.

A: Dosis-abhängige Wirkung der Agonisten 5-Methoxytryptamin (5-MT) und 5-Carboxyamidotryptamin (5-CT) auf die $[\text{cAMP}]_i$ in der Am5-HT₁-Zelllinie.

B: Dosis-abhängige Wirkung der Antagonisten Methiothepin, Prazosin und WAY100635 auf die $[\text{cAMP}]_i$ in der Am5-HT₁-Zelllinie. Alle Messungen wurden auf 5-HT-Hintergrund (0,5 μM 5-HT) durchgeführt.

Alle Messungen erfolgten in Gegenwart von IBMX (100 μM). Die Ermittlung der basalen $[\text{cAMP}]_i$ erfolgte mit 100 μM IBMX in Abwesenheit jeglicher Liganden. Die Bestimmung einer möglichen Liganden-abhängigen Erniedrigung der $[\text{cAMP}]_i$ erfolgte in Gegenwart von NKH477 (10 μM). Alle Werte sind auf die $[\text{cAMP}]_i$ bei Inkubation mit IBMX und NKH477 (gestrichelte Linie) normiert. Die dargestellten Werte sind Mittelwerte aus Vierfachbestimmungen. Die Fehlerbalken stellen die Standardfehler dar.

3.2 Der Am5-HT_{2α}-Rezeptor

3.2.1 Isolierung und Charakterisierung der Am5-HT_{2α}-Rezeptor-cDNA

Analog zu dem Am5-HT₁-Rezeptor konnte innerhalb der genomischen DNA der Honigbiene ein weiteres Gen für einen 5-HT-Rezeptor ermittelt werden. Die Sequenzinformation dieses Gens wurde in PCR-Experimenten genutzt, um die vollständige Rezeptor-cDNA zu amplifizieren und in den pGEM-Vektor zu integrieren.

Das Am5-*ht*_{2α}-Gen besitzt einen offenen Leserahmen von 1962 bp und ist auf 7 Exons verteilt (Tab. 5). Diese sind in 3'→5'-Richtung auf dem Contig3527 (Acc.No. AADG05003527) auf dem Chromosom LG9 lokalisiert. Die Introns findet man in jenen Sequenzbereichen, welche für den N-Terminus, die ECL1 und 2, die CPL3 und den C-Terminus kodieren. Das annotierte Am5-*ht*_{2α}-Gen zeigt einen deutlichen Unterschied zu dem klonierten Rezeptor. So beginnt im annotierten Gen das Exon V (ExonV_{annot}) bei Position 1202 des offenen Leserahmen des klonierten Rezeptors. Zwar besitzt ExonV_{annot}, im Gegensatz zu Exon V des klonierten Rezeptors einen stark konservierten Spleiß-Akzeptor (aacag/GTGCA), jedoch konnte diese Variante in PCR-Experimenten nicht gefunden werden.

Es konnte außerdem eine cDNA isoliert werden, welche einen offenen Leserahmen von 1737 bp besitzt. Die Analyse der Sequenz dieser cDNA zeigte, dass es sich um eine Spleißvariante - Am5-*ht*_{2α}*tr* - handelt. Dieser fehlt das komplette ExonIII (225 bp) (vgl. Tab. 5, Schema), wodurch jedoch der ORF unbeeinflusst bleibt. Die übrige Sequenz ist identisch zur vollständigen Variante.

Tab. 5: Genomische Organisation des Am5-*ht*_{2α}-Gens. Die Tabelle listet die Merkmale der Exons des Am5-*ht*_{2α}-Gens auf. Die Exonsequenzen sind in Groß- und die Intronsequenzen in Kleinbuchstaben dargestellt. Das Schema dient der Verdeutlichung der genomischen Struktur der vollständigen cDNA sowie der trunkierten Variante. Die Boxen repräsentieren die Exons und die abgewinkelten Linien die Introns. Die Lage der für die Transmembrandomänen kodierenden Bereiche wird durch schwarze Kästen angezeigt.

Exon	Länge	cDNA-Position	Contig-Position	Spleiß-Akzeptor	Spleiß-Donor
I	309 bp	1 - 309	99683 - 99991	-	ATCAG/gtgaa
II	301 bp	310 - 610	99309 - 99609	cacag/ATATT	CTTGG/gtgag
III	225 bp	611 - 835	83794 - 84018	tgcag/GATAC	TTTGG/gtaaa
IV	319 bp	836 - 1154	82688 - 83006	cccag/GCATA	GACAG/gtaaa
V	270 bp	1155 - 1424	81872 - 82141	tccag/TTTAA	CTCAG/gttcg
VI	297 bp	1425 - 1721	81198 - 81494	cccag/GTTTC	TCCAG/gtgag
VII	241 bp	1722 - 1962	80344 - 80584	tctag/GTCAG	-

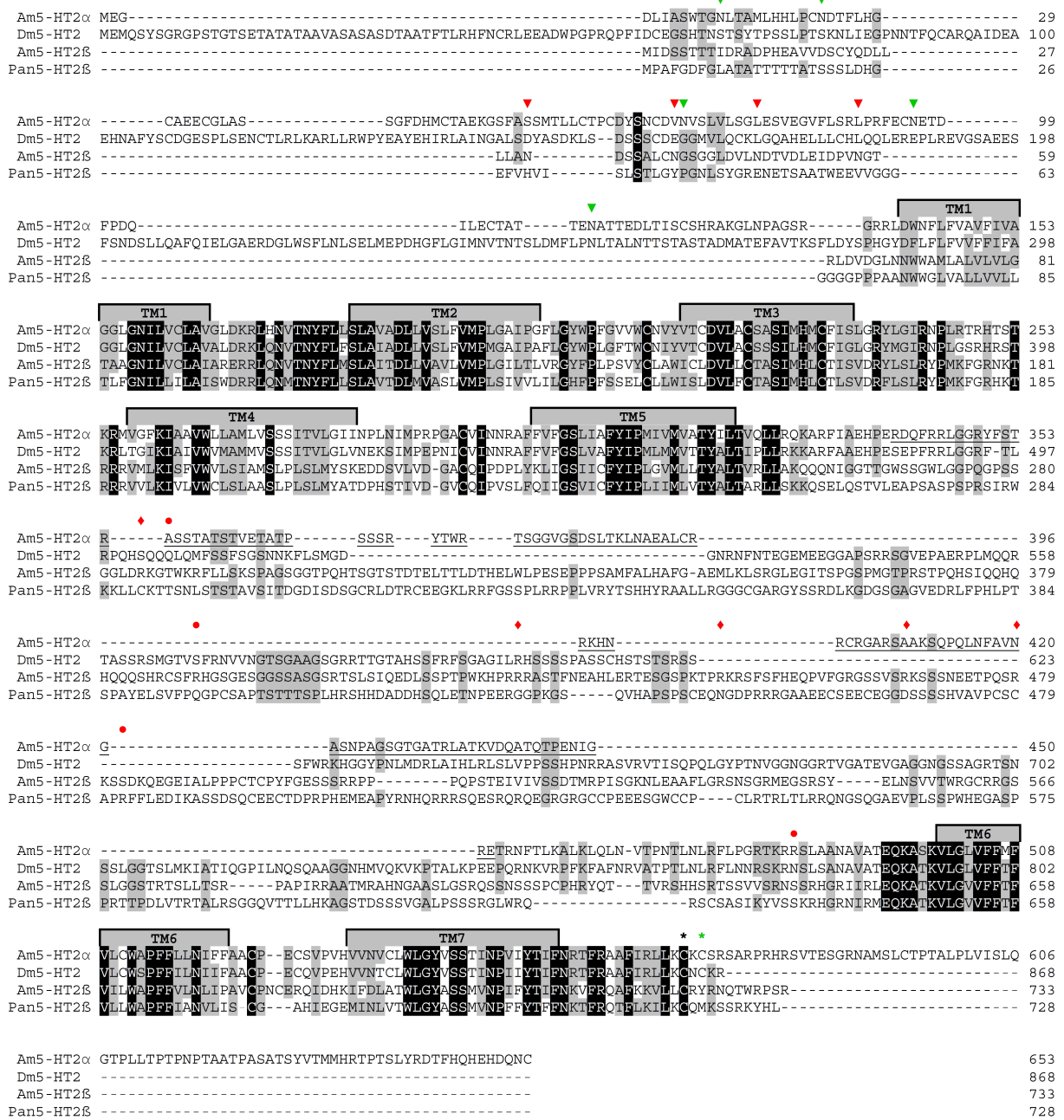


Abb. 17: Alignment der abgeleiteten Aminosäuresäuresequenz von orthologen 5-HT₂-Rezeptoren aus *A. mellifera* (Am5-HT_{2 α}), *Drosophila melanogaster* (Dm5-HT₂, CAA57429), Am5-HT_{2 β} und *Panulirus interruptus* (Pan5-HT_{2 β} , AY550910). Putative Transmembranregionen sind durch graue Boxen (TM1-7) markiert. Schwarz sind identische AS ($\geq 80\%$) und grau konservativ substituierte AS hinterlegt. Konsensusstellen für Am5-HT_{2 α} sind grün und für AM5-HT_{2 β} rot markiert. Schwarze Symbole markieren identische Konsensusstellen in beiden Rezeptorsequenzen. Hierbei steht ▼ für N-Glykosylierung, ◆ für Phosphorylierung via PKA, • für Phosphorylierung via PKC und * für C-Palmitoylierung. Unterstrichene AS repräsentieren jenen Bereich der CPL3 im Am5-HT_{2 α} -Rezeptor der für die Antikörperherstellung genutzt wurde.

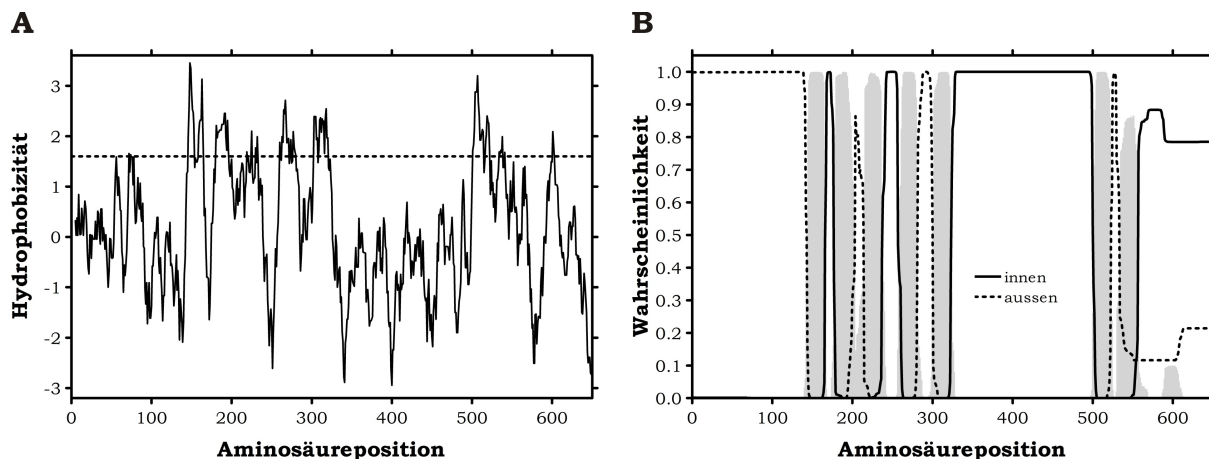


Abb. 18: Strukturelle Eigenschaften der abgeleiteten Aminosäuresequenz des Am5-HT_{2α}-Rezeptors.

A: Hydrophathieprofil nach KYTE & DOOLITTLE (1982). Die Fensterweite betrug 19 AS. Bereiche mit Hydrophobizitätswerten größer als 1,6 deuten auf Transmembrandomänen hin.

B: Die Transmembrantopologie wurde mit Hilfe des TMHMM-Server 2.0 erstellt (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/>). Die grauen Bereiche repräsentieren die Transmembrandomänen.

3.2.2 Eigenschaften der abgeleiteten Aminosäuresequenz

Die Am5-*ht*_{2α}-cDNA weist einen 1962 bp langen offenen Leserahmen auf, welcher für ein 653 AS langes und 71,5 kDa schweres Protein - Am5-HT_{2α} - kodiert (vgl. Abb. 17). Hydrophathieprofil und Transmembrandomänenvorhersage (Abb. 18) sagen einen 140 AS langen extrazellulären N-Terminus vorher. Diesem folgen sieben Transmembrandomänen, verbunden durch je 3 intra- und extrazelluläre Schleifen. Die CPL3 wird von 176 AS gebildet. Der C-Terminus ist 72 AS lang und intrazellulär lokalisiert. Die trunkeerte cDNA kodiert für ein Protein - Am5-HT_{2α}tr. Dieses besitzt eine Länge von 578 AS und ist, bis auf die fehlenden TM3 und 4 sowie die CPL2, identisch zu dem vollständigen Am5-HT_{2α}-Protein.

Die Sequenzanalyse zeigt stark konservierte Aminosäuren, welche in Tab. 6 aufgelistet sind. Auffällig ist, dass der Aspartatrest des für biogene Aminrezeptoren typischen DRY-Motivs in diesem Rezeptor gegen ein Glycinrest substituiert ist (GRY, 237-239).

Es konnten zudem mehrere Aminosäuren gefunden werden, welche posttranslational modifiziert werden können. N-Glykosylierung (N-x-S/T) ist an 4 Stellen im N-Terminus möglich: NLT (12-14), NVS (71-73), NET (96-98) und NAT (113-115). Zudem findet man im C-Terminus zwei Cysteinreste (CKC, 570-572), wodurch die C-Palmitoylierung und damit die Verankerung des C-Terminus in der Zellmembran möglich ist. Dagegen zeigt die Sequenzanalyse keine Möglichkeit für die Phosphorylierung via PKC oder PKA.

In phylogenetischen Analysen (Abb. 7) gruppiert Am5-HT_{2α} stets mit den anderen 5-HT₂-Rezeptoren. Auffällig ist, dass Am5-HT_{2α} nicht mit dem zweiten 5-HT₂-Rezeptor der Honigbiene (Am5-HT_{2β}) gruppiert, sondern in einem abgehobenen Cluster zusammen mit Vertebraten-5-HT₂-Rezeptoren zu finden ist. Die größte Ähnlichkeit besteht zu dem 5-HT₂-Rezeptor aus *D. melanogaster* (Dm5-HT₂, COLAS ET AL., 1995).

Tab. 6: Konservierte Aminosäurereste im Am5-HT_{2α}-Rezeptorprotein. Nomenklatur der Aminosäurereste innerhalb der Transmembrandomänen nach BALLESTEROS & WEINSTEIN (1995). **TM** Transmembrandomäne, **ECL** extrazelluläre Schleife, **CPL** cytoplasmatische Schleife.

Domäne	AS/-Motiv	AS-Position	Domäne	AS/-Motiv	AS-Position
TM1	G _{1.49} N _{1.50}	157-158	TM5	F _{5.47} xxP _{5.50}	309
	V _{1.53}	161		Y _{5.58}	320
TM2	S _{2.45} L _{2.46} A _{2.47}	181-138	CL3	ExKAxxxL	494-501
	D _{2.50}	186	TM6	F _{6.44}	508
	V _{2.57} M _{2.58} P _{2.59}	193-195		W _{6.47}	512
ECL1	W	206		P _{6.49} F _{6.50} F _{6.51}	514-516
	C	213	ECL3	C	525
TM3	D _{3.32}	220	TM7	W _{7.40} L _{7.42} G _{7.42}	540-542
	S _{3.39} I _{3.40}	227-228		Y _{7.43}	543
	R _{2.50} Y _{2.51}	238-239		S _{7.46}	546
TM4	W _{4.50}	265		N _{7.49} P _{7.50} xxY _{7.53}	549-553
ECL2	C	293			

3.2.3 Generierung eines monoklonalen Antikörpers gegen Am5-HT_{2α}

Wie bereits beschrieben, existieren alternativ gespleißte mRNAs von Am5-*ht*_{2α}. Es sollte die Frage beantwortet werden, ob beide Varianten *in vivo* als Protein vorliegen. Hierfür sollte ein monoklonaler Antikörper gegen die dritte cytoplasmatische Schleife dieses Rezeptors hergestellt werden (Abschnitt 2.6.10, Seite 27). Dieser hätte zum einen den Vorteil, dass er in Western-Blot-Analysen beide Rezeptorvarianten erkennen würde. Zum anderen erkennt ein monoklonaler Antikörper nur eine antigene Determinante, wodurch eine hohe Spezifität erreicht werden sollte.

Das Testen der monoklonalen Antikörper in Western-Blot-Analysen

Es konnten Hybridoma-Zellen erzeugt werden, welche in Zellkultur genommen wurden. In ersten ELISA-Tests wurden mehrere Kulturen positiv getestet (gegen His-Tag-Am5-HT_{2α}, Daten nicht gezeigt). Diese wurden anschließend in Western-Blot-Experimenten getestet. Hierbei dienten Fusionsproteine, welche die CPL3 des Am5-HT_{2α}-Rezeptors enthielten (Maltosebindeprotein, His-Tag-Bindeprotein) als Positivkontrolle. Entsprechende Fusionsproteine der CPL2 dienten als Negativkontrolle. Kulturen, deren Antikörper die CPL3 des Am5-HT_{2α}-Rezeptors erkannten und dabei eine geringe Hintergrundaktivität zeigten, wurden erhalten und es wurde versucht, die Zellen dieser Kulturen zu vereinzeln. Waren monoklonale Kulturen herangewachsen, wurden diese wieder in ELISA-Tests und Western-Blot-Analysen gegen Fusionsproteine getestet. Exemplarisch zeigt Abbildung 19 A einen Western-Blot mit Fusionsproteinen, inkubiert mit dem Antikörper anti-Am5-HT_{2α}DD3. Positiv getestete Antikörper wurden anschließend in einer weiteren Western-Blot-Analyse untersucht.

Hierbei waren Membranproteine aus HEK293-Zellen, welche entweder die eine oder die andere Am5-HT_{2α}-Rezeptorvariante exprimieren, aufgetragen. Es konnten 2 Kulturen (DD3, FB5) gefunden werden, deren Antikörper die Rezeptorproteine erkennen. In HEK293-Zellen detektieren diese Antikörper in gleicher Weise Proteine wie der HA-Antikörper (Abb. 19 B). Bei HEK293-Zellen, welche den vollständigen Rezeptor exprimieren, markieren die Antikörper zwei Banden

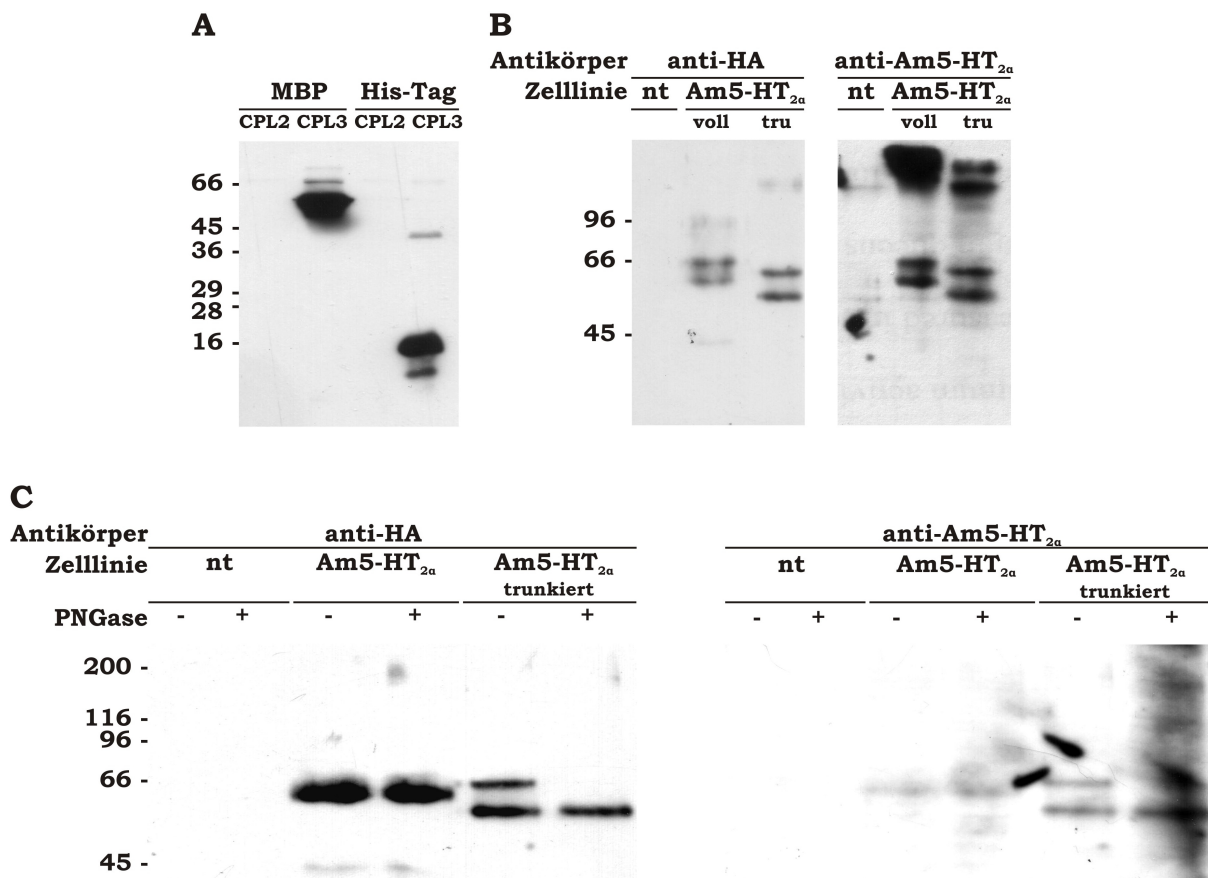


Abb. 19: Western-Blot-Analysen mit dem anti-Am5-HT_{2α}DD3-Antikörper.

A: Western-Blot-Analyse mit anti-Am5-HT_{2α}DD3 (Kulturüberstand 1:10) auf ungereinigten Fusionsproteinen. Auf jeder Bahn wurden 3 µl Homogenat entsprechender *E. coli*-Übernachtulturen aufgetragen. Als sekundärer Antikörper diente *goat-anti-mouse*-HRP (1:20.000).

B: Western-Blot-Analyse von Membranproteinen aus HEK293-Zellen mit anti-Am5-HT_{2α}DD3 (Kulturüberstand 1:10) und *goat-anti-mouse*-HRP (1:20.000). Auf jeder Bahn wurden 10 µg Protein aufgetragen. Als Positiv-Kontrolle dienten identische Western-Blots, welche mit anti-HA (1:5.000) und *goat-anti-rat*-HRP (1:20.000) inkubiert wurden.

C: Western-Blot-Analyse von Membranproteinen von HEK293-Zellen. Auf jeder Bahn wurden 7 µg der entsprechenden Proteinfraction eingesetzt. Je eine der Proben wurde mit PNGase F behandelt (+), die andere nicht (-). Die Inkubation des Western-Blots erfolgte mit anti-HA (1:5.000) und dem sekundären Antikörper *goat-anti-rat* HRP (1:20.000) bzw. mit dem anti-Am5-HT_{2α}DD3 (1:10) und dem sekundären Antikörper *goat-anti-mouse* HRP (1:20.000). Der Molekulargewichtsstandard (in kDa) ist jeweils links angegeben. **MBP** Maltosebindeprotein, **His-Tag** His-Tag-Bindeprotein, **nt** nicht transfiziert, **voll** vollständig, **tru** trunkiert

von 60 bzw. 66 kDa. Die Analyse der den trunkierten Rezeptor exprimierenden HEK293-Zellen zeigt, dass hier ebenfalls zwei Banden markiert werden (55 bzw. 63 kDa). Wie der PNGase F-Verdau zeigt, handelt es sich bei der größeren Bande jeweils um das glykosylierte Protein (Abb. 19 C). Damit weichen die Größen der Proteine leicht von den vorhergesagten Gewichten ab (71,5 bzw. 63,0 kDa für den vollständigen bzw. trunkierten Rezeptor). Die beiden monoklonalen Antikörper müssen allerdings in sehr hohen Konzentrationen eingesetzt werden, damit die Rezeptorproteine erkannt werden. In vielen der durchgeführten Experimente führt die Inkubation

mit diesen Antikörpern außerdem zu Flecken, welche keine spezifischen Markierungen darstellen. Sie sind weder reproduzierbar noch erscheinen sie parallel zu den anderen Proteinbanden (vgl. Abb. 19 C). In Western-Blot-Analysen von Gewebeproben (unbehandelte Membranproteine, sowie deglykosylierte Membranproteine) konnten keine Proteine detektiert werden, welche in der Größe dem vollständigen, bzw. dem trunkierten Rezeptorprotein entsprechen (Daten nicht gezeigt). Zudem traten auch hier die Probleme mit unspezifischen Flecken auf.

Die monoklonalen Antikörper in immuncytochemischen Analysen

In einer weiteren Analyse sollte getestet werden, ob die Antikörper das native Rezeptorprotein in fixierten HEK293-Zellen erkennen. In Zellen, die den vollständigen Am5-HT_{2α}-Rezeptor exprimieren, entstehen durch Inkubation mit den spezifischen Antikörpern Markierungen, welche denen entsprechen, die durch Inkubation mit dem anti-HA-Antikörper erzielt werden (Abb. 20 A, C). Lässt man in einem Kontrollexperiment die primären Antikörper weg, so sind keine derartigen Markierungen zu sehen (Abb. 20 B, D). Gleiches gilt für HEK293-Zellen, in welchen der trunkierte Rezeptor exprimiert wird (Abb. 20 E-H). Jedoch mussten hierbei sowohl der anti-HA-Antikörper, als auch die spezifischen monoklonalen Antikörper um den Faktor 10 stärker konzentriert eingesetzt werden. In Kontrollexperimenten, in welchen die monoklonalen Antikörper auf fixierten nicht-transfizierten HEK293-Zellen eingesetzt wurden, sind keine vergleichbaren Signale zu beobachten (Abb. 20 I).

Es wurde außerdem versucht, das Rezeptorprotein in fixiertem Bienengewebe mit Hilfe der monoklonalen Antikörper nachzuweisen. In diesen Experimenten konnten keine Markierungen gefunden werden, welche sich vom Hintergrundsignal abheben. Es wurde auch versucht, die fixierten Proteine mit Hilfe von Natriumdodecylsulfat (*Sodium Dodecyl Sulfate*, SDS) zu denaturieren. Auch diese Behandlung führte zu keiner sichtbaren Immunreaktivität.

Abb. 20 (nächste Seite): Immuncytochemischer Nachweis des Am5-HT_{2α}-Rezeptorproteins in stabil transfizierten HEK293-Zellen.

A: Zellen der Am5-HT_{2α}-Zelllinie wurden mit anti-Am5-HT_{2α}DD3 (1:100) und *anti-mouse*-Alexa568 (1:200) inkubiert.

B: Kontrollexperiment zu A, ohne primären Antikörper.

C: Zellen der Am5-HT_{2α}-Zelllinie wurden mit anti-HA (1:5.000) und *anti-rat*-Cy3 (1:200) inkubiert.

D: Kontrollexperiment zu C, ohne primären Antikörper.

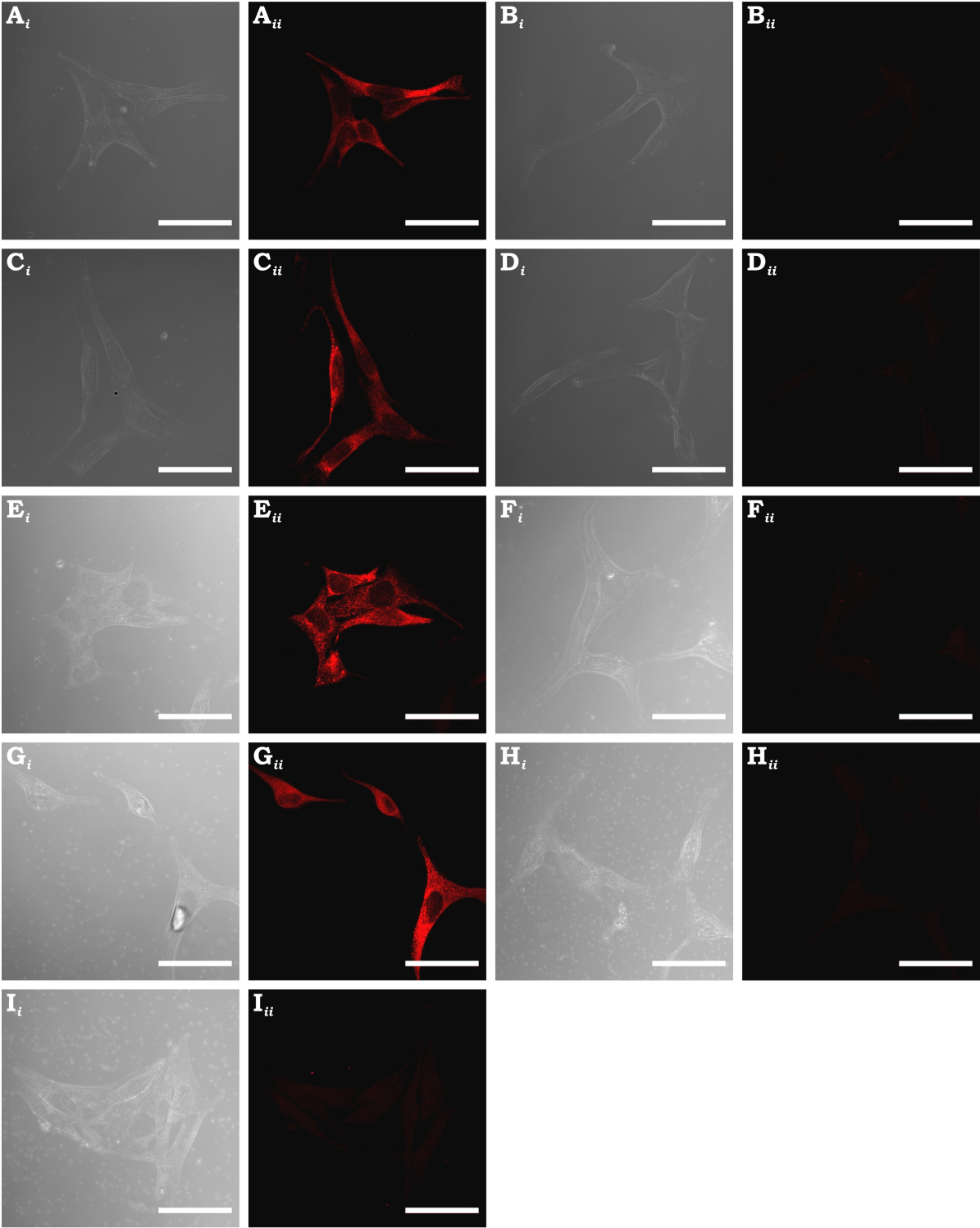
E: Zellen der Am5-HT_{2α}trunkiert-Zelllinie wurden mit anti-Am5-HT_{2α}DD3 (1:10) und *anti-mouse*-Alexa568 (1:200) inkubiert.

F: Kontrollexperiment zu E, ohne primären Antikörper.

G: Zellen der Am5-HT_{2α}trunkiert-Zelllinie wurden mit anti-HA (1:500) und *anti-rat*-Cy3 (1:200) inkubiert.

H: Kontrollexperiment zu G, ohne primären Antikörper.

I: Kontrollexperiment mit nicht-transfizierten HEK293-Zellen. Diese wurden mit anti-Am5-HT_{2α}DD3 (1:10) und *anti-mouse*-Alexa568 (1:200) inkubiert. Die Abbildungen zeigen identische fixierte HEK293-Zellen im differentiellen Interferenzkontrast- (X_i) und Immunfluoreszenz-Aufnahmen (X_{ii}). Die Cy3- bzw. Alexa568-konjugierten sekundären Antikörper wurden durch Grünlichtanregung sichtbar gemacht. Der Maßstabsbalken entspricht 40 μm .



3.2.4 Funktionelle und pharmakologische Charakterisierung von Am5-HT_{2α}

Es ist bekannt, dass die Aktivierung von 5-HT₂-Rezeptoren zu einer Erhöhung der intrazellulären Ca²⁺-Konzentration ([Ca²⁺]_i) führt. Die Änderung der [Ca²⁺]_i kann fluorometrisch mit dem Farbstoff Fluo4 verfolgt werden (vgl. Abschnitt 2.7.4, Seite 31). HEK293-Zellen die Am5-HT_{2α} stabil exprimieren, sollten genutzt werden, um diesen Rezeptor funktionell und pharmakologisch zu charakterisieren. Zudem sollte geklärt werden, ob das trunkierte Am5-HT_{2α}-Rezeptorprotein allein ebenfalls als 5-HT₂-Rezeptor fungiert. Hierfür wurde es ebenfalls in HEK293-Zellen exprimiert. Die Expression beider Rezeptorvarianten konnte sowohl in Western-Blot- (Abb. 19) als auch in immunocytochemischen Analysen (Abb. 20) nachgewiesen werden.

Endogen exprimierte Rezeptoren

HEK293-Zellen exprimieren endogen aminerge Rezeptoren. LEURS ET AL. (1995) konnten zeigen, dass sich darunter der H₁-Histamin-Rezeptor befindet, welcher die Änderung der [Ca²⁺]_i vermittelt. Die Inkubation von nicht-transfizierten HEK293-Zellen mit Histamin (10 μM) führt auch in dieser Untersuchung zu einem signifikantem Anstieg der [Ca²⁺]_i (Abb. 21 A). Für die biogenen Amine Serotonin, Dopamin, Tyramin, Octopamin und Noradrenalin konnte kein messbarer Einfluss auf die [Ca²⁺]_i nachgewiesen werden.

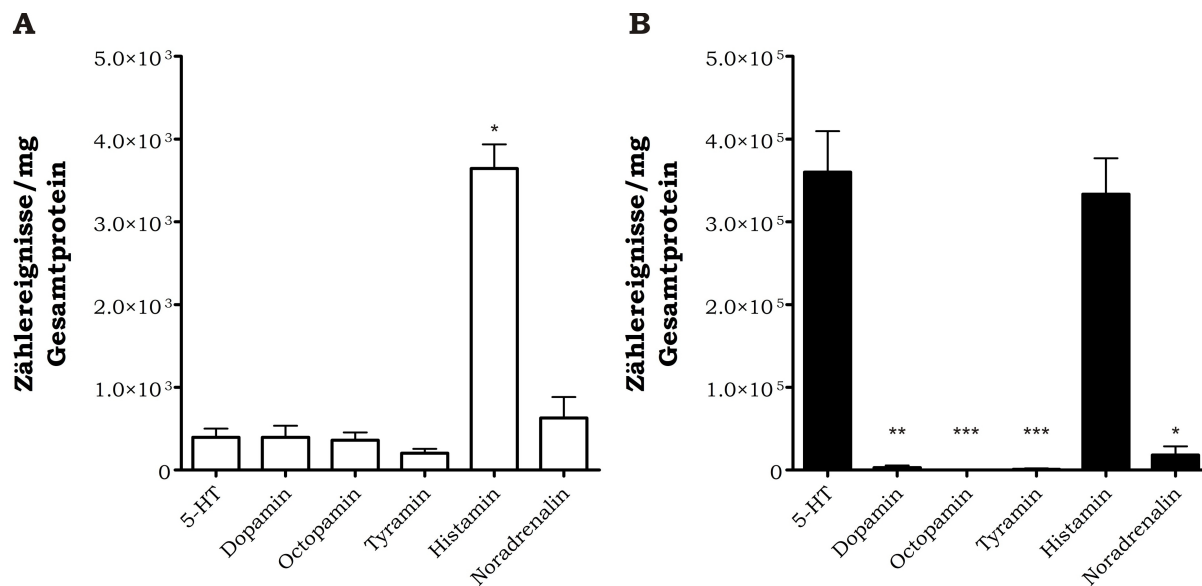


Abb. 21: Wirkung biogener Amine auf die intrazelluläre Ca²⁺-Konzentration Am5-HT_{2α}-exprimierender HEK293-Zellen.

A: Nicht-transfizierte HEK293-Zellen wurden mit biogenen Aminen (je 10 mM) inkubiert und die [Ca²⁺]_i fluorometrisch gemessen.

B: Am5-HT_{2α}-exprimierende HEK293-Zellen wurden mit biogenen Aminen (je 10 mM) inkubiert und die [Ca²⁺]_i fluorometrisch gemessen.

Es wurden zusätzlich Zellen nur mit ES-Lösung inkubiert und der Basalwert bestimmt. Der Mittelwert des Basalwertes wurde von allen Werten abgezogen. Dargestellt sind Mittelwerte mit Standardabweichungen aus Achtfachbestimmungen. Signifikante Unterschiede zu 5-HT-stimulierter [Ca²⁺]_i der jeweiligen Zelllinie sind durch Sternchen gekennzeichnet (*one-way* ANOVA, gefolgt von Dunnett's *multiple comparison* Test, * p < 0,05, ** p < 0,01, *** P < 0,001). Die Ca²⁺-Konzentration ist in Zählereignissen/mg Gesamtprotein angegeben.

Funktionalitätsnachweis und Wirkung biogener Amine auf die $[Ca^{2+}]_i$

In der HEK293-Zelllinie, welche den vollständigen Am5-HT_{2α}-Rezeptor exprimiert, ist im Gegensatz zu nicht-transfizierten HEK293-Zellen sowie zu der Zelllinie, welche das trunkierte Rezeptorprotein exprimiert, eine signifikante Erhöhung der $[Ca^{2+}]_i$ nach 5-HT-Applikation zu beobachten (Abb. 21 A). Durch die Inkubation der Zellen mit 5-HT in verschiedenen Konzentrationen, konnte die Dosisabhängigkeit dieses Effekts nachgewiesen werden (Abb. 22). Dabei wurde für den Am5-HT_{2α}-Rezeptor für 5-HT ein EC₅₀-Wert von 3,52 nM ($\log EC_{50} = -8,49 \pm 0,07$, Mittelwert \pm Standardfehler) ermittelt.

Die Spezifität des Am5-HT_{2α}-Rezeptors sollte durch die Applikation weiterer biogener Amine (10 μ M, Abb. 21) nachgewiesen werden. Dabei erzeugte die Histamin-Applikation einen signifikanten Anstieg der $[Ca^{2+}]_i$. Dies ist jedoch auf endogene Histaminrezeptoren zurückzuführen (s. o.). Die biogenen Amine Dopamin, Tyramin, Octopamin und Noradrenalin hatten dagegen keinen messbaren Einfluss.

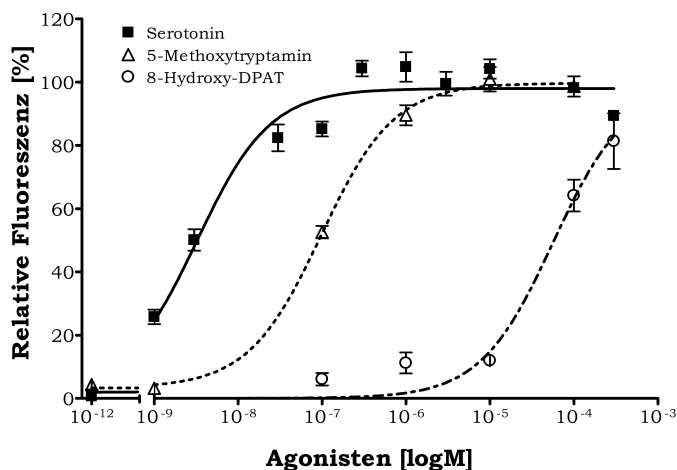
Wirkung von Agonisten und Antagonisten auf die $[Ca^{2+}]_i$

Die weitere pharmakologische Charakterisierung des Am5-HT_{2α}-Rezeptors erfolgte durch die Testung von bekannten 5-HT₂-Rezeptor-Agonisten und -Antagonisten.

Zunächst wurden Am5-HT_{2α}-exprimierende HEK293-Zellen mit steigenden Konzentrationen der Agonisten inkubiert. Die Dosis-Wirkungskurven der wirksamen Agonisten sind in Abb. 22 dargestellt. Die Agonisten 5-MT und 8-Hydroxy-DPAT sind in der Lage, den Rezeptor zu aktivieren, was durch einen Anstieg der $[Ca^{2+}]_i$ sichtbar wurde (Abb. 22). Diese Effekte sind konzentrationsabhängig.

Abb. 22: Dosisabhängige Wirkung verschiedener Agonisten auf die intrazelluläre Ca^{2+} -Konzentration Am5-HT_{2α}-exprimierender HEK293-Zellen.

Die Zellen wurden mit aufsteigenden Konzentrationen der Agonisten inkubiert. Die Ca^{2+} -Konzentration ist als relative Fluoreszenz angegeben. Dargestellt sind Mittelwerte mit Standardabweichungen aus Achtfachbestimmungen.



Es wurde für 5-MT ein EC₅₀-Wert von 97,61 nM ($\log EC_{50} = -7,01 \pm 0,05$, Mittelwert \pm Standardfehler) und für 8-OH-DPAT von 56,52 μ M ($\log EC_{50} = -4,25 \pm 0,16$, Mittelwert \pm Standardfehler) gemessen. Auf nicht-transfizierte HEK293-Zellen hatten diese Substanzen keine Wirkung. Dagegen beeinflussen 5-CT und 2,5,-Dimethoxy-4-Iodamphetamin (DOI) die $[Ca^{2+}]_i$ in nicht-transfizierten HEK293-Zellen und konnten daher nicht in die Auswertung mit einbezogen werden.

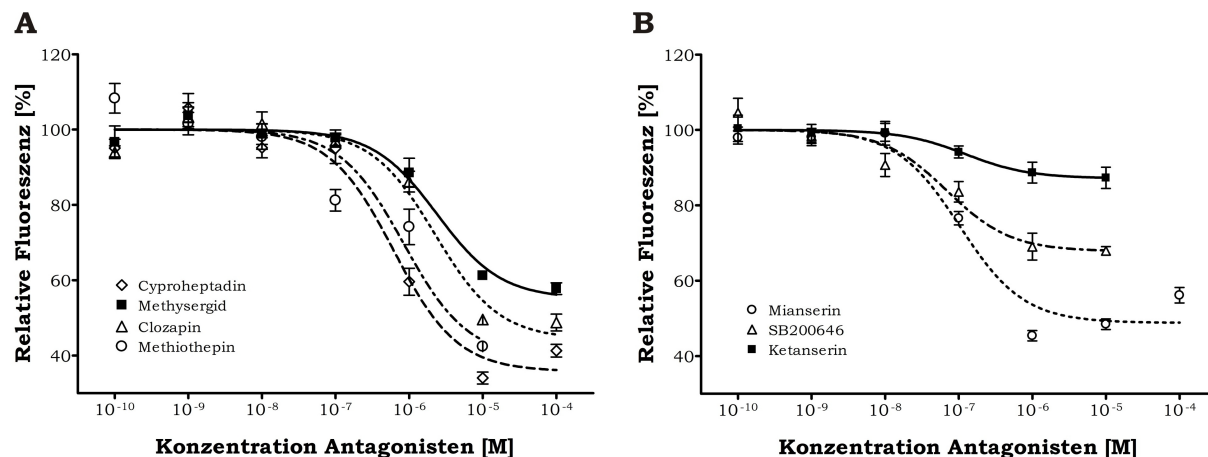


Abb. 23: Dosis abhängige Wirkung verschiedener Substanzen auf die $[Ca^{2+}]_i$ Am5-HT $_{2\alpha}$ -exprimierender HEK293-Zellen.

A: Dosis-abhängige Wirkung der Antagonisten Cyproheptadin, Methysergid, Clozapin und Methiothepin auf die $[Ca^{2+}]_i$ in der Am5-HT $_{2\alpha}$ -Zelllinie.

B: Dosis-abhängige Wirkung der Antagonisten Mianserin, SB200646 und Ketanserin auf die $[Ca^{2+}]_i$ der Am5-HT $_{2\alpha}$ -Zelllinie.

Am5-HT $_{2\alpha}$ exprimierende HEK293-Zellen wurden mit 50 nM 5-HT und mit steigenden Konzentrationen der Antagonisten inkubiert. Die Ca^{2+} -Konzentration ist als relative Fluoreszenz angegeben. Dargestellt sind Mittelwerte mit Standardabweichungen aus Achtfachbestimmungen.

Anschließend wurden die Zellen mit 50 nM 5-HT stimuliert und überprüft, ob potentielle Antagonisten den 5-HT-Effekt blockieren können. Diese wurden in Konzentrationen von 1 nM bis 100 μ M eingesetzt. Lisurid zeigt auch eine Wirkung auf nicht-transfizierte HEK293-Zellen und wird daher in der Auswertung nicht berücksichtigt. Die konzentrationsabhängigen Effekte der wirksamen Antagonisten sind in Abb. 23 graphisch dargestellt, die EC_{50} -Werte, die ermittelten Dissoziationskonstanten sowie die Effektivität der Substanzen ist Tabelle 7 zu entnehmen. Für SB200646 wurde die höchste und für Methysergid die niedrigste Wirksamkeit für Am5-HT $_{2\alpha}$ nachgewiesen. Nach sinkender Effektivität lassen sich die Antagonisten wie folgt ordnen: Cyproheptadin > Methiothepin > Clozapin > Mianserin > Methysergid > SB200646 >> Ketanserin.

Tab. 7: Eigenschaften der wirksamen Am5-HT $_{2\alpha}$ -Antagonisten. Log EC_{50} -Werte als Mittelwert \pm Standardfehler. Die Dissoziationskonstanten (K_i) wurden nach CHENG & PRUSOFF (1973) und JERMAN ET AL. (2001) berechnet. Die Effektivität ergibt sich aus der maximal erreichten Abnahme des Fluoreszenzsignals bei der höchsten Antagonistenkonzentration, im Vergleich zur alleinigen 5-HT-Stimulation (50 nM).

Antagonist	EC_{50} [μ M]	log EC_{50}	K_i	Effektivität
Clozapin	2,25	-5,647 \pm 0,1035	7,97 $\times 10^{-7}$	56 %
Cyproheptadin	0,61	-6,210 \pm 0,1062	2,19 $\times 10^{-7}$	64 %
Ketanserin	0,12	-6,909 \pm 0,4178	4,25 $\times 10^{-8}$	13 %
Methiothepin	0,84	-6,073 \pm 0,1714	3,04 $\times 10^{-7}$	61 %
Methysergid	2,39	-5,622 \pm 0,1475	8,46 $\times 10^{-7}$	45 %
Mianserin	0,10	-6,985 \pm 0,0982	3,54 $\times 10^{-8}$	51 %
SB200646	0,06	-7,162 \pm 0,1964	2,48 $\times 10^{-8}$	32 %

3.3 Der Am5-HT_{2β}-Rezeptor

3.3.1 Isolierung und Charakterisierung der Am5-HT_{2β}-Rezeptor-cDNA

Als Folge der Veröffentlichung der genomischen Sequenz der Honigbiene (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/guide/bee/>) wurden mehrere partielle mRNAs postuliert, welche für weitere 5-HT₂-Rezeptoren kodieren sollen. Diese annotierten mRNAs (Acc.No. XM_001122856, XM_001119970, XM_624894) sind zu kurz, um für vollständige GPCRs zu kodieren (522 bp, 256 bp, 1053 bp) und enthielten jeweils die Information für max. 2 Transmembrandomänen. Die konservierten Nucleotide zeigten große Ähnlichkeit zu Pan5-*ht*_{2β} (*Panulirus interruptus*, Acc.No. AY550910). Daher wurde das Bienengenom mit der Pan5-*ht*_{2β}-Sequenz abgeglichen. Es konnten spezifische Primer entwickelt werden, welche jeweils kurz vor dem Start-Codon bzw. kurz hinter dem Stop-Codon binden. Mit diesen konnte eine cDNA amplifiziert und kloniert werden, welche einen offenen Leserahmen von 2202 bp aufweist. Dieser ist in unterschiedlicher Orientierung auf 3 Contigs verteilt (vgl. Tab. 8). Ein Contig (Acc.No. NW_001252966) wurde dem Chromosom LG10 zugeordnet. Die anderen zwei erfuhren bisher keine Zuordnung zu einem Chromosom. Die Introns findet man in den für die ECL 1 und 2 sowie der CPL 3 kodierenden Bereiche des Am5-*ht*_{2β}-Gens. Für diesen Rezeptor konnte ebenfalls eine alternative Spleißvariante nachgewiesen werden. Das fehlende ExonII führt zu einer Verschiebung des ORF und einem vorzeitigen Stop-Codon. Dieser ORF kodiert für die Bereiche N-Terminus bis ECL1. Zudem konnte ein zweiter ORF entdeckt werden, welcher im dritten Exon beginnt, bis zum eigentlichen Stop-Codon reicht und für die Bereiche TM5 bis C-Terminus kodiert (vgl. Tab. 8, Schema).

Tab. 8: Genomische Organisation des Am5-*ht*_{2β}-Gens. Die Tabelle listet die Merkmale der Exons des Am5-*ht*_{2β}-Gens auf. Das Gen liegt auf mehreren Contigs (A: NW_001262451, B: NW_001252966, und C: NW_001262048) in jeweils unterschiedlicher Orientierung. Die Exonsequenzen sind in Groß- und die Intronsequenzen in Kleinbuchstaben dargestellt. Das Schema dient der Verdeutlichung der genomischen Struktur, sowohl für die vollständige cDNA als auch für die trunke Variante. Die Boxen repräsentieren die Exons und die abgewinkelten Linien die Introns. Die Lage der für die Transmembrandomänen kodierenden Bereiche wird durch schwarze Kästen angezeigt. Exons mit Leserasterverschiebung sind grau dargestellt.

Exon	Länge	cDNA-Position	Contig/-Position	Spleiß-Akzeptor	Spleiß-Donor
I	394 bp	1 - 394	A 3'→5' 23247 - 23640	-	CAGAG/gtaag
II	233 bp	395 - 627	B 5'→3' 44050 - 44282	tacag/GATAT	CGAAG/gtgag
III	217 bp	628 - 844	B 5'→3' 56833 - 57049	tccag/GAGGA	GGGAG/gttag
			C 3'→5' 38767 - 38983	tccag/GAGGA	GGGAG/gttag
IV	331 bp	845 - 1175	C 3'→5' 29971 - 30301	tccag/GGCTG	CACGG/gtaag
V	533 bp	1176 - 1708	C 3'→5' 17612 - 18144	ttcag/GAGCG	GGGAG/gtggg
VI	494 bp	1709 - 2202	C 3'→5' 16497 - 16990	cgcag/GAAGC	-

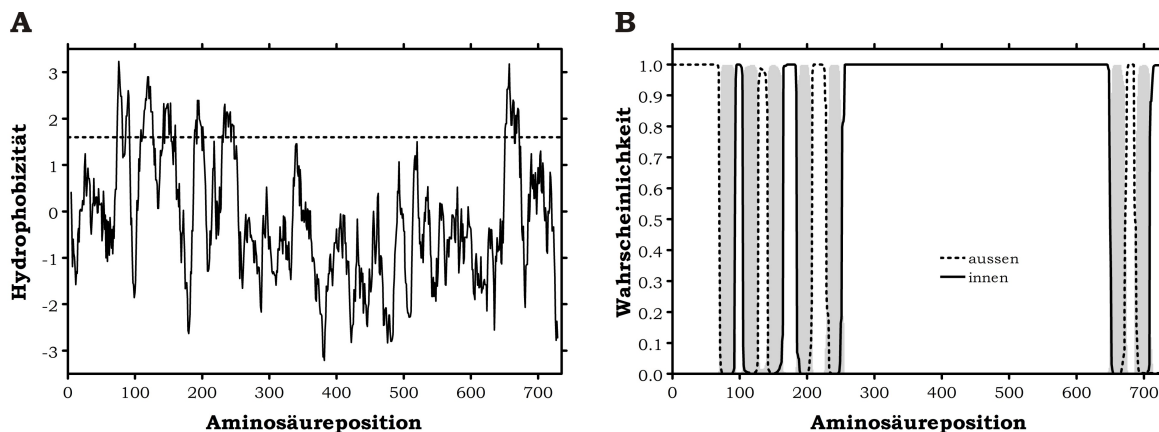


Abb. 24: Strukturelle Eigenschaften der abgeleiteten Aminosäuresequenz des Am5-HT_{2β}-Rezeptors.

A: Hydrophathieprofil nach KYTE & DOOLITTLE (1982). Fensterweite 19 AS. Bereiche mit Hydrophobizitätswerten größer als 1,6 deuten auf Transmembrandomänen hin.

B: Die Transmembrantopologie wurde mit Hilfe des TMHMM-Server 2.0 erstellt (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/>). Die grauen Bereiche repräsentieren die Transmembrandomänen.

3.3.2 Eigenschaften der abgeleiteten Aminosäuresequenz

Der ORF des *Am5-ht_{2β}*-Gens kodiert für ein 733 AS langes und 80,7 kDa schweres Protein - Am5-HT_{2β} (vgl. Abb. 17). Die strukturelle Analyse der Sequenz (Abb. 24) verlangt einen 68 AS langen extrazellulären N-Terminus. Diesem schließen sich sieben Transmembrandomänen an, welche durch extra- und intrazelluläre Schleifen miteinander verbunden sind. Die CPL3 ist mit 399 AS ungewöhnlich lang. Der intrazelluläre N-Terminus ist dagegen mit einer Länge von 25 AS relativ kurz. Außer diesen konservierten Domänen sind ebenfalls viele stark konservierte AS zu finden (Tab. 9). Innerhalb dieses Rezeptorproteins sind eine Vielzahl an Konsensusstellen für posttranslationale Modifikationen vorhanden. Der N-Terminus kann an 4 Stellen per N-Glykosylierung modifiziert werden: NDS (31-33), NGS (38-40), NDT (47-49) und NGT (58-60). Die CPL3 bietet zahlreiche Möglichkeiten für Phosphorylierungen. So sind in dieser Region mit RKGT (285-288), RRAS (425-428), RKRS (447-450), RKSS (467-470) und RRGs (563-566) fünf Konsensusstellen für Phosphorylierung via PKA (R-R/K-x-S/T) vorhanden. Ebenso ist die Phosphorylierung via PKC (S/T-x-R/K) an vier Stellen in der CPL3 möglich (TWK, 288-290; SFR, 388-390; SDK, 482-484; SSR, 634-636). Im C-Terminus befindet sich ein Cysteinrest (722), welcher palmitoyliert werden könnte.

Auf der trunkeierten mRNA sind zwei ORFs zu finden. Der erste besitzt eine Länge von 1074 Nukleotiden. Im Gegensatz zu Am5-HT_{2α} führt alternatives Spleißen bei der *Am5-ht_{2β}*-mRNA zu einer Leserasterverschiebung. Das hypothetisch resultierende Protein ist 358 AS lang und besitzt eine Molekülmasse von 39,5 kDa und lässt sich in zwei große Abschnitte untergliedern. Der erste (AS 1 bis AS 132) gleicht dem vollständigem Am5-HT_{2β}-Rezeptorprotein. In diesem Abschnitt befinden sich die ersten beiden Transmembrandomänen. Aufgrund der Leserasterverschiebung unterscheidet sich der folgende Sequenzabschnitt (AS 132 bis AS 358) völlig von dem vollständigen Rezeptorprotein. BLAST-Analysen und die Suche nach bekannten Motiven zeigten

keine Ähnlichkeiten zu bekannten Proteinen. Der zweite ORF, welcher sich auf der trunkierten *Am5-ht_{2β}*-mRNA befindet, kodiert für ein 491 AS langes und 54,1 kDa schweres Protein. Dieses ist in der Sequenz identisch zu dem entsprechendem Sequenzabschnitt des vollständigen Am5-HT_{2β}-Rezeptorproteins. Es beginnt mit einem extrazellulären N-Terminus, welchen die TM5 folgt und endet mit einem intrazellulären C-Terminus.

Vergleicht man die Proteinsequenz von Am5-HT_{2β} mit anderen bekannten 5-HT-Rezeptoren (Abb. 7), so gruppiert dieser stets mit allen anderen 5-HT₂-Rezeptoren. Die größte Ähnlichkeit besteht zu den 5-HT₂-Rezeptoren aus *Panulirus interruptus* (Pan5-HT_{2β}) und *Procambarus clarkii* (Pro5-HT₂) mit welchen er die basale Gruppe der 5-HT₂-Rezeptoren bildet.

Tab. 9: Konservierte Aminosäurreste im Am5-HT_{2β}-Rezeptor. Nomenklatur der Aminosäurreste innerhalb der Transmembrandomänen nach BALLESTEROS & WEINSTEIN (1995). **TM** Transmembrandomäne, **ECL** extrazelluläre Schleife, **CPL** cytoplasmatische Schleife.

Domäne	AS/-Motiv	AS-Position	Domäne	AS/-Motiv	AS-Position
TM1	G _{1.49} N _{1.50} V _{1.53}	85-86 89	TM5	F _{5.47} xxP _{5.50} Y _{5.58}	236-239 247
TM2	S _{2.45} L _{2.46} A _{2.47} D _{2.50} V _{2.57} M _{2.58} P _{2.59}	109-111 114 121-123	CPL3	ExKAxxxL	644-651
ECL1	C	141	TM6	F _{6.44} W _{6.47} P _{6.49} F _{6.50} F _{6.51}	658 662 664-666
TM3	D _{3.32} S _{3.39} I _{3.40} D _{2.49} R _{2.50} Y _{2.51}	148 155-156 165-167	ECL3	C	675
TM4	W _{4.50}	193	TM7	W _{7.40} L _{7.42} G _{7.42} Y _{7.43} S _{7.46}	692-694 695 968
ECL2	C	220		N _{7.49} P _{7.50} xxY _{7.53}	701-705

3.4 Der Einfluss von Serotonin und 5-HT-Rezeptorliganden auf das phototaktische Verhalten von Bienen

Die immunhistochemischen Analysen zur Verteilung des Am5-HT₁-Rezeptors ergaben, dass dieser Rezeptor sehr prominent in den optischen Loben und in den Ocellarnerven exprimiert wird. Zum einen sollte untersucht werden, ob 5-HT einen Einfluss auf das phototaktische Verhalten der Honigbiene besitzt. Zum anderen sollten Verhaltensversuche zeigen, ob die in Abschnitt 3.1.4 (Seite 46) untersuchten Rezeptorliganden in der Lage sind, die 5-HT-Wirkung (wenn vorhanden) zu imitieren bzw. zu blockieren.

In einem ersten Experiment wurden 7 Tage alte Arbeiterbienen, welche seit ihrem Schlupf mit 10 mM 5-HT (gelöst in 50 % Saccharose) gefüttert wurden, in ihrem phototaktischen Verhalten untersucht. Es stellte sich heraus, dass diese Bienen, im Vergleich zu einer Kontrollgruppe, welche mit einer reinen 50 %igen Saccharose-Lösung gefüttert wurden, eine deutlich verminderte Phototaxis bei den Intensitäten 1-4 zeigen (Abb. 26 A). Dies äußert sich dadurch, dass die Tiere deutlich länger benötigen, um die Strecke zwischen zwei Dioden gleicher Intensität zu überwinden. Zum einen halten sie öfter an, um sich zu orientieren. Zum anderen weichen sie häufiger und zugleich stärker als Tiere der Kontrollgruppe vom direkten Weg zur Diode ab (vgl. Abb. 25). Durch das Verfüttern von 5-HT konnte jedoch keine signifikante Wirkung auf die lokomotorische Aktivität der Bienen festgestellt werden (Abb. 26 B).

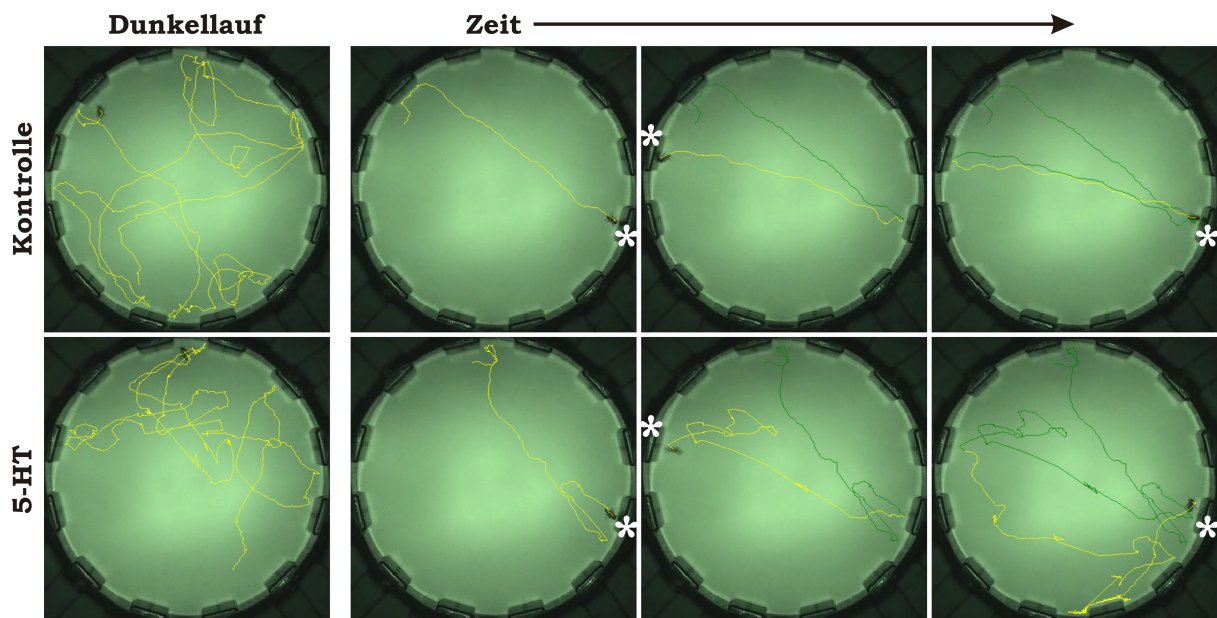


Abb. 25: Ausschnitt aus dem Verlauf eines Phototaxisexperiments.

Dargestellt sind Momentaufnahmen aus Experimenten von einer Biene der Kontrollgruppe (obere Reihe) und einer Biene aus der Gruppe, welche mit 5-HT gefüttert wurde (untere Reihe). Links ist der Weg dargestellt, welcher in 1 min im Dunkeln zurückgelegt wurde (Dunkellauf). Die drei anderen Abbildungen (rechts) geben den Weg an, welchen die Biene zurückgelegt hat, bis sie an der aktuell leuchtenden Diode (*) angekommen ist (gelbe Linie). Die grüne Linie gibt den davor zurückgelegten Weg an. Die Laufspuren wurden mittels GrenTrack erfasst.

Da die 5-HT-Wirkung hauptsächlich bei den ersten drei Lichtintensitäten zu verzeichnen ist, wurden die Bienen in den folgenden Experimenten ausschließlich bei diesen Intensitäten getestet. Der Am5-HT₁-Rezeptor-Agonist 5-MT hat keinen messbaren Einfluss auf das phototaktische Verhalten. Bienen welche diesen Liganden verfüttert bekommen haben, benötigen die gleiche Zeit, um den Weg zwischen zwei Dioden zu überwinden (Abb. 26 C). Dagegen sieht man bei dem für Am5-HT₁ affineren Liganden 5-CT (im Vergleich zu 5-MT, vgl. Abschnitt 3.1.4) einen deutlichen, jedoch knapp nicht-signifikanten Einfluss. Verfüttert man Bienen diese Substanz, so benötigen sie bei der geringsten Lichtintensität im Vergleich zur Kontrollgruppe im Durchschnitt 5 s länger, um zur anderen Diode zu gelangen (Abb. 26 D). Für 5-CT konnte ebenfalls keine Wirkung auf die lokomotorische Aktivität im Dunkeln nachgewiesen werden (Abb. 26 E).

Durch ein weiteres Experiment sollte untersucht werden, ob der Am5-HT₁-Rezeptor-Antagonist Prazosin (vgl. Abschnitt 3.1.4) in der Lage ist, die 5-HT-Wirkung (s. o.) aufzuheben. Es wurden 4 Gruppen von Bienen untersucht. Einer Gruppe wurde lediglich Zuckerwasser (50 % Saccharose) verfüttert (Kontrollgruppe). Die zweite Gruppe bekam 10 mM 5-HT und die dritte 10 mM Prazosin (jeweils in 50 % Saccharose gelöst). Der vierten Gruppe wurde eine Kombination beider Liganden verfüttert (10 mM 5-HT + 10 mM Prazosin gelöst in 50 % Saccharose). In Abbildung 26 F kann man erkennen, dass die 5-HT-Wirkung reproduziert werden konnte. Die Verfütterung von Prazosin in Abwesenheit von 5-HT hatte keinen messbaren Effekt auf das phototaktische Verhalten. Dagegen zeigt die Verfütterung von Prazosin deutliche Wirkung auf den 5-HT-Effekt. Die Laufzeiten dieser Gruppe unterscheiden sich nicht mehr signifikant von denen der Kontrollgruppe. In allen vier Gruppen konnte kein Unterschied bzgl. der motorischen Aktivität im Dunkeln festgestellt werden (Abb. 26 G).

Abb. 26 (nächste Seite): Wirkung verschiedener 5-HT-Rezeptor-Liganden auf das phototaktische Verhalten sowie die motorische Aktivität.

A, C und D Laufzeiten von Bienen, denen verschiedene Rezeptorliganden verfüttert wurden, zwischen den Dioden gleicher Intensität. Die Laufzeitbestimmung erfolgte jeweils 4-fach. Signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen sind durch * gekennzeichnet (t-Test für unabhängige Stichproben, $p < 0,05$). Unterschiede zwischen den Gruppen die knapp nicht signifikant sind, sind durch # gekennzeichnet ($p = 0,055$).

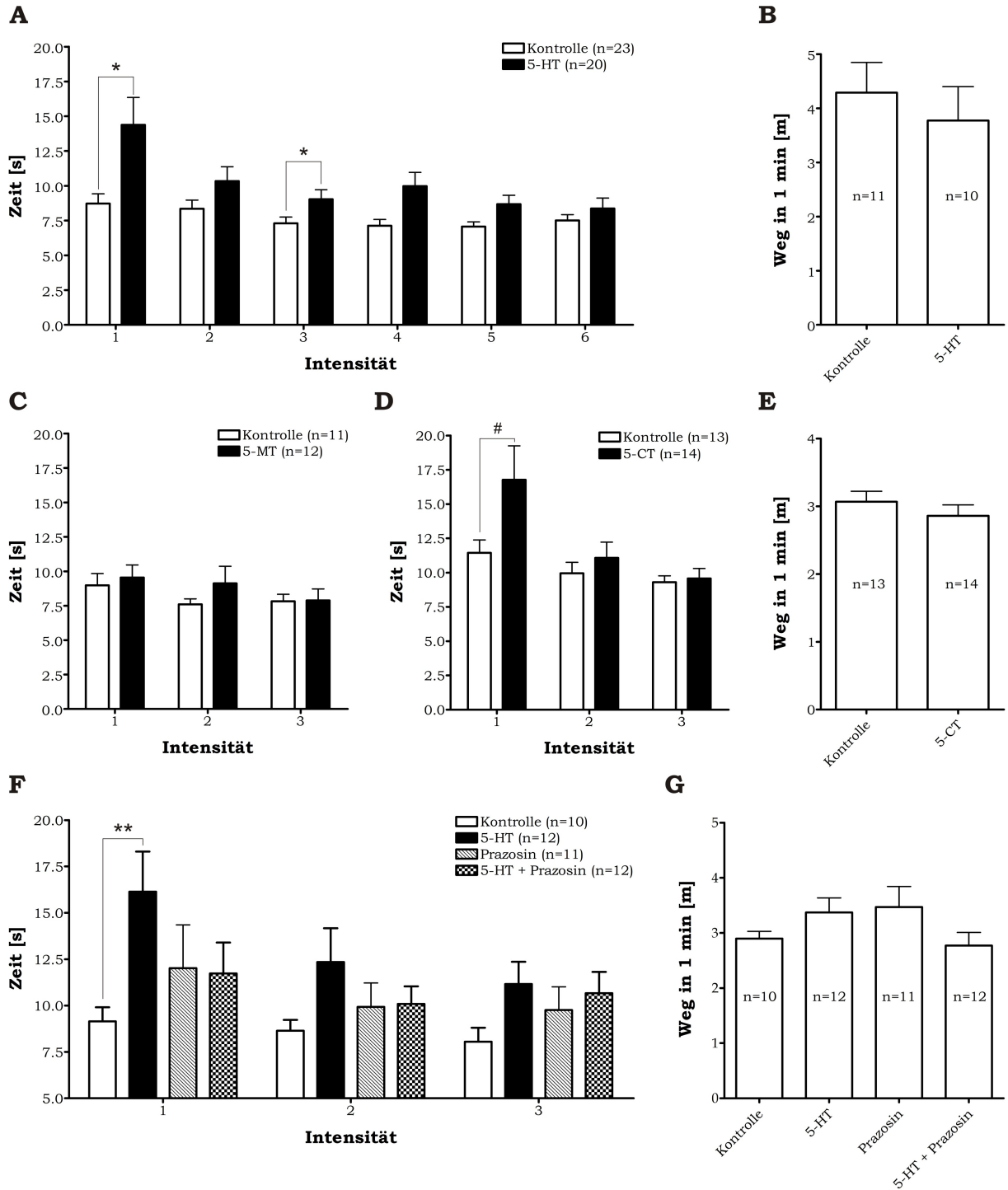
B Kontrollexperiment zu A. Dargestellt sind die Strecken, welche die Bienen in völliger Dunkelheit in 1 min zurückgelegt haben. Die Strecken unterscheiden sich nicht signifikant (t-Test für unabhängige Stichproben, $p = 0,545$).

E Kontrollexperiment zu D. Dargestellt sind die Strecken, welche die Bienen in völliger Dunkelheit in 1 min zurückgelegt haben. Die Strecken unterscheiden sich nicht signifikant (t-Test für unabhängige Stichproben, $p = 0,36$).

F Laufzeiten verschieden gefütterter Bienen zwischen den Dioden gleicher Intensität. Die Laufzeitbestimmung erfolgte jeweils 4-fach. Signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen sind mit ** gekennzeichnet (t-Test für unabhängige Stichproben, wegen multipler Tests wurde das Signifikanzniveau für eine 5 %ige Irrtumswahrscheinlichkeit von $p = 0,05$ mit Bonferroni-Korrektur auf $p' = 0,017$ verändert).

G Kontrollexperiment zu F. Dargestellt sind die Strecken, welche die Bienen in völliger Dunkelheit in 1 min zurückgelegt haben. Die Strecken unterscheiden sich nicht signifikant (*one-way ANOVA*, gefolgt von *Tukey's Multiple Comparison Test*, $p > 0,05$)

Dargestellt sind in Mittelwerte und Standardabweichungen (A-G).



4 Diskussion

Bei Vertretern aller Tierstämme, welche in der Lage sind, ein Nervensystem zu bilden, konnten serotonerge Neuronen nachgewiesen werden. Als klassischer Neurotransmitter und Neuromodulator sowie als Neurohormon kontrolliert und moduliert es wichtige Verhaltensweisen wie zum Beispiel das Fressverhalten, das Sexualverhalten und aggressives Verhalten (WEIGER, 1997). Serotonin entfaltet seine Wirkung über membranständige Rezeptoren, an welche es bindet und die dadurch aktiviert werden. Sieben verschiedene 5-HT-Rezeptor-Klassen sind bei Vertebraten bekannt. Diese gehören, mit Ausnahme der 5-HT₃-Rezeptoren, der Klasse der G-Protein-gekoppelten-Rezeptoren an (NICHOLS & NICHOLS, 2008). Die 5-HT₃-Rezeptoren stellen Liganden-gesteuerte Ionenkanäle dar (NICHOLS & NICHOLS, 2008). Die G-Protein-gekoppelten 5-HT-Rezeptoren sind eine evolutiv sehr alte Gruppe von Proteinen, welche vor der Trennung von Protostomia und Deuterostomia entstanden sind (PEROUTKA & HOWELL, 1994). Im Vergleich zu dem Wissen über 5-HT-Rezeptoren der Vertebraten, ist das Wissen über 5-HT-Rezeptoren der Invertebraten immer noch relativ gering. Jedoch konnten auch bei Invertebraten G-Protein-gekoppelte 5-HT-Rezeptoren nachgewiesen werden, welche den 5-HT₁, 5-HT₂ und 5-HT₇-Rezeptoren der Vertebraten homolog sind (PEROUTKA, 1994).

Analysen zur Verteilung serotonerger Neuronen bei der Honigbiene lassen vermuten, dass 5-HT in weiten Bereichen des Bienenhirns ausgeschüttet wird und modulierend auf die Aktivität der entsprechenden Areale wirkt (SCHÜRMAN & KLEMM, 1984; BICKER, 1999). Viele Studien zeigen, dass 5-HT einen Einfluss auf zahlreiche physiologische Prozesse sowie das Verhalten besitzt (u. a. MERCER & MENZEL, 1982; KLOPPENBURG & ERBER, 1995; MENZEL & MÜLLER, 1996).

Will man die physiologische Wirkung von 5-HT verstehen, ist es wichtig, die Rezeptoren, über die sie ihre Wirkung entfalten, genau zu charakterisieren. Mit der Veröffentlichung der genomischen Sequenz der Honigbiene wurden zahlreiche Gene vorhergesagt (THE HONEYBEE GENOME SEQUENCING CONSORTIUM, 2006). Darunter befinden sich auch Gene für 5-HT-Rezeptoren (HAUSER ET AL., 2006). Diese *in silico*-Analysen verraten jedoch nur wenig über die Funktionen eines putativen Rezeptors. Aufgrund von Ähnlichkeiten in der molekularen Struktur kann zwar auf die endogenen Liganden sowie die intrazellulären Signalwege geschlossen werden, doch kann man keine genauen Aussagen zur Pharmakologie, Verteilung und zur physiologischen Funktion machen. Bisher ist mit Am5-HT₇ nur ein serotonerger Rezeptor der Honigbiene molekular und pharmakologisch charakterisiert worden (SCHLENSTEDT ET AL., 2006). Somit weist das Wissen um das serotonerge System der Honigbiene noch beachtliche Lücken auf. Durch die umfangreiche Charakterisierung weiterer serotonerger GPCRs der Honigbiene hat die vorliegende Arbeit dazu beigetragen, diese Lücken zu schließen.

Die folgende Diskussion gliedert sich in sechs Abschnitte. Der erste setzt sich mit den strukturellen Eigenschaften der Gene sowie der Proteine der untersuchten 5-HT-Rezeptoren auseinander. Im zweiten Abschnitt wird das alternative Spleißen diskutiert, welches bei zwei der analysierten Rezeptoren beobachtet wurde. Die Signaltransduktion sowie das pharmakologische Profil der untersuchten Rezeptoren sind Gegenstand des dritten Teils der Diskussion. Die räumliche Verteilung der Rezeptoren wird im vierten Teil erläutert. Der letzte Teil behandelt die mögliche

physiologische Funktion des Am5-HT₁-Rezeptors. Abschließend wird ein Ausblick darüber gegeben, welche Untersuchungen in Zukunft sinnvoll sind, um den Kenntnissstand über das serotonerge System der Honigbiene noch weiter zu verbessern.

4.1 Strukturelle Eigenschaften der 5-HT-Rezeptoren der Honigbiene

Ein entscheidender Vorteil bei der Suche nach den 5-HT-Rezeptoren war die Veröffentlichung der genomischen Sequenz der Honigbiene (THE HONEYBEE GENOME SEQUENCING CONSORTIUM, 2006). Die AS-Sequenzen stark konservierter Bereiche innerhalb der Transmembranregionen bereits bekannter Arthropoden-GPCRs (WITZ ET AL., 1990; SAUDOU ET AL., 1992; COLAS ET AL., 1995; CLARK ET AL., 2004; SOSA ET AL., 2004; DACKS ET AL., 2006) wurde genutzt, um das Genom der Honigbiene nach homologen Sequenzen zu durchsuchen. Mit den daraus resultierenden Informationen war es möglich, Primer zu generieren, mit denen in PCR-Experimenten die cDNAs von drei 5-HT-Rezeptoren amplifiziert und anschließend kloniert werden konnten.

4.1.1 Genomische Organisation und die Annotierung von Genen

Ein Merkmal eukaryotischer Gene besteht darin, dass sie sogenannte Introns aufweisen. Dies sind nicht kodierende DNA-Abschnitte, welche zwischen den kodierenden Bereichen (Exons) stehen. Wird ein Gen in mRNA translatiert, so werden die Introns zunächst mit übersetzt, später jedoch am Spleißosom entfernt. Dieses nutzt die konservierten Exon/Intron-Übergänge, um die Introns zu erkennen und zu entfernen.

Das Am5-*ht*₁-Gen besitzt eine Spleißstelle, welche ebenfalls im Dm5-*ht*_{1A}-Gen (SAUDOU ET AL., 1992) und Pxu5-*ht*-1-Gen (*Papilio xuthus*, ONO & YOSHIKAWA, 2004) konserviert ist. Eine weitere gemeinsame Spleißstelle besitzen die Gene Am5-*ht*₁ und Pxu5-*ht*-1 in der Region, die für die TM1 kodiert. Das Am5-*ht*_{2α}-Gen weist je eine Spleißstelle in der ECL2 und 3 sowie zwei in der CPL3 auf, welche Dm5-*ht*₂ (COLAS ET AL., 1995) ebenfalls besitzt. Interessanterweise besitzen sowohl Am5-*ht*_{2α} als auch Am5-*ht*_{2β} Spleißstellen in der ECL2 und CPL2. Zudem werden die mRNAs beider Rezeptoren an diesen Stellen alternativ gespleißt (vgl. Abschnitt 4.2, Seite 70). Mit Hilfe von speziellen Programmen ist es möglich, Gene aufgrund bestimmter Merkmale in der genomischen Sequenz vorherzusagen (Annotierung). So wurden u. a. die Gene für die drei klonierten Rezeptoren annotiert und ihre AS-Sequenz vorhergesagt. Wie der Vergleich der annotierten Sequenzen mit den Sequenzen der klonierten Rezeptoren zeigt, bestehen zum Teil sehr starke Abweichungen zwischen der annotierten AS-Sequenz und der von der isolierten cDNA abgeleiteten AS-Sequenz. So unterscheidet sich der N-Terminus der annotierten AS-Sequenz und der von der isolierten cDNA abgeleiteten AS-Sequenz, was durch zwei völlig verschiedene erste Exons in der annotierten Sequenz und der Sequenz der klonierten cDNA verursacht wird. Das Exon I der annotierten AS-Sequenz konnte jedoch in keinem der durchgeführten PCR-Experimente nachgewiesen werden. Die Klonierung der Am5-*ht*_{2α}-cDNA lässt auf eine andere Exon-Intron-Struktur schließen, als durch die Annotierung vorhergesagt wurde. Das annotierte Am5-*ht*_{2α}-Gen weist ein deutlich kürzeres Exon V auf. Dieses konnte ebenfalls nicht nachgewiesen werden. Daher handelt es sich in beiden Fällen um fehlerhafte Annotierungen. Ein Grund für diese Fehler könnte unter anderem darin bestehen, dass das Spleißosom der Biene nicht auf

die stark konservierten Spleiß-Donor- und -Akzeptorsequenzen angewiesen ist und auch weniger stark konservierte Spleißstellen prozessieren kann. Die Annotierungsprogramme sind jedoch unter anderem darauf ausgelegt, stark konservierte Spleiß-Donor- und -Akzeptorsequenzen zu erkennen (KORF, 2004).

Besonders drastisch ist die fehlerhafte Annotierung im Fall des Am5-HT_{2β}-Rezeptors. Hier konnte kein zusammenhängender 7-TM-Rezeptor vorhergesagt werden. Dies kann mehrere Ursachen haben. Das Am5-HT_{2β}-Gen besitzt sehr große Introns (> 100.000 bp). Diese großen Introns werden zum Teil von den Programmen nicht erkannt und das Resultat sind falsch annotierte Gene (WANG ET AL., 2003). Diese Fehlerquelle in den Annotierungsprogrammen zu beheben wäre sinnvoll. "Mega-Introns" wie z. B. das 3 Mb Intron in dem Dynein-Gen *dhdhc7* aus *Drosophila hydei* (REUGELS ET AL., 2000) wurden in 10 % aller humanen und in 5 % aller Gene von *D. melanogaster* nachgewiesen (DEUTSCH & LONG, 1999; SAXONOV ET AL., 2000). Weiterhin konnten die genomischen Sequenzabschnitte (die sogenannten Contigs), auf welche sich das Gen verteilt, bisher nicht eindeutig einem Chromosom zugeordnet werden, was die Verknüpfung der Am5-HT_{2β}-Sequenzdaten deutlich erschwert. Ein weiterer Punkt, welcher diese Verknüpfung schwierig macht, besteht darin, ist, dass die Exons auf zwei der drei Contigs in 3'→5'-Richtung lokalisiert sind und auf dem dritten in 5'→3'-Richtung. Somit bleibt das Klonieren und Sequenzieren von cDNAs annotierter Gene unumgänglich für die exakte Ermittlung der Sequenz der entsprechenden Proteine.

4.1.2 Eigenschaften der abgeleiteten Aminosäuresequenz

G-Protein-gekoppelte aminerge Rezeptoren weisen auf der Proteinebene konservierte AS bzw. Sequenzbereiche auf. Diese sind für die strukturelle Stabilität, die Rezeptoraktivierung und die Signalweiterleitung notwendig. Zudem treten Merkmale auf, die der Regulation der Rezeptoren dienen bzw. diese beeinflussen.

Heptahelikale Struktur

G-Protein-gekoppelte Rezeptoren sind durch ein extrem konserviertes Merkmal als Supergenfamilie charakterisiert - das Vorhandensein von sieben hydrophoben Transmembranhelices. Die Einordnung der untersuchten Rezeptoren in diese Genfamilie ist durch die strukturelle Analyse eindeutig gegeben (Abb. 6, 18, 24). Jeder Rezeptor beginnt mit einem extrazellulären N-Terminus, dem sieben Membranhelices folgen und endet mit einem intrazellulären C-Terminus.

Spezifische Ligandenbindungstasche

Für die Rezeptoraktivierung ist die Bindung eines spezifischen Liganden notwendig. Der Vergleich der AS-Sequenzen aller drei Rezeptoren mit den Sequenzen von bekannten GPCRs (Abb. 7) legte nahe, dass es sich bei dem Liganden um Serotonin handelt. Vergleicht man die AS der Transmembranhelices verschiedener Rhodopsin-ähnlicher GPCRs miteinander, so stellt man fest, dass die weiter extrazellulär gelegenen Bereiche weniger stark konserviert sind (MIRZADEGAN ET AL., 2003). Innerhalb der aminergen GPCRs findet man jedoch stark konservierte AS in den Transmembrandomänen 3, 5 und 6. Diese spielen bei der Bindung des Liganden eine wichtige Rolle

(für Reviews siehe: STRADER ET AL., 1995; GETHER, 2000; KROEZE ET AL., 2002) und sind auch in den hier untersuchten Rezeptoren konserviert (Tab. 4, 6, 9). In der TM3 ist der Asparaginsäurerest D_{3,32} konserviert, an welchen die Aminogruppe des Liganden bindet. Weitere wichtige AS finden sich in der TM6. Hierbei handelt es sich um die Phenylalaninreste F_{6,44}, F_{6,50} und F_{6,51}. Diese vermitteln über Wasserstoffbrückenbindungen die Anlagerung des Indolrings des Serotonins. Der Serinrest S_{5,45} in der TM5, welcher die Bindung der Hydroxylgruppe des Liganden vermittelt, ist konserviert in Rezeptoren, welche an den IP₃-Weg koppeln. Beide Am5-HT₂-Rezeptoren weisen diesen Aminosäurerest auf (Tab. 6, 9). Beim Am5-HT₁-Rezeptor dagegen ist diese Aminosäure gegen Alanin substituiert. Bisher ist lediglich bekannt, dass 5-HT-Rezeptoren welche an die AC koppeln, statt dem Serinrest Threonin- oder Cysteinreste besitzen (DONNELLY ET AL., 1994). Möglicherweise übernimmt in diesem Rezeptor der dem Alaninrest vorangestellte Cysteinrest C_{5,44} die Bindung der Hydroxylgruppe des Liganden.

Rezeptoraktivierung

Lagert sich in die Bindungstasche des Rezeptors ein Ligand an, so ändert der Rezeptor seine Konformation. Dies betrifft unter anderem den Winkel des Prolin-Knicks (P_{6,50}) der TM6, wodurch sich deren cytoplasmatisches Ende von dem der TM3 entfernt (GETHER ET AL., 1997; GETHER & KOBILKA, 1998). P_{6,50} ist in den untersuchten Rezeptoren konserviert.

In der TM7 der Am5-HT₁-, Am5-HT_{2α}- und Am5-HT_{2β}-Rezeptoren ist das N_{7,49}P_{7,50}XXY_{7,53}-Motiv konserviert, welches für die Konformation und Signaltransduktion des Rezeptors von entscheidender Bedeutung ist. Mutationsstudien haben gezeigt, dass Y_{7,53} an der Agonist-induzierten Aktivierung des Rezeptors beteiligt ist (BARAK ET AL., 1994; KALATSKAYA ET AL., 2004; FRITZE ET AL., 2003). Aminosäurereste dieses Motivs sorgen über Wasserstoffbrückenbindungen mit Aminosäureresten in der TM2 und 3 dafür, dass die Konformation des Rezeptors, wie sie für die Bindung des Liganden erforderlich ist, aufrecht erhalten wird (SEALFON ET AL., 1995). Weiterhin können monomere GTP-bindende Proteine an das NPxxY-Motiv binden (HALL ET AL., 1999), wodurch eine Kopplung der Serotonin-Rezeptoren an den Phospholipase-D-Weg möglich wird (MITCHELL ET AL., 1998).

Das DRY-Motiv (D_{2,49}R_{2,50}Y_{2,51}), welches im Am5-HT₁ sowie im Am5-HT_{2β} zu finden ist, vermittelt die Liganden-induzierte Konformationsänderung des Rezeptors. Dabei kommt es zu Interaktionen zwischen D_{2,49} und R_{2,50} sowie R_{2,50} und konservierten, polaren Resten in den TM1, TM2, TM6 und TM7 (GETHER & KOBILKA, 1998; SHAPIRO ET AL., 2002). In der Sequenz von Am5-HT_{2α} ist der Asparaginsäurerest durch Glycin ersetzt. Auch bei anderen Invertebraten-GPCRs findet man Substitutionen von Aminosäureresten innerhalb des DRY-Motivs. In der Sequenz eines 5-HT₂-Rezeptors aus *D. melanogaster* findet sich der gleiche Austausch von Asparaginsäure zu Glycin (COLAS ET AL., 1995). In Am5-HT₇ (*A. mellifera*), Pan5-HT_{2β} (*Panulirus interruptus*) und Pro5-HT_{2β} (*Procambarus clarkii*) ist der Tyrosinrest gegen Phenylalanin substituiert (CLARK ET AL., 2004; SCHLENSTEDT ET AL., 2006; SPITZER ET AL., 2008). SCHEER ET AL. (1996) zeigten, dass der Austausch der Asparaginsäure gegen Arginin zu einer starken konstitutiven Aktivität des Rezeptors führt. Auch der Am5-HT₇- und Pan5-HT_{2β}-Rezeptor sind konstitutiv aktiv (CLARK ET AL., 2004; SCHLENSTEDT ET AL., 2006). Durch eine Mutationsstudie, in welcher der Phenylalaninrest gegen einen Tyrosinrest substituiert wurde, konnte

keine konstitutive Aktivität des Pan5-HT_{2β}-Rezeptors mehr festgestellt werden (CLARK ET AL., 2004). Ob auch der Am5-HT_{2α}-Rezeptor konstitutiv aktiv ist, muss durch weiterführende Studien geklärt werden.

Posttranslationale Proteinmodifikationen

Jeder der untersuchten Rezeptoren weist zwei bis vier Konsensusstellen für die N-Glykosylierung auf. In Western-Blot-Analysen mit Proteinen aus Am5-HT₁- bzw. Am5-HT_{2α}-exprimierenden HEK293-Zellen konnte gezeigt werden, dass diese Proteine an einer oder mehrerer dieser Stellen glykosyliert werden (Abb. 9, 19 C). Im nativen Gewebe konnte die Glykosylierung dieser Rezeptorproteine jedoch nicht nachgewiesen werden. Diese für Membranproteine typische Art der Modifikation hilft wahrscheinlich bei dem gerichteten Transport des Proteins zur Zellmembran sowie dem Einbau in diese (CLAGETT-DAME & MCKELVY, 1989; RANDS ET AL., 1990; DESLAURIERS ET AL., 1999; TANSKY ET AL., 2007). Für Am5-HT_{2β} wurden keine entsprechenden Experimente durchgeführt.

Serin- oder Threoninreste in intrazellulär lokalisierten Bereichen des Rezeptorproteins können durch die cAMP-abhängige Proteinkinase A (PKA), die Ca²⁺-abhängige Proteinkinase C (PKC) oder durch G-Protein-gekoppelte Rezeptorkinasen phosphoryliert werden (FERGUSON, 2001; TOBIN, 2008). Die Funktion dieser Veränderungen liegt in der Desensitisierung der Rezeptoren (FREEDMAN ET AL., 1995) sowie der Aktivierung von Arrestin-abhängigen Signalwegen (LUTTRELL & LEFKOWITZ, 2002; DEFEA, 2008). Der Am5-HT₁-Rezeptor besitzt innerhalb der CPL3 vier Konsensusstellen für die Phosphorylierung via PKC. Dagegen finden sich keine Bereiche, welche durch die PKA phosphoryliert werden können. In der abgeleiteten Sequenz von Am5-HT_{2β} sind jeweils vier Konsensusstellen für die Phosphorylierung via PKA und PKC in der CPL3 zu finden. Dagegen gibt die abgeleitete Aminosäuresequenz von Am5-HT_{2α} keinen Hinweis auf eine mögliche Phosphorylierung. Im Rahmen dieser Arbeit wurde nicht experimentell untersucht, ob und durch welche Enzyme die beschriebenen Bereiche phosphoryliert werden. Die C-Palmitoylierung ist eine posttranslationale Modifikation, welche bei vielen charakterisierten GPCRs nachgewiesen wurde. Dabei wird Palmitinsäure kovalent an einen Cysteinrest gebunden (QANBAR & BOUVIER, 2003; TORRECILLA & TOBIN, 2006). Alle der hier untersuchten Rezeptoren besitzen im C-Terminus mindestens einen Cysteinrest. Werden diese palmitoyliert, ist es möglich, den C-Terminus in der Zellmembran zu verankern, wodurch eine vierte cytoplasmatische Schleife entsteht (PONIMASKIN ET AL., 2002). Für die C-Palmitoylierung konnten mehrere wichtige Funktionen nachgewiesen werden. So wurde gezeigt, dass sie einen großen Einfluss auf den korrekten Transport des Proteins zur Membran besitzt (NG ET AL., 1994; RENNER ET AL., 2007). Weiterhin konnten O'DOWD ET AL. (1989) zeigen, dass durch den Austausch des palmitoylierbaren Cysteinrests durch ein Glycin ein nicht-palmitoylierter Rezeptor entsteht, welcher eine verminderte Kopplung des G-Proteins aufweist. Weitere Funktionen besitzt die C-Palmitoylierung bei den Vorgängen der Desensitisierung (PONIMASKIN ET AL., 2005) und der Rezeptoroligomerisation (KOBE ET AL., 2008).

Phylogenetische Analyse der 5-HT-Rezeptoren

Die phylogenetische Analyse von 5-HT-Rezeptoren der Protostomia und Deuterostomia (siehe

Abb. 7) ergibt eindeutig die Aufspaltung in zwei große Gruppen. Eine Gruppe wird von der Klasse der 5-HT₂-Rezeptoren gebildet, welche an G_q-Proteine koppeln. Die andere Gruppe bilden Rezeptoren, welche an Adenylylzyklen koppeln. Diese Gruppe lässt sich wiederum unterteilen. Auf einer Seite stehen die 5-HT₁- und auf der anderen die 5-HT₇-Rezeptoren. Interessant dabei ist, dass die Vertebraten-Rezeptoren keine eigene, Klassen-unabhängige Gruppe bilden, sondern jeweils in den entsprechenden Klassen zu finden sind. Dieses Ergebnis wurde in anderen Studien ebenfalls erzielt (PEROUTKA & HOWELL, 1994; WALKER ET AL., 1996) und verlangt für jeden der drei untersuchten Rezeptor-Klassen (5-HT₁, 5-HT₂ und 5-HT₇) einen Vorfahr, welcher bereits vor der Aufspaltung der Protostomier und Deuterostomier existierte. Die Entstehung von Rezeptorsubtypen wird durch Genduplikation und sich anschließende Mutationen erklärt (VERNIER ET AL., 1995). In der Tat lassen sich die Rezeptoren der einzelnen Klassen in weitere Subklassen unterteilen. So findet man stets mehrere Subtypen für jede Klasse der Vertebraten-5-HT-Rezeptoren, welche durch Genduplikation entstanden sind (BARNES & SHARP, 1999). Bei den 5-HT-Rezeptoren der Invertebraten findet man oft nur einen Vertreter für eine Klasse pro Species. Es gibt jedoch auch hier einige Beispiele für Genduplikationen. Die 5-HT₁-Rezeptoren von *D. melanogaster* (SAUDOU ET AL., 1992) sind wahrscheinlich bei einer sehr jungen Genduplikation entstanden. Die 5-HT₁-Rezeptoren aus *Manduca sexta* dagegen stehen weit auseinander und sprechen für die Gliederung der Invertebraten-5-HT₁-Rezeptoren in mindestens zwei Subklassen (DACKS ET AL., 2006). Ein deutlich länger zurückliegendes Ereignis war die Entstehung der beiden 5-HT₂-Rezeptorisoformen von *A. mellifera*. Die 5-HT₂-Rezeptoren separieren in einen Invertebraten-Typ, welchem der Am5-HT_{2β}-Rezeptor zuzuordnen ist, und in einem Vertebraten-Typ, welchem der Am5-HT_{2α}-Rezeptor angehört. Es existieren weitere zum Teil unvollständig annotierte Gene von *A. mellifera* (Acc. Nummer: XP_394102, AY_961394), welchen zur Zeit nicht eindeutig ein Ligand zugeordnet werden kann (Am10 und Am18 aus HAUSER ET AL., 2006). Auch *D. melanogaster* weist einen zweiten, bisher unvollständig annotierten 5-HT-Rezeptor auf (CG Nummer: CG7994/CG8007). Molekularbiologische Untersuchungen müssen in Zukunft zeigen, dass es sich dabei tatsächlich um 5-HT-Rezeptoren handelt und ob diese für weitere Genduplikationen sprechen.

4.2 Alternatives Spleißen

Alternatives Spleißen ist ein weiterer Aspekt, der zeigt, dass die Informationen, welche aus Annotierungsverfahren gewonnen werden, nur einen Bruchteil dessen darstellen, was aus PCR- und Klonierungsexperimenten gewonnen werden kann. Spleißen ist ein posttranskriptionaler Mechanismus, welcher dazu dient, die nicht-kodierenden Bereiche (Introns) der prä-mRNA zu entfernen, um eine mRNA zu erhalten, welche nur aus Exons (kodierende Bereiche) besteht. Dies ist kein starrer Vorgang. So ist es möglich, prä-mRNAs alternativ zu spleißen. Bei diesen Modifikationen kann der prä-mRNA ein oder mehrere komplette Exons entfernt (*Exon Skipping*), Introns beibehalten (*Intron Retention*) und alternative 3'- oder 5'-Spleißstellen verwendet werden. Es können auch mRNAs entstehen, welche alternative Exons (*Mutually Exclusive Exons*) aufweisen (BLACK, 2003). Dadurch wird die Diversität und Flexibilität von Transkriptom und Proteom

entscheidend erhöht (BOUE ET AL., 2003). Verschiedene Rezeptor-mRNAs von Vertebraten wie von Invertebraten können alternativ gespleißt werden (MONSMA ET AL., 1989; CANTON ET AL., 1996; HEARN ET AL., 2002; SUGIURA ET AL., 2005).

Für die zwei untersuchten 5-HT₂-Rezeptoren konnte ebenfalls alternatives Spleißen nachgewiesen werden. In PCR-Experimenten wurde jeweils eine kurze und eine lange cDNA-Variante amplifiziert und anschließend kloniert. In beiden Fällen handelt es sich bei der langen um jene Variante, welche die komplette Information für einen vollständigen Rezeptor enthält. Die kurze Variante entsteht bei beiden Rezeptor-mRNAs durch *Exon Skipping*. Interessanterweise wird in beiden Fällen jenes Exon entfernt, welches für den Bereich TM3 - TM4 kodiert. Möglicherweise ist dieser Spleißvorgang konserviert und bereits bei dem gemeinsamen Vorfahr beider Gene aufgetreten. Diesbezüglich wäre es interessant zu untersuchen, ob diese Form des alternativen Spleißens auch bei den entsprechenden Genen bei nah verwandten Arten auftritt. Bisher wurden jedoch keine vergleichbaren Spleiß-Varianten bei anderen bekannten Invertebraten-5-HT₂-Rezeptoren entdeckt. Lediglich der 5-HT₂-Rezeptor des Nematoden *Ascaris suum* weist eine durch *Exon Skipping* verursachte Spleiß-Variante auf (HUANG ET AL., 1999, 2002). Diese betrifft jedoch den N-Terminus und unterscheidet sich daher deutlich von den in dieser Arbeit beschriebenen Varianten. Dagegen wurden mehrere 5-HT-Rezeptor-Spleiß-Varianten bei Vertebraten beschrieben, bei denen der Bereich TM3 - TM4 beeinflusst wird (CANTON ET AL., 1996; OLSEN ET AL., 1999; GUEST ET AL., 2000). So konnten CANTON ET AL. (1996) für den 5-HT_{2c}-Rezeptor der Ratte *Exon Skipping* nachweisen, bei dem ein Teil der TM4 entfernt wird und es anschließend zu einer abweichenden Sequenz und einem frühen Stop-Codon kommt.

Im Fall des Am5-HT_{2α} wird das Exon III herausgeschnitten, wodurch die Informationen für die TM3 und TM4 sowie die CPL2 entfernt werden. Der Leserahmen bleibt dabei erhalten. Wird diese trunkierte mRNA in ein Protein übersetzt, so wären die Bereiche vom N-Terminus bis zur TM2 und von der TM5 bis zum C-Terminus identisch zum vollständigen Rezeptorprotein. Für humane Chemokinin-Rezeptoren wurden zwei, eine natürlich beobachtete (CCR5) und eine künstlich erzeugte (CXCR4), alternative Spleißvarianten beschrieben. Diesen fehlen zwar die Bereiche TM1 bis TM2, jedoch stehen sie auf funktioneller Ebene den vollständigen Rezeptoren in nichts nach (LING ET AL., 1999). Für Am5-HT_{2α} sollte geklärt werden, ob die Spleiß-Variante eine Funktion besitzt. Ob Am5-HT_{2α}-tr tatsächlich im Gewebe vorliegt, kann derzeit nicht beantwortet werden. Der monoklonale Antikörper gegen diesen Rezeptor funktioniert nicht in Western-Blot-Analysen mit Proteinen, welche direkt aus dem Nervengewebe isoliert wurden (vgl. Abschnitt 3.2.3, Seite 52). Allerdings konnte gezeigt werden, dass Am5-HT_{2α}-tr in HEK293-Zellen exprimiert wird und dabei als glykosyliertes Protein vorliegt (Abb. 19 C). Außerdem wurde untersucht ob Am5-HT_{2α}-tr allein funktionell ist. In diesen Experimenten konnte jedoch kein rezeptorvermittelter Anstieg der [Ca²⁺]_i gemessen werden. Daraus lässt sich schlussfolgern, dass die Spleißvariante Am5-HT_{2α}-tr keinen *Stand-alone*-Rezeptor darstellt. Es ist jedoch möglich, dass dieses Protein mit Am5-HT_{2α} interagiert und dessen Eigenschaften moduliert. Die bei Schizophrenie-Patienten entdeckte Spleißvariante D3nf unterscheidet sich vom D3-Dopamin-Rezeptor durch eine nicht-homologe TM6 und eine nicht vorhandene TM7 (SCHMAUSS ET AL., 1993). Immunpräzipitationsexperimente legen nahe, dass beide Varianten miteinander interagieren (KARPA ET AL., 2000). Dabei beeinflusst D3nf negativ die Bindungs-

eigenschaften des D3-Dopaminrezeptors (ELMHURST ET AL., 2000). Die Dimerbildung beider Am5-HT_{2α}-Varianten kann zum Beispiel mittels Co-Immunpräzipitationsexperimenten untersucht werden. Eine weitere Möglichkeit wären FRET-Experimente in HEK293-Zellen, welche beide entsprechend markierten Rezeptorvarianten exprimieren (PFLEGER & EIDNE, 2005; MAUREL ET AL., 2008). Diese Experimente haben den Vorteil, dass sie sehr genau Rückschlüsse über die räumliche Distanz zulassen.

Der Am5-HT_{2β}-Rezeptor besitzt eine alternativ gespleißte mRNA, bei der es zur Verschiebung des ORF und einem frühzeitigen Stop-Codon kommt. Dadurch entsteht theoretisch ein Protein, welches für den Bereich vom N-Terminus bis zur TM3 und einen alternativen C-Terminus kodiert. Zudem findet man auf der trunkierten mRNA einen zweiten ORF, welcher für den Bereich von der TM5 bis zum C-Terminus kodiert. Es wäre möglich, dass diese trunkierten Varianten ebenfalls exprimiert werden und miteinander und/oder mit dem vollständigem Am5-HT_{2β}-Rezeptor interagieren. So konnte gezeigt werden, dass sich experimentell erzeugte Rezeptorteile zu einem funktionellen Rezeptor-Komplex zusammenlagern können (MAGGIO ET AL., 1993). Eine andere Studie zeigte, dass es sogar möglich ist, das strukturverwandte Bakteriorhodopsin aus verschiedenen proteolytisch erzeugten Fragmenten funktionell zu reassemblieren (POPOT & DE VITRY, 1990). Die Oligomerisierung der verschiedenen Am5-HT_{2β}-Varianten könnte ebenfalls mittels Immunpräzipitations- und FRET-Experimenten in HEK293-Zellen untersucht werden. Da sich Am5-HT_{2βtr} im C-Terminus deutlich von Am5-HT_{2β} unterscheidet, bietet es sich an, gegen den C-Terminus beider Varianten Antikörper zu generieren. Diese könnten in Co-Immunpräzipitationsexperimenten mit Proteinen aus Bienengewebe eingesetzt werden, wodurch eine Untersuchung der Oligomerisierung im nativen Gewebe möglich werden würde.

4.3 Funktionelle Charakterisierung der 5-HT-Rezeptoren der Honigbiene

Die Am5-*ht*₁-, Am5-*ht*_{2α}- und Am5-*ht*_{2α}trunkiert-cDNAs wurden stabil in HEK293-Zellen integriert, um die Rezeptoren funktionell und pharmakologisch zu untersuchen. Der Nachweis der Expression konnte sowohl in Western-Blot-Analysen als auch in immunocytochemischen Untersuchungen erbracht werden.

4.3.1 Das heterologe Expressionssystem

In diversen Studien konnte gezeigt werden, dass das HEK293-Expressionssystem für die Untersuchung der funktionellen und pharmakologischen Eigenschaften aminerger Invertebraten-GPCRs gut geeignet ist (BLENAU ET AL., 1998; SCHLENSTEDT ET AL., 2006; SPITZER ET AL., 2008; ROTTE ET AL., 2009). Bei der Verwendung dieser Zellen sind jedoch folgende Aspekte zu beachten: LEURS ET AL. (1995) konnte zeigen, dass HEK293-Zellen den H₁ Histamin-Rezeptor exprimieren. Dieser, eine Änderung der [Ca²⁺]_i vermittelnde Rezeptor, konnte in der vorliegenden Arbeit ebenfalls nachgewiesen werden (Abb. 21). Abgesehen von den bekannten endogen exprimierten Rezeptoren können die Zellen zusätzlich Rezeptoren exprimieren, da sich das Expressionsprofil einer Zelle in Kultur aufgrund des geringen Selektionsdruck verändern kann (FRIEDMAN ET AL., 2002; CLARK & BARO, 2007). Dies trifft auch auf aminerge GPCRs zu. So sind HEK293-Zellen in der Lage, endogen Rezeptoren zu exprimieren, welche einen Dopamin-

bzw. Oktopamin-induzierten Anstieg der $[cAMP]_i$ vermitteln (ROTTE ET AL., 2009). Diese Reaktionen wurden in der vorliegenden Arbeit ebenfalls beobachtet (Abb. 15). 5-HT hatte in keiner der getesteten Konzentrationen, einen Einfluss auf die $[Ca^{2+}]_i$ oder die $[cAMP]_i$ von nicht-transfizierten HEK293-Zellen. Daher konnten die Analysen in diesem Zellsystem durchgeführt werden. Liganden, welche auch bei nicht-transfizierten Zellen Effekte zeigen, wurden von der Analyse ausgeschlossen.

4.3.2 Am5-HT₁ ist ein funktioneller Serotoninrezeptor

Die Funktionalität eines Rezeptors ist abhängig von der relativen Konservierung bestimmter Aminosäuren, welche die spezifische Bindung des Liganden sowie die Kopplung an einen spezifischen intrazellulären Signalweg vermitteln. Die molekulare Analyse der abgeleiteten Aminosäuresequenz von Am5-HT₁ spricht dafür, dass es sich bei diesem Rezeptor um einen 5-HT-Rezeptor der Klasse 1 handelt. Diese koppeln über G_{i/o}-Proteine negativ an die AC und bewirken bei Aktivierung eine Verminderung der $[cAMP]_i$. Diese Hypothese wurde überprüft, indem HEK293-Zellen mit dem wasserlöslichen Forskolinanalogen NKH477 stimuliert und der Einfluss der biogenen Amine Serotonin, Dopamin, Tyramin, Octopamin und Histamin getestet wurde. Nur 5-HT ist in der Lage, den NKH477-stimulierten Anstieg der $[cAMP]_i$ um bis zu 60 % zu reduzieren. Vergleichbare Wirkungen sind bei homologen Rezeptoren ebenfalls beobachtet wurden (SAUDOU ET AL., 1992; TROPPMANN ET AL., 2009). Dies spricht dafür, dass Am5-HT₁ ein funktioneller 5-HT-Rezeptor ist, welcher G_{i/o}-Proteine aktiviert. Der 5-HT-Effekt ist dosisabhängig. Der für 5-HT ermittelte EC₅₀-Wert von 16,9 nM entspricht den EC₅₀-Werten charakterisierter Invertebraten-5-HT₁-Rezeptoren wie z.B. Dm5-HT_{1A} (30 nM), Dm5-HT_{1B} (18 nM, beide SAUDOU ET AL., 1992) und Pro5-HT₁ (31 nM, SPITZER ET AL., 2008). Bm5-HT₁ dagegen weist mit 83 nM (CHEN ET AL., 2004) einen um den Faktor 5, Pea5-HT₁ mit 150 nM (TROPPMANN ET AL., 2009) sogar um den Faktor 10 höheren EC₅₀-Wert für 5-HT auf.

4.3.3 Pharmakologische Charakterisierung von Am5-HT₁

Auf der Suche nach Substanzen, welche die 5-HT-Wirkung auf Am5-HT₁-exprimierende Zellen imitieren bzw. aufheben können, wurde auf bereits bekannte 5-HT-Rezeptor-Agonisten und -Antagonisten zurückgegriffen.

Agonisten

5-CT und 5-MT stellen vollwertige Am5-HT₁-Rezeptor-Antagonisten dar, da sie die NKH477-induzierte cAMP-Produktion in gleicher Weise hemmen wie 5-HT. Die agonistische Wirkung von 5-CT und die hohe Affinität zu 5-HT₁-Rezeptoren wurde bereits an homologen Rezeptoren nachgewiesen (BARBAS ET AL., 2002; ANGERS ET AL., 1998). Jedoch können diese Substanzen nicht als selektiv für Am5-HT₁ angesehen werden. 5-CT ist ebenfalls an 5-HT₂- und 5-HT₇-Rezeptoren wirksam (LEE & PIETRANTONIO, 2003; SCHLENSTEDT ET AL., 2006; SPITZER ET AL., 2008). Für 5-MT konnten ebenfalls Effekte auf 5-HT₂-Rezeptoren nachgewiesen werden (diese Arbeit, SPITZER ET AL., 2008). 8-OH-DPAT zeigte keinerlei Wirkung auf die NKH477-stimulierte cAMP-Antwort von Am5-HT₁. ANGERS ET AL. (1998) konnten zeigen, dass 8-OH-DPAT auch

auf den 5-HT₁-Rezeptor von *Aplysia* nur eine geringe Wirkung hat. TROPPMANN ET AL. (2009) konnten gar keinen Einfluss von 8-OH-DPAT auf den Pea5-HT₁-Rezeptor der Schabe *P. americana* nachweisen. Bindungsstudien deuten darauf hin, dass 8-OH-DPAT nur eine geringe Affinität für verschiedene Invertebraten-5-HT₁-Rezeptoren besitzt (SAUDOU ET AL., 1992; BARBAS ET AL., 2002). Die selektiven 5-HT_{1A}- bzw. 5-HT_{1B/D}-Rezeptoragonisten Buspiron und Sumatriptan (HOYER ET AL., 2002) zeigten ebenfalls keine Wirkungen auf 5-HT₁-Rezeptoren der Invertebraten.

Antagonisten

Bereits SAUDOU ET AL. (1992) konnten zeigen, dass Prazosin eine hohe Affinität für die 5-HT₁-Rezeptoren von *D. melanogaster* besitzt und die 5-HT-induzierte Verminderung der Forskolin-stimulierten cAMP-Antwort völlig aufhebt. In den hier durchgeführten Untersuchungen ist Prazosin in der Lage, den 5-HT-Effekt um etwa 40 % zu vermindern und kann als partieller Antagonist angesehen werden. In gleicher Weise blockiert WAY100635, ein hochselektiver 5-HT_{1A}-Rezeptorantagonist (FORSTER ET AL., 1995; FLETCHER ET AL., 1996; NEWMAN-TANCREDI ET AL., 1996), den 5-HT-Effekt. Am Pea5-HT₁-Rezeptor wirkt diese Substanz als inverser Agonist (TROPPMANN ET AL., 2009), ein Phänomen, welches für diese Substanz bei Vertebraten-Rezeptoren nur unter bestimmten Bedingungen beobachtet werden konnte (COSI & KOEK, 2000). SPITZER ET AL. (2008) beurteilten WAY100635 bei den entsprechenden Rezeptoren der Crustacea als unwirksam. Als einzige getestete Substanz war der 5-HT_{1E}/5-HT₆-Rezeptor-Antagonist Methiothepin (HOYER ET AL., 2002; KITSON, 2007) in der Lage, den 5-HT-vermittelten Effekt vollständig zu blockieren und kann daher als Antagonist des Am5-HT₁-Rezeptors angesehen werden. Diese Wirkung wurde durch TROPPMANN ET AL. (2009) ebenfalls für den Pea5-HT₁-Rezeptor beschrieben. Jedoch wirkt Methiothepin auch am Am5-HT_{2α}-Rezeptor als Antagonist (vgl. Abschnitt 3.2.4, Seite 56) und am Am5-HT₇-Rezeptor als inverser Agonist (SCHLENSTEDT ET AL., 2006). Daher muss diese Substanz als unspezifischer Ligand der 5-HT-Rezeptoren der Honigbiene eingestuft werden.

4.3.4 Am5-HT_{2α} ist ein funktioneller Serotoninrezeptor

Rezeptoren der 5-HT₂-Klasse veranlassen bei Aktivierung über die Interaktion mit G_{q/11}-Proteinen die Synthese von Inositoltrisphosphat (IP₃). Dies führt wiederum dazu, dass die intrazelluläre Ca²⁺-Konzentration erhöht wird (HOYER ET AL., 2002). Dass dies ebenfalls für Am5-HT_{2α} zutrifft, wurde durch die Messung der [Ca²⁺]_i in HEK293-Zellen, welche diesen Rezeptor exprimieren, überprüft (Abb. 21). Nach 5-HT-Gabe ist eine deutliche Ca²⁺-Erhöhung zu verzeichnen. Die Ergebnisse sprechen deutlich dafür, dass Am5-HT_{2α} einen funktionellen 5-HT₂-Rezeptor darstellt. Der gezeigte 5-HT-Effekt ist dosisabhängig. Der EC₅₀-Wert beträgt 3,52 nM. Die pharmakologisch charakterisierten Invertebraten-5-HT₂-Rezeptoren aus *Panulirus interruptus* und *Procambarus clarkii* besitzen EC₅₀-Werte von 52 bzw. 27 nM (SPITZER ET AL., 2008) und der von *Lymnea stagnalis* 113,9 nM (GERHARDT ET AL., 1996). Diese Werte liegen deutlich über dem EC₅₀-Wert von Am5-HT_{2α}.

Für das trunkierte Rezeptorprotein von Am5-HT_{2α} konnte keine Funktionalität nachgewiesen

werden. Auf dieses Ergebnis wurde in Abschnitt 4.2 (Seite 70) näher eingegangen.

4.3.5 Pharmakologische Charakterisierung von Am5-HT_{2α}

Nur wenige Arbeiten haben sich bisher mit den pharmakologischen Eigenschaften von Invertebraten-5-HT₂-Rezeptoren auseinandergesetzt. Für die pharmakologische Charakterisierung von Am5-HT_{2α} wurden bekannte Vertebraten-Agonisten und -Antagonisten verwendet. Zum Teil wurden die gleichen Substanzen auch bei der Charakterisierung von Dm5-HT_{2α}, Pan5-HT_{2β} und Pro5-HT_{2β} eingesetzt (COLAS ET AL., 1995; SPITZER ET AL., 2008).

Agonisten

Zwei Substanzen zeigen eine deutliche agonistische Wirkung am Am5-HT_{2α}-Rezeptor. 5-MT imitiert den Effekt von 5-HT vollständig. Jedoch besitzt es einen 30-fach höheren EC₅₀-Wert als Serotonin, was auf eine geringere Affinität hinweist. Ähnliche Ergebnisse zeigen die Untersuchungen an 5-HT₂-Rezeptoren der Crustaceen. 5-MT zeigt mit 80 % des 5-HT-Effekts bei Pan5HT_{2β} bzw. 29 % bei Pro5HT_{2β} ebenfalls agonistische Wirkung und hat dabei einen 15 bzw. 20-fach geringeren EC₅₀-Wert als Serotonin (SPITZER ET AL., 2008). Eine noch geringere Affinität zu Am5-HT_{2α} besitzt 8-OH-DPAT. Es weist einen 16.000-fach höheren EC₅₀-Wert auf als 5-HT. Dieses Ergebnis wird durch SPITZER ET AL. (2008) nicht bestätigt. In deren Untersuchungen wurden für 8-OH-DPAT EC₅₀-Werte ermittelt, die nur geringfügig größer sind als die von 5-HT. Dafür kann 8-OH-DPAT den 5-HT-Effekt am Am5-HT_{2α}-Rezeptor zu annähernd 100 % imitieren (vgl. 77 % an Pan5-HT_{2β} bzw. 64 % an Pro5-HT_{2β}). Sowohl 5-CT als auch 8-OH-DPAT müssen als unspezifische Agonisten des Am5-HT_{2α}-Rezeptors betrachtet werden. 5-CT kann zusätzlich den Am5-HT₁-Rezeptor (siehe Abb. 16) und den Am5-HT₇-Rezeptor und 8-OH-DPAT ebenfalls den Am5-HT₇-Rezeptor aktivieren (SCHLENSTEDT ET AL., 2006).

Antagonisten

Sieben der getesteten Substanzen vermindern mehr oder weniger deutlich die 5-HT-Antwort des Am5-HT_{2α}-Rezeptors. Die stärksten Effekte weisen Cyproheptadin (64 %), Methiothepin (61 %), Clozapin (56 %) und Mianserin (51 %) auf. Für diese Liganden konnte auch eine hohe Affinität zum Dm5-HT_{2α}-Rezeptor nachgewiesen werden. Ausgenommen davon ist Clozapin. Dieses besitzt zwar eine hohe Affinität für Dm5-HT_{2α}, nicht jedoch für Am5-HT_{2α}. Es entfaltet seine volle Wirkung erst in Konzentrationen über 1 μM. Ähnliche Werte ermittelten SPITZER ET AL. (2008) für Pan5-HT_{2α} und Pro5-HT_{2α}. Jedoch hat Clozapin in diesen Analysen einen deutlich stärkeren Effekt (80 %). Methiothepin besitzt für Am5-HT_{2α} einen vergleichbaren EC₅₀-Wert wie für Pan5-HT_{2α} und Pro5-HT_{2α}, zeigt bei den Crustaceen-Rezeptoren aber eine stärkere Wirksamkeit. Ketanserin und SB200646 sind sehr affin für Am5-HT_{2α}, blockieren den 5-HT-Effekt jedoch nur in sehr geringem Ausmass (13 bzw. 32 %). Ketanserin ist ebenfalls sehr affin für Dm5-HT_{2α}, dagegen unwirksam bei Pan5-HT_{2α} und Pro5-HT_{2α} (SPITZER ET AL., 2008). Methiothepin ist nicht spezifisch für den Am5-HT_{2α}-Rezeptor, da es ebenfalls an Am5-HT₁ (diese Arbeit) und Am5-HT₇ (SCHLENSTEDT ET AL., 2006) wirkt. Dagegen zeigt Clozapin keine antagonistische Wirkung auf Am5-HT₇ (SCHLENSTEDT ET AL., 2006). Für die Analysen

des Am5-HT₁-Rezeptors wurde Clozapin nicht verwendet. Weitere Untersuchungen müssen klären, ob Clozapin spezifisch für Am5-HT_{2α} ist, oder ob es ebenfalls als Am5-HT₁- und/oder Am5-HT_{2β}-Rezeptorantagonist wirksam ist. Für die übrigen Antagonisten liegen keine Vergleichswerte für weitere Rezeptoren der Honigbiene vor.

4.4 Lokalisation der 5-HT-Rezeptoren der Honigbiene

4.4.1 Lokalisation von Am5-HT₁

In den RT-PCR-Analysen von SCHLENSTEDT (2005) konnte das Transkript von *Am5-ht1* im Zentralgehirn, den optischen Loben, der Flugmuskulatur und den Malpighischen Gefäßen nachgewiesen werden. Durch die Generierung eines spezifischen Antiserums gegen ein Teilstück des Am5-HT₁-Rezeptorproteins war es möglich, die Verteilung des Rezeptors auf der Proteinebene zu untersuchen und mit der Verteilung der mRNA zu vergleichen. Das Antiserum detektiert ein Protein mit einer Größe von ca. 50 kDa. Dieses Molekulargewicht liegt leicht über dem erwarteten von 44,5 kDa. Ein solcher Größenunterschied ist für GPCRs nicht ungewöhnlich. Eine Möglichkeit für die Größenzunahme ist die N-Glykosylierung. Der PNGase F-Verdau führt jedoch nicht zu einer Verringerung des Molekulargewichts des detektierten Proteins. Die Rezeptorproteine können einer Vielzahl weiterer posttranslationaler Modifikationen, welche das Molekulargewicht beeinflussen, unterliegen.

In Western-Blot-Experimenten stimmt die Verteilung von Am5-HT₁ mit den Ergebnissen aus RT-PCR-Experimenten überein. Außerdem wurde die Analyse ausgeweitet und der Rezeptor in den Antennalloben, dem Unterschlundganglion und dem Bauchmark nachgewiesen. Analysen zur Verteilung von 5-HT₁-Rezeptoren bei anderen Invertebraten zeigen stets die Expression in Nervengewebe (SAUDOU ET AL., 1992; DACKS ET AL., 2006; ONGVARRASOPONE ET AL., 2006; BARBAS ET AL., 2002; SOSA ET AL., 2004). Auch bei Vertebraten sind die 5-HT₁-Rezeptoren im Nervengewebe lokalisiert (NICHOLS & NICHOLS, 2008). Dagegen konnte das Rezeptorprotein weder in der Flugmuskulatur und den Malpighischen Gefäßen (vgl. SCHLENSTEDT, 2005), noch in den übrigen peripheren Geweben nachgewiesen werden. Dieser Widerspruch der Ergebnisse von RT-PCR und Western-Blot-Analysen könnte daran liegen, dass die RT-PCR ein viel empfindlicheres Detektionssystem darstellt. Theoretisch benötigt man nur ein mRNA-Molkül, um es in cDNA umzuschreiben und zu vermehren.

Zur Untersuchung der zellulären Verteilung des Am5-HT₁-Rezeptors im Bienengehirn wurden immunhistochemische Experimente an Schnittpräparaten durchgeführt. Hierbei zeigten die Ocellarnerven eine besonders deutliche Am5-HT₁-Immunantwort. Keine Arbeit zur Verteilung von serotonergen Rezeptoren bei Insekten konnte bisher ähnliche Ergebnisse liefern. Zudem konnten SCHÜRMAN & KLEMM (1984) bei der Honigbiene auch keine serotonergen Fasern in diesem Neuropil nachweisen. In der vorliegenden Arbeit kann aber klar das Gegenteil gezeigt werden. Wie in Abb. 13 B gezeigt wird, befinden sich im Ocellarnerv 5-HT-immunreaktive Fasern.

In der Lamina, wo die Eingänge von den Photorezeptoren verschaltet werden, konnte eine hohe Rezeptordichte nachgewiesen werden. In Radioligandenbindungsstudien mit radioaktiv markiertem 5-HT konnten ebenfalls Bindungsstellen für Serotonin festgestellt werden. Dazu passt, dass in der C-Schicht der Lamina, serotonerge Fasern lokalisiert sind, welche zum Teil in der

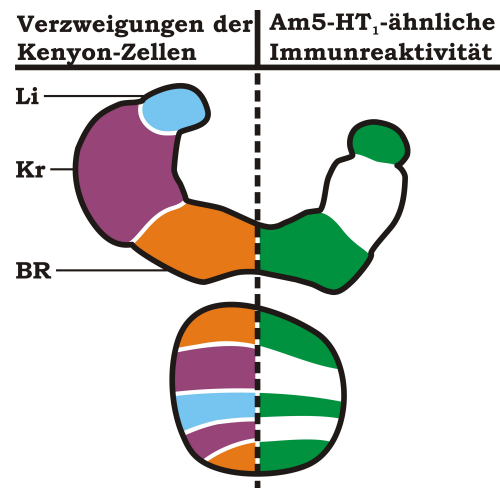
B-Schicht verzweigen. SCHEIDLER (1991) stellte zudem in der Medulla und in der Lamina hohe [³H]5-HT-Bindungsstellendichten fest, wobei auch die unterschiedlichen Dichten in den einzelnen Schichten von sowohl Medulla als auch Lobula mit den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit korrelieren. Abweichend ist, dass in den Bindungsstudien eine Abnahme der Bindungsdichten von proximal nach distal zu verzeichnen ist. In Bezug auf den Am5-HT₁-Rezeptor weist dagegen die Lamina die höchste Rezeptordichte auf. Es kann zur Zeit nicht ausgeschlossen werden, dass in der Medulla und der Lobula weitere 5-HT-Rezeptoren exprimiert werden. Die unterschiedlichen Affinitäten eines Rezeptors beeinflussen entscheidend die Ergebnisse von Bindungsstudien. Die pharmakologischen Untersuchungen zu Am5-HT₁ und Am5-HT_{2α} zeigen eine höhere Affinität des Am5-HT_{2α}-Rezeptors für 5-HT. Möglicherweise ist dieser für ein stärkeres Signal in den Bindungsstudien verantwortlich. Untersuchungen mit spezifischen Antikörpern können dies in Zukunft klären. Der Dm5-HT_{1B}-Rezeptor konnte ebenfalls in den optischen Loben nachgewiesen werden (YUAN ET AL., 2005). Die hohe Am5-HT₁-Rezeptordichte sowie das gleichzeitige Vorkommen von serotonergen Fasern (vgl. SCHÜRMAN & KLEMM, 1984) deutet auf eine starke Modulation der visuellen Signalweiterleitung in den optischen Neuropilen hin.

SCHEIDLER (1991) konnte zudem eine hohe [³H]5-HT-Bindungsstellendichte in der Lippe, dem Basalring, dem Pedunculus und den α- und β-Loben nachweisen. Diese Ergebnisse gleichen den Ergebnissen dieser Arbeit. Die Rezeptoren Dm5-HT_{1A} und Dm5-HT_{1B} konnten ebenfalls in den Pilzkörpern nachgewiesen werden (YUAN ET AL., 2005, 2006). Die fehlende Markierung serotonerger Fasern in der Lippe der Pilzkörper deutet darauf hin, dass Am5-HT₁ nicht zwingend an der Ausbildung klassischer Synapsen beteiligt ist. Es scheint wahrscheinlich, dass 5-HT nach Freigabe durch entsprechende Fasern zum Wirkungsort diffundiert. Biogene Amine und deren Rezeptoren müssen nicht zwingend kolokalisiert sein, wie bereits anhand anderer Systeme gezeigt werden konnte (ERBER ET AL., 1991; KREISSL ET AL., 1994; BLENAU ET AL., 1998; YUAN ET AL., 2005). Die auffällige Schichtung der Immunreaktivität in den Pedunculi und den α-Loben gleicht der Schichtung der [³H]5-HT-Rezeptormarkierung (SCHEIDLER, 1991). Diese Schichtung im α-Lobus spiegelt die hohe Ordnung der synaptischen Kontakte von extrinsischen Aus- und Eingangsneuronen zu den intrinsischen Kenyonzellen wieder (STRAUSFELD, 2002). Die Kragenregion der Pilzkörper wird von den dendritischen Eingängen jener Kenyonzellen gebildet, welche in Strukturen des α-Lobus verzweigen, die keine bzw. nur sehr geringe Am5-HT₁-Rezeptordichten aufweisen. Dagegen verzweigen die Kenyonzellen mit Eingängen aus der Lippen- bzw. Kragenregion der Pilzkörper in den Schichten des α-Lobus, welche hohe Am5-HT₁-Immunreaktivität zeigen (vgl. Abb. 27). Dieser Befund deutet darauf hin, dass der Am5-HT₁-Rezeptor im Wesentlichen auf intrinsischen Pilzkörperzellen lokalisiert ist.

Zwischen der Verteilung von Am5-HT₁ und Pea5-HT₁ (TROPPMANN ET AL., 2009) ist keine Gemeinsamkeit bezüglich der Verteilung im Gehirn zu erkennen. Dies ist vermutlich durch die große evolutionäre Distanz beider Organismen zu erklären. Eine weitere Möglichkeit besteht darin, dass bei *Periplaneta americana* weitere 5-HT₁-Rezeptoren vorkommen. Bei *Drosophila melanogaster* konnten zwei 5-HT₁-Rezeptoren nachgewiesen werden, welche sich zum Teil in der zellulären Verteilung unterscheiden (YUAN ET AL., 2005, 2006).

Die Antennalloben und das Unterschlundganglion gehören zu jenen Gehirnregionen, welche kei-

Abb. 27: Schema zur Verdeutlichung der axonalen und dendritischen Verzweigungen im Pilzkörperkelch und im α -Lobus. Schema verändert nach STRAUSFELD (2002). Hellblau, Orange und Violett repräsentieren jeweils die Verzweigungen der gleichen Kenyonzelltypen. Grüne Flächen stellen die Rezeptormarkierung dar.
BR Basalring, **Kr** Kragen, **Li** Lippe



ne Am5-HT₁-ähnliche Immunreaktivität zeigen. Diese Ergebnisse stehen den Ergebnissen aus Western-Blot-Analysen entgegen, in welchen durch das Antiserum in beiden Arealen eine Rezeptorbande detektiert werden konnte. Dies kann daran liegen, dass der Antikörper das native Rezeptorprotein weniger affin bindet, als das denaturierte. Demnach würden im Gewebe nur Strukturen erkannt werden, welche den Rezeptor in sehr hoher Dichte exprimieren. So kann in manchen Präparaten eine schwache Markierung der Glomeruli in den Antennalloben beobachtet werden, welche sich aber nur gering von der Hintergrundfluoreszenz des Gewebes abhebt. Zudem sind noch drei weitere 5-HT-Rezeptoren der Honigbiene bekannt (u. a. SCHLENSTEDT ET AL., 2006). Die Verteilung dieser Proteine wurde im Gewebe noch nicht analysiert. Jedoch findet man auch im Unterschlundganglion und in den Antennalloben serotonerge Fasern. Es ist also gut möglich, dass einer dieser Rezeptoren in hoher Dichte in diesen Regionen exprimiert wird.

4.4.2 Lokalisation von Am5-HT_{2 α}

Die Verteilung der Am5-ht_{2 α} -cDNA wurde ebenfalls durch SCHLENSTEDT (2005) untersucht. Das Transkript konnte im Zentralgehirn, in den optischen Loben, in der Flugmuskulatur und in den Malpighischen Gefäßen nachgewiesen werden. Der Nachweis des Am5-HT_{2 α} -Proteins erfolgte mittels eines monoklonalen Antikörpers, der in Western-Blot-Analysen sowohl das vollständige als auch das trunkierte Rezeptorprotein erkennt. Dass dies falsch-positive Signale sind, kann ausgeschlossen werden, da der HA-Antikörper auf Western-Blots von Am5-HT_{2 α} -exprimierenden HEK293-Zellen die gleichen Proteine erkennt. Die Antikörper erkennen Proteine, welche deglykosyliert deutlich geringere Molekulargewichte aufweisen als erwartet. Dies könnte daran liegen, dass Am5-HT_{2 α} N-terminal ein Signalpeptid besitzt. Weisen Membranproteine Signalpeptide auf, so äußert sich dies durch eine hydrophobe Domäne, welche an einer spezifischen Erkennungs- und Schneidesequenz durch das Enzym SPase I vom restlichen Protein abgetrennt wird (KAISER ET AL., 1987; CIOFFI ET AL., 1989; PAETZEL ET AL., 2002). Das Hydropathieprofil des Rezeptors zeigt einen deutlich hydrophoben Bereich im N-Terminus (Abb. 18). Die Analyse des N-Terminus auf das Vorhandensein eines Signalpeptides (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>, Daten nicht gezeigt) ergibt nur eine geringe Wahrscheinlichkeit für ein Signalpeptid im N-Terminus von Am5-HT_{2 α} . Würde jedoch das Rezeptorprotein an jener Stelle geschnitten werden, welche

die Analyse als wahrscheinlichste Schnittstelle erkennt (20 %), ergibt sich ein Molekulargewicht von 64 kDa für das vollständige bzw. 55,8 kDa für das trunkierte Rezeptorprotein. Dies stimmt mit dem Gewicht der in den Western-Blot-Analysen markierten Proteine auffallend gut überein (Abb. 19). Ob tatsächlich die Prozessierung durch die SPase I stattfindet, könnte man folgendermassen untersuchen. Dem N-Terminus würde molekularbiologisch ein Peptid-Tag angefügt, für welchen ein spezifischer Antikörper verfügbar ist. Somit hätte man sowohl am N- als auch am C-Terminus einen Tag (C-Terminus besitzt HA-Tag), der durch einen spezifischen Antikörper erkannt werden kann. Der Antikörper gegen den Tag am C-Terminus würde das Rezeptorprotein nur erkennen, wenn dieses nicht durch SPase I prozessiert wird. Erkennt er jedoch ein Protein im gleichen Massenbereich wie der HA-Antikörper, so wäre nachgewiesen, dass kein Signalpeptid abgespalten wird.

In immuncytochemischen Analysen von Am5-HT_{2α}-exprimierenden HEK293-Zellen konnte gezeigt werden, dass der monoklonale Antikörper auch die nativen Rezeptorproteine erkennt. Dagegen konnten in keiner der durchgeführten Analysen mit Bienengewebe (Western-Blot-Analysen und immunhistochemische Analysen) spezifische Signale durch den Antikörper detektiert werden. Dies könnte verschiedene Ursachen haben. Möglicherweise wird das Am5-HT_{2α}-Rezeptorprotein im Gehirn nur sehr schwach exprimiert. In RT-PCR-Experimenten, einer deutlich empfindlicheren Methode, von SCHLENSTEDT (2005) konnte im Gehirn, im Vergleich zu anderen Geweben/Organen, die höchste Konzentration der Am5-ht_{2α}-mRNA nachgewiesen werden. In Analysen mit Proteinen aus HEK293-Zellen muss der Antikörper in sehr hoher Konzentration eingesetzt werden. Dies deutet darauf hin, dass er nur eine verhältnismäßig geringe Affinität zum Rezeptorprotein besitzt. Dies hat zur Folge, dass in Western-Blot-Experimenten nur hohe Rezeptorprotein-Konzentrationen zu einem messbaren Signal führen. In Analysen mit HEK293-Zellen, die den Rezeptor überexprimieren, sind diese gegeben. Im Gehirn wird das Rezeptorprotein vermutlich nur in geringen Konzentrationen exprimiert, welche unter der Detektionsgrenze für Western-Blot-Experimente liegt. Genauso ist das Negativergebnis bei den immunhistochemischen Analysen zu erklären: Möglicherweise ist die Rezeptor-Dichte im Gehirn zu gering. Eventuell wären Untersuchungen mit Geweben aus Embryonen sinnvoll. COLAS ET AL. (1999) und SCHAERLINGER ET AL. (2007) konnte zeigen, dass der Dm5-HT_{2α}-Rezeptor entscheidend an der *germband-extension* während der Gastrulation von *D. melanogaster* beteiligt ist und dementsprechend in Embryonen hoch exprimiert wird.

Eine weitere Möglichkeit ist, dass beim nativen Rezeptorprotein durch posttranslationale Modifikation die antigene Determinante maskiert wird. So konnten HWANG & LAI (1994) nachweisen, dass es durch Prenylierung zur Maskierung eines Hepatitis Delta Antigens kommt. Der monoklonale Antikörper DO-1 besitzt eine stark reduzierte Affinität zu dem menschlichen Tumor Suppressor Protein p35. Inkubiert man das Protein zunächst mit Phosphatasen, so bindet der Antikörper mit einer deutlich höheren Affinität, was auf einen phosphorylierten Aminosäurerest in dem p35-Protein hinweist (CRAIG ET AL., 1999). Innerhalb der CPL3 des Am5-HT_{2α}-Rezeptors konnte allerdings keine Konsensussequenz für Phosphorylierung via PKA oder PKC gefunden werden. Eine weitere Möglichkeit wäre die SUMOylierung (*sumo* = *small ubiquitin like modifier*). SUMO-1 ist ein 12 kDa großes Protein, welches mit den Lysinresten bestimmter Proteine kovalent verknüpft wird und unterschiedlichste Funktionen besitzt (MA-

TUNIS ET AL., 1996; HAY, 2005). Darunter fällt auch der Schutz von Proteinen vor Ubiquitierung (DESTERRO ET AL., 1998), welche zur Internalisierung von GPCRs führen kann (SHENOY, 2007). Neben den meist nuklearen SUMOylierungssubstraten wurden auch zellmembranständige Proteine wie die Glukosetransporter GLUT1 und GLUT4 als SUMOylierungssubstrate entdeckt (GIORGINO ET AL., 2000). Laut Genbank besitzt *A. mellifera* ein *sumo-like* Protein (Acc.No. XP_392826). Zudem besitzt die CPL3 mit TKVD (437-440) eine Konsensussequenz für SUMOylierung (Ψ KxE, Ψ steht für eine hydrophobe AS). Ob bei dem Am5-HT_{2α}-Rezeptorprotein tatsächlich SUMOylierung vorliegt bzw. ob andere posttranslationale Modifikationen für ein Epitop-*Masking* verantwortlich sind, müssen weitere Untersuchungen zeigen.

4.5 Die physiologische Funktion der 5-HT-Rezeptoren der Honigbiene

Es ist schwierig, Aussagen über die möglichen Funktionen eines Proteins zu machen, wenn nicht bekannt ist, wo dieses exprimiert wird. Daher war eine Aufgabe der vorliegenden Arbeit, spezifische Antikörper gegen die untersuchten Rezeptoren zu generieren, um ihre Verteilung im Gewebe genauer untersuchen zu können. Für drei der vier klonierten 5-HT-Rezeptoren der Honigbiene ist es derzeit nicht möglich, entsprechende Untersuchungen durchzuführen. Will man mehr über ihre Verteilung im Gewebe erfahren, ist es sinnvoll, weiterhin an der Generierung geeigneter Antikörper zu arbeiten.

Für den Am5-HT₁-Rezeptor konnte dagegen ein Antikörper hergestellt und entsprechende Untersuchungen durchgeführt werden. Die Ergebnisse dieser Untersuchungen lassen Hypothesen über die funktionelle Bedeutung des Rezeptors zu. Zusätzlich wurden Verhaltensexperimente durchgeführt, um eine dieser Hypothesen genauer zu überprüfen.

Die mögliche Funktion des Am5-HT₁-Rezeptors im Bienenhirn

Der Am5-HT₁-Rezeptor wird in bestimmten Strukturen der Pilzkörper exprimiert (Abschnitt 3.1.3, Seite 39). Die Stimulation von kultivierten Kenyon-Zellen mit 5-HT führt zu einem Anstieg der PKA-Aktivität (MÜLLER, 1997). Diese wird in der Regel durch den Botenstoff cAMP aktiviert. Der Am5-HT₁-Rezeptor koppelt jedoch negativ an die AC, wodurch bei Rezeptoraktivierung die Synthese von cAMP verhindert wird. Daher muss ein zweiter 5-HT-Rezeptor in den Pilzkörpern exprimiert werden. Tatsächlich konnten SCHLENSTEDT ET AL. (2006) das Transkript des Am5-HT₇-Rezeptors, welcher positiv an die AC koppelt, in den Somata der intrinsischen Pilzkörperzellen nachweisen. Zukünftige Studien müssen zeigen, ob die beiden Rezeptorproteine in denselben Zellen exprimiert werden. Ist dies der Fall, so könnte der Am5-HT₁-Rezeptor die Wirkung des Am5-HT₇-Rezeptors aufheben, sobald die Konzentration des ausgeschütteten 5-HT einen kritischen Wert überschreitet. Dafür spricht, dass der Am5-HT₇-Rezeptor einen um den Faktor 10 niedrigeren EC₅₀-Wert als der Am5-HT₁-Rezeptor besitzt (1-2 nM vs. 16,9 nM 5-HT, SCHLENSTEDT ET AL., 2006). Werden beide Rezeptoren in unterschiedlichen Pilzkörperzellen exprimiert, so erschließt sich eine mögliche Funktion für den Am5-HT₁-Rezeptor, wenn man den molekularen Mechanismus der Gedächtnisbildung betrachtet. Die PKA-Aktivität ist für die Ausbildung des Langzeitgedächtnisses (MÜLLER, 2000) durch die Phosphorylierung bestimmter Transkriptionsfaktoren verantwortlich (FRANK & GREENBERG, 1994; DEZAZZO & TULLY,

1995). Injiziert man 5-HT in die Pilzkörper, so vermindert sich sowohl die Lernleistung, als auch die Fähigkeit, ein bestehendes Gedächtnis abzurufen (ERBER ET AL., 1993). Somit ist es möglich, dass Am5-HT₁ dafür sorgt, dass sich die Zellen in einem „erregbaren Zustand“ befinden. Durch die Blockade der cAMP-Synthese wird die PKA-Aktivität in den entsprechenden Pilzkörperzellen auf einem Niveau gehalten, welches unter der Schwelle liegt, welche für eine erfolgreiche Gedächtnisbildung erforderlich ist. Diese Hypothese erfordert jedoch die andauernde Präsenz von 5-HT.

In den drei großen Neuropilen der optischen Loben und im Ocellarneuropil konnten sowohl serotonerge Fasern als auch das Am5-HT₁-Rezeptorprotein nachgewiesen werden. Dies deutet darauf hin, dass Am5-HT₁ die visuelle Signalverarbeitung und -weiterleitung moduliert. Bereits MERCER ET AL. (1983) und SCHÜRMAN & KLEMM (1984) haben diskutiert, dass 5-HT an der Modulation visueller Prozesse beteiligt ist. Verschiedene Autoren konnten serotonerge Wirkungen auf das visuelle System von Arthropoden nachweisen. So erhöht 5-HT die Photorezeptorsensitivität durch die Änderung der Leitfähigkeit von K⁺-Kanälen bei *Schistocerca gregaria* und *D. melanogaster* (CUTTLE ET AL., 1995; HEVERS & HARDIE, 1995). Beim Schmetterling *Papilio xuthus* verringert Licht die elektrische Aktivität serotonerger Zellen (ICHIKAWA, 1994). Präsentiert man fixierten Bienen sich vertikal bewegende Streifenmuster, so strecken sie reflexartig die Antennen entgegen der Bewegungsrichtung (ERBER & SCHILDBERGER, 1980). Dies ist ein natürliches Verhalten, welches zum Beispiel im Flug der Tiere kurz vor der Landung beobachtet werden kann (HERAN, 1959). Injiziert man den fixierten Bienen 5-HT in die optischen Loben, so verringert sich die Reflexreaktion (ERBER & KLOPPENBURG, 1995). Zudem konnte gezeigt werden, dass 5-HT zur Reduktion der Antworten von bewegungsempfindlichen Lobula-Neuronen führt (KLOPPENBURG & ERBER, 1995).

In den Ocellarnerven wurde ebenfalls eine hohe Am5-HT₁-Rezeptordichte nachgewiesen. Den Ocellen der Insekten werden unter anderem zwei bedeutende Aufgaben zugeschrieben: Zum einen sind sie an der Stabilisation des Fluges und der Wahrnehmung der Eigenrotation beteiligt (STANGE & HOWARD, 1979; STANGE, 1981; TAYLOR, 1981a,b; KASTBERGER, 1990; PARSONS ET AL., 2006). Zum anderen wird den Ocellen die Regulation der Wahrnehmung geringer Lichtintensitäten zugesprochen. Behindert man experimentell die Lichtaufnahme durch die Ocellen, so vermindert sich deutlich die positive Phototaxis (SCHRICKER, 1965; LAZZARI ET AL., 1998). Weiterhin konnte SCHRICKER (1965) zeigen, dass der Helligkeitsgrad, welcher benötigt wird, damit Bienen Sammelflüge durchführen, deutlich höher ist, je stärker die Lichtaufnahme durch die Ocellen beeinträchtigt ist. Die Regulation der Photorezeption und die Stabilisation des Fluges wird bei KASTBERGER & SCHUHMAN (1992) verknüpft, indem sie zeigen konnten, dass die Ocellen die generelle Bereitschaft, während des Fluges auf visuelle Muster zu reagieren, kontrollieren. HEINZELLER (1976) schlug vor, dass die Ocellen einen Einfluss auf die hormonelle Kontrolle der motorischen Aktivität von Honigbienen besitzen.

Die ocellaren L-Neuronen von Bienen weisen zum Teil sehr komplexe Aktivitätsmuster auf (MILDE & HOMBERG, 1984; BAADER, 1989; MILDE & HOMBERG, 1988). So können einige dieser Neuronen von einem Zustand, in welchen sie keine Aktionspotentiale erzeugen und auf starke Lichtreize mit graduierten Potentialen antworten, in einen Zustand wechseln, in welchen sie dauerhaft spontane Aktionspotentiale erzeugen (MILDE, 1981). In diesem Zustand kommt es durch

einen starken Lichtreiz zu einem plötzlichen Ausbleiben der Aktionspotentiale. Sobald dieser Lichtreiz vorüber ist, erzeugt die Zelle wieder Aktionspotentiale (MILDE, 1981). Diese Neuronen sind bisher nicht pharmakologisch charakterisiert. Durch die hohe Rezeptordichte sowie das Auftreten serotonerger Fasern in den Ocellarnerven ist es wahrscheinlich, dass Am5-HT₁ entscheidend an der Modulation dieser komplexen Aktivitätsmuster beteiligt ist.

Der Einfluss von Am5-HT₁-Rezeptor-Liganden auf das phototaktische Verhalten

Der aktivierte Am5-HT₁-Rezeptor hält den cAMP-Spiegel und damit die PKA-Aktivität gering. Zudem besitzt 5-HT eine „reduzierende Wirkung“ auf Gedächtnisbildung und -abruf (ERBER ET AL., 1993) sowie das optische System (ERBER & KLOPPENBURG, 1995; KLOPPENBURG & ERBER, 1995). Da der Am5-HT₁-Rezeptor im optischen System der Honigbiene stark exprimiert wird, lässt sich vermuten, dass dieser Rezeptor daran beteiligt ist, die Erregbarkeit des optischen Systems zu dämpfen. Diese Hypothese sollte anhand von Versuchen zum phototaktischen Verhalten von *A. mellifera*-Arbeiterinnen untersucht werden.

Wie in Abschnitt 3.4 (Seite 62) gezeigt wurde, weisen junge Bienen, denen 5-HT- verfüttert wurde, eine reduzierte Phototaxis auf. Durch Kontrollexperimente wurde gezeigt, dass es sich dabei nicht um eine unspezifisch dämpfende Wirkung auf die motorische Aktivität handelt. In den folgenden Experimenten sollte versucht werden, diese 5-HT-Wirkung auf den Am5-HT₁-Rezeptor einzugrenzen. Zum einen konnte der Rezeptor bei der immunhistochemischen Analyse in den optischen Neuropilen der unterschiedlich behandelten Gruppen nachgewiesen werden (5-HT- und Kontrollgruppe, Daten nicht gezeigt). Zum anderen wurde überprüft, ob die getesteten Am5-HT₁-Rezeptor-Agonisten 5-CT und 5-MT das phototaktische Verhalten ähnlich wie 5-HT beeinflussen können. Verfüttert man den Bienen 5-CT, so kann man die gleiche Wirkung beobachten. 5-MT kann diese Wirkung nicht imitieren, was jedoch nicht gegen die Beteiligung von Am5-HT₁ spricht. Ordnet man die Agonisten nach steigenden EC₅₀-Werten, so ergibt sich die Reihenfolge: 5-HT < 5-CT < 5-MT. Dabei unterscheiden sich die Werte der benachbarten Agonisten jeweils ca. um den Faktor 10. Somit kann der ausbleibende Effekt nach 5-MT-Behandlung durch die geringe Affinität zum Am5-HT₁-Rezeptor erklärt werden. Weiterhin sollte ein wirksamer Am5-HT₁-Antagonist getestet. Diese Versuche sprechen ebenfalls für eine Rezeptor-vermittelte Wirkung. Die 5-HT-Wirkung auf das phototaktische Verhalten kann durch den Antagonisten Prazosin deutlich abgeschwächt werden.

Somit wurden die ersten deutlichen Hinweise dafür gesammelt, dass der Am5-HT₁-Rezeptor an der Regulation der Erregbarkeit des optischen Systems beteiligt ist. Bisher kann jedoch nicht definitiv ausgeschlossen werden, dass andere 5-HT-Rezeptoren mit überlappenden pharmakologischen Eigenschaften an der Vermittlung der 5-HT-Wirkung beteiligt sind. Weitere Experimente sollten durchgeführt werden, um sicher ausschließen zu können, dass weitere 5-HT-Rezeptoren an der Vermittlung des 5-HT-Effekts beteiligt sind. So sollte mit Hilfe der heterologen Expressionssysteme untersucht werden, ob Prazosin spezifisch auf den Am5-HT₁-Rezeptor wirkt oder auch an anderen 5-HT-Rezeptoren wirksam ist. Umgekehrt kann untersucht werden, ob Liganden, welche spezifisch für einen oder mehrere der anderen 5-HT-Rezeptoren sind, jedoch nachweislich nicht am Am5-HT₁-Rezeptor wirken (z.B. 8-OH-DPAT), ebenfalls einen Einfluss auf das

phototaktische Verhalten der Honigbiene besitzen. Weiterhin wäre es möglich, die Expression des Am5-HT₁-Rezeptors mit Hilfe geeigneter Methoden, wie zum Beispiel der RNAi-Methode (FIRE ET AL., 1998), herunter zu regulieren. Dass diese Methode prinzipiell bei der Honigbiene anwendbar ist, zeigen verschiedene Arbeiten (FAROOQUI ET AL., 2004; AMDAM ET AL., 2006; PATEL ET AL., 2007; MACKERT ET AL., 2008). Blicke die Phototaxis in Folge der Herunterregulierung der Am5-HT₁-Expression unbeeinflusst von einer 5-HT-Behandlung, wäre dies ein weiterer starker Hinweis auf die Beteiligung dieses Rezeptors. Wenn der Am5-HT₁-Rezeptor an der natürlichen Regulation des phototaktischen Verhalten der Honigbiene beteiligt ist, so könnte möglicherweise allein die Herunterregulation der Expression dieses Rezeptors ausreichen, um einen positiven Effekt auf die Phototaxis zu bewirken.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass mit Hilfe der bisher durchgeführten Experimente gezeigt werden konnte, dass der Am5-HT₁-Rezeptor wahrscheinlich an der Regulation der Lichtwahrnehmung beteiligt ist. Dieser Rezeptor wird in Teilen des Bienenhirns exprimiert, welche visuelle Informationen verarbeiten. Bei dem Krebs *Procambarus clarkii* konnte ebenfalls die modulatorische Wirkung von Pro5-HT₁ auf ein photosensitives Neuron nachgewiesen werden. Dieses Neuron ist an der Regulation der circadianen Rhythmik beteiligt (RODRÍGUEZ-SOSA ET AL., 2007). Für den Dm5-HT_{1A}-Rezeptor konnte eine deutliche circadiane Oszillation der mRNA-Konzentration beobachtet werden (CLARIDGE-CHANG ET AL., 2001; YUAN ET AL., 2005). Sollte die Expression von Am5-HT₁ ebenfalls oszillieren, könnte der Rezeptor die Photosensitivität in Abhängigkeit von der Tageszeit modulieren. Zukünftige Untersuchungen müssen jedoch zeigen, ob die Expression von Am5-HT₁ wirklich im Tagesgang variiert. Durch den in dieser Arbeit generierten Antikörper, kann dies auch auf Proteinebene geschehen.

Weiterhin wäre es sinnvoll, die Wirksamkeit der untersuchten Liganden an frei fliegenden Bienen in ihrer natürlichen Umgebung zu untersuchen. SCHRICKER (1965) konnte in Freilandexperimenten zeigen, dass die Ocellen einen starken Einfluss auf die Wahrnehmung geringer Lichtintensitäten besitzen. Die ocellaren Interneurone exprimieren den Am5-HT₁-Rezeptor. Daher wäre es interessant, Bienen mit den Am5-HT₁-Rezeptorliganden zu füttern und anschließend zu beobachten, ob dies einen Einfluss auf die Durchführung der Sammelflüge in Abhängigkeit von der Lichtintensität hat.

4.6 Ausblick

Bisher war nur ein 5-HT-Rezeptor der Honigbiene *Apis mellifera* molekular und pharmakologisch charakterisiert worden (Am5-HT₇, SCHLENSTEDT ET AL., 2006). Mit der vorliegenden Arbeit ist es gelungen, das Wissen über die 5-HT-Rezeptoren der Honigbiene um drei molekular charakterisierte Rezeptoren (Am5-HT₁, Am5-HT_{2 α} und Am5-HT_{2 β}) zu erweitern. Das Genom der Honigbiene weist jedoch weitere Gene auf, die möglicherweise für 5-HT-Rezeptoren kodieren. Möchte man das serotonerge System der Honigbiene in seiner Gesamtheit verstehen, ist es wichtig, weitere Rezeptoren zu isolieren und zu charakterisieren.

Für zwei 5-HT-Rezeptoren (Am5-HT₁ und Am5-HT_{2 α}) wurde in einem heterologen Expressionssystem die Funktionalität nachgewiesen und ein pharmakologisches Profil erstellt. Für den Am5-HT_{2 β} stehen diese Arbeiten noch aus. Die vollständige Rezeptor-cDNA konnte kloniert werden und müsste noch in einen Expressionsvektor integriert werden. Die Informationen aus diesen Experimenten sind wichtig, da man durch das Wissen über die Pharmakologie eines Rezeptors Möglichkeiten finden kann, diesen *in vivo* pharmakologisch zu untersuchen und in seiner Aktivität zu beeinflussen. Somit erhält man Werkzeuge, um mehr über seine Funktion zu erfahren.

Für den Am5-HT₁-Rezeptor war es möglich ein spezifisches Antiserum zu generieren und die Expression des Rezeptors im Gewebe zu analysieren. Weitere Untersuchungen könnten zeigen, ob die entdeckten Expressionsmuster vom Alter, von der Kaste und von der Tätigkeit der Bienen abhängig sind. Auf diese Weise kann man ebenfalls mehr über die physiologische Funktion des Rezeptors erfahren.

Für die beiden anderen untersuchten Rezeptoren war es bisher nicht möglich, die Verteilung des Proteins im Gewebe näher zu untersuchen. Daher ist zur Zeit keine Aussage über Funktionen dieser Rezeptoren möglich. Zudem ist die Bedeutung der Spleißvarianten von Am5-HT_{2 α} und Am5-HT_{2 β} offen. Auch aus diesem Grund wäre es wichtig, weiter daran zu arbeiten, spezifische Antikörper gegen die entsprechenden Proteine zu entwickeln, um zu erfahren, ob, wo und wann die trunkierten Rezeptoren exprimiert werden. Zum anderen bietet das heterologe Expressionssystem die Möglichkeit Interaktionen zwischen den verschiedenen Rezeptoren und Rezeptorvarianten näher zu untersuchen.

Die Ergebnisse aus Analysen zur Gewebsverteilung und der pharmakologischen Untersuchungen helfen, Informationen über die Funktion eines Rezeptors zu erhalten. Die Ergebnisse der Verhaltenstests mit Liganden des Am5-HT₁-Rezeptors haben dies gezeigt. Dieser Rezeptor spielt sehr wahrscheinlich eine wichtige Rolle bei der Regulation des phototaktischen Verhalten. Weiterführende Experimente (weitere Verhaltenstest mit geeigneten Liganden, RNAi) müssen diese begründete Hypothese jedoch bestätigen. Zudem wäre es sinnvoll, Experimente zu entwickeln, welche das natürliche Verhalten der Honigbiene besser widerspiegeln. Dadurch könnte man mehr über die Bedeutung der 5-HT-Wirkung auf natürlich auftretende Verhaltensweisen erfahren.

Die Expression von Am5-HT₁ in den Pilzkörpern deutet auf eine Funktion beim Lernen der Bienen hin. Auch diese mögliche Rolle des Rezeptors sollte experimentell untersucht werden. Für die Untersuchung des Lernverhalten der Honigbiene gibt es zahlreiche gut etablierte Verhaltenspara-

digmen (u. a. BITTERMAN ET AL., 1983; MENZEL & MÜLLER, 1996; BEHRENDTS & SCHEINER, 2009). Bei solchen Untersuchungen können dieselben Pharmaka eingesetzt werden, die schon bei den Versuchen zum phototaktischen Verhalten verwendet wurden. Ebenso würde sich der Einsatz von RNAi-Methoden anbieten.

Literatur

- AMDAM, G. V.; NORBERG, K.; PAGE, R. E.; ERBER, J. AND SCHEINER, R. (2006): Downregulation of vitellogenin gene activity increases the gustatory responsiveness of honey bee workers (*Apis mellifera*), in: *Behav Brain Res*, 169(2), S. 201–205.
- ANGERS, A.; STOROZHUK, M. V.; DUCHAÎNE, T.; CASTELLUCCI, V. F. AND DESGROSELLERS, L. (1998): Cloning and functional expression of an *Aplysia* 5-HT receptor negatively coupled to adenylate cyclase, in: *J Neurosci*, 18(15), S. 5586–5593.
- BAADER, A. (1989): Sensitivity of ocellar interneurons of the honeybee to constant and temporally modulated light, in: *J Neurobiol*, 20(6), S. 519–529.
- BALLESTEROS, J. A.; JENSEN, A. D.; LIAPAKIS, G.; RASMUSSEN, S. G.; SHI, L.; GETHER, U. AND JAVITCH, J. A. (2001): Activation of the beta 2-adrenergic receptor involves disruption of an ionic lock between the cytoplasmic ends of transmembrane segments 3 and 6, in: *J Biol Chem*, 276(31), S. 29.171–29.177.
- BALLESTEROS, J. A. AND WEINSTEIN, H. (1995): A simple method for displaying the hydrophobic character of a protein., in: *Methods Neurosci.*, 25, S. 366–428.
- BARAK, L. S.; TIBERI, M.; FREEDMAN, N. J.; KWATRA, M. M.; LEFKOWITZ, R. J. AND CARON, M. G. (1994): A highly conserved tyrosine residue in G protein-coupled receptors is required for agonist-mediated beta 2-adrenergic receptor sequestration, in: *J Biol Chem*, 269(4), S. 2790–2795.
- BARBAS, D.; ZAPPULLA, J. P.; ANGERS, S.; BOUVIER, M.; CASTELLUCCI, V. F. AND DESGROSELLERS, L. (2002): Functional characterization of a novel serotonin receptor (5-HTap2) expressed in the CNS of *Aplysia californica*, in: *J Neurochem*, 80(2), S. 335–345.
- BARNES, N. M. AND SHARP, T. (1999): A review of central 5-HT receptors and their function, in: *Neuropharmacology*, 38(8), S. 1083–1152.
- BEGGS, K. T.; HAMILTON, I. S.; KURSHAN, P. T.; MUSTARD, J. A. AND MERCER, A. R. (2005): Characterization of a D2-like dopamine receptor (AmDOP3) in honey bee, *Apis mellifera*, in: *Insect Biochem Mol Biol*, 35(8), S. 873–882.
- BEHRENDTS, A. AND SCHEINER, R. (2009): Evidence for associative learning in newly emerged honey bees (*Apis mellifera*), in: *Anim Cogn*, 12, S. 249–255.
- BERRIDGE, M. J. AND HESLOP, J. P. (1981): Separate 5-hydroxytryptamine receptors on the salivary gland of the blowfly are linked to the generation of either cyclic adenosine 3',5'-monophosphate or calcium signals, in: *Br J Pharmacol*, 73(3), S. 729–738.
- BICKER, G. (1999): Biogenic amines in the brain of the honeybee: cellular distribution, development, and behavioral functions, in: *Microsc Res Tech*, 44(2-3), S. 166–178.

- BICKER, G. AND MENZEL, R. (1989): Chemical codes for the control of behaviour in arthropods, in: *Nature*, 337(6202), S. 33–39.
- BITTERMAN, M. E.; MENZEL, R.; FIETZ, A. AND SCHÄFER, S. (1983): Classical conditioning of proboscis extension in honeybees (*Apis mellifera*), in: *J Comp Psychol*, 97(2), S. 107–119.
- BLACK, D. L. (2003): Mechanisms of alternative pre-messenger RNA splicing, in: *Annu Rev Biochem*, 72, S. 291–336.
- BLENAU, W.; BALFANZ, S. AND BAUMANN, A. (2000): Amtyr1: characterization of a gene from honeybee (*Apis mellifera*) brain encoding a functional tyramine receptor, in: *J Neurochem*, 74(3), S. 900–908.
- BLENAU, W. AND BAUMANN, A. (2001): Molecular and pharmacological properties of insect biogenic amine receptors: lessons from *Drosophila melanogaster* and *Apis mellifera*, in: *Arch Insect Biochem Physiol*, 48(1), S. 13–38.
- BLENAU, W.; ERBER, J. AND BAUMANN, A. (1998): Characterization of a dopamine D1 receptor from *Apis mellifera*: cloning, functional expression, pharmacology, and mRNA localization in the brain, in: *J Neurochem*, 70(1), S. 15–23.
- BOCKAERT, J. AND PIN, J. P. (1999): Molecular tinkering of G protein-coupled receptors: an evolutionary success, in: *EMBO J*, 18(7), S. 1723–1729.
- BOUE, S.; LETUNIC, I. AND BORK, P. (2003): Alternative splicing and evolution, in: *Bioessays*, 25(11), S. 1031–1034.
- BRANDT, D. R. AND ROSS, E. M. (1985): GTPase activity of the stimulatory GTP-binding regulatory protein of adenylate cyclase, Gs. Accumulation and turnover of enzyme-nucleotide intermediates, in: *J Biol Chem*, 260(1), S. 266–272.
- CANALS, M.; MARCELLINO, D.; FANELLI, F.; CIRUELA, F.; DE BENEDETTI, P.; GOLDBERG, S. R.; NEVE, K.; FUXE, K.; AGNATI, L. F.; WOODS, A. S.; FERRÉ, S.; LLUIS, C.; BOUVIER, M. AND FRANCO, R. (2003): Adenosine A2A-dopamine D2 receptor-receptor heteromerization: qualitative and quantitative assessment by fluorescence and bioluminescence energy transfer, in: *J Biol Chem*, 278(47), S. 46.741–46.749.
- CANTON, H.; EMESON, R. B.; BARKER, E. L.; BACKSTROM, J. R.; LU, J. T.; CHANG, M. S. AND SANDERS-BUSH, E. (1996): Identification, molecular cloning, and distribution of a short variant of the 5-hydroxytryptamine_{2C} receptor produced by alternative splicing, in: *Mol Pharmacol*, 50(4), S. 799–807.
- CARMAN, C. V. AND BENOVIĆ, J. L. (1998): G-protein-coupled receptors: turn-ons and turn-offs, in: *Curr Opin Neurobiol*, 8(3), S. 335–344.
- CAVENEY, S.; CLADMAN, W.; VERELLEN, L. AND DONLY, C. (2006): Ancestry of neuronal monoamine transporters in the Metazoa, in: *J Exp Biol*, 209(Pt 24), S. 4858–4868.

- CHEN, A.; HOLMES, S. P. AND PIETRANTONIO, P. V. (2004): Molecular cloning and functional expression of a serotonin receptor from the Southern cattle tick, *Boophilus microplus* (Acari: Ixodidae), in: *Insect Mol Biol*, 13(1), S. 45–54.
- CHENG, Y. AND PRUSOFF, W. H. (1973): Relationship between the inhibition constant (K_I) and the concentration of inhibitor which causes 50 per cent inhibition (I₅₀) of an enzymatic reaction., in: *Biochem. Pharmacol.*, 22(23), S. 3099–3108.
- CHINI, B. AND PARENTI, M. (2009): G-protein-coupled receptors, cholesterol and palmitoylation: facts about fats, in: *J Mol Endocrinol*, 42(5), S. 371–379.
- CIOFFI, J. A.; ALLEN, K. L.; LIVELY, M. O. AND KEMPER, B. (1989): Parallel Effects of Signal Peptide Hydrophobic Core Modifications on Co-translational Translocation and Post-translational Cleavage by Purified Signal Peptidase, in: *The Journal of Biological Chemistry*, 264(25), S. 15.052–15.058.
- CLAGETT-DAME, M. AND MCKELVY, J. F. (1989): N-linked oligosaccharides are responsible for rat striatal dopamine D₂ receptor heterogeneity, in: *Arch Biochem Biophys*, 274(1), S. 145–154.
- CLARIDGE-CHANG, A.; WIJNEN, H.; NAEF, F.; BOOTHROYD, C.; RAJEWSKY, N. AND YOUNG, M. W. (2001): Circadian regulation of gene expression systems in the *Drosophila* head, in: *Neuron*, 32(4), S. 657–671.
- CLARK, M. C. AND BARO, D. J. (2007): Arthropod D₂ receptors positively couple with cAMP through the Gi/o protein family, in: *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol*, 146(1), S. 9–19.
- CLARK, M. C.; DEVER, T. E.; DEVER, J. J.; XU, P.; REHDER, V.; SOSA, M. A. AND BARO, D. J. (2004): Arthropod 5-HT₂ receptors: a neurohormonal receptor in decapod crustaceans that displays agonist independent activity resulting from an evolutionary alteration to the DRY motif, in: *J Neurosci*, 24(13), S. 3421–3435.
- COLAS, J. F.; LAUNAY, J. M.; KELLERMANN, O.; ROSAY, P. AND MAROTEAUX, L. (1995): *Drosophila* 5-HT₂ serotonin receptor: coexpression with fushi-tarazu during segmentation, in: *Proc Natl Acad Sci U S A*, 92(12), S. 5441–5445.
- COLAS, J. F.; LAUNAY, J. M.; VONESCH, J. L.; HICKEL, P. AND MAROTEAUX, L. (1999): Serotonin synchronises convergent extension of ectoderm with morphogenetic gastrulation movements in *Drosophila*, in: *Mech Dev*, 87(1-2), S. 77–91.
- COLEMAN, C. M. AND NECKAMEYER, W. S. (2005): Serotonin synthesis by two distinct enzymes in *Drosophila melanogaster*, in: *Arch Insect Biochem Physiol*, 59(1), S. 12–31.
- COREY, J. L.; QUICK, M. W.; DAVIDSON, N.; LESTER, H. A. AND GUASTELLA, J. (1994): A cocaine-sensitive *Drosophila* serotonin transporter: cloning, expression, and electrophysiological characterization, in: *Proc Natl Acad Sci U S A*, 91(3), S. 1188–1192.

- COSI, C. AND KOEK, W. (2000): The putative «silent» 5-HT(1A) receptor antagonist, WAY 100635, has inverse agonist properties at cloned human 5-HT(1A) receptors, in: *Eur J Pharmacol*, 401(1), S. 9–15.
- CRAIG, A. L.; BURCH, L.; VOJTESEK, B.; MIKUTOWSKA, J.; THOMPSON, A. AND HUPP, T. R. (1999): Novel phosphorylation sites of human tumour suppressor protein p53 at Ser20 and Thr18 that disrupt the binding of mdm2 (mouse double minute 2) protein are modified in human cancers, in: *Biochem J*, 342 (Pt 1), S. 133–141.
- CUTTLE, M. F.; HEVERS, W.; LAUGHLIN, S. B. AND HARDIE, R. C. (1995): Diurnal modulation of photoreceptor potassium conductance in the locust., in: *J Comp Physiol A*, 176(3), S. 307–316.
- DACKS, A. M.; DACKS, J. B.; CHRISTENSEN, T. A. AND NIGHORN, A. J. (2006): The cloning of one putative octopamine receptor and two putative serotonin receptors from the tobacco hawkmoth, *Manduca sexta*, in: *Insect Biochem Mol Biol*, 36(9), S. 741–747.
- DAVIES, M. N.; SECKER, A.; FREITAS, A. A.; MENDAO, M.; TIMMIS, J. AND FLOWER, D. R. (2007): On the hierarchical classification of G protein-coupled receptors, in: *Bioinformatics*, 23(23), S. 3113–3118.
- DEFEA, K. (2008): Beta-arrestins and heterotrimeric G-proteins: collaborators and competitors in signal transduction, in: *Br J Pharmacol*, 153 Suppl 1, S. 298–309.
- DEMCHYSHYN, L. L.; PRISTUPA, Z. B.; SUGAMORI, K. S.; BARKER, E. L.; BLAKELY, R. D.; WOLFGANG, W. J.; FORTE, M. A. AND NIZNIK, H. B. (1994): Cloning, expression, and localization of a chloride-facilitated, cocaine-sensitive serotonin transporter from *Drosophila melanogaster*, in: *Proc Natl Acad Sci U S A*, 91(11), S. 5158–5162.
- DESLAURIERS, B.; PONCE, C.; LOMBARD, C.; LARGUIER, R.; BONNAFOUS, J. C. AND MARIE, J. (1999): N-glycosylation requirements for the AT1a angiotensin II receptor delivery to the plasma membrane, in: *Biochem J*, 339 (Pt 2), S. 397–405.
- DESTERRO, J. M.; RODRIGUEZ, M. S. AND HAY, R. T. (1998): SUMO-1 modification of I κ B inhibits NF- κ B activation, in: *Mol Cell*, 2(2), S. 233–239.
- DEUTSCH, M. AND LONG, M. (1999): Intron-exon structures of eukaryotic model organisms, in: *Nucleic Acids Res*, 27(15), S. 3219–3228.
- DEZAZZO, J. AND TULLY, T. (1995): Dissection of memory formation: from behavioral pharmacology to molecular genetics, in: *Trends Neurosci*, 18(5), S. 212–218.
- DOHLMAN, H. G.; THORNER, J.; CARON, M. G. AND LEFKOWITZ, R. J. (1991): Model systems for the study of seven-transmembrane-segment receptors, in: *Annu Rev Biochem*, 60, S. 653–688.
- DONNELLY, D.; FINDLAY, J. B. AND BLUNDELL, T. L. (1994): The evolution and structure of aminergic G protein-coupled receptors, in: *Receptors Channels*, 2(1), S. 61–78.

- DOWNES, G. B. AND GAUTAM, N. (1999): The G protein subunit gene families, in: *Genomics*, 62(3), S. 544–552.
- ELMHURST, J. L.; XIE, Z.; O'DOWD, B. F. AND GEORGE, S. R. (2000): The splice variant D3nf reduces ligand binding to the D3 dopamine receptor: evidence for heterooligomerization, in: *Brain Res Mol Brain Res*, 80(1), S. 63–74.
- ELOFSSON, R. AND KLEMM, N. (1972): Monoamine-Containing Neurons in the Optic Ganglia of Crustaceans and Insects, in: *Z. Zellforsch.*, 133, S. 475–499.
- ERBER, J. AND KLOPPENBURG, P. (1995): The modulatory effects of serotonin and octopamine in the visual system of the honey bee (*Apis mellifera* L.) I. Behavioral analysis of the motion-sensitive antennal reflex., in: *J Comp Physiol A*, 176, S. 111–118.
- ERBER, J.; KLOPPENBURG, P. AND SCHEIDLER, A. (1991): Neuromodulation in the honeybee: autoradiography, behaviour and electrophysiology. In: L. J. Goodman and R. C. Fisher. *The behaviour and pharmacology of bees*. Chapter 19, 273-287, CAB International.
- ERBER, J.; KLOPPENBURG, P. AND SCHEIDLER, A. (1993): Neuromodulation by serotonin and octopamine in the honeybee: behaviour, neuroanatomy and electrophysiology, in: *Experientia*, 49, S. 212–218.
- ERBER, J. AND SCHILDBERGER, K. (1980): Conditioning of an Antennal Reflex to Visual Stimuli in Bees (*Apis mellifera* L.), in: *J Comp Physiol*, 135, S. 217–225.
- FAROOQUI, T.; VAESSIN, H. AND SMITH, B. H. (2004): Octopamine receptors in the honeybee (*Apis mellifera*) brain and their disruption by RNA-mediated interference, in: *J Insect Physiol*, 50(8), S. 701–713.
- FERGUSON, S. S. (2001): Evolving concepts in G protein-coupled receptor endocytosis: the role in receptor desensitization and signaling, in: *Pharmacol Rev*, 53(1), S. 1–24.
- FIRE, A.; XU, S.; MONTGOMERY, M. K.; KOSTAS, S. A.; DRIVER, S. E. AND MELLO, C. C. (1998): Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*, in: *Nature*, 391(6669), S. 806–811.
- FLETCHER, A.; FORSTER, E. A.; BILL, D. J.; BROWN, G.; CLIFFE, I. A.; HARTLEY, J. E.; JONES, D. E.; MCLENACHAN, A.; STANHOPE, K. J.; CRITCHLEY, D. J.; CHILDS, K. J.; MIDDLEFELL, V. C.; LANFUMEY, L.; CORRADETTI, R.; LAPORTE, A. M.; GOZLAN, H.; HAMON, M. AND DOURISH, C. T. (1996): Electrophysiological, biochemical, neurohormonal and behavioural studies with WAY-100635, a potent, selective and silent 5-HT_{1A} receptor antagonist, in: *Behav Brain Res*, 73(1-2), S. 337–353.
- FORSTER, E. A.; CLIFFE, I. A.; BILL, D. J.; DOVER, G. M.; JONES, D.; REILLY, Y. AND FLETCHER, A. (1995): A pharmacological profile of the selective silent 5-HT_{1A} receptor antagonist, WAY-100635, in: *Eur J Pharmacol*, 281(1), S. 81–88.

- FRANK, D. A. AND GREENBERG, M. E. (1994): CREB: a mediator of long-term memory from mollusks to mammals, in: *Cell*, 79(1), S. 5–8.
- FREDRIKSSON, R.; LAGERSTRÖM, M. C.; LUNDIN, L. G. AND SCHIÖTH, H. B. (2003): The G-protein-coupled receptors in the human genome form five main families. Phylogenetic analysis, paralogon groups, and fingerprints, in: *Mol Pharmacol*, 63(6), S. 1256–1272.
- FREEDMAN, N. J.; LIGGETT, S. B.; DRACHMAN, D. E.; PEI, G.; CARON, M. G. AND LEFKOWITZ, R. J. (1995): Phosphorylation and desensitization of the human beta 1-adrenergic receptor. Involvement of G protein-coupled receptor kinases and cAMP-dependent protein kinase, in: *J Biol Chem*, 270(30), S. 17.953–17.961.
- FRIEDMAN, J.; BABU, B. AND CLARK, R. B. (2002): Beta(2)-adrenergic receptor lacking the cyclic AMP-dependent protein kinase consensus sites fully activates extracellular signal-regulated kinase 1/2 in human embryonic kidney 293 cells: lack of evidence for G(s)/G(i) switching, in: *Mol Pharmacol*, 62(5), S. 1094–1102.
- FRISCH, K. v. (1967): *The dance language and orientation of bees.*, Cambridge, MA, Harvard University Press.
- FRITZE, O.; FILIPEK, S.; KUKSA, V.; PALCZEWSKI, K.; HOFMANN, K. P. AND ERNST, O. P. (2003): Role of the conserved NPxxY(x)5,6F motif in the rhodopsin ground state and during activation, in: *Proc Natl Acad Sci U S A*, 100(5), S. 2290–2295.
- GADDUM, J. H. AND PICARELLI, Z. P. (1957): Two kinds of tryptamine receptor., in: *Br J Pharmacol*, 12, S. 323–328.
- GERHARDT, C. C. AND VAN HEERIKHUIZEN, H. (1997): Functional characteristics of heterologously expressed 5-HT receptors, in: *Eur J Pharmacol*, 334(1), S. 1–23.
- GERHARDT, C. C.; LEYSEN, J. E.; PLANTA, R. J.; VREUGDENHIL, E. AND VAN HEERIKHUIZEN, H. (1996): Functional characterisation of a 5-HT₂ receptor cDNA cloned from *Lymnaea stagnalis*, in: *Eur J Pharmacol*, 311(2-3), S. 249–258.
- GERSCHENFELD, H. M. AND PAUPARDIN-TRITSCH, D. (1974): On the transmitter function of 5-hydroxytryptamine at excitatory and inhibitory monosynaptic junctions, in: *J Physiol*, 243(2), S. 457–481.
- GETHER, U. (2000): Uncovering molecular mechanisms involved in activation of G protein-coupled receptors, in: *Endocr Rev*, 21(1), S. 90–113.
- GETHER, U. AND KOBILKA, B. K. (1998): G protein-coupled receptors. II. Mechanism of agonist activation, in: *J Biol Chem*, 273(29), S. 17.979–17.982.
- GETHER, U.; LIN, S.; GHANOUNI, P.; BALLESTEROS, J. A.; WEINSTEIN, H. AND KOBILKA, B. K. (1997): Agonists induce conformational changes in transmembrane domains III and VI of the beta₂ adrenoceptor, in: *EMBO J*, 16(22), S. 6737–6747.

- GEYER, M. A. AND VOLLENWEIDER, F. X. (2008): Serotonin research: contributions to understanding psychoses, in: *Trends Pharmacol Sci*, 29(9), S. 445–453.
- GIORGINO, F.; DE ROBERTIS, O.; LAVIOLA, L.; MONTRONE, C.; PERRINI, S.; MCCOWEN, K. C. AND SMITH, R. J. (2000): The sentrin-conjugating enzyme mUbc9 interacts with GLUT4 and GLUT1 glucose transporters and regulates transporter levels in skeletal muscle cells, in: *Proc Natl Acad Sci U S A*, 97(3), S. 1125–1130.
- GIURFA, M. (2003a): The amazing mini-brain: Lessons from a honey bee., in: *Bee World*, 84, S. 5–18.
- GIURFA, M. (2003b): Cognitive neuroethology: dissecting non-elemental learning in a honeybee brain, in: *Curr Opin Neurobiol*, 13(6), S. 726–735.
- GROHMANN, L.; BLENAU, W.; ERBER, J.; EBERT, P. R.; STRÜNKER, T. AND BAUMANN, A. (2003): Molecular and functional characterization of an octopamine receptor from honeybee (*Apis mellifera*) brain, in: *J Neurochem*, 86(3), S. 725–735.
- GUEST, P. C.; SALIM, K.; SKYNNER, H. A.; GEORGE, S. E.; BRESNICK, J. N. AND MCALISTER, G. (2000): Identification and characterization of a truncated variant of the 5-hydroxytryptamine(2A) receptor produced by alternative splicing, in: *Brain Res*, 876(1-2), S. 238–244.
- HALL, R. A.; PREMONT, R. T. AND LEFKOWITZ, R. J. (1999): Heptahelical receptor signaling: beyond the G protein paradigm, in: *J Cell Biol*, 145(5), S. 927–932.
- HALL, T. A. (1999): BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis., in: *Nucl. Acids. Symp. Ser.*, 41, S. 95–98.
- HAMMER, M. AND MENZEL, R. (1995): Learning and memory in the honeybee, in: *J Neurosci*, 15(3 Pt 1), S. 1617–1630.
- HANNON, J. AND HOYER, D. (2008): Molecular biology of 5-HT receptors, in: *Behav Brain Res*, 195(1), S. 198–213.
- HARRIS, J. W. AND WOODRING, J. (1992): Effects of stress, age, season, and colony on levels of octopamine, dopamine and serotonin in the honey-bee (*apis mellifera*) brain., in: *Journal of Insect Physiology*, 38(1), S. 29–35.
- 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*, in: *Prog Neurobiol*, 80(1), S. 1–19.
- HAY, R. T. (2005): SUMO: a history of modification, in: *Mol Cell*, 18(1), S. 1–12.
- HEARN, M. G.; REN, Y.; MCBRIDE, E. W.; REVEILLAUD, I.; BEINBORN, M. AND KOPIN, A. S. (2002): A *Drosophila* dopamine 2-like receptor: Molecular characterization and identification of multiple alternatively spliced variants, in: *Proc Natl Acad Sci U S A*, 99(22), S. 14.554–14.559.

- HEDLUND, P. B. AND SUTCLIFFE, J. G. (2004): Functional, molecular and pharmacological advances in 5-HT₇ receptor research, in: *Trends Pharmacol Sci*, 25(9), S. 481–486.
- HEINZELLER, T. (1976): Ciradiane Änderungen im endokrinen System der Honigbiene, *Apis mellifera*, Effekt von Haft und Ocellenblendung., in: *J. Insect Physiol.*, 22, S. 315–321.
- HERAN, H. (1959): Conditioning of an Antennal Reflex to Visual Stimuli in Bees (*Apis mellifera* L.), in: *Zeitschrift für vergleichende Physiologie*, 42(2), S. 103–163.
- HERMANS, E. (2003): Biochemical and pharmacological control of the multiplicity of coupling at G-protein-coupled receptors, in: *Pharmacol Ther*, 99(1), S. 25–44.
- HEVERS, W. AND HARDIE, R. C. (1995): Serotonin modulates the voltage dependence of delayed rectifier and Shaker potassium channels in *Drosophila* photoreceptors, in: *Neuron*, 14(4), S. 845–856.
- HIGASHIJIMA, T.; FERGUSON, K. M.; STERNWEIS, P. C.; SMIGEL, M. D. AND GILMAN, A. G. (1987): Effects of Mg²⁺ and the beta gamma-subunit complex on the interactions of guanine nucleotides with G proteins, in: *J Biol Chem*, 262(2), S. 762–766.
- HIRSH, J. AND DAVIDSON, N. (1981): Isolation and characterization of the dopa decarboxylase gene of *Drosophila melanogaster*, in: *Mol Cell Biol*, 1(6), S. 475–485.
- HOMBERG, U. (1994): Distribution of Neurotransmitters in the insect brain., in: *Progress in Zoology*, 40.
- HOYER, D.; CLARKE, D. E.; FOZARD, J. R.; HARTIG, P. R.; MARTIN, G. R.; MYLECHARANE, E. J.; SAXENA, P. R. AND HUMPHREY, P. P. (1994): International Union of Pharmacology classification of receptors for 5-hydroxytryptamine (Serotonin), in: *Pharmacol Rev*, 46(2), S. 157–203.
- HOYER, D.; HANNON, J. P. AND MARTIN, G. R. (2002): Molecular, pharmacological and functional diversity of 5-HT receptors, in: *Pharmacol Biochem Behav*, 71(4), S. 533–554.
- HUANG, X.; DURAN, E.; DIAZ, F.; XIAO, H.; MESSER, W. S. AND KOMUNIECKI, R. (1999): Alternative-splicing of serotonin receptor isoforms in the pharynx and muscle of the parasitic nematode, *Ascaris suum*, in: *Mol Biochem Parasitol*, 101(1-2), S. 95–106.
- HUANG, X.; XIAO, H.; REX, E. B.; HOBSON, R. J.; MESSER, W. S.; KOMUNIECKI, P. R. AND KOMUNIECKI, R. W. (2002): Functional characterization of alternatively spliced 5-HT₂ receptor isoforms from the pharynx and muscle of the parasitic nematode, *Ascaris suum*, in: *J Neurochem*, 83(2), S. 249–258.
- HUMPHRIES, M. A.; MUSTARD, J. A.; HUNTER, S. J.; MERCER, A.; WARD, V. AND EBERT, P. R. (2003): Invertebrate D₂ type dopamine receptor exhibits age-based plasticity of expression in the mushroom bodies of the honeybee brain, in: *J Neurobiol*, 55(3), S. 315–330.

- HWANG, S. B. AND LAI, M. M. (1994): Isoprenylation masks a conformational epitope and enhances trans-dominant inhibitory function of the large hepatitis delta antigen, in: *J Virol*, 68(5), S. 2958–2964.
- ICHIKAWA, T. (1994): Light suppresses the activity of serotonin-immunoreactive neurons in the optic lobe of the swallowtail butterfly, in: *Neurosci Lett*, 172(1-2), S. 115–118.
- JACOBY, E.; BOUHELAL, R.; GERSPACHER, M. AND SEUWEN, K. (2006): The 7 TM G-protein-coupled receptor target family, in: *ChemMedChem*, 1(8), S. 761–782.
- JERMAN, J. C.; BROUGH, S. J.; GAGER, T.; WOOD, M.; COLDWELL, M. C.; SMART, D. AND MIDDLEMISS, D. N. (2001): Pharmacological characterisation of human 5-HT₂ receptor subtypes., in: *Eur. J. Pharmacol.*, 414(1), S. 23–30.
- JIN, H.; XIE, Z.; GEORGE, S. R. AND O'DOWD, B. F. (1999): Palmitoylation occurs at cysteine 347 and cysteine 351 of the dopamine D(1) receptor, in: *Eur J Pharmacol*, 386(2-3), S. 305–312.
- KAISER, C. A.; PREUSS, D.; GRISAFI, P. AND BOTSTEIN, D. (1987): Many Random Sequences Functionally Replace the Secretion Signal Sequence of Yeast Invertase., in: *SCIENCE*, 235, S. 312–317.
- KALATSKAYA, I.; SCHÜSSLER, S.; BLAUKAT, A.; MÜLLER-ESTERL, W.; JOCHUM, M.; PROUD, D. AND FAUSSNER, A. (2004): Mutation of tyrosine in the conserved NPXXY sequence leads to constitutive phosphorylation and internalization, but not signaling, of the human B2 bradykinin receptor, in: *J Biol Chem*, 279(30), S. 31.268–31.276.
- KARPA, K. D.; LIN, R.; KABBANI, N. AND LEVENSON, R. (2000): The dopamine D₃ receptor interacts with itself and the truncated D₃ splice variant d3nf: D₃-D₃nf interaction causes mislocalization of D₃ receptors, in: *Mol Pharmacol*, 58(4), S. 677–683.
- KASTBERGER, G. (1990): The ocelli control the flight course in honeybees., in: *Physiological Entomology*, 15, S. 337–346.
- KASTBERGER, G. AND SCHUHMAN, K. (1992): Ocellar Occlusion Effect on the Flight Behaviour of Homing Honeybees., in: *J. Insect Physiol.*, 39(7), S. 589–600.
- KITSON, S. L. (2007): 5-hydroxytryptamine (5-HT) receptor ligands, in: *Curr Pharm Des*, 13(25), S. 2621–2637.
- KLOPPENBURG, P. AND ERBER, J. (1995): The modulatory effects of serotonin and octopamine in the visual system of the honey bee (*Apis mellifera* L.) II. Electrophysiological analysis of motion-sensitive neurons in the lobula., in: *J Comp Physiol A*, 176, S. 119–129.
- KOBE, F.; RENNER, U.; WOEHLE, A.; WLODARCZYK, J.; PAPUSHEVA, E.; BAO, G.; ZEUG, A.; RICHTER, D. W.; NEHER, E. AND PONIMASKIN, E. (2008): Stimulation- and palmitoylation-dependent changes in oligomeric conformation of serotonin 5-HT_{1A} receptors, in: *Biochim Biophys Acta*, 1783(8), S. 1503–1516.

- KORF, I. (2004): Gene finding in novel genomes, in: *BMC Bioinformatics*, 5, S. 59.
- KOZAK, M. (1984): Compilation and analysis of sequences upstream from the translational start site in eukaryotic mRNAs, in: *Nucleic Acids Res*, 12(2), S. 857–872.
- KREISSL, S.; EICHMÜLLER, S.; BICKER, G.; RAPUS, J. AND ECKERT, M. (1994): Octopamine-like immunoreactivity in the brain and subesophageal ganglion of the honeybee, in: *J Comp Neurol*, 348(4), S. 583–595.
- KROEZE, W. K.; KRISTIANSEN, K. AND ROTH, B. L. (2002): Molecular biology of serotonin receptors structure and function at the molecular level, in: *Curr Top Med Chem*, 2(6), S. 507–528.
- KROEZE, W. K.; SHEFFLER, D. J. AND ROTH, B. L. (2003): G-protein-coupled receptors at a glance, in: *J Cell Sci*, 116(Pt 24), S. 4867–4869.
- KYTE, J. AND DOOLITTLE, R. F. (1982): A simple method for displaying the hydropathic character of a protein., in: *J. Mol. Biol.*, 157, S. 105–132.
- LAZZARI, C. R.; REISEMAN, C. E. AND INSAUSTI, T. C. (1998): The role of the ocelli in the phototactic behaviour of the haematophagous bug *Triatoma infestans*, in: *J Insect Physiol*, 44(12), S. 1159–1162.
- LEE, D. W. AND PIETRANTONIO, P. V. (2003): In vitro expression and pharmacology of the 5-HT₇-like receptor present in the mosquito *Aedes aegypti* tracheolar cells and hindgut-associated nerves, in: *Insect Mol Biol*, 12(6), S. 561–569.
- LEURS, R.; SMIT, M. J.; ALEWIJNSE, A. E. AND TIMMERMAN, H. (1998): Agonist-independent regulation of constitutively active G-protein-coupled receptors, in: *Trends Biochem Sci*, 23(11), S. 418–422.
- LEURS, R.; SMIT, M. J. AND TIMMERMAN, H. (1995): Molecular pharmacological aspects of histamine receptors, in: *Pharmacol Ther*, 66(3), S. 413–463.
- LINDAUER, M. (1959): Angeborene und erlernte Komponenten in der Sonnenorientierung der Bienen., in: *Z Vergl Physiol*, 42, S. 43–62.
- LING, K.; WANG, P.; ZHAO, J.; WU, Y. L.; CHENG, Z. J.; WU, G. X.; HU, W.; MA, L. AND PEI, G. (1999): Five-transmembrane domains appear sufficient for a G protein-coupled receptor: functional five-transmembrane domain chemokine receptors, in: *Proc Natl Acad Sci U S A*, 96(14), S. 7922–7927.
- LIVINGSTONE, M. S. AND TEMPEL, B. L. (1983): Genetic dissection of monoamine neurotransmitter synthesis in *Drosophila*, in: *Nature*, 303(5912), S. 67–70.
- LUTTRELL, L. M. (2008): Reviews in molecular biology and biotechnology: transmembrane signaling by G protein-coupled receptors, in: *Mol Biotechnol*, 39(3), S. 239–264.

- LUTTRELL, L. M. AND LEFKOWITZ, R. J. (2002): The role of beta-arrestins in the termination and transduction of G-protein-coupled receptor signals, in: *J Cell Sci*, 115(Pt 3), S. 455–465.
- MACKERT, A.; DO NASCIMENTO, A. M.; BITONDI, M. M.; HARTFELDER, K. AND SIMÕES, Z. L. (2008): Identification of a juvenile hormone esterase-like gene in the honey bee, *Apis mellifera* L.—expression analysis and functional assays, in: *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol*, 150(1), S. 33–44.
- MAGGIO, R.; VOGEL, Z. AND WESS, J. (1993): Reconstitution of functional muscarinic receptors by co-expression of amino- and carboxyl-terminal receptor fragments, in: *FEBS Lett*, 319(1-2), S. 195–200.
- MATUNIS, M. J.; COUTAVAS, E. AND BLOBEL, G. (1996): A novel ubiquitin-like modification modulates the partitioning of the Ran-GTPase-activating protein RanGAP1 between the cytosol and the nuclear pore complex, in: *J Cell Biol*, 135(6 Pt 1), S. 1457–1470.
- MAUREL, D.; COMPS-AGRAR, L.; BROCK, C.; RIVES, M. L.; BOURRIER, E.; AYOUB, M. A.; BAZIN, H.; TINEL, N.; DURROUX, T.; PRÉZEAU, L.; TRINQUET, E. AND PIN, J. P. (2008): Cell-surface protein-protein interaction analysis with time-resolved FRET and snap-tag technologies: application to GPCR oligomerization, in: *Nat. Methods*, 5, S. 561–567.
- MELTZER, H. Y.; LI, Z.; KANEDA, Y. AND ICHIKAWA, J. (2003): Serotonin receptors: their key role in drugs to treat schizophrenia, in: *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*, 27(7), S. 1159–1172.
- MENZEL, R. AND MÜLLER, U. (1996): Learning and memory in honeybees: from behavior to neural substrates, in: *Annu Rev Neurosci*, 19, S. 379–404.
- MERCER, A. R. (1987): Biogenic Amines in the insect brain., In: A.P. Gupta (ED.) *Arthropod Brain. Its Evolution, Development, Structure, and Functions*. John Wiley & Sons, New York, pp. 399-414.
- MERCER, A. R. AND MENZEL, R. (1982): The Effects of Biogenic Amines on Conditioned and Unconditioned Responses to Olfactory Stimuli in the Honeybee *Apis mellifera*, in: *J Comp Physiol A*, 145(3), S. 363–368.
- MERCER, A. R.; MOBBS, P. G.; DAVENPORT, A. P. AND EVANS, P. D. (1983): Biogenic amines in the brain of the honeybee, *Apis mellifera*, in: *Cell Tissue Res*, 234(3), S. 655–677.
- MILDE, J. (1981): Gated Potentials and Action Potentials in the Large Ocellar Interneurons of the Bee., in: *J Comp Physiol A*, 143, S. 427–434.
- MILDE, J. AND HOMBERG, U. (1984): Ocellar interneurons in the honeybee. Characteristics of spikig L-neurons, in: *J Comp Physiol A*, 155, S. 151–160.
- MILDE, J. AND HOMBERG, U. (1988): Visual Responses of Interneurons in the Posterior Median Protocerebrum and the Central Complex of the Honeybee *Apis mellifera*, in: *J Insect Physiol*, 34(5), S. 427–436.

- MILLIGAN, G. AND KOSTENIS, E. (2006): Heterotrimeric G-proteins: a short history, in: *Br J Pharmacol*, 147 Suppl 1, S. 46–55.
- MIRZADEGAN, T.; BENKÖ, G.; FILIPEK, S. AND PALCZEWSKI, K. (2003): Sequence analyses of G-protein-coupled receptors: similarities to rhodopsin, in: *Biochemistry*, 42(10), S. 2759–2767.
- MITCHELL, R.; MCCULLOCH, D.; LUTZ, E.; JOHNSON, M.; MACKENZIE, C.; FENNELL, M.; FINK, G.; ZHOU, W. AND SEALFON, S. C. (1998): Rhodopsin-family receptors associate with small G proteins to activate phospholipase D, in: *Nature*, 392(6674), S. 411–414.
- MOBBS, P. G. (1985): Brain Structure, Kerkut, G.A., Gilbert, L.I. Eds, *Comparative Insect Physiology, Biochemistry and Pharmacology*, Vol. 5: Nervous system: Structure and motor function. Oxford, Pergamon Press pp. 299–370.
- MONSMA, F. J.; MCVITTIE, L. D.; GERFEN, C. R.; MAHAN, L. C. AND SIBLEY, D. R. (1989): Multiple D2 dopamine receptors produced by alternative RNA splicing, in: *Nature*, 342(6252), S. 926–929.
- MÜLLER, U. (1997): Neuronal cAMP-dependent protein kinase type II is concentrated in mushroom bodies of *Drosophila melanogaster* and the honeybee *Apis mellifera*, in: *J Neurobiol*, 33(1), S. 33–44.
- MÜLLER, U. (2000): Prolonged activation of cAMP-dependent protein kinase during conditioning induces long-term memory in honeybees, in: *Neuron*, 27(1), S. 159–168.
- MUSTARD, J. A.; BLENAU, W.; HAMILTON, I. S.; WARD, V. K.; EBERT, P. R. AND MERCER, A. R. (2003): Analysis of two D1-like dopamine receptors from the honey bee *Apis mellifera* reveals agonist-independent activity, in: *Brain Res Mol Brain Res*, 113(1-2), S. 67–77.
- NATHANSON, J. A. AND GREENGARD, P. (1974): Serotonin-sensitive adenylate cyclase in neural tissue and its similarity to the serotonin receptor: a possible site of action of lysergic acid diethylamide, in: *Proc Natl Acad Sci U S A*, 71(3), S. 797–801.
- NECKAMEYER, W. S. AND QUINN, W. G. (1989): Isolation and characterization of the gene for *Drosophila* tyrosine hydroxylase, in: *Neuron*, 2(2), S. 1167–1175.
- NEW, D. C. AND WONG, J. T. (1998): The evidence for G-protein-coupled receptors and heterotrimeric G proteins in protozoa and ancestral metazoa, in: *Biol Signals Recept*, 7(2), S. 98–108.
- NEWMAN-TANCREDI, A.; CHAPUT, C.; VERRIÈLE, L. AND MILLAN, M. J. (1996): S 15535 and WAY 100,635 antagonise 5-HT-stimulated [35S]GTP gamma S binding at cloned human 5-HT1A receptors, in: *Eur J Pharmacol*, 307(1), S. 107–111.
- NG, G. Y.; MOUILLAC, B.; GEORGE, S. R.; CARON, M.; DENNIS, M.; BOUVIER, M. AND O'DOWD, B. F. (1994): Desensitization, phosphorylation and palmitoylation of the human dopamine D1 receptor, in: *Eur J Pharmacol*, 267(1), S. 7–19.

- NICHOLS, D. E. AND NICHOLS, C. D. (2008): Serotonin receptors, in: *Chem Rev*, 108(5), S. 1614–1641.
- NODA, M.; HIGASHIDA, H.; AOKI, S. AND WADA, K. (2004): Multiple signal transduction pathways mediated by 5-HT receptors, in: *Mol Neurobiol*, 29(1), S. 31–39.
- OAKLEY, R. H.; LAPORTE, S. A.; HOLT, J. A.; BARAK, L. S. AND CARON, M. G. (2001): Molecular determinants underlying the formation of stable intracellular G protein-coupled receptor-beta-arrestin complexes after receptor endocytosis*, in: *J Biol Chem*, 276(22), S. 19.452–19.460.
- OBOSSI, L. A.; SCHUETTE, D. G.; EUROPE-FINNER, G. N.; BEADLE, D. J.; HEN, R.; KING, L. A. AND BERMUDEZ, I. (1996): Functional characterisation of the *Drosophila* 5-HTdro1 and 5-HTdro2B serotonin receptors in insect cells: activation of a G(alpha) s-like protein by 5-HTdro1 but lack of coupling to inhibitory G-proteins by 5-HTdro2B, in: *FEBS Lett*, 381(3), S. 233–236.
- O'DOWD, B. F.; HNATOWICH, M.; CARON, M. G.; LEFKOWITZ, R. J. AND BOUVIER, M. (1989): Palmitoylation of the human beta 2-adrenergic receptor. Mutation of Cys341 in the carboxyl tail leads to an uncoupled nonpalmitoylated form of the receptor, in: *J Biol Chem*, 264(13), S. 7564–7569.
- OLSEN, M. A.; NAWOSCHIK, S. P.; SCHURMAN, B. R.; SCHMITT, H. L.; BURNO, M.; SMITH, D. L. AND SCHECHTER, L. E. (1999): Identification of a human 5-HT6 receptor variant produced by alternative splicing, in: *Brain Res Mol Brain Res*, 64(2), S. 255–263.
- ONGVARRASOPONE, C.; ROSHORM, Y.; SOMYONG, S.; POTHIRATANA, C.; PETCHDEE, S.; TANGKHABUANBUTRA, J.; SOPHASAN, S. AND PANYIM, S. (2006): Molecular cloning and functional expression of the *Penaeus monodon* 5-HT receptor, in: *Biochim Biophys Acta*, 1759(7), S. 328–339.
- ONO, H. AND YOSHIKAWA, H. (2004): Identification of amine receptors from a swallowtail butterfly, *Papilio xuthus* L.: cloning and mRNA localization in foreleg chemosensory organ for recognition of host plants, in: *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 34, S. 1247–1256.
- PAETZEL, M.; DALBEY, R. E. AND STRYNADKA, N. C. (2002): Crystal structure of a bacterial signal peptidase apoenzyme: implications for signal peptide binding and the Ser-Lys dyad mechanism, in: *J. Biol. Chem.*, 277, S. 9512–9519.
- PAGE, R. E. AND ERBER, J. (2002): Levels of behavioral organization and the evolution of division of labor, in: *Naturwissenschaften*, 89(3), S. 91–106.
- PAN, K. C. AND GOODMAN, L. J. (1977): Ocellar Projections within the Central Nervous System of the Worker Honey Bee, *Apis mellifera*., in: *Cell Tiss. Res.*, 176, S. 505–527.
- PARK, P. S.; FILIPEK, S.; WELLS, J. W. AND PALCZEWSKI, K. (2004): Oligomerization of G protein-coupled receptors: past, present, and future, in: *Biochemistry*, 43(50), S. 15.643–15.656.

- PARK, P. S. AND PALCZEWSKI, K. (2005): Diversifying the repertoire of G protein-coupled receptors through oligomerization, in: *Proc Natl Acad Sci U S A*, 102(25), S. 8793–8794.
- PARSONS, M. M.; KRAPP, H. G. AND LAUGHLIN, S. B. (2006): A motion-sensitive neurone responds to signals from the two visual systems of the blowfly, the compound eyes and ocelli, in: *J Exp Biol*, 209(Pt 22), S. 4464–4474.
- PATEL, A.; FONDRK, M. K.; KAFTANOGLU, O.; EMORE, C.; HUNT, G.; FREDERICK, K. AND AMDAM, G. V. (2007): The making of a queen: TOR pathway is a key player in diphenic caste development, in: *PLoS One*, 2(6).
- PÉREZ, M.; SCHACHTER, J. AND QUESADA-ALLUÉ, L. A. (2004): Constitutive activity of N-beta-alanyl-catecholamine ligase in insect brain, in: *Neurosci Lett*, 368(2), S. 186–191.
- PÉREZ, M.; WAPPNER, P. AND QUESADA-ALLUÉ, L. A. (2002): Catecholamine-beta-alanyl ligase in the medfly *Ceratitis capitata*, in: *Insect Biochem Mol Biol*, 32(6), S. 617–625.
- PEROUTKA, S. J. (1994): 5-Hydroxytryptamine receptors in vertebrates and invertebrates: why are there so many?, in: *Neurochem Int*, 25(6), S. 533–536.
- PEROUTKA, S. J. AND HOWELL, T. A. (1994): The molecular evolution of G protein-coupled receptors: focus on 5-hydroxytryptamine receptors, in: *Neuropharmacology*, 33(3-4), S. 319–324.
- PFLEGER, K. D. AND EIDNE, K. A. (2005): Monitoring the formation of dynamic G-protein-coupled receptor-protein complexes in living cells, in: *Biochem. J.*, 385, S. 625–637.
- PONIMASKIN, E.; DUMUIS, A.; GAVEN, F.; BARTHET, G.; HEINE, M.; GLEBOV, K.; RICHTER, D. W. AND OPPERMAN, M. (2005): Palmitoylation of the 5-hydroxytryptamine_{4a} receptor regulates receptor phosphorylation, desensitization, and beta-arrestin-mediated endocytosis, in: *Mol Pharmacol*, 67(5), S. 1434–1443.
- PONIMASKIN, E. G.; HEINE, M.; JOUBERT, L.; SEBEN, M.; BICKMEYER, U.; RICHTER, D. W. AND DUMUIS, A. (2002): The 5-hydroxytryptamine(4a) receptor is palmitoylated at two different sites, and acylation is critically involved in regulation of receptor constitutive activity, in: *J Biol Chem*, 277(4), S. 2534–2546.
- POPOT, J. L. AND DE VITRY, C. (1990): On the microassembly of integral membrane proteins, in: *Annu Rev Biophys Biophys Chem*, 19, S. 369–403.
- PRIBBENOW, B. AND ERBER, J. (1996): Modulation of antennal scanning in the honeybee by sucrose stimuli, serotonin, and octopamine: behavior and electrophysiology, in: *Neurobiol Learn Mem*, 66(2), S. 109–120.
- QANBAR, R. AND BOUVIER, M. (2003): Role of palmitoylation/depalmitoylation reactions in G-protein-coupled receptor function, in: *Pharmacol Ther*, 97(1), S. 1–33.

- RANDS, E.; CANDELORE, M. R.; CHEUNG, A. H.; HILL, W. S.; STRADER, C. D. AND DIXON, R. A. (1990): Mutational analysis of beta-adrenergic receptor glycosylation, in: *J Biol Chem*, 265(18), S. 10.759–10.764.
- RAYMOND, J. R. (1991): Protein kinase C induces phosphorylation and desensitization of the human 5-HT_{1A} receptor, in: *J Biol Chem*, 266(22), S. 14.747–14.753.
- RAYMOND, J. R.; MUKHIN, Y. V.; GELASCO, A.; TURNER, J.; COLLINSWORTH, G.; GETTYS, T. W.; GREWAL, J. S. AND GARNOVSKAYA, M. N. (2001): Multiplicity of mechanisms of serotonin receptor signal transduction, in: *Pharmacol Ther*, 92(2-3), S. 179–212.
- RENNER, U.; GLEBOV, K.; LANG, T.; PAPUSHEVA, E.; BALAKRISHNAN, S.; KELLER, B.; RICHTER, D. W.; JAHN, R. AND PONIMASKIN, E. (2007): Localization of the mouse 5-hydroxytryptamine(1A) receptor in lipid microdomains depends on its palmitoylation and is involved in receptor-mediated signaling, in: *Mol Pharmacol*, 72(3), S. 502–513.
- REUGELS, A. M.; KUREK, R.; LAMMERMANN, U. AND BÜNEMANN, H. (2000): Mega-introns in the dynein gene *DhDhc7(Y)* on the heterochromatic Y chromosome give rise to the giant threads loops in primary spermatocytes of *Drosophila hydei*, in: *Genetics*, 154(2), S. 759–769.
- RIBI, W. A. (1975): The first optic ganglion of the bee. I. Correlation between visual cell types and their terminals in the lamina and medulla, in: *Cell Tissue Res*, 165(1), S. 103–111.
- RIBI, W. A. AND SCHEEL, M. (1981): The second and third optic ganglia of the worker bee: Golgi studies of the neuronal elements in the medulla and lobula, in: *Cell Tissue Res*, 221(1), S. 17–43.
- RICHARDT, A.; KEMME, T.; WAGNER, S.; SCHWARZER, D.; MARAHIEL, M. A. AND HOVEMANN, B. T. (2003): Ebony, a novel nonribosomal peptide synthetase for beta-alanine conjugation with biogenic amines in *Drosophila*, in: *J Biol Chem*, 278(42), S. 41.160–41.166.
- RODRÍGUEZ-SOSA, L.; CALDERÓN-ROSETE, G.; FLORES, G. AND PORRAS, M. G. (2007): Serotonin-caused phase shift of circadian rhythmicity in a photosensitive neuron, in: *Synapse*, 61(10), S. 801–808.
- ROEDER, T. (1994): Biogenic amines and their receptors in insects., in: *Comp Biochem. Physiol. C*, 107, S. 1–12.
- ROEDER, T.; SEIFERT, M.; KÄHLER, C. AND GEWECKE, M. (2003): Tyramine and octopamine: antagonistic modulators of behavior and metabolism, in: *Arch Insect Biochem Physiol*, 54(1), S. 1–13.
- ROTTE, C.; KRACH, C.; BALFANZ, S.; BAUMANN, A.; WALZ, B. AND BLENAU, W. (2009): Molecular characterization and localization of the first tyramine receptor of the American cockroach (*Periplaneta americana*), in: *Neuroscience*, 162(4), S. 1120–1133.
- SAITOU, N. AND NEI, M. (1987): The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees, in: *Mol Biol Evol*, 4(4), S. 406–425.

- SASAGAWA, H.; NARITA, R.; KITAGAWA, Y. AND KADOWAKI, T. (2003): The expression of genes encoding visual components is regulated by a circadian clock, light environment and age in the honeybee (*Apis mellifera*), in: *Eur J Neurosci*, 17(5), S. 963–970.
- SAUDOU, F.; BOSCHERT, U.; AMLAIKY, N.; PLASSAT, J. L. AND HEN, R. (1992): A family of *Drosophila* serotonin receptors with distinct intracellular signalling properties and expression patterns, in: *EMBO J*, 11(1), S. 7–17.
- SAVITZ, J.; LUCKI, I. AND DREVETS, W. C. (2009): 5-HT(1A) receptor function in major depressive disorder, in: *Prog Neurobiol*, 88(1), S. 17–31.
- SAXONOV, S.; DAIZADEH, I.; FEDOROV, A. AND GILBERT, W. (2000): EID: the Exon-Intron Database-an exhaustive database of protein-coding intron-containing genes, in: *Nucleic Acids Res*, 28(1), S. 185–190.
- SCHAERLINGER, B.; LAUNAY, J. M.; VONESCH, J. L. AND MAROTEAUX, L. (2007): Gain of affinity point mutation in the serotonin receptor gene 5-HT_{2Dro} accelerates germband extension movements during *Drosophila* gastrulation, in: *Dev Dyn*, 236(4), S. 991–999.
- SCHÄFER, S. AND BICKER, G. (1986): Common projection areas of 5-HT and GABA-like immunoreactive fibres in the visual system of the honeybee., in: *Brain Research*, 380, S. 368–370.
- SCHIEER, A.; FANELLI, F.; COSTA, T.; DE BENEDETTI, P. G. AND COTECCHIA, S. (1996): Constitutively active mutants of the alpha 1B-adrenergic receptor: role of highly conserved polar amino acids in receptor activation, in: *EMBO J*, 15(14).
- SCHIEDLER, A. (1991): Autoradiographische Darstellung von Bindungsstellen für verschiedene Neurotransmitter-Kandidaten im Gehirn der Honigbienen (*Apis mellifera* L.), Dissertation, Technische Universität Berlin.
- SCHIEINER, R.; BAUMANN, A. AND BLENAU, W. (2006): Aminergic control and modulation of honeybee behaviour, in: *Current Neuropharmacology*, 4, S. 259–276.
- SCHIÖTH, H. B. AND FREDRIKSSON, R. (2005): The GRAFS classification system of G-protein coupled receptors in comparative perspective, in: *Gen Comp Endocrinol*, 142(1-2), S. 94–101.
- SCHLENSTEDT, J. (2005): Molekulare und pharmakologische Charakterisierung von Serotonin-Rezeptoren der Honigbiene *Apis mellifera*., Dissertation, Universität Potsdam.
- SCHLENSTEDT, J.; BALFANZ, S.; BAUMANN, A. AND BLENAU, W. (2006): Am5-HT₇: molecular and pharmacological characterization of the first serotonin receptor of the honeybee (*Apis mellifera*), in: *J Neurochem*, 98(6), S. 1985–1998.
- SCHMAUSS, C.; HAROUTUNIAN, V.; DAVIS, K. L. AND DAVIDSON, M. (1993): Selective loss of dopamine D₃-type receptor mRNA expression in parietal and motor cortices of patients with chronic schizophrenia, in: *Proc Natl Acad Sci U S A*, 90(19), S. 8942–8946.

- SCHRICKER, B. (1965): Die Orientierung der Honigbiene in der Dämmerung., in: Zeitschrift für vergleichende Physiologie, 49, S. 420–458.
- SCHULZ, D. J. AND ROBINSON, G. E. (1999): Biogenic amines and division of labor in honey bee colonies: behaviorally related changes in the antennal lobes and age-related changes in the mushroom bodies, in: J Comp Physiol A, 184(5), S. 481–488.
- SCHÜRSMANN, F. W. AND KLEMM, N. (1984): Serotonin-immunoreactive neurons in the brain of the honeybee, in: J Comp Neurol, 225(4), S. 570–580.
- SEALFON, S. C.; CHI, L.; EBERSOLE, B. J.; RODIC, V.; ZHANG, D.; BALLESTEROS, J. A. AND WEINSTEIN, H. (1995): Related contribution of specific helix 2 and 7 residues to conformational activation of the serotonin 5-HT_{2A} receptor, in: J Biol Chem, 270(28), S. 16.683–16.688.
- SEIDEL, C. AND BICKER, G. (1996): The developmental expression of serotonin-immunoreactivity in the brain of the pupal honeybee, in: Tissue Cell, 28(6), S. 663–672.
- SELEY, T. D. (1995): The wisdom of the hive., Cambridge, MA, Harvard University Press.
- SHAPIRO, D. A.; KRISTIANSEN, K.; WEINER, D. M.; KROEZE, W. K. AND ROTH, B. L. (2002): Evidence for a model of agonist-induced activation of 5-hydroxytryptamine 2A serotonin receptors that involves the disruption of a strong ionic interaction between helices 3 and 6, in: J Biol Chem, 277(13), S. 11.441–11.449.
- SHENOY, S. K. (2007): Seven-transmembrane receptors and ubiquitination, in: Circ Res, 100(8), S. 1142–1154.
- SLOLEY, B. D. (2004): Metabolism of monoamines in invertebrates: the relative importance of monoamine oxidase in different phyla, in: Neurotoxicology, 25(1-2), S. 175–183.
- SMITH, N. J. AND LUTTRELL, L. M. (2006): Signal switching, crosstalk, and arrestin scaffolds: novel G protein-coupled receptor signaling in cardiovascular disease, in: Hypertension, 48(2), S. 173–179.
- SOSA, M. A.; SPITZER, N.; EDWARDS, D. H. AND BARO, D. J. (2004): A crustacean serotonin receptor: cloning and distribution in the thoracic ganglia of crayfish and freshwater prawn, in: J Comp Neurol, 473(4), S. 526–537.
- SPITZER, N.; EDWARDS, D. H. AND BARO, D. J. (2008): Conservation of structure, signaling and pharmacology between two serotonin receptor subtypes from decapod crustaceans, *Panulirus interruptus* and *Procambarus clarkii*, in: J Exp Biol, 211(Pt 1), S. 92–105.
- STANGE, G. (1981): The ocellar component of flight equilibrium control in dragonflies, in: J Comp Physiol A, 141(3), S. ,.
- STANGE, G. AND HOWARD, J. (1979): An Ocellar Dorsal Light Response In A Dragonfly, in: J. Exp. Biol, 83, S. ,351–355.

- STEFAN, C. J.; OVERTON, M. C. AND BLUMER, K. J. (1998): Mechanisms governing the activation and trafficking of yeast G protein-coupled receptors, in: *Mol Biol Cell*, 9(4), S. 885–899.
- STRADER, C. D.; FONG, T. M.; GRAZIANO, M. P. AND TOTA, M. R. (1995): The family of G-protein-coupled receptors, in: *FASEB J*, 9, S. 745–754.
- STRAUSFELD, N. J. (2002): Organization of the honey bee mushroom body: representation of the calyx within the vertical and gamma lobes, in: *J Comp Neurol*, 450(1), S. 4–33.
- SUGIURA, M.; FUKU, S.; SUO, S.; SASAGAWA, N.; VAN TOL, H. H. AND ISHIURA, S. (2005): Characterization of a novel D2-like dopamine receptor with a truncated splice variant and a D1-like dopamine receptor unique to invertebrates from *Caenorhabditis elegans*, in: *J Neurochem*, 94(4), S. 1146–1157.
- TAMURA, K.; DUDLEY, J.; NEI, M. AND KUMAR, S. (2007): MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0, in: *Mol Biol Evol*, 24(8), S. 1596–1599.
- TANSKY, M. F.; POTHOLAKIS, C. AND LEEMAN, S. E. (2007): Functional consequences of alteration of N-linked glycosylation sites on the neurokinin 1 receptor, in: *Proc Natl Acad Sci U S A*, 104(25), S. 10.691–10.696.
- TAYLOR, C. P. (1981a): Contribution of Compound Eyes and Ocelli to Steering Of Locusts in Flight: I. Behavioural Analysis, in: *J Exp Biol*, 93, S. 1–18.
- TAYLOR, C. P. (1981b): Contribution of Compound Eyes and Ocelli to Steering of Locusts in Flight: II. Timing Changes in Flight Motor Units, in: *J Exp Biol*, 93, S. 19–31.
- TAYLOR, D. J.; ROBINSON, G. E.; LOGAN, B. J.; LAVERTY, R. AND MERCER, A. R. (1992): Changes in brain amine levels associated with the morphological and behavioural development of the worker honeybee, in: *J Comp Physiol A*, 170(6), S. 715–721.
- THE HONEYBEE GENOME SEQUENCING CONSORTIUM (2006): Insights into social insects from the genome of the honeybee *Apis mellifera*, in: *Nature*, 443, S. 931–949.
- THOMPSON, J. D.; HIGGINS, D. G. AND GIBSON, T. J. (1994): CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice, in: *Nucleic Acids Res*, 22(22), S. 4673–4680.
- TIERNEY, A. J. (2001): Structure and function of invertebrate 5-HT receptors: a review, in: *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol*, 128(4), S. 791–804.
- TOBIN, A. B. (2008): G-protein-coupled receptor phosphorylation: where, when and by whom, in: *Br J Pharmacol*, 153 Suppl 1, S. 167–176.
- TORRECILLA, I. AND TOBIN, A. B. (2006): Co-ordinated covalent modification of G-protein coupled receptors, in: *Curr Pharm Des*, 12(14), S. 1797–1808.

- TROPPMANN, B.; BAUMANN, A. AND BLENAU, W. (2009): Inverse agonist and neutral antagonist actions of synthetic compounds at an insect 5-HT₁ receptor., in: *Br J Pharmacol*, submitted.
- VERNIER, P.; CARDINAUD, B.; VALDENNAIRE, O.; PHILIPPE, H. AND VINCENT, J. D. (1995): An evolutionary view of drug-receptor interaction: the bioamine receptor family, in: *Trends Pharmacol Sci*, 16(11), S. 375–381.
- VON NICKISCH-ROSENEGK, E.; KRIEGER, J.; KUBICK, S.; LAAGE, R.; STROBEL, J.; STROTMANN, J. AND BREER, H. (1996): Cloning of biogenic amine receptors from moths (*Bombyx mori* and *Heliothis virescens*)., in: *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 26, S. 817–827.
- WAGENER-HULME, C.; KUEHN, J. C.; SCHULZ, D. J. AND ROBINSON, G. E. (1999): Biogenic amines and division of labor in honey bee colonies, in: *J Comp Physiol A*, 184(5), S. 471–479.
- WALKER, R. J.; BROOKS, H. L. AND HOLDEN-DYE, L. (1996): Evolution and overview of classical transmitter molecules and their receptors, in: *Parasitology*, 113 Suppl, S. 3–33.
- WANG, J.; LI, S.; ZHANG, Y.; ZHENG, H.; XU, Z.; YE, J.; YU, J. AND WONG, G. K. (2003): Vertebrate gene predictions and the problem of large genes, in: *Nat Rev Genet*, 4(9), S. 741–749.
- WEIGER, W. A. (1997): Serotonergic modulation of behaviour: a phylogenetic overview, in: *Biol Rev Camb Philos Soc*, 72(1), S. 61–95.
- WESS, J. (1997): G-protein-coupled receptors: molecular mechanisms involved in receptor activation and selectivity of G-protein recognition, in: *FASEB J*, 11(5), S. 346–354.
- WILLETS, J. M.; CHALLISS, R. A. AND NAHORSKI, S. R. (2003): Non-visual GRKs: are we seeing the whole picture?, in: *Trends Pharmacol Sci*, 24(12), S. 626–633.
- WITZ, P.; AMLAIKY, N.; PLASSAT, J. L.; MAROTEAUX, L.; BORRELLI, E. AND HEN, R. (1990): Cloning and characterization of a *Drosophila* serotonin receptor that activates adenylate cyclase, in: *Proc Natl Acad Sci U S A*, 87(22), S. 8940–8944.
- WONG, S. K. (2003): G protein selectivity is regulated by multiple intracellular regions of GPCRs, in: *Neurosignals*, 12(1), S. 1–12.
- WRIGHT, T. R. (1987): The genetics of biogenic amine metabolism, sclerotization, and melanization in *Drosophila melanogaster*, in: *Adv Genet*, 24, S. 127–222.
- YONA, S.; LIN, H. H.; SIU, W. O.; GORDON, S. AND STACEY, M. (2008): Adhesion-GPCRs: emerging roles for novel receptors, in: *Trends Biochem Sci*, 33(10), S. 491–500.
- YUAN, Q.; JOINER, W. J. AND SEHGAL, A. (2006): A sleep-promoting role for the *Drosophila* serotonin receptor 1A, in: *Curr Biol*, 16(11), S. 1051–1062.
- YUAN, Q.; LIN, F.; ZHENG, X. AND SEHGAL, A. (2005): Serotonin modulates circadian entrainment in *Drosophila*, in: *Neuron*, 47(1), S. 115–127.

Anhang

Abkürzungsverzeichnis

Allgemein gebräuchliche Abkürzungen und Maßeinheiten werden nicht gesondert aufgeführt.

5-CT	5-Carboxamidotryptamin
5-HT	5-Hydroxytryptamin, Serotonin
5-MT	5-Methoxytryptamin
8-OH-DPAT	8-Hydroxy-2-(di-n-propylamino)-Tetralin
AC	Adenylylzyklase
APS	Ammoniumpersulfat
AS	Aminosäure
ATP	Adenosintriphosphat
bp	Basenpaare
cAMP	cyclisches Adenosinmonophosphat
cDNA	komplementäre DNA
CPL	<i>cytoplasmic loop</i> , intrazelluläre Schleife
C-Terminus	Carboxylterminus
DAG	Diacylglycerol
DDC	DOPA-Decarboxylase
DEPC	Diethylen-Pyrocbonat
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DTT	Dithiothreitol
ECL	<i>extracellular loop</i> , extrazelluläre Schleife
EDTA	Ethylendiamin-Tetraessigsäure
GDP	Guanosindiphosphat
G-Protein	Guaninnukleotid-bindendes Protein
GPCR	<i>G protein-coupled receptor</i> , G-Protein-gekoppelter Rezeptor
GTP	Guamosintriphosphat
HRP	<i>Horseradish Peroxidase</i> , Meerrettich-Peroxidase
IP ₃	Inositol-1,4,5-triphosphat
IPTG	Isopropyl-Thio-D-Galaktopyranosid
kb	Kilobasenpaare
MBP	Maltose-Bindeprotein
N-Terminus	Aminoterminus
ORF	open reading frame, offener Leserahmen
PBS	<i>phosphate buffered saline</i> , Phosphat gepufferte Salzlösung
PCR	Polymerasekettenreaktion
PIP ₂	1-Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat
PKA	Proteinkinase A
PKC	Proteinkinase C
PLC	Phospholipase C

RT	Raumtemperatur
RT-PCR	reverse transcription PCR
SDS	<i>sodium dodecyl sulfate</i> , Natrium-Dodecyl-Sulfat
TEMED	Tetramethyldiamin
TH	Tyrosin-Hydroxylase
TM	Transmembrandomäne
TRH	Tryptophan-Hydroxylase
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-Aminomethan
U	Units
UpM	Umdrehungen pro Minute
Vol	Volumen
ZNS	Zentrales Nervensystem

Nukleotid-Sequenzen der untersuchten Rezeptoren

Die Nukleotidabfolge ist in 5'-3'-Richtung dargestellt. Start-Codon (ATG) und Stopp-Codon (TAG) sind grau unterlegt.

Am5 - HT₁

```

ATGGAGGAACACGTTGAACCGAGACCTCGAGAAACTCGTCCCTCGGACGGGTTGGTTTTACGGATGCCTCGATCATTCTCAG 80
AACATTGGTGCTGGGTCTCTTTGACTCGTCACCCTTGTTCGGGAATCTGTTCTGATAGCTGCGATCCCTGCTCGAGCGGA 160
ACCTGCAATCGGTGGCCAATTATTTGATCGTCAGCTTGGCCGTGGCCGATCTCATGGTCGCCCTGTCTGGTCAATGCCTCTC 240
GGTGGCGGTTTACGAGATAAACTCGGAATGGTTCGCTCGGGCCCGAGCTTTGCGACATGTGGACCAGCAGCGACGTTCTCTG 320
CTGCACTGCCTCGATATTTGCATCTGGTGGCTATCGCGGTCGACAGATATTTGGGCAGTCACCAGATCTCAATTAATACAGG 400
CGAGGAATCCACGACGGATTGGTATGTTGATCGTCGCCGCTGGGTGGTGTCCCTTAGGAATCTCGTTGGCGCCCAACTC 480
GGATGGAAAGGATCCCTGATTATTTGGATCGTATAGCGGACGGGACTTGTCTGGTGTCCGAGGATCCCGCATACCAGATCTT 560
CGCCACTTGGCGGACATTTCTATCTACCCCTGTTGGTTATTTCTATTCCTGTACTGGAGGATATTTCAAGCGGCGCGGAAGC 640
GGATCAGAAGGAGGCCGGGAACCATTTGTCAGCCAGCTCGTGAAGAAGAGGCATCCCTTAGATACGTACAAAAAGACCCG 720
AGGGAGGAATCGACAGCGTTACGATAAACGAGATCCACGCCGGATCATTCTGATCTCGCCTGAGAAATCGTCTCTTA 800
CAACGGGGCGAACCGACCCAATCGACCACGGTCACCCCGTCGACCGTCTCGACGACCACGACCACCACCACCACCGA 880
CAGTGACGAATCCCTTCGAGCAGCCACTCGACCCACTCGTCGAGCAAAGGACGCGCGACACTATCGAGTCGAAAGCGCGAG 960
AAGAAAGCCGCGAAAAAGCTGGCGATAATCACCGGGGCGTTCTGCGCGTGTGGTTGCCTTTCTTCTGTTGTTGCGTTGCT 1040
CCGCGCACTTGGCAGGCTGCGAGCCACTGAGCTCATAGCAAGCGTCTTCTGTGGCTGGGCTATTTCAACAGCACCC 1120
TGAACCTGTGATATACACTGTATTCTCACAGAGTTTACGGCAAGCCTTCAAGAGGATGCTTTGCGGTGGTTCCAGGATA 1200
ATTCTGCTGA 1209

```

Am5 - HT_{2α}

```

ATGGAGGGGGATCTGATCGCCTCTTGGACCGGCAACCTGACCCGATGTTGCAACCACCTGCCCTGCAACGACACCTTCCCT 80
CCACGGATGCGCGGAGGAGTGTGGACTCGCCTCGTCGGGATTCGATCACATGTGCACGGCCGAGAAGGGAAGCTTCGCCT 160
CGTCCATGACTCTGCTCTGCACGCCCTGCACTACTCCAACCTGCGACGTGAACGTGTCCCTGGTCCCTCAGCGGGCTGGAG 240
AGCGTGGAGGGCGTTTTCTGTCCAGGTTGCCGAGGTTGAGTGCAACGAGACCATTTCCTCCGATCAGATATTTGGAGTG 320
CACGGGACTACGGAGAACCGGACTACGGAGGATCTGACTATCTTTGCTCGCACAGGGCGAAGGGCTTGAATCCGGCTG 400
GGAGCAGAGGGCGAGCTCTCGACTGGAACCTTCTCTTCTGTTGCTGATTTATCGTGGCGGGTGGCCTGGGGAACATACTC 480
GTCTGTCTCGCTGTGGGGCTCGATAAAAGGCTGCACAACGTCAACCAATTACTTCCCTTTTGTCTCTCGCGTGGCCGATTT 560
ACTGTACGCTGTTCTGTCATGCCCTTGGGCGCGATCCCAGGCTTCTTGGGATACTGGCCATTGGAGTGGTGTGGTGTA 640
ACGTGTACGTGACGTGCGGATGTGCTGGCTTGTTCGCGAGCATAAATGCAATGTGCTTTCATCTCGTTGGGCCGGTATCTC 720
GGCATCCGGAATCCCTTTCGCGACGAGGCACACGTCCACCAACCGGATGGTCCGGCTTCAAGATAGCGGCTGTGTGGTTGCT 800
CGCCATGTTGGTCTCCAGCTCGATCACGGTTTTGGGCATAATAAATCCTCTAAACATCATGCCACGGCCGGGAGCGTGGC 880
TGATCAACAACAGAGCGTTTTTCTGTTCTGGCTCTCTGATCGCCTTCTACATACCCATGATCGTCATGGTAGCCACTTAC 960
ATTTCTGACGGTGCAGCTGCTCAGGCAAAAAGCCCGTTTCACTCGCGAATCCTGAAACGAGATCAATTCGAAAGGCTGGG 1040
AGGCAGATATTTCTCGACGAGGGCTTCTCCACCGCCACTCGACCGTGGAACCGCCACCCCTTCTGCTCGCGGTATA 1120
CGTGGAGGACTTCCGCGGTGTGCGAAGCGACAGTTTAAACCAATTAACCGCGGAGGCTCTGTGCGCTCGCAAAACATAAC 1200
AGGTGACAGGGGGCAAGTTCGGCCGCAAGTCTCAACCGCAGTTGAAATTTCCCGTGAACGGGGCGAGTAACCCGGCCGG 1280
AAGCGGAACCGGGGCGACGAGACTGGCGACGAAAGTGGATCAGGCGACGCAACCGCGGAGAAATATCGGCCGTGAAACAA 1360
GGAATTTCACTCTGAAGGCTTTGAAGCTCCAATTAACGTCACTCCCAACACCCCTGAATCTCAGGTTTCTCCCGGTAGA 1440
ACGAAGAGGAGATCGTTGGCCCGAACCGCGTTGCAACGGAGCAGAAAGCCAGCAAGGTGTTGGCCCTGGTTTTCTTCAT 1520
GTTCTGTCTGTGTTGGCCCCGTTCTTTCTACTAAACATATTTTTCGCGCGTGCCTCCGGAATGCTCGTCCCGGTACAG 1600
TGGTCAACGTGTGTCTGTGGCTCGGATACGTGTCTCCACGATCAATCCGGTCACTACACCATCTTCAATAGAACGTTT 1680
AGGGCTGCGTTTCATCAGATTTGTTGAAGTGAAGTGTTCAGGTCAGCAAGGCCGAGGCATCGTTCTAGTGACGGAGAGTGG 1760
ACGAAAACGGATGAGCCTGTGCACCCCGACCCGCTGCCATTGGTCATTAGTCTTCAGGGTACGCCGTTGTTGACGCCAA 1840
CACCGAATCCGACGGCGGCCACCGCCGCTCGGCAACCTCTACGTGACGATGATGCATCGCACGCCAACCTCCCTTAC 1920
CGTGACACTTTTCTCAACACGAGCACGATCAGAATTGTTGA 1962

```

Am5 - HT_{2β}

ATGATCGACTCGTCGACGACGACGATCGATCGCGCGGATCCACAGGCCGTGGTCGACAGCTGTTACCAGGATCTTTT 80
GCTGTTGGCGAACGACAGCAGCGCGCTTTGCAACGGATCAGGAGGATTGGACGTA CTGAACGACACCGTCGATCTAGAGA 160
TTGACCCGGTGAACGGGACACGGTTGGACGTTGACGGATTGAACAATTGGTGGGCGATGCTCGCCTTGGTCCCTGGTGTG 240
GGCACAGCAGCCGGCAATATTTTGGTGTGCTTGGCCATTGCCAGGGAGAGGAGATTGCAGAACGTCAACCAATTATTTCTT 320
GATGAGCTTGGCGATCACGGATCTGCTCGTAGCCGTGCTTGTAAATGCCTCTTGAATACTCACTTTGGTCAGAGGATATT 400
TCCCTCTGCCGTCACTTTACTGCCCTCGCTTGGATCTGCCTGGATGTAATTTATATGCACAGCGAGCATCATGCACTTGTGC 480
ACCATAAGCGTGGACCGATACCTCAGTCTACGGTATCCCATGAAATTCGGTCGGAATAAGACGAGGCGGGCGGTTCATGTT 560
GAAAATCAGCTTCTGCTGGGTTCTCAGCATCGCGATGAGTTTGCCTCAGTCTGATGTACTCGAAGGAGGACGACTCGG 640
TGCTGGTGGACGGTGCCTGTCAAATACCGGATCCCTGTACAAGTTGATCGGCAGCATAATCTGCTTTTACATAACGTTG 720
GGCGTGATGCTGCTTACGTACGCGTTGACAGTGAGATTGCTGGCGAAACAGCAACAGAATATAGGAGGAACTACTGTTG 800
GTCCTCCGGATGGCTGGGTGGCCCGCAGGGCCCATCTTTCGGGAGGGCTGGACAGGAAAGGCACGTGGAAGCGATTTCTGT 880
TGAGCAAAAGCCCCGGCGGAAGCGGCGGTACACCCGACGACACTTCCGGCACATCGACAGACACCGAGCTGACGACACTG 960
GACACTCACGAACCTTGGCTTCCGAAAGCGAGCCGCCGCCCTCGGCCATGTTCCGCCCTTACGCTTTTCGGCGCAGAGAT 1040
GCTCAAGTTGTCGAGGGGCTGGAGGGTATCACCCAGCCCTGGAAGCCCTATGGGCACACCGAGATCCACGCCCTCAACACT 1120
CGATCCAGCAACATCAGCATCAGCAACAGTCCGACAGGTGCAGCTTCCGTACCGGGAGCGGGGAGAGCGGGCGGGAGCAGC 1200
GCTTCCGGTCCAGGACGAGCCTCTCGATCCAAGAAGATCTCAGCTCGCCAACGCCGTGGAAGCATCCACGTGACGCGC 1280
GTCCACGTTCAACGAGGCTCACCTTGGAGCGGACCGAGTCCGGATCGCCGAAGACGCCCTAGGAAGCGATCGTTGAGCTTCC 1360
ACGAGCAGCCCCGTTCGGGCGTGGCTCCTCCGTTTCGAGGAAGAGCTCCTCGAACGAGGAAACGCCGCAGAGCCGGAAG 1440
TCGAGCGACAAACAGGAGGGTGAGATCGCCCTCCCGCCCGCTGCACGTGCCATACTTCCGGCGAGTCGTGCTCGAGGAG 1520
ACCCCGCCCCAACCTTCTACCGAGATCGTGATCGTTCCAGCGCACGATGAGGCCGATCTCGGGCAAGAACCTCGAGG 1600
CGGCTTCTTGGGAAGGAGCAACAGCGGCAGGATGGAGGGCAGCAGAAGCTACGAGCTGAATTCCGTTGTCAGTGGAGA 1680
GGGTGCAGGAGAGGGTCTAGTTTGGGAGGAAGCAGAGGACCAGCCTGCTGACGTCGAGGCCAGCCCCGATCCGCCCGC 1760
GGCGACGATGCGTGCCCAACAAGGGCCGCGAGCCTCGGCTCGAGGCAAAGCAGCAATTCGTGCTCCCATGCCCCACA 1840
GATACCAAAACGACAGTACGCAGCCCACTCGAGGACGAGCAGCGTGGTGTCCCGGAACAGCTCGCGCCACGGTTCGGATC 1920
ATCAGGCTCGAGCAGAAGGCCACCAAGGTGCTCGGGGTGGTGTCTTTCACGTTGCTCATACTGTGGGCGCCGTCTTCTCGT 2000
TCTCAACCTGATCCAGCCGTGTGCCCCAACTGCGAGAGACAAATCGACCACAAGATATTGACCTGGCCACCTGGCTGG 2080
GCTACGCCAGCTCCATGGTGAACCCCATCTTCTACACCATCTTCAACAAGGTGTTGAGACAAGCGTTCAAGAAGGTGTTG 2160
CTCTGCAGGTACAGGAATCAAACGTGGAGACCGTCCAGGTAG 2202

Übersicht über die verwendeten Oligo-Nukleotide

Primer:

- Am5-HT ₁ -		
Name	Sequenz (in 5'-3'-Richtung)	Verwendungszweck
5-HT1aKF	TTGAATTCATGGAGGAACACGTGAACCAG	Amplifizieren der vollständigen
Am5HT1ARev	TTTAAATCCACTGTCAGCG	Am5- <i>ht</i> ₁ -cDNA
5ht1Exfor	TTTAAGCTTCCACCATGGAGGAACACGTGAACC	Amplifizieren der Am5- <i>ht</i> ₁ -cDNA
5ht1Exrev	TTTGAATTCGCGAATTATCCTGGAACCACC	zur Herstellung eines Expressionskonstruktes
am5HT1_CL3_for	TTTGAATTCGGAACCATTGTGCAGCC	Amplifizieren der CPL3 der
am5HT1_CL3_rev	TTTAAGCTTTTAGGTGACCGTGGTCGATTG	Am5- <i>ht</i> ₁ -cDNA

- Am5-HT _{2α} -		
Name	Sequenz (in 5'-3'-Richtung)	Verwendungszweck
Am5HT2KF	TTTGAATTCATGGAGGGGGATCTGATC	Amplifizieren der vollständigen
am5HT2rev1	TCAACAATTCTGATCGTGCC	Am5- <i>ht</i> _{2α} -cDNA
Am5HT2_Ex_for	TTTGCTAGCCACCATGGAGGGGGATCTGATCG	Amplifizieren der Am5- <i>ht</i> _{2α} -cDNA
Am5HT2_Ex_rev	TTTGAATTCACAATTCTGATCGTGCTCG	zur Herstellung eines Expressionskonstruktes
am5HT2_CL3_for	TTTGAATTCGAGATCAATCCGAAGG	Amplifizieren der CPL3 der
am5HT2_CL3_rev	TTTAAGCTTTTATTCACGGCCGATATCTC	Am5- <i>ht</i> _{2α} -cDNA

- Am5-HT _{2β} -		
Name	Sequenz (in 5'-3'-Richtung)	Verwendungszweck
am17start1	CGATTTACCCAGAGAGGACC	
am17start2	CGTATTCACGCAGATGCC	Amplifizieren der vollständigen
am17stop1	CCCTGGTGACAGCGATCC	Am5- <i>ht</i> _{2β} -cDNA
am17stop2	CGCTTTCCCTGGAAGTCG	

weitere Oligo-Nukleotide:

für die Herstellung eines HA-Tags (Expressionskonstrukte Am5-HT₁/Am5-HT_{2α}):

5ht1HAfor: 5'-AAAGAATTCACCCATACGACGTCCCAGACTACGCTTAAGCGGCCGCTTTTT-3'

5ht1HArev: 5'-AAAAAGCGGCCGCTTAAGCGTAGTCTGGGACGTCGTATGGGTAGAATCTTT-3'

für die Klonierung der CPL2 des Am5-HT_{2α}-Rezeptors:

am5HT2_CL2_for: 5'-TTTGAATTCCTGGGCCGGTATCTCGGCATCCGGAATCCTTTGCGGACGAGGCACAC
GTCCACCAAACGGATGTAAGCTTTTT-3'

am5HT2_CL2_rev: 5'-AAAAAGCTTTTACATCCGTTTGGTGGACGTGTGCCTCGTCCGCAAAGGATTCCGGA
TGCCGAGATACCGGCCCAAGAATTCAAA-3'

Lebenslauf

PERSÖNLICHE INFORMATIONEN

Name	Markus Thamm
Geburtsdatum	26. Mai 1982
Geburtsort	Borna

WISSENSCHAFTLICHER WERDEGANG

12/2006 - 11/2009	Promotionsstudium im Fach „Molekulare Zoophysologie“ am Institut für Biochemie und Biologie der Universität Potsdam Stipendiat des Graduiertenkollegs 837 „Functional Insect Science“
10/2005 - 07/2006	Diplomarbeit zum Thema: „Molekularbiologische Untersuchungen zur Phylogenie und Taxonomie von <i>Stentor</i> OKEN 1815 (Heterotrichea, Ciliophora)“
10/2001 - 07/2006	Studium der Biologie an der Universität Leipzig Abschluss: Diplom-Biologe

ZIVILDienst

10/2000 - 08/2001	Zivildienst bei der Stadt Lucka
-------------------	---------------------------------

SCHULAUSSBILDUNG

08/1992 - 07/2000	Wiprecht-Gymnasium Groitzsch Abschluss: Abitur
09/1988 - 07/1992	Grundschule, POS „Clara Zetkin“ Groitzsch

Publikationen

Thamm M, Schmidt SL, Schlegel M, and Bernhard D „Insights into the phylogeny of the genus *Stentor* (Heterotrichea, Ciliophora) with special emphasis on the evolution of the macronucleus based on SSU rDNA data“ *in preparation*

Thamm M, Balfanz S, Scheiner R, Baumann A, and Blenau W „Characterization and localization of the 5-HT1 receptor of the honeybee (*Apis mellifera*) - Involvement in the regulation of phototactic behavior“ *in preparation*

Thamm M, Baumann A, and Blenau W „Molecular and pharmacological Characterization of two 5-HT2 receptors of the honeybee (*Apis mellifera*)“ *in preparation*

Tagungsbeiträge

Thamm M, Schleenstedt J, Blenau W. (2007) „Molecular and Pharmacological Characterization of Honeybee (*Apis mellifera*) Serotonin Receptors.“ *20. Tagung der Deutschsprachigen Sektion der IUSSI*

Thamm M, Blenau W. (2008) „Honeybee (*Apis mellifera*) serotonin receptors - characterization of full length receptors and truncated splice variants.“ *ICE2008, Abstract-No. 0741*

Teilnahme an nationalen und internationalen Konferenzen

05.05. - 06.05.2007	Entwicklung und Plastizität des Insektennervengehirns, Rauschholzhausen
26.09. - 28.09.2007	20. Tagung der Deutschsprachigen Sektion der International Union for the Study of Social Insects (IUSSI), Schwerte
26.04. - 27.04.2008	Entwicklung und Plastizität des Insektennervengehirns, Rauschholzhausen
06.07. - 12.07.2008	International Congress of Entomology 2008, Durban, Südafrika
16.05. - 17.05.2009	Entwicklung und Plastizität des Insektennervengehirns, Rauschholzhausen
09.10. - 12.10.2009	1st Central European Meeting of the International Union for the Study of Social Insects (IUSSI), München

Ich sage Danke!

Ich danke PD Dr. Wolfgang Blenau für die Überlassung dieses überaus interessanten Themas sowie seine ständige Bereitschaft mich zu unterstützen!

Ich danke Prof. Dr. Arnd Baumann, Prof. Dr. Gerd Bicker und Prof. Dr. Joachim Erber für die Bereitschaft zur Begutachtung dieser Arbeit! Ein besonderer Dank gilt Prof. Dr. Arnd Baumann für die Kooperation auf dem Gebiet der Zellkultur! Ausserdem danke ich Prof. Dr. Joachim Erber und PD Dr. Ricarda Scheiner für die Möglichkeit der Durchführung und die Unterstützung bei den Verhaltensexperimenten!

Ich danke der gesamten AG Zoophysiologie für tolle drei Jahre und super Arbeitsklima! Ich danke besonders Lennart und Kristoffer! Ohne Euch wäre es nur halb so schön gewesen!

Ich danke allen Mitgliedern des Graduiertenkollegs „Functional Insect Science“ für die zahlreichen und angenehmen Symposien, Vorträge und Seminare!

Ich danke ganz besonders meiner Familie, die immer alles dafür getan hat damit ich meinen Weg gehen kann! Ich danke meinen Freunden, die immer für mich da waren!

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, die vorliegende Dissertation selbstständig, ohne die Hilfe Dritter und nur mit den angegebenen Quellen und Hilfsmitteln angefertigt zu haben. Diese Arbeit hat in gleicher oder ähnlicher Form noch keiner anderen Hochschule vorgelegen.

Potsdam, den 07.10.2009

Markus Thamm