

Institut für Biochemie und Biologie

Arbeitsgruppe Zoophysiologie

Molekulare und pharmakologische Charakterisierung
von Serotonin-Rezeptoren der Honigbiene
Apis mellifera

- D i s s e r t a t i o n -

zur Erlangung des akademischen Grades

„doctor rerum naturalium“

(Dr. rer. nat.)

in der Wissenschaftsdisziplin „Zoophysiologie“

eingereicht an der
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Universität Potsdam

von

Jana Schlenstedt

Potsdam, im Dezember 2005

Zusammenfassung

Die Honigbiene *Apis mellifera* gilt seit langem als Modell-Organismus zur Untersuchung von Lern- und Gedächtnisvorgängen sowie zum Studium des Sozialverhaltens und der Arbeitsteilung. Bei der Steuerung und Regulation dieser Verhaltensweisen spielt das Indolalkylamin Serotonin (5-Hydroxytryptamin, 5-HT) eine wesentliche Rolle. Serotonin entfaltet seine Wirkung durch die Bindung an G-Protein-gekoppelte Rezeptoren (GPCRs). In der vorliegenden Arbeit wird der erste Serotonin-Rezeptor aus der Honigbiene molekular charakterisiert.

Durch die Anwendung zwei verschiedener Klonierungsstrategien konnten drei cDNA-Sequenzen isoliert werden, die für potentielle Serotonin-Rezeptoren kodieren. Die Sequenzen weisen die größte Ähnlichkeit zu dem 5-HT₇- und 5-HT₂-Rezeptor von *Drosophila melanogaster* bzw. dem 5-HT₁-Rezeptor von *Panulirus interruptus* auf. Die isolierten Serotonin-Rezeptoren der Honigbiene wurden dementsprechend Am(*Apis mellifera*)5-HT₁, Am5-HT₂ und Am5-HT₇ benannt.

Das Hydropathieprofil des Am5-HT₁-, Am5-HT₂- und Am5-HT₇-Rezeptors deutet auf das Vorhandensein des charakteristischen heptahelikalen Aufbaus G-Protein-gekoppelter Rezeptoren hin. Die abgeleiteten Aminosäuresequenzen zeigen typische Merkmale biogener Amin-Rezeptoren. Aminosäuren, die eine Bedeutung bei der Bildung der Liganden-Bindungstasche, der Rezeptor-Aktivierung und der Kopplung eines G-Proteins an den Rezeptor haben, sind in allen drei Rezeptoren konserviert. Interessanterweise ist jedoch das in den meisten biogenen Amin-Rezeptoren vorhandene „DRY“-Motiv in dem Am5-HT₂- und Am5-HT₇-Rezeptor nicht konserviert. Das Vorhandensein einer PDZ-Domäne in dem Am5-HT₁- und Am5-HT₇-Rezeptor lässt vermuten, dass diese Rezeptoren als Adapterproteine fungieren, die Signalmoleküle zu einem Signaltransduktionskomplex vereinigen.

RT-PCR-Experimente zeigen die Expression der Rezeptoren in verschiedenen Geweben der Honigbiene. Auffallend ist die hohe Expression im Zentralgehirn. Des Weiteren konnte die Expression der Serotonin-Rezeptoren in den optischen Loben, Antennalloben sowie in der Peripherie, d.h. in der Flugmuskulatur und den Malpighischen Gefäßen nachgewiesen werden. Durch *in situ* Hybridisierungen wurde die Expression in Gefrierschnitten von Gehirnen adulter Sammlerinnen im Detail untersucht. Transkripte der Rezeptoren sind in den Somata von intrinsischen Pilzkörperzellen, Neuronen der optischen Loben und Neuronen der Antennalloben vorhanden.

In einem heterologen Expressionssystem wurde der intrazelluläre Signalweg des Am5-HT₇-Rezeptors untersucht. Die Aktivierung des stabil exprimierten Rezeptors durch Serotonin

führt zur Bildung von cAMP. Der 5-HT₇-Rezeptor spezifische Agonist 5-CT zeigt eine mit Serotonin vergleichbare Fähigkeit, die intrazelluläre cAMP-Konzentration zu erhöhen. Am5-HT₇ gehört daher funktionell zu der Gruppe der 5-HT₇-Rezeptoren. Der EC₅₀-Wert von 1,06 nM (5-HT), ist im Vergleich zu anderen 5-HT₇-Rezeptoren äußerst niedrig. Des Weiteren wurde gezeigt, dass das basale cAMP-Niveau in den transfizierten Zellen im Vergleich zu nicht transfizierten Zellen deutlich erhöht ist. Das heißt, dass der Rezeptor auch in der Abwesenheit eines Liganden aktiv ist. Diese konstitutive Aktivität ist auch von anderen biogenen Amin-Rezeptoren bekannt. Methiothepin wurde als wirksamer inverser Agonist des Am5-HT₇-Rezeptors identifiziert, da es in der Lage ist, der konstitutiven Aktivität entgegenzuwirken.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde ein polyklonaler Antikörper gegen den Am5-HT₇-Rezeptor hergestellt (anti Am5-HT₇). Dieser detektiert im Homogenat von Bienengehirnen, kultivierten Kenyon-Zellen sowie in transfizierten HEK 293-Zellen die glykosylierte Form des Rezeptors mit einer Molekularmasse von ≈ 66 kDa.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit deuten darauf hin, dass die Serotonin-Rezeptoren in verschiedenen Regionen des ZNS der Honigbiene an der Informationsverarbeitung beteiligt sind. Es kann eine Beeinflussung von Lern- und Gedächtnisprozessen sowie des olfaktorischen und visuellen Systems durch diese Rezeptoren vermutet werden. Mit der Klonierung und funktionellen Charakterisierung des ersten Serotonin-Rezeptors der Honigbiene ist eine Grundlage für die Untersuchung der molekularen Mechanismen der serotonergen Signaltransduktion geschaffen worden.

Abstract

The honeybee *Apis mellifera* is a model organism for studying insect division of labor, learning and memory. An important substance that has been implicated in the control and regulation of these phenomena is the indolalkylamine serotonin (5-hydroxytryptamine, 5-HT). Pharmacological and functional studies indicate, that serotonin activates various receptor subtypes which predominantly belong to the family of G protein-coupled receptors (GPCRs). This work describes the first serotonin receptor of the honeybee.

Using a homology based screening approach on a brain-specific cDNA library of the honeybee and a PCR-based strategy three cDNAs encoding putative serotonin receptors were isolated. The deduced amino acid sequences of these putative serotonin receptors show the highest homology to a 5-HT₇ and a 5-HT₂ receptor from *Drosophila melanogaster* and a 5-HT₁ receptor from *Panulirus interruptus*.

The distribution of the 5-HT receptor mRNAs in several tissues of the honeybee by RT-PCR was studied. The analysis revealed a high amount of all three receptors in the central brain. Additionally the expression of the receptors was shown in the optic lobes, the antennal lobes and the flight muscles and the Malpighian tubules. By using in situ-hybridization the receptor encoding mRNAs in cryostat sections of honeybee brain was detected. The receptor transcripts were proven in neurons of the optic lobes, intrinsic mushroom body neurons, and deutocerebral neurons.

In HEK 293 cell lines, stably expressing the 5-HT₇ receptor protein, the intracellular signalling pathway was investigated. When activated by serotonin, the 5-HT₇ receptor induces an increase in intracellular cAMP level. 5-CT, a specific agonist for mammalian 5-HT₇-receptors, showed a similar ability to activate the adenylyl cyclase. Furthermore, Am5-HT₇ causes a significant increase in the non-agonist stimulated cAMP levels relative to those of non-transfected cells. Therefore, the Am5-HT₇ receptor displays agonist-independent activity which has been also demonstrated for other GPCRs. Methiothepin was shown to act as a inverse agonist on the Am5-HT₇ receptor.

A specific affinity-purified anti-Am5-HT₇ antibody detects a protein band of 66 kDa in homogenates of honeybee brains, cultured Kenyon cells and HEK 293 cells expressing the Am5-HT₇ receptor. This represents the glycosylated form of the receptor protein.

The results of this work suggest an role of the serotonin receptors in the processing of information in different areas in the honeybee brain. One may conclude, that the receptors play a role in learning and memory and have an influence on the olfactory and visual system. The cloning and functional characterization of the first serotonin receptor of the honeybee is a basis for the studie of the molecular mechanisms of the serotonergic signal transduction.

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	i
Abbildungsverzeichnis	iv
Abkürzungsverzeichnis	vi
1 Einleitung	1
1.1 Die Honigbiene als Modellorganismus	1
1.2 Bedeutung von biogenen Aminen in der Honigbiene	3
1.3 G-Protein-gekoppelte Rezeptoren	5
1.3.1 Struktur G-Protein-gekoppelter Rezeptoren	5
1.3.2 Aktivierung G-Protein-gekoppelter Rezeptoren	6
1.3.3 Inaktivierung G-Protein-gekoppelter Rezeptoren	8
1.3.4 Liganden- und G-Protein-unabhängige Aktivierung	9
1.4 Serotonin-Rezeptoren	10
1.4.1 Bedeutung der Serotonin-Rezeptoren in Vertebraten	11
1.4.2 Serotonin-Rezeptoren in Insekten	11
1.5 Fragestellung	13
2 Material und Methoden	14
2.1 Chemikalien und Geräte	14
2.2 Molekularbiologische Methoden	15
2.2.1 Agarosegelelektrophorese	15
2.2.2 DNA-Extraktion aus Agarosegelen	15
2.2.3 Restriktion	16
2.2.4 Ligation	16
2.2.5 Transformation in <i>E. coli</i>	16
2.2.6 Isolierung von Plasmid-DNA	17
2.2.7 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	18

2.2.8	PCR mit degenerierten Primern	18
2.2.9	RT-PCR („Reverse Transcription PCR“)	19
2.2.10	Herstellung von cDNA durch „random priming“	19
2.2.11	Herstellung radioaktiv markierter Sonden	20
2.2.12	Durchmustern einer cDNA Bibliothek	20
2.2.13	„In vivo excision“	21
2.2.14	<i>in situ</i> -Hybridisierung	21
2.3	Biochemische Methoden	23
2.3.1	Methoden zur Bestimmung der Proteinkonzentration	23
2.3.2	SDS-PAGE nach Laemmli	24
2.3.3	Westernblot	24
2.3.4	Immundetektion	25
2.3.5	Präabsorption	26
2.3.6	Expression von Fusionsproteinen	26
2.3.7	Reinigung von Fusionsproteinen mittels Amylose-Säulenchromatographie	27
2.3.8	Reinigung von Fusionsproteinen mittels Nickel-NTA-Säulenchromatographie	27
2.3.9	Herstellung polyklonaler Antisera	28
2.3.10	Affinitätschromatografie polyklonaler Antikörper	28
2.3.11	Kultivierung von Pilzkörperzellen	29
2.4	Heterologe Expression in HEK 293-Zellen und Funktionalitätsnachweis	29
2.4.1	Konstruktion eines Expressionsvektors	29
2.4.2	Herstellung stabiler Zelllinien	30
2.4.3	Präparation von Membranproteinen	30
2.4.4	Deglykosylierung von Membranproteinen	31
2.4.5	cAMP Assay	31
2.5	Bioinformatische Analysen	31
3	Ergebnisse	33
3.1	Der Am5-HT ₇ -Rezeptor	33
3.1.1	Isolierung der Am5- <i>ht7</i> cDNA	33
3.1.2	Strukturelle Eigenschaften der Am5- <i>ht7</i> cDNA und Organisation des Am5- <i>ht7</i> -Gens	34
3.1.3	Eigenschaften der abgeleiteten Aminosäuresequenz	35
3.1.4	Expressionsmuster des Am5- <i>ht7</i> Gens	41
3.1.5	Immunologischer Nachweis des Am5-HT ₇ -Proteins auf Westernblots	42

3.1.6	Funktionelle Expression des Rezeptorproteins in HEK 293 Zellen . .	44
3.2	Der Am5-HT ₂ -Rezeptor	49
3.2.1	Isolierung der Am5- <i>ht2</i> cDNA	49
3.2.2	Genomische Organisation und trunkierte Varianten des Am5- <i>ht2</i> - Gens	51
3.2.3	Eigenschaften der abgeleiteten Aminosäuresequenz	53
3.2.4	Expressionsmuster des Am5- <i>ht2</i> -Gens	56
3.3	Der Am5-HT ₁ -Rezeptor	57
3.3.1	Isolierung der Am5- <i>ht1</i> cDNA	57
3.3.2	Genomische Organisation des Am5- <i>ht1</i> -Gens	59
3.3.3	Eigenschaften der abgeleiteten Aminosäuresequenz	60
3.3.4	Expressionsmuster des Am5- <i>ht1</i> -Gens	61
4	Diskussion	63
4.1	Genomische Organisation der 5-HT-Rezeptoren	64
4.2	Eigenschaften der Aminosäuresequenz	67
4.3	Expressionsmuster der Serotonin-Rezeptoren	71
4.4	Funktionelle Charakterisierung des Am5-HT ₇ -Rezeptors	74
4.5	Mögliche Funktionen der Serotonin-Rezeptoren in der Honigbiene	77
4.6	Ausblick	80
A	Literaturverzeichnis	I
5	Anhang	XIX
5.1	Verwendete Primer	XX

Abbildungsverzeichnis

1.1	Aufbau des Bienenhirns	2
1.2	Biosynthese von Serotonin	3
1.3	Topographie G-Protein-gekoppelter Rezeptoren	6
1.4	Intrazelluläre Signalwege G-Protein-gekoppelter Rezeptoren	7
1.5	Effektoren G-Protein-gekoppelter Rezeptoren	9
3.1	Nukleinsäuresequenz des Am5- <i>ht7</i> -cDNA-Klons	34
3.2	Genomische Organisation des Am5- <i>ht7</i> -Gens	35
3.3	Hydrophathieprofil der abgeleiteten AS-Sequenz des Am5-HT ₇ -Rezeptors	36
3.4	Abgeleitete Aminosäuresequenz der Am5- <i>ht7</i> -cDNA	37
3.5	Aminosäuresequenz-Alignment von 5-HT ₇ -Rezeptoren	39
3.6	Dendrogram	40
3.7	Expression von Am5-HT ₇ in verschiedenen Geweben von <i>Apis mellifera</i>	41
3.8	<i>In situ</i> -Hybridisierung der Am5- <i>ht7</i> -„antisense“-Sonde	42
3.9	Immunologischer Nachweis des Am5-HT ₇ -Proteins	43
3.10	Immunologischer Nachweis des Am5-HT ₇ -Proteins in Membranproteinen transfizierter Zellen	44
3.11	Immunhistochemischer Nachweis von Am5-HT ₇ in HEK 293-Zellen	45
3.12	Stimulierung des Am5-HT ₇ -Rezeptors mit Agonisten	46
3.13	Dosis-Wirkungskurve des Am5-HT ₇ -Rezeptors	47
3.14	Einfluss von Antagonisten auf den Am5-HT ₇ -Rezeptor	48
3.15	Nukleotid- und abgeleitete Aminosäuresequenz der Am5- <i>ht2</i> -cDNA	50
3.16	Genomische Struktur und trunkierte Varianten von Am5- <i>ht2</i>	51
3.17	Spleiß-Übergänge der Am5- <i>ht2tr_a</i>	52
3.18	Vergleich der Spleißstelle von Dm5-HT ₂ und Am5- <i>ht2</i>	53
3.19	Hydrophathieprofil der abgeleiteten AS-Sequenz des Am5-HT ₂ -Rezeptors	54
3.20	Aminosäure-Sequenzvergleich von 5-HT ₂ -Rezeptoren	55
3.21	Expression von Am5-HT ₂ in verschiedenen Geweben von <i>Apis mellifera</i>	56

3.22 <i>In situ</i> -Hybridisierung der Am5- <i>ht2</i> -„antisense“-Sonde	57
3.23 Nukleotid- und abgeleitete Aminosäuresequenz der Am5- <i>ht1</i> -cDNA	58
3.24 Genomische Organisation des Am5- <i>ht1</i> -Gens	59
3.25 Hydropathieprofil der abgeleiteten AS-Sequenz des Am5-HT ₁ -Rezeptors . .	60
3.26 Expression von Am5-HT ₁ in verschiedenen Geweben von <i>Apis mellifera</i> . .	61
3.27 <i>In situ</i> -Hybridisierung der Am5- <i>ht1</i> -„antisense“-Sonde	62

Abkürzungsverzeichnis

5-CT	5-Carboxamidotryptamine
5-HT	5-Hydroxytryptamin, Serotonin
APS	Ammoniumpersulfat
ARF	ADP-ribosylation factor
AS	Aminosäure
ATP	Adenosintriphosphat
bp	Basenpaare
cDNA	komplementäre DNA
DAG	Diacylglycerol
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DTT	Dithiothreitol
E. coli	<i>Escherichia coli</i>
ECL	' <i>enhanced chemiluminescence</i> '
EDTA	Ethylendiamin-Tetraessigsäure
ER	Eppendorfreaktionsgefäß
G-Protein	Guanin-Nukleotid-bindendes Protein
GPCR	' <i>G protein-coupled receptor</i> ', G-Protein-gekoppelter Rezeptor
His6	Hexa-Histidin
HPLC	' <i>high-performance liquid chromatography</i> ', Hochdruckflüssigkeitschromatographie
HRPO	' <i>Horseradish Peroxidase</i> ', Meerrettich-Peroxidase
IP ₃	Inositol-1,4,5-triphosphat
IPTG	Isopropyl-Thio-D-Galaktopyranosid
kb	Kilobasenpaare
LSD	Lysergsäurediethylamid
MBP	Maltose-Bindeprotein
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PBS	' <i>phosphate buffered saline</i> ', Phosphat gepufferte Saline

PCR	Polymerasekettenreaktion
PDZ	PSD-95/Disc-large/Zonula occludens-1
PIP ₂	1-Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat
PKC	Proteinkinase C
rpm	' <i>rounds pro minute</i> ', Umdrehungen pro Minute
SDS	' <i>sodium dodecyl sulfate</i> ', Natrium-Dodecyl-Sulfat
TBST	' <i>tris buffered saline plus triton</i> ', Phosphat gepufferte Saline plus Triton
TEMED	Tetramethyldiamin
TM	Transmembrandomäne
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-Aminomethan
U	Units
Vol.	Volumen
ZNS	Zentrales Nervensystem

Kapitel 1

Einleitung

1.1 Die Honigbiene als Modellorganismus

Die Honigbiene verfügt als soziales Insekt über eine Reihe komplexer Verhaltensweisen. Hierzu zählen insbesondere die sozialen Interaktionen innerhalb einer Kolonie (Page und Erber, 2002), sowie die Lern- und Gedächtnisvorgänge (Hammer, 1997). Honigbienen lernen schnell, aus einer großen Zahl unterschiedlicher Blüten effektiv Pollen und Nektar zu sammeln. Sie betreiben Brutpflege und organisieren flexibel die Verteilung verschiedenster Aufgaben im und außerhalb des Bienenstocks (von Frisch, 1967). Zu ihren weiteren Fähigkeiten zählen die Informationsweitergabe über die Bedürfnisse der Kolonie und die Verständigung über Ort und Qualität einer entfernten Nahrungsquelle durch den Schwänzeltanz. Landschaftsmerkmale zwischen dem Bienenstock und den Futterstellen werden für jede neue Nahrungsquelle erlernt und während des Flugs in der richtigen Reihenfolge wieder abgerufen. Ebenso wird die genaue Lage des Stockeingangs in Verbindung mit Landmarken erlernt (Menzel und Müller, 1996).

Lernen und Gedächtnis spielen für die komplexen Verhaltensweisen der Honigbiene eine entscheidende Rolle. Durch das reiche Verhaltensrepertoire und das im Vergleich zu höheren Wirbeltieren relativ einfach aufgebaute Gehirn ist sie zum Modellorganismus für das Studium der neuronalen Mechanismen von Verhaltensreaktionen geworden (Giurfa, 2003).

Das Gehirn der Honigbiene besteht aus drei Hauptregionen: dem Protocerebrum, dem Deutocerebrum und dem Tritocerebrum. Im Protocerebrum befinden sich die optischen Loben (Lamina, Medulla und Lobula), die Pilzkörper und der Zentralkomplex (siehe Abb. 1.1). Die optischen Loben erhalten und verarbeiten Informationen des Komplexauges. Die symmetrisch angeordneten Pilzkörper werden von etwa 170.000 dicht gepackten Nervenzellen gebildet (= Kenyon-Zellen, nach Kenyon, 1896). Ihre lateralen und medialen

Calyces erhalten optische, olfaktorische und mechanische Informationen. Die Axone der Kenyon-Zellen ziehen durch den Pedunculus und teilen sich dann in zwei Äste auf, die in den α - und β -Loben enden. Dies sind die Output-Regionen der Pilzkörper (Menzel *et al.*, 1994). Die im Deutocerebrum befindlichen Antennalloben erhalten olfaktorische Informationen von den olfaktorischen Rezeptoren der Antennen. Die Dorsalloben sind das mechanosensorische und motorische Zentrum der Antennen.

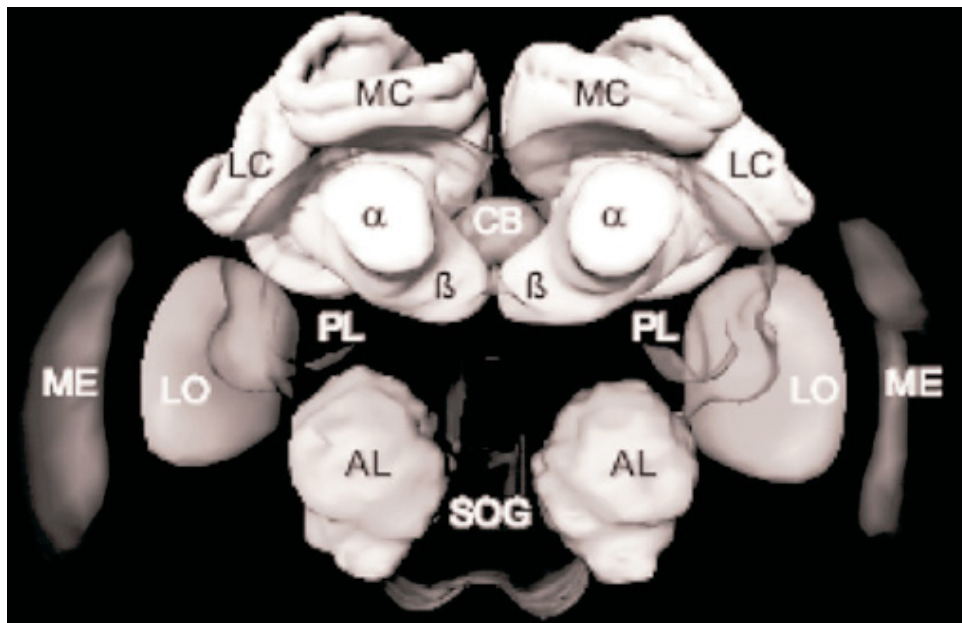


Abbildung 1.1: **Dreidimensionale Rekonstruktion des Gehirns der Honigbiene (aus Giurfa, 2003)**. Verschiedene Neuropile sind markiert: ME = Medulla; LO = Lobula; AL = Antennalloben; PL = protocerebrale Loben; SOG = suboesophageales Ganglion; CB = Zentralkomplex. Die große helle Region in der Mitte des Bildes stellt die Pilzkörper dar. Jeder Pilzkörper besteht aus: der lateralen (LC) und medianen (MC) Calyx, dem Pedunculus und dem α - und β -Lobus.

Unabhängig von der Art der wahrgenommenen Information (olfaktorisch, optisch, mechanisch) ist der Mechanismus der Weiterleitung an die verschiedenen Gehirnareale identisch. Eine spezialisierte Zelle (Sensor) nimmt den Reiz auf und wandelt ihn in elektrische Potentiale um (Aktionspotentiale). Der Informationsaustausch zwischen Neuronen erfolgt überwiegend durch die Umwandlung des elektrischen in ein chemisches Signal, bei dem es zur Freisetzung von chemischen Botenstoffen aus dem erregten Neuron kommt.

Die Bindung des Botenstoffs an spezifische Rezeptorproteine, die in der Zellmembran der Zielzellen lokalisiert sind, führt zu einer elektrischen oder biochemischen Antwort in der Zielzelle. Botenstoffe können Monoamine, Neuropeptide, Aminosäuren oder auch Gase sein. Eine Gruppe von Substanzen, die in der Honigbiene und anderen Insekten als

Botenstoffe eine wesentliche Rolle spielen und deren modulatorische Wirkung bei Lern- und Gedächtnisvorgängen sowie bei der Arbeitsteilung gut untersucht sind, stellen die biogenen Amine dar (Mercer und Menzel, 1982; Bicker, 1999).

1.2 Bedeutung von biogenen Aminen in der Honigbiene

Biogene Amine sind kleine organische Verbindungen, die durch enzymatische Decarboxylierung aus Aminosäuren entstehen (siehe Abb. 1.2 am Beispiel von Serotonin). Die biogenen Amine Dopamin, Serotonin und Histamin wirken sowohl in Vertebraten als auch Invertebraten als Neurohormone, Neurotransmitter und Neuromodulatoren (Roeder, 2002). Adrenalin und Noradrenalin, bedeutende Neurotransmitter in Vertebraten, sind zwar in geringen Mengen in einigen Insekten nachgewiesen worden, eine physiologische Rolle konnte ihnen jedoch bisher nicht zugeschrieben werden. In Invertebraten sind Adrenalin und Noradrenalin vermutlich durch zwei strukturell verwandte Monoamine, Oktopamin und Tyramin, funktionell ersetzt.

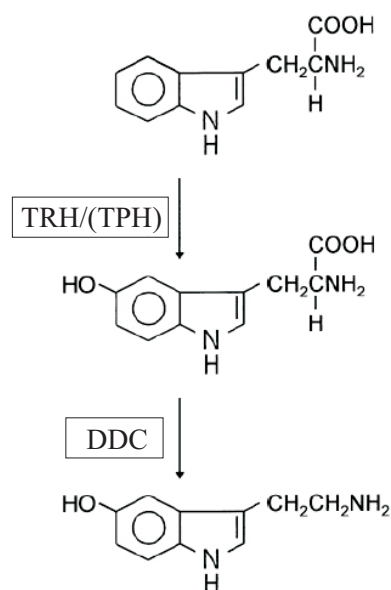


Abbildung 1.2: **Biosynthese des Indolalkylamins Serotonin.** L-Tryptophan wird durch die Tryptophan-Hydroxylase (TRH) zu 5-Hydroxytryptophan hydroxyliert. In *Drosophila melanogaster* wurde nachgewiesen, dass die Hydroxylierung ebenso durch die Tryptophan-Phenylalanin-Hydroxylase (TPH) erfolgen kann (Coleman und Neckameyer, 2005). 5-Hydroxytryptophan wird durch die DOPA Decarboxylase (DDC) zu Serotonin decarboxyliert.

Seit dem ersten Nachweis von biogenen Aminen im Gehirn der Honigbiene (Elofsson

und Klemm, 1972) ist eine Vielzahl von Arbeiten erschienen, die die Wirkung (Erber *et al.*, 1993; Erber und Kloppenburg, 1995; Pribbenow und Erber, 1996; Menzel *et al.*, 1999; Barron und Robinson, 2005) und Gewebsverteilung beschreiben (Fuchs *et al.*, 1989; Harris und Woodring, 1992; Taylor *et al.*, 1992). Im Folgendem wird genauer auf das Indolalkylamin Serotonin eingegangen.

Serotonin wurde mit Hilfe von Fluoreszenzhistochemie und HPLC (high-performance liquid chromatography) in der Honigbiene nachgewiesen (Mercer *et al.*, 1983). Es wird von einer kleinen Zahl Neurone ausgeschüttet. Ein sehr spezifischer Nachweis der Verteilung Serotonin-immunreaktiver Neuronen im ZNS der Biene gelang Schürmann und Klemm (1984). Die 75 Serotonin-immunreaktiven Zellkörper im Deuto- und Protocerebrum treten gehäuft in so genannten „*Clustern*“ auf. Die Serotonin-immunreaktiven Fasern in den Pilzkörpern sind extrinsischen Ursprungs. Autoradiographische Untersuchungen zeigten eine hohe Dichte von Bindungsstellen für radioaktiv markiertes Serotonin in den Pilzkörpern (insbesondere in den Pilzkörperkelchen) und den optischen Loben (Erber *et al.*, 1991).

In weiteren Arbeiten (Schäfer und Bicker, 1986; Seidel und Bicker, 1996) wurden mit Serotonin-Antisera Interneurone markiert, die in viele Gebiete des Bienenhirns projizieren. Dies spricht dafür, dass Serotonin, wenn es von einem einzelnen Neuron freigesetzt wird, die Aktivität großer Gehirnareale beeinflussen kann.

Serotonin ist im ZNS der Honigbiene in großen Mengen (6-21 pmol) vorhanden (Wagener-Hulme *et al.*, 1999). Die höchste Konzentration wurde in den α -Loben der Pilzkörper gefunden. Die Mengen schwanken in einzelnen Individuen abhängig von der Jahreszeit, der Kolonie, dem Alter der Biene sowie der Kaste (Harris und Woodring, 1992; Schulz und Robinson, 1999). So wiesen Taylor *et al.* (1992) in Sammlerinnen eine höhere Serotonin-Konzentration nach als in Bienen, die andere Aufgaben, wie z.B. Brutpflege, erfüllen.

In Verhaltensexperimenten reduziert Serotonin konditionierte und unkonditionierte, olfaktorische Reaktionen (Mercer und Menzel, 1982), führt zu einer verringerten Antwort des visuellen Systems (Erber und Kloppenburg, 1995) und hemmt Reaktionen auf gustatorische Reize. Weitere Untersuchungen ergaben, dass Serotonin einen Einfluss auf das Lernen und Gedächtnis hat, indem es den Erwerb und das Abrufen erlernten Verhaltens beeinträchtigt (Bicker und Menzel, 1989; Menzel und Müller, 1996). Serotonin führt also allgemein zu einer Abnahme der Empfindlichkeit und Aktivität des Nervensystems.

Die Injektion von Serotonin in die optischen Loben führt zu einer Reduktion der Rich-

tungsspezifität der Antennenreaktionen auf visuelle Reize (Kloppenburg und Erber, 1995). Pribbenow und Erber (1996) zeigten, dass Serotonin-Injektionen in den Dorsallobus die antennale Abtastsequenz signifikant reduziert. Auch die unkonditionierte Antennenreaktion auf olfaktorische und gustatorische Reize kann durch Serotonin-Injektion in Neuropile der olfaktorischen Bahn reduziert werden (Menzel *et al.*, 1994).

Serotonin entfaltet seine Wirkung durch die Bindung an spezifische Membranrezeptoren. Diese gehören zum größten Teil zur Familie der G-Protein-gekoppelten Rezeptoren.

1.3 G-Protein-gekoppelte Rezeptoren

G-Protein-gekoppelte Rezeptoren (GPCRs) stellen die größte und diverseste Gruppe der Zelloberflächen-Rezeptoren dar. Sie repräsentieren mit 1000-2000 Genen annähernd 1-5 % des Invertebraten- bzw. Vertebraten-Genoms (Bockaert und Pin, 1999). Die GPCRs werden in drei Unterfamilien eingeteilt (Strader *et al.*, 1995): die Rhodopsin-ähnlichen Rezeptoren (Klasse A), die peptidergen Rezeptoren (Klasse B) und die metabotropen Glutamat-Rezeptoren (Klasse C).

Die größte Rezeptorfamilie stellt die Klasse A dar. Rezeptoren dieser Familie bilden Gruppen, die unterschiedlichste Liganden wie biogene Amine, Peptide, Glykoproteine, Lipide, Purine, Eicosanoide, Proteasen oder Chemokine binden. Auf die Struktur dieser Rezeptoren wird im folgenden Kapitel näher eingegangen (siehe 1.3.1).

An Rezeptoren der Klasse B binden vor allem Peptidhormone wie Glucagon, Calcitonin oder Parathormon und Neuropeptide wie das Growth Hormone Releasing Hormon. Die Rezeptoren besitzen einen großen extrazellulären N-terminalen Abschnitt (100 bis 170 Aminosäurereste), der für die Ligandenbindung von Bedeutung ist (Harmar, 2001). Mitglieder der dritten und kleinsten Rezeptorfamilie im Metazoenreich sind die metabotropen Glutamat- und GABA_B-Rezeptoren (Bettler *et al.*, 2004).

1.3.1 Struktur G-Protein-gekoppelter Rezeptoren

Ungeachtet der chemischen und funktionellen Unterschiede der Botenstoffe, die an GPCRs binden, sind die Rezeptorproteine strukturell sehr ähnlich aufgebaut (Donnelly *et al.*, 1994; Hall *et al.*, 1999; Tierney, 2001; Kroeze *et al.*, 2002). Alle GPCRs bestehen aus einer einzigen Polypeptidkette, die die Plasmamembran der Zelle siebenfach durchspannt (siehe Abb. 1.3). Die sieben Transmembrandomänen (TM) werden von den hydrophoben Bereichen des Proteins gebildet. Sie sind alternierend durch drei extrazelluläre und drei intrazelluläre hydrophile Bereiche miteinander verbunden. Häufig wird eine vierte

intrazelluläre Schleife durch die Insertion von posttranslational palmitoylierten Cystein-Resten des Carboxyterminus (C-Terminus) in die Zellmembran gebildet (Jin *et al.*, 1999). Der extrazelluläre Amino-Terminus (N-Terminus) der Proteine ist häufig glykosyliert. Dadurch wird die korrekte Anordnung des Rezeptors in der Zellmembran gesichert. Der zytoplasmatische C-Terminus sowie die intrazellulären Schleifen enthalten viele Serin- und Threonin-Reste, die potentielle Phosphorylierungsstellen für Proteinkinasen wie z.B. Proteinkinase A (PKA) und Proteinkinase C (PKC) sind (Willets *et al.*, 2003).

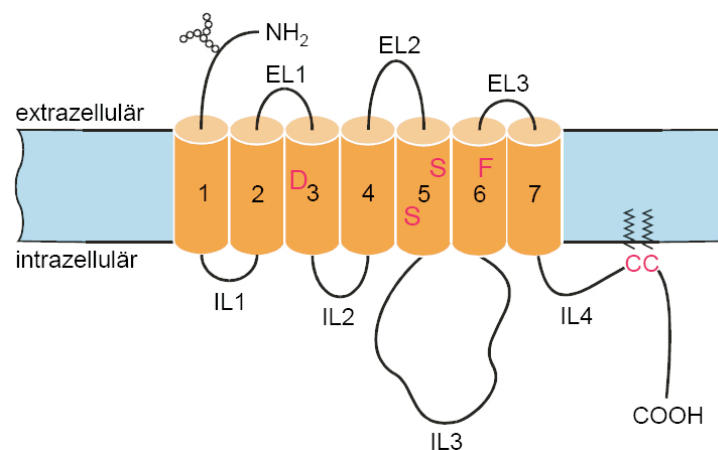


Abbildung 1.3: **Topographie eines G Protein-gekoppelten Rezeptors (aus Blenau und Baumann, 2001)**. GPCR besitzen sieben hydrophobe transmembranale Segmente (TM 1-7). Diese sind durch drei hydrophile extrazelluläre (EL 1-3) und drei intrazelluläre Schleifen (IL 1-3) verbunden. Der glykosylierte N-Terminus befindet sich auf der extrazellulären, der C-Terminus auf der intrazellulären Seite der Membran. Eine vierte intrazelluläre Schleife (IL 4) kann durch die Insertion palmitoylierter Cystein-Reste in die Plasmamembran gebildet werden.

In der Untergruppe der biogenen Amin-Rezeptoren, erfolgt die Bindung der Liganden in einer Bindetasche, die von den transmembranalen Segmenten geformt wird. Durch Mutageneseuntersuchungen wurde gezeigt, dass an der Wechselwirkung mit dem Liganden ein Asparaginsäure-Rest in TM 3, Serin-Reste in TM 5 sowie hydrophobe Aminosäure-Reste wie z.B. Phenylalanin-Reste in TM 6 beteiligt sind (siehe Abb. 1.3) (Strader *et al.*, 1995; Almaula *et al.*, 1996; Kroeze *et al.*, 2002).

1.3.2 Aktivierung G-Protein-gekoppelter Rezeptoren

GPCRs werden durch viele, chemisch und molekular sehr unterschiedliche Botenstoffe aktiviert (Probst *et al.*, 1992; Strader *et al.*, 1995; Hall *et al.*, 1999). Dazu gehören Proteine, Peptide, Aminosäuren, Fettsäurederivate, sowie Photonen und Geruchsstoffe.

Der gleiche Ligand kann verschiedene Rezeptoren einer Unterfamilie aktivieren. Ein gutes Beispiel sind die Serotonin-Rezeptoren, von denen 14 Subtypen in Säugetieren bekannt sind, 13 gehören zu der Familie der GPCRs (Hoyer *et al.*, 2002).

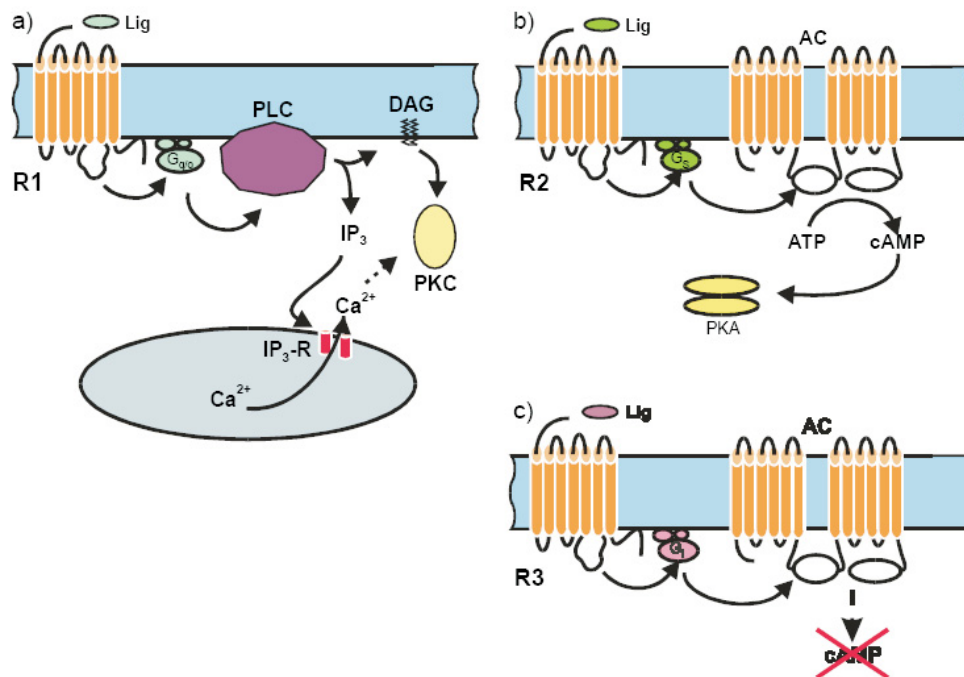


Abbildung 1.4: **Schematische Darstellung der wichtigsten Signalwege G-Proteingekoppelter Rezeptoren (aus Blenau und Baumann, 2001).** **a** Rezeptor 1 (R1) aktiviert nach der Bindung eines Liganden (Lig) ein heterotrimeres G-Protein (G_{qo}). Die Phospholipase C (PLC) wird stimuliert. Das Enzym hydrolysiert PIP₂ zu IP₃ und DAG. Das IP₃ bindet an intrazelluläre Rezeptoren, die die Freisetzung von Ca²⁺ bewirken. **b** Rezeptor 2 (R2) aktiviert ein anderes heterotrimeres G-Protein (G_s), das eine Adenylatzyklase stimuliert. Das Enzym synthetisiert cAMP aus ATP. Der Anstieg der intrazellulären cAMP-Konzentration ([cAMP]_i) aktiviert u.a. die cAMP-abhängige Proteinkinase (PKA), die daraufhin z.B. Ionenkanäle und Transkriptionsfaktoren phosphoryliert. **c** Rezeptor 3 (R3) aktiviert ein heterotrimeres G-Protein (G_i). Die Adenylatzyklase wird inhibiert und [cAMP]_i sinkt.

In der inaktiven Konformation eines GPCRs ist ein trimeres GTP-bindendes Regulatorprotein (G-Protein) an den Rezeptor gebunden. Die Kopplung eines extrazellulären Liganden bewirkt eine Konformationsänderung des Rezeptors, die über die Transmembransegmente an die intrazellulären Domänen des Proteins weitergeleitet wird (Wess, 1997). Aus dieser Konformationsänderung resultiert eine Abnahme der Affinität der α -Untereinheit des G-Proteins für GDP. Das gebundene GDP wird gegen GTP ausgetauscht. Der G-Protein-Komplex zerfällt in den $\beta\gamma$ -Komplex und die GTP-gebundene α -Untereinheit

($G\alpha$). Die $G\alpha$ -Untereinheit bindet an intrazelluläre Effektorproteine, wie z.B. Adenylatzyklasen, Phosphodiesterasen, Phospholipasen oder an Ionenkanäle. Durch die Bindung erfolgt eine Aktivierung oder auch Inhibierung des Effektor-Proteins. Dadurch wird eine Reihe von Ereignissen ausgelöst, die zur Änderung der Konzentration mindestens eines intrazellulären Signalmoleküls führt. Zu den wichtigsten GPCR-vermittelten Signalwegen gehören die Erhöhung bzw. Erniedrigung der intrazellulären cAMP-Konzentration sowie die Synthese von Diacylglycerol (DAG) und Inositol-1,4,5-trisphosphat (IP_3) (siehe Abb. 1.4). Das IP_3 bindet an spezifische Rezeptoren im endoplasmatischen Retikulum und bewirkt die Freisetzung von Ca^{2+} aus intrazellulären Speichern. Die sekundären Botenstoffe (Ca^{2+} , cAMP, IP_3) setzen die Signalkaskade fort, indem sie die Aktivität ausgewählter zellulärer Proteine modulieren. Die Aktivierung eines GPCR führt letztendlich zu transienten Änderungen der Phosphorylierungsmuster ausgewählter Proteine und/oder der Genexpression. Diese Änderungen beeinflussen die Aktivität und/oder das Vorkommen von Proteinen, welche für neuronale Signalübertragung und elektrische Leitfähigkeit verantwortlich sind. Die Veränderungen in der Nervenzell-Aktivität können schließlich zu Verhaltensänderungen führen.

1.3.3 Inaktivierung G-Protein-gekoppelter Rezeptoren

Die Inaktivierung der GPCRs kann durch die Phosphorylierung von Serin-/Threonin-Resten intrazellulärer Domänen durch die cAMP-aktivierte Proteinkinase A, die Diacylglycerol- und Ca^{2+} -aktivierte Proteinkinase C oder durch G-Protein-gekoppelte Rezeptorkinasen (kurz GRKs) (Raymond, 1991; Freedman *et al.*, 1995; Willets *et al.*, 2003) erfolgen. Zum Einen führt die Phosphorylierung zu einer Konformationsänderung des Rezeptors. Die neue Konformation beeinflusst die Rezeptor-G-Protein-Interaktion oder die Affinität des Rezeptors für den Liganden, so dass es zu einer Abschwächung des Rezeptorsignals kommt (Carman und Benovic, 1998). Zum Anderen erhöht sich durch die GRKs vermittelte Phosphorylierung die Affinität des Rezeptors für Mitglieder der β -Arrestin Proteinfamilie (Leurs *et al.*, 1998). Die Bindung von β -Arrestin verhindert die Rezeptor-G-Proteinen-Interaktionen. Obwohl die Ligandenbindung an den Rezeptor weiterhin möglich ist, erfolgt intrazellulär keine Signalübertragung mehr. Der Rezeptor ist desensibilisiert. Das β -Arrestin dient dem Rezeptor als Adapterprotein, dass die Interaktionen mit weiteren Proteinen, z.B. Clathrin ermöglicht. Die Bindung des Rezeptor- β -Arrestin-Komplexes an Clathrin führt zur Internalisierung des Rezeptors. Dabei wird durch die Zusammenlagerung von Clathrin-Molekülen eine Hülle aus Clathrin („clathrin coat“) gebildet, in deren Inneren die Zellmembran mit dem Rezeptor mehr und mehr eingestülpt wird. Schließlich wird die Zellmembran abgeschnürt und wandert in Form von Membranvesikeln in das

Zellinnere. Nachdem in diesen Vesikeln die Phosphatgruppen des Rezeptorproteins durch Phosphatasen entfernt wurden, wird der Rezeptor zurück zur Plasmamembran transportiert („*recycling*“) oder abgebaut („*degradation*“) (Leurs *et al.*, 1998; Oakley *et al.*, 2001).

1.3.4 Liganden- und G-Protein-unabhängige Aktivierung

Es gibt eine zunehmende Anzahl von Arbeiten, die zeigen, dass G-Protein-gekoppelte Rezeptoren nicht nur als trimere Komplex (Lean *et al.*, 1980) aus Ligand : Rezeptor : G-Protein physiologisch aktiv sind. Ein GPCR ist in Abwesenheit eines Agonisten nicht zwingend inaktiv (Kjelsberg *et al.*, 1992; Samama *et al.*, 1993). Bei vielen GPCRs existiert vielmehr ein thermodynamisches Gleichgewicht zwischen inaktivem und spontan aktivem Zustand. Die Anbindung eines Agonisten verschiebt das Gleichgewicht in Richtung des aktiven Zustands, während so genannte inverse Agonisten das Gleichgewicht in Richtung des inaktiven Zustands verschieben (Gether und Kobilka, 1998; Hunyady *et al.*, 2003). Hinweise für konstitutive, also Liganden-unabhängige Aktivität gibt es sowohl *in vitro* (Claeyssen *et al.*, 1999; Krobot und Levy, 2002; Hobson *et al.*, 2003) als auch *in vivo* (Bond *et al.*, 1995; Morisset *et al.*, 2000).

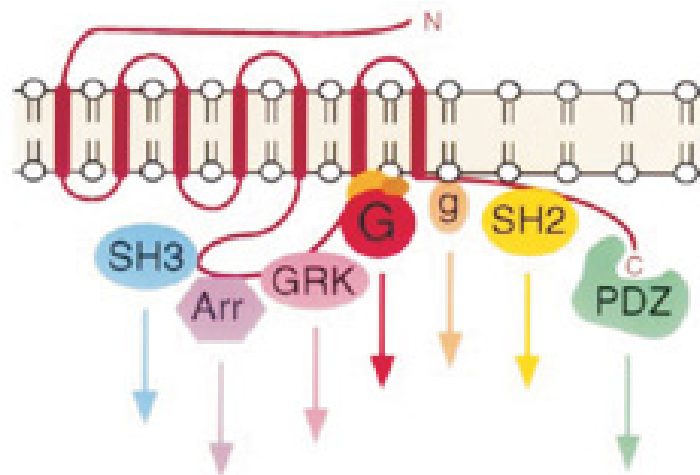


Abbildung 1.5: **Schematische Darstellung von Bindungspartnern heptahelikaler Rezeptoren** (Hall *et al.*, 1999). Heptahelikale Rezeptoren können mit Mitgliedern verschiedenster Familien intrazellulärer Proteine assoziiert sein. Dazu gehören trimere G-Proteine (G), SH3-Domänen enthaltende Proteine (SH3), Arrestine (Arr), GPCR-Kinasen (GRK), monomere G-Proteine (g), Proteine mit SH2-Domänen (SH2) bzw. mit PDZ-Domänen (PDZ)

Mit dem Hefe-Doppelhybrid-System und Fusionsprotein-Overlays wurden verschiedene intrazelluläre Interaktionspartner identifiziert, die die Rezeptoraktivität unabhängig von

Liganden und G-Proteinen regulieren (Hall *et al.*, 1999). An den C-Terminus des 5-HT_{2C}-Rezeptors können mehr als 15 verschiedene Proteine binden (siehe Abb. 1.5). Die Wechselwirkung kann über SH3 bzw. SH2-Domänen (Src-Homologie), PDZ-Domänen oder EVH-Domänen (Ena/VASP-Homologie) erfolgen. Durch die Bindung an zytoplasmatische Schleifen und den C-Terminus des Rezeptors beeinflussen diese intrazellulären Proteine die Lokalisation und Funktion des GPCR. Spezifität, Selektivität und der zeitliche Ablauf einer Reaktion wird durch sie moduliert (Hunter, 2000; Bockaert *et al.*, 2003).

Des Weiteren hat die Oligomerisierung von GPCRs inzwischen große Beachtung gefunden (Canals *et al.*, 2003; Park *et al.*, 2004; Park und Palczewski, 2005). Durch die Entstehung neuer Bindungstaschen und die Möglichkeit alternativer struktureller Antworten auf die Kopplung eines Liganden vermitteln oligomere Komplexe neue pharmakologische Eigenschaften. Jede Untereinheit des Komplexes kann unterschiedliche Aufgaben übernehmen, so dass z.B. ein Partner für die Ligandenbindung zuständig ist, ein anderer für die G-Protein-Kopplung.

1.4 Serotonin-Rezeptoren

Die Fähigkeit eines einzelnen Neurotransmitters eine große Anzahl von Funktionen zu beeinflussen, ist mit der Existenz verschiedener Rezeptorsubtypen verbunden, die an unterschiedliche intrazelluläre Signalwege koppeln. Vor über 50 Jahren erkannte man erstmals das Vorhandensein von Serotonin-Rezeptorsubtypen, als Gaddum und Picarelli (1997) zwei durch Serotonin ausgelöste physiologische Reaktionen entdeckten, die durch verschiedene Antagonisten blockiert werden konnten.

Die Charakterisierung von Rezeptoren wurde ein aktives Forschungsgebiet und bis zum jetzigen Zeitpunkt wurden mindestens 14 verschiedene 5-HT-Rezeptorgene in Säugetieren identifiziert, von denen 13 der Familie der GPCRs angehören (Raymond *et al.*, 2001). Die Komplexität dieser Rezeptorgruppe wird durch alternatives Spleißen und RNA-Editing weiter erhöht. Die 5-HT-Rezeptorsubtypen werden in sieben Familien eingeteilt (Barnes und Sharp, 1999; Hoyer *et al.*, 2002). Sechs dieser Familien werden von GPCRs gebildet. Eine Ausnahme bilden die 5-HT₃-Rezeptoren, die Liganden-gesteuerte Ionenkanäle sind. Der Klassifizierung der Vertebraten-Rezeptoren folgend, ist man bestrebt auch die Invertebraten-Rezeptoren einzuteilen. Dies ist jedoch nur eingeschränkt möglich, da sich in vielen Fällen die pharmakologischen Eigenschaften der Invertebraten-Rezeptoren von denen der Vertebraten-Rezeptoren unterscheiden (Blenau und Baumann, 2001). Bis jetzt besteht jedoch für die Invertebraten kein eigenes Klassifizierungssystem (Tierney, 2001). Die sechs Familien der G-Protein-gekoppelten Serotonin-Rezeptoren werden aufgrund ih-

rer Aminosäuresequenz und der Kopplung an verschiedene intrazelluläre Signalwege eingeteilt. Die 5-HT₁-Rezeptoren sind negativ an die Adenylatzyklase gekoppelt. Alle Mitglieder der 5-HT₂-Rezeptoren stimulieren die Phospholipase C. 5-HT₄-, 5-HT₅-, 5-HT₆- und 5-HT₇-Rezeptoren aktivieren die Adenylatzyklase, jedoch unterscheiden sie sich in ihren pharmakologischen Eigenschaften (Gerhardt und van Heerikhuizen, 1997).

1.4.1 Bedeutung der Serotonin-Rezeptoren in Vertebraten

Serotonin-Rezeptoren sind bei Vertebraten in hoher Dichte im Zentralnervensystem, im Gastrointestinaltrakt, im Herz-Kreislaufsystem und im Blut zu finden (Review siehe Hoyer *et al.*, 2002). Physiologisch spielen sie unter anderem bei der Blutgerinnung, bei Lernprozessen und bei der Steuerung des Tag-Nacht-Rhythmus eine Rolle. Fehlsteuerungen biochemischer Vorgänge an den Serotonin-Rezeptoren führen zu Pathophysiologien wie Migräne, (pulmonale) Hypertonie, Depression, Schizophrenie, Essstörungen, Übelkeit und Erbrechen (Hedlund und Sutcliffe, 2004). Rezeptorautoradiographiestudien zeigten, dass jeder einzelne Serotonin-Rezeptorsubtyp ein spezifisches Verteilungsmuster im ZNS besitzt (Review siehe Barnes und Sharp, 1999; Hoyer *et al.*, 2002). Im Folgendem wird auf die Bedeutung der Serotonin-Rezeptoren anhand der 5-HT₇- und 5-HT_{2A}-Rezeptoren eingegangen.

Die 5-HT₇-Rezeptoren stellen eine sehr gut untersuchte Gruppe dar. So wurde eine Beeinflussung der zirkadianen Rhythmik (Sprouse *et al.*, 2004) und der Thermoregulation (Hedlund *et al.*, 2003) nachgewiesen. „*Knock-out*“-Mäuse, denen das 5-HT₇-Rezeptorprotein fehlt, zeigen Defizite im kontextabhängigen Lernen (Roberts *et al.*, 2004). In Ratten führt der 5-HT₇-Rezeptor zu Muskelkontraktionen (Paea *et al.*, 2004) und in der Cornea des Menschen beeinflusst er die Flüssigkeitssekretion (Crider *et al.*, 2003).

Auch für den 5-HT_{2A}-Rezeptor der Säugetiere liegen *knock-out*-Untersuchungen und Studien zur Wirkung von spezifischen Antagonisten bzw. Agonisten auf die physiologische Funktionen vor. 5-HT_{2A}-Rezeptoren sind unter anderen am Aufbau der quergestreiften Muskulatur beteiligt (Guillet-Deniau *et al.*, 1997) und beeinflussen das Fress- und Sexualverhalten. Des Weiteren wirken sich 5-HT₂-Rezeptor Agonisten hemmend auf das konditionierte und unkonditionierten Lernen aus (Review siehe Barnes und Sharp, 1999).

1.4.2 Serotonin-Rezeptoren in Insekten

Nathanson und Greengard (1974) identifizierten einen Serotonin- und einen Oktopamin-Rezeptor im Nervensystem der Schabe als Bindeprotein des Halluzinogens LSD. In der Speicheldrüse der Schmeißfliege fanden Berridge und Heslop (1981) zwei verschiedene

Serotonin-Rezeptorsubtypen. Diese frühen Arbeiten zeigen nicht nur die Diversität von Serotonin-Rezeptoren in Insekten sondern waren auch der erste Nachweis, dass IP_3 ein intrazellulärer Botenstoff ist.

Der erste Serotonin-Rezeptor der aus Insekten kloniert werden konnte war 5-HT-dro1 (Umbenennung in Dm5-HT₇; Tierney, 2001). Dieser Rezeptor von *Drosophila melanogaster* aktiviert die Adenylatzyklase (Witz *et al.*, 1990). Saudou *et al.* (1992) entdeckten zwei weitere Serotonin-Rezeptoren in *Drosophila melanogaster*: 5-HT-dro2A (später Dm5-HT_{1A}) und 5-HT-dro2B (später Dm5-HT_{1B}), die jedoch die Adenylatzyklase inhibieren. Je nach Expressionssystem kann 5-HT-dro2B ebenso eine stimulierende Wirkung auf die Phospholipase C ausüben (Obosi *et al.*, 1996). Colas *et al.* (1995) gelang die Identifizierung eines Serotonin-Rezeptors von *Drosophila melanogaster* (Dm5-HT₂), der die typischen pharmakologischen Eigenschaften eines Serotonin-Rezeptors der 5-HT₂-Familie zeigt und die Phospholipase C aktiviert.

Pietrantonio *et al.* (2001) klonierten mit dem 5-HT₇-Rezeptor aus der Gelbfiebermücke *Aedes aegypti* einen weiteren Serotonin-Rezeptor, der die Adenylatzyklase stimuliert (Lee und Pietrantonio, 2003). Auch aus *Bombyx mori* und *Heliothis virescens* wurden Rezeptoren kloniert (Nickisch-Rosenegk *et al.*, 1996). Die Annahme, dass es sich um Serotonin-Rezeptoren handelt, begründet sich jedoch ausschließlich auf Sequenzvergleichen, pharmakologische Untersuchungen geben keinen eindeutigen Aufschluss darüber. Ein weiterer Serotonin-Rezeptor wurde aus dem Schwalbenschwanz *Papilio xuthus* kloniert (Ono und Yoshikawa, 2004). Durch RT-PCR und *in situ*-Hybridisierungen am chemosensorischen Organ der Vorderbeine, wurde auf eine Beteiligung des Rezeptors an der chemosensorischen Signaltransduktion geschlossen.

1.5 Fragestellung

Biogene Amine wirken durch die Aktivierung spezifischer membranständiger, G-Proteingekoppelter Rezeptoren in Wirbeltieren und Wirbellosen als Neurotransmitter, Neuromodulatoren und Neurohormone. Aufgrund der großen Bedeutung der Rezeptoren sind sie zum Gegenstand intensiver Forschung geworden. Das Wissen über die biogenen Amin-Rezeptoren von Wirbellosen ist im Vergleich zum Kenntnisstand bei Wirbeltieren jedoch immer noch begrenzt.

Modulatorische Wirkungen biogener Amine sind bei Insekten vielfach beschrieben. Für ein umfassendes Verständnis ihrer komplexen physiologischen Wirkungen fehlen jedoch wichtige Informationen über die molekulare Identität der entsprechenden Rezeptorproteine, ihre pharmakologischen Eigenschaften, ihre Gewebsverteilung und ihre intrazellulären Reaktionspartner. Dies ist vor allem für die Honigbiene von Bedeutung, gilt sie doch seit langem als Modellorganismus für verhaltensbiologische Studien und die Untersuchungen der zellulären Mechanismen des Lernens und der Gedächtnisbildung. Bis zum jetzigen Zeitpunkt wurden drei Dopamin-Rezeptoren (Blenau *et al.*, 1998; Humphries *et al.*, 2003; Mustard *et al.*, 2003; Beggs *et al.*, 2005), ein Tyramin-Rezeptor (Blenau *et al.*, 2000), und ein Oktopamin-Rezeptor (Grohmann *et al.*, 2003) der Honigbiene kloniert und funktionell charakterisiert. Jedoch sind keine molekularen Informationen über Serotonin-Rezeptoren bekannt. Dies steht in einem deutlichen Missverhältnis zur Bedeutung des serotonergen Systems bei Lern- und Gedächtnisprozessen und bei der Modulation sensorischer Neurone. Das Ziel der vorliegenden Arbeit war die Klonierung eines Serotonin-Rezeptors aus der Honigbiene *Apis mellifera*. Das Expressionsmuster des Rezeptorgens in verschiedenen Geweben der Honigbiene, insbesondere im Gehirn, sollte untersucht werden. Das zelluläre Expressionsmuster der Rezeptor-mRNA sollte durch *in situ*-Hybridisierung an Gewebeschnitten bestimmt werden. Die funktionelle Kopplung des Rezeptors an intrazelluläre Botenstoffwege und die pharmakologischen Eigenschaften des Rezeptors sollten nach heterologer Expression in Säugerzellen (HEK 293) untersucht werden. Ebenso sollte durch die Herstellung eines polyklonalen Antikörpers das Rezeptorprotein nachgewiesen werden.

Kapitel 2

Material und Methoden

2.1 Chemikalien und Geräte

Chemikalien sowie Verbrauchsmaterialien wurden von den Firmen Roth (Karlsruhe), Sigma (Taufkirchen) und Merck (Darmstadt), die Restriktionsenzyme von Roche (Mannheim) und die Oligonukleotidprimer von TIB-Molbiol (Berlin) bezogen. Sequenzierungen wurden durch die Firma AGOWA (Berlin) durchgeführt. Für das Ansetzen von Lösungen wurde steriles Reinstwasser (Millipore-Qualität) verwendet. Lösungen, Medien und Wasser wurden in einem Varioklav Dampfsterilisator bei 121 °C für 20 min sterilisiert. Weitere Angaben zu verwendeten Materialien befinden sich im Text. Im Folgenden sind verwendete Vektoren, Bakterienstämme und Geräte aufgeführt:

Vektor	Herkunft	Anwendung
pBluescript SK ⁻	Stratagene (Amsterdam)	Klonierung
pcDNA 3.1(+)	Invitrogen (Karlsruhe)	eukaryotische Expression
pET-30a	Novagen (Darmstadt)	prokaryotische Expression
pGEM-T	Promega (Mannheim)	T/A-Klonierung
pMal-c2X	New England Biolabs	prokaryotische Expression

Tabelle 2.1: Vektoren und deren Anwendung

Bakterienstamm	Herkunft	Anwendung
<i>E. coli</i> JM109	Stratagene	Vermehrung von Plasmiden
<i>E. coli</i> XL1-Blue	Stratagene	Vermehrung von Plasmiden
<i>E. coli</i> BL21(DE3)pLysS	Novagen	Expression rekombinanter Proteine

Tabelle 2.2: Bakterienstämme und deren Anwendung

Gerät	Hersteller
PCR-Maschine, T3 Thermocycler	Biometra (Göttingen)
Gel-Dokumentation, Gelsystem 8Entry	Biostep (Jahnsdorf)
Agarose-Horizontalgelelektrophorese, HoferTM HE33	Amersham Bioscience (Freiburg)
PAGE-Elektrophorese im Vertikalsystem, Mini Protean IITM	Bio-Rad (München)
Protein-Transfer, Trans Blot SD	Bio-Rad
Spektralphotometer Cary 50	Varian (Darmstadt)
Tischzentrifuge, Biofuge pico	Heraeus (Hanau)
Kühlzentrifuge, Biofuge 15R	Heraeus
Schüttler, Shaker ES - 70	Peqlab (Erlangen)
Gefriermikrotom HM 500 OM Microm	Edgewater (USA)
Axioplan2-Mikroskop	Zeiss (Jena)
konfokales Mikroskop LSM510	Zeiss

Tabelle 2.3: Geräte

2.2 Molekularbiologische Methoden

Standardmethoden wurden nach Sambrook und Russell (2001) durchgeführt.

2.2.1 Agarosegelelektrophorese

Für die Auftrennung und Identifizierung von DNA wurden Gele mit 0,8–1,2 % Agarose in 1x TAE-Puffer verwendet. Zur Färbung der DNA wurde dem TAE-Puffer Ethidiumbromid zugegeben. Die DNA-Proben wurden mit 0,2 Vol. Gelladepuffer gemischt und auf das Gel aufgetragen. Als Größenstandard dienten bekannte Marker-DNAs (1 kb DNA Ladder, 100 bp Ladder, New England Biolabs, Frankfurt). Für die Auftrennung der DNA wurde eine Spannung von 85 V angelegt.

50x TAE Puffer: 1,5 M Tris Base, 60 mM EDTA, 5,71% (v/v) Essigsäure, 1 µg/ml Ethidiumbromid
 Gelladepuffer: 0,25% (w/v) Bromphenolblau, 0,25% (w/v) Xylencyanol, 30%(v/v) Glycerol

2.2.2 DNA-Extraktion aus Agarosegelen

Um gewünschte DNA-Fragmente aus einem Agarosegel zu isolieren, wurde ein „Minisieb“ vorbereitet. Ein Eppendorfreaktionsgefäß (ER) wurde durchtrennt und der untere Teil mit einer Kanüle durchstoßen. Das Loch wurde mit silanisierter Glaswolle (Serva) bedeckt, und das halbierte ER in ein zweites, intaktes ER gesteckt. Das isolierte Gelstück wurde auf die Glaswolle überführt und für 2 min bei 6.000 UpM (Biofuge pico) zentrifugiert. Die

DNA wurde aus dem erhaltenen Eluat durch die Zugabe von 0,1 Vol. 3 M Natriumacetat und 2,5 Vol. Ethanol (100 %) bei -20°C für mindestens 2 h präzipitiert. Nach einer Zentrifugation für 5 min bei 13.000 UpM (Biofuge pico) wurde das Pellet mit 70 % Ethanol gewaschen, erneut zentrifugiert (3 min, 13.000 UpM) und in Wasser oder alternativ in TE-Puffer resuspendiert.

TE-Puffer: 10 mM Tris-HCl, pH 7,4, 1 mM EDTA

2.2.3 Restriktion

Um die Klonierung eines Fragments in einem Plasmid-Vektor zu überprüfen, wurden analytische Restriktionsanalysen durchgeführt. Dazu wurden 200-500 ng DNA mit 5 U Restriktionsendonuklease in einem Endvolumen von 15 μl in dem vom Hersteller empfohlenen Puffer und der angegebenen optimalen Temperatur (37°C bzw. 55°C für das Enzym *Bst*ZI) 1 h inkubiert. Für eine präparative Restriktion eines Plasmids oder PCR-Produkts wurde die dreifache Menge an DNA eingesetzt und 2-16 h mit dem Restriktionsenzym inkubiert. Die Restriktionsfragmente wurden anschließend aus einem Agarosegel eluiert (siehe 2.2.2) und konnten direkt weiter verwendet werden (z.B. für Ligation).

2.2.4 Ligation

Vektoren und Fragmente mit passenden kohäsiven Enden wurden durch Restriktion (siehe 2.2.3) erhalten. Ein Ligationsansatz mit einem Gesamtvolumen von 20 μl enthielt 150 ng Vektor-DNA, 450 ng Insert-DNA, 1x Ligase-Puffer, 5 U T4-DNA-Ligase (Fermentas). Es erfolgte eine Inkubation bei 4°C über Nacht oder alternativ 2 h bei 16°C und anschließend die Transformationen in *E. coli*-Zellen (siehe 2.2.5). Alternativ konnten ungeschnittene PCR-Produkte in den pGEM-T Vektor ligiert werden (T/A-Klonierung, pGEM-T Vector System, Promega). Die Ligation erfolgte nach dem Protokoll des Herstellers.

10 x Ligase-Puffer: 400 mM Tris-HCl, 100mM MgCl_2 , 100mM DTT, 5mM ATP, pH 7.8

2.2.5 Transformation in *E. coli*

Es wurden 200 μl transformationskompetente Bakterien mit 20 μl Ligationsansatz 30 min auf Eis inkubiert. Nach einem Hitzeschock von 40 s bei 42°C im Wasserbad wurde der Ansatz 2 min auf Eis gekühlt, mit 900 μl LB-Medium (LB-Broth, LAB M, Lancashire)

versetzt und 1 h bei 37°C im Schüttler inkubiert. Nach Sedimentation (2 min, 6.000 UpM, Biofuge pico) wurde das Pellet in 100 µl LB-Medium aufgenommen, auf LB-Agar-Platten (LB-Agar, LAB M, Lancashire) mit entsprechenden Antibiotika-Zusätzen ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert. Für Blau-Weiß-Selektionen wurde den Platten zuvor 0,5 mM IPTG (Isopropyl-Thio-D-Galaktopyranosid) und 80 µg/ml X-Gal zugesetzt.

Antibiotika Zusätze: Carbenicillin 100 µg/ml; Chloramphenicol 34 µg/ml; Kanamycin 50 µg/ml

2.2.6 Isolierung von Plasmid-DNA

Für Plasmid-Isolierungen im Mini-Maßstab wurden 5 ml LB-Medium, versetzt mit dem entsprechenden Antibiotikum, mit einer einzelnen Kolonie beimpft und über Nacht bei 37°C im Schüttler inkubiert. Die Präparation der Plasmid DNA erfolgte mit dem E.Z.N.A Miniprep Kit (Peglab) nach Vorschrift des Herstellers. Die Plasmid-DNA wurde mit TE-Puffer eluiert. Für die Präparation größerer DNA-Mengen wurden 50 ml LB-Medium, ebenso mit Antibiotikum versetzt, mit einer Kolonie beimpft und über Nacht bei 37°C inkubiert. Die Kulturflüssigkeit wurde 10 min bei 5.500 UpM (Biofuge 15R) zentrifugiert. Das Bakterienpellet wurde nach dem Resuspendieren in 4 ml Lösung I mit 8 ml Lösung II versetzt, vermischt und umgehend mit 8 ml Lösung III inkubiert. Nach einer Zentrifugation für 5 min bei 5.500 UpM wurde der Überstand durch einen Faltenfilter filtriert und zur Präzipitation der Plasmid-DNA mit 25 ml Isopropanol versetzt. Es erfolgte eine Zentrifugation für 10 min bei 5.500 UpM. Der Überstand wurde dekantiert und das Pellet in 1,45 ml H₂O gelöst. Nach Zugabe von 2,5 ml 4 M LiCl und 50 µl 1 M Tris-HCl (pH 7,5) erfolgte eine erneute Zentrifugation für 5 min bei 5.500 UpM. Der Überstand wurde mit 2,5 Vol. Ethanol (100 %) versetzt und 10 min bei 5.500 UpM zentrifugiert. Das Pellet wurde in 200-300 µl TE-Puffer resuspendiert, mit 2-3 µl RNase Cocktail (Ambion) versetzt und mindestens 30 min bei 37°C inkubiert. Anschließend erfolgte eine Phenol/Chloroform-Extraktion und eine Präzipitation mit 1/10 Vol. 3 M LiCl und dem dreifachen Vol. 100 % Ethanol. Die Reinheit und Konzentration der DNA wurden spektroskopisch durch Messung der Absorption bei 260 nm und 280 nm in TE-Puffer bestimmt.

Lösung I: 50 mM Glukose, 10 mM EDTA, 25 mM Tris-HCl, pH 8,0
Lösung II: 0,2 M NaOH, 1 % SDS
Lösung III: 60 % (v/v) 5 M KAc, 11,5 % (v/v) Essigsäure, pH 4,8
TE-Puffer: 10 mM Tris-HCl, pH 7,4, 1 mM EDTA

2.2.7 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Mit PCR-Reaktionen wurden ausgewählte DNA-Sequenzabschnitte spezifisch amplifiziert. Als Template dienten eine λ -Uni-ZAPTM XR-cDNA-Bibliothek von *Apis mellifera* (zur Verfügung gestellt von Dr. Dorothea Eisenhardt, FU Berlin; Eisenhardt et al., 2001), Plasmid-DNA oder Bienenhirn-cDNA. Die λ -Uni-ZAPTM XR-cDNA-Bibliothek wurde vor der Verwendung für 10 min bei 95°C inkubiert. Ein PCR-Ansatz (50 μ l) enthielt ca. 100-200 ng Matrizen-DNA, je 200 nmol der beiden Primer, 400 μ M jedes dNTPs (Amersham Bioscience), 1x Reaktionspuffer und 2,5 U *Taq*-DNA-Polymerase (Peqlab). Die PCR-Bedingungen waren wie folgt: 1 Zyklus: Denaturierung 2,5 min bei 94°C; 35 Zyklen: Denaturierung 40 s bei 94°C, Annealing 40 s bei 55-65°C, Elongation 1 min pro kb bei 72°C; 1 Zyklus: Finale Elongation 10 min bei 72°C; Kühlung 4°C. Die PCR-Produkte wurden mittels Agarosegelelektrophorese aufgetrennt und gegebenenfalls eluiert (siehe 2.2.2). Über die Primer wurden geeignete Restriktionsschnittstellen eingeführt. Das amplifizierte Fragment wurde mit den entsprechenden Restriktionsendonukleasen geschnitten (siehe 2.2.3) und in geeignete Plasmid-Vektoren kloniert. Eine Tabelle mit den Sequenzen der verwendeten Primer befindet sich im Anhang (siehe 5.1).

10 x Reaktionspuffer: 100 mM Tris-HCl, pH 8,8, 500 mM KCl, 0,1 % Tween 20, 15 mM MgCl₂

2.2.8 PCR mit degenerierten Primern

Durch den Einsatz von degenerierten Primern sollten Sequenzinformationen von bislang unbekanntem biogenen Amin-Rezeptoren der Honigbiene erhalten werden. Die Primer wurden zur Amplifikation von Fragmenten aus der λ -Uni-ZAPTM XR-cDNA-Bibliothek von *Apis mellifera* eingesetzt. Von dem λ -Phagen-cDNA-Bibliothek-Eluat wurden 20 μ l bei 94°C für 10 min erhitzt und als Matrize verwendet. Die PCR-Reaktion wurde mit 400 μ M jedes dNTPs, 2 μ M der degenerierten Primer, 1,25 mM MgCl₂, und 2,5 U *Taq*-Polymerase in einem Gesamtvolumen von 100 μ l angesetzt. Die Amplifikation erfolgte unter den folgenden Bedingungen: 1 Zyklus: 2,5 min bei 94°C; 35 Zyklen: 40 s bei 94°C, 1 min bei 50°C, 1 min bei 72°C; 1 Zyklus: 10 min bei 72°C. Die Sequenz der verwendeten Primer ist im Anhang angegeben (siehe 5.1). Um die Spezifität des amplifizierten Fragments zu testen, wurde eine „*nested-PCR*“ (= verschachtelte PCR) durchgeführt. Von dem in der ersten PCR-Runde amplifizierten Fragment wurden 2 μ l als Matrize für eine zweite PCR eingesetzt. Die in dieser PCR verwendeten Primer lagen innerhalb der Sequenz des zuvor amplifizierten Fragments. Auf diese Weise kann die Ausbeute spezifischer PCR-Produkte erhöht werden. Die Bedingungen der „*nested-PCR*“ entsprachen denen der ersten Runde.

Auch diese PCR-Produkte wurden aus einem Agarosegel eluiert (siehe 2.2.2) und durch Ligation in Vektoren integriert (siehe 2.2.4).

2.2.9 RT-PCR („*Reverse Transcription PCR*“)

Mit dieser Methode wurden Rezeptor-spezifische mRNAs in verschiedenen Geweben semiquantitativ nachgewiesen. Für die RT-PCR wurde Gesamt-RNA mit Hilfe des Trizol™ LS Reagenz (Gibco, Karlsruhe) nach dem Protokoll des Herstellers extrahiert. Um Kontaminationen durch genomische DNA zu vermeiden, wurde 1,1 µg isolierte RNA mit DNase I verdaut (2 Units, Ambion, Huntingdon, UK). Als Negativ-Kontrolle wurde die äquivalente Menge einem DNase I/RNase-Verdau (RNase Cocktail, Ambion) unterzogen. Für eine PCR-Reaktion mit spezifischen Primern wurden 200 ng der Gesamt-RNA-Präparation eingesetzt. Weitere Schritte erfolgten entsprechend der Anleitung des SuperScript One-Step RT-PCR Systems mit Platinum *Taq* (Invitrogen). Die PCR-Bedingungen waren wie folgt: 1 Zyklus: cDNA-Synthese und Denaturierung 30 min bei 50°C, 2 min bei 94°C; 35 Zyklen: Amplifikation 40 s bei 94°C, 40 s bei 50°C, 40 s bei 72°C; 1 Zyklus: finale Elongation 10 min bei 72°C. Amplifizierte PCR-Fragmente wurden in einem 1,2 % Agarosegel aufgetrennt.

2.2.10 Herstellung von cDNA durch „*random priming*“

Für die Gewinnung von cDNA mit Hilfe von Zufallshexameren („*random primers*“) wurde zunächst Gesamt-RNA aus Bienengehirnen mit dem Trizol™ LS-Reagenz extrahiert. Aus der Gesamt-RNA wurde mit dem Mikro Fast Track 2.0 Kit (Invitrogen) nach Angaben des Herstellers poly(A)⁺-RNA angereichert und die Konzentration photometrisch bestimmt. Von der mRNA wurde 1 µg in einem Endvolumen von 12 µl für die cDNA Synthese eingesetzt. Nach der Zugabe von 2 µM der Random Primer erfolgte eine 10 min eine Denaturierung bei 65°C. Der Ansatz wurde auf Eis abgekühlt, damit die Zufallshexamere an die mRNA binden können. Zu dem cDNA Synthese-Ansatz wurden dann (Endkonzentration) je 400 µM der dNTPs, 10 mM DTT, 20 U RNase Inhibitor und 200 U AMV Reverse Tanskriptase (aus **A**vian **M**yeloblastosis **V**irus) gegeben. Nach einer Inkubation von 50 min bei 42°C (Elongation) wurde die Reaktion durch 15 min Inkubation bei 75°C gestoppt. Die cDNA wurde mit 1/10 Vol. 3 M Natriumacetat und 2,5 Vol. 100 % Ethanol präzipitiert und in Wasser resuspendiert. Die cDNA wurde als Template für PCR-Reaktionen verwendet.

2.2.11 Herstellung radioaktiv markierter Sonden

Für das Durchmustern einer cDNA-Bibliothek von *Apis mellifera* wurden DNA-Fragmente mit der „*random priming*“-Methode radioaktiv markiert. Von der doppelsträngigen DNA wurden 100 ng in Gegenwart von Zufallsdecameren („*random primers*“, Invitrogen) 10 min bei 95°C denaturiert. Die nachfolgenden Markierungsreaktion (Endvolumen 25 µl) erfolgte mit dem DECAprime Kit (Ambion) nach den Anweisungen des Herstellers. Dabei benutzt die DNA-Polymerase (Klenow-Fragment) die Oligonukleotide als Startpunkte für die DNA-Neusynthese und baut gleichzeitig radioaktiv markiertes 5′-[α-³²P]-Desoxycytidin in die DNA ein. Zur Abtrennung nicht eingebauter Nukleotide wurde der Markierungsansatz über eine Sephadex-G-75-Säule (Amersham Bioscience) gereinigt.

2.2.12 Durchmustern einer cDNA Bibliothek

Die radioaktiv markierte Sonde wurde für das Durchmustern einer cDNA-Bibliothek (ca. 1x10⁶ Rekombinante) in λ-ZAPII-Vektoren (Blenau *et al.*, 1998) verwendet. Von dieser cDNA-Bibliothek wurden Filterabzüge hergestellt. Die Hybridisierung der Filter erfolgte unter mäßig reduzierter Stringenz in 5x SET, 5x Denhardts-Lösung, 100 µg/ml autoklavierter Heringssperma-DNA, 0,1 % SDS, 10⁶ cpm/ml radioaktiv markierter Sonden-DNA bei 59°C im Rotorofen (Biometra) über Nacht. Die Filter wurden zweimal für 30 min in 2x SET, 0,1 % SDS bei 65°C gewaschen. Die Exposition der Röntgenfilme wurde über Nacht unter Verwendung von Verstärkerfolien durchgeführt. Positive Rekombinanten wurden anhand der Signale auf dem Röntgenfilm Plaqueregionen auf den Agarplatten zugeordnet und isoliert. Die Phagen wurden in SM⁺-Puffer eluiert und verschiedene Verdünnungen zur Vereinzelnung ausplattiert. Dafür wurden 50 µl Bakterienzellen für 15 min bei 37°C mit der Phagenverdünnung inkubiert. Nach Zugabe von Top-Agarose (6 ml) wurde der Ansatz ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert. Die Filterabzüge dieser Phagen-Platten wurden für einen Feinscreen (unter den gleichen Bedingungen wie oben beschrieben) verwendet. Nach der Verifizierung positiver vereinzelter Klone durch Autoradiografie, wurde die Plasmid-DNA durch „*in vivo excision*“ (siehe 2.2.13) isoliert.

20x SET:	3 M NaCl, 0,4 M Tris-HCl, pH 7,5, 0,02 M EDTA
100x Denhardts-Lösung:	2 % (w/v) BSA, 2 % (w/v) Ficoll 400, 2 % (w/v) Polyvinylpyrrolidon
SM ⁺ -Puffer:	100 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl, pH 7,4, 10 mM MgCl ₂ , 10 mM CaCl ₂ , 0,05 % (w/v) Gelatine
Top-Agarose:	LB-Medium mit 10 µM MgSO ₄ und 6 g/l Agarose

2.2.13 „*In vivo excision*“

Vom Eluat eines vereinzelt λ -Zap II-Phagen-Klons wurden 100 μ l mit 200 μ l kompetenten Mg^{2+} XL1-Blue-Zellen ($OD_{600}/ml = 10$) und 1 μ l des Helferphagen R 408 (Stratagene) versetzt und 15 min bei 37°C inkubiert. Die Ansätze wurden für 3 h bei 37°C in YT-Medium inkubiert. Anschließend erfolgte eine 20minütige Inkubation bei 70°C. Nach einer Zentrifugation von 15 min bei 1.000x g war das Phagemid (Bluescript SK⁻/gesuchte cDNA) isoliert. Durch erneute Inkubation mit Mg^{2+} XL1-Blue Zellen wurde das Phagemid in die Zellen eingeschleust. Nach 15 min Inkubation bei 37°C wurde die Suspension auf LB/Carbenicillin-Platten ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert. Die Plasmid-DNA wurde aus einzelnen Kolonien isoliert (siehe 2.2.6).

2x YT-Medium: 16g/l Bacto Trypton, 10 g/l Bacto Yeast Extract, 10 g/l NaCl, pH 7,0
 Mg^{2+} XL1-Blue Zellen: Aufzucht in LB-Medium, 0,2% Maltose, 10 μ M $MgSO_4$

2.2.14 *in situ*-Hybridisierung

Herstellung von Kryostatschnitten

Es wurden Gehirne von adulten Sammlerinnen präpariert und für 2 h mit 1x PBS/4 % (w/v) Paraformaldehyd bei 4°C fixiert. Nach drei 15minütigen Waschschritten mit 1x PBS wurden die Gehirne über Nacht in 25 % Saccharose bei 4°C inkubiert. Für die *in situ*-Hybridisierungen wurden 14 μ m dicke Kryotomschnitte der fixierten Bienengehirne angefertigt und auf silanisierte Objektträger (Sigma) überführt. Die Schnitte wurden durch Inkubation in einer Alkoholreihe dehydriert. Die luftgetrockneten Schnitte wurden für 5 min in 2x SSC bei RT equilibriert, und zum Ablösen unzureichend fixierter Schnitte in 2x SSC bei 70°C für 20 min inkubiert. Es erfolgte eine Inkubation mit Proteinase K (4 μ g/ml in DEPC-H₂O) für 2 min. Anschließend wurden die Schnitte in PBS/0,2 % (w/v) Glycin für 2 min inkubiert, in PBS/4 % Paraformaldehyd für 20 min nachfixiert und danach dehydriert. Die Schnitte waren jetzt für die Inkubation mit der RNA-Sonde vorgefertigt.

10x PBS („phosphate buffered saline“): 300 mM NaCl; 0,1 M Natriumphosphat; pH 7,2
20x SSC: 3 M NaCl, 0,3 M Na-citrat, pH 7,0

In vitro-Transkription

Für die Herstellung einer RNA-Sonde durch *in vitro*-Transkription wurden zwei spezifische Primer eingesetzt, die in einer PCR-Reaktion ein charakteristisches Fragment des

entsprechenden Rezeptors amplifizierten (Primer siehe 5.1). Das Fragment wurde in den pBluescript SK⁻ Vektor subkloniert. Zur Gewinnung der „*antisense*“-Sonde wurde der Vektor (mit dem subklonierten Fragment) durch Restriktion mit *Xho*I linearisiert. Für die Herstellung der als Negativkontrolle verwendeten „*sense*“-Sonde wurde der Vektor mit *Eco*RI linearisiert. Es folgte eine Phenol/Chloroform Extraktion und Ethanolpräzipitation der Restriktionsprodukte. Die linearisierte DNA wurde in DEPC-H₂O resuspendiert. Die Synthese der RNA-Sonden wurde mit Hilfe des DIG RNA Labeling Kits (Roche) durchgeführt. Die *in vitro*-Transkription der „*antisense*“-Sonde erfolgte mit der T7-RNA-Polymerase, die des „*sense*“-Stranges mit der T3-RNA-Polymerase nach der Anleitung des Herstellers. Die Reaktion wurde mit 4 µl EDTA (0,5 M) gestoppt. Die Sonden wurden mit 1/10 Vol. 3 M LiCl und 3 Vol. Ethanol (100%) präzipitiert und für 30 min bei 13.000 UpM zentrifugiert. Das Pellet wurde mit 75 % (v/v) Ethanol gewaschen, nochmals zentrifugiert, getrocknet und in RNase-freiem TE-Puffer resuspendiert. Zur Quantifizierung der DIG-markierten RNA-Sonde wurde eine markierte Standard-RNA bekannter Konzentration als Bezug verwendet und mit den synthetisierten RNA-Sonden in einem Agarosegel aufgetrennt.

In situ-Hybridisierung

Mit der *in situ*-Hybridisierung wurde das Expressionsmuster eines Gens in Gehirnschnitten adulter Bienen ermittelt. Die Hybridisierung erfolgte mit Digoxigenin-markierten RNA-Sonden (siehe 2.2.13). Die Kryostatschnitte wurden mit 0,5 µg/ml Digoxigenin-markierter Sonde hybridisiert. Dies erfolgte in 50 % Formamid, 5x SSC, 100 µg/ml Heringssperma-DNA, 50 µg/ml Heparin, 0,1 % Tween 20 bei 42°C über Nacht in einer feuchten Kammer. Anschließend wurden die Schnitte zweimal mit 50 % Formamid und 1x SSC bei 37°C für 1,5 h gewaschen. Nach einer Inkubation von zweimal 1 min in Puffer 1 erfolgte eine Blockierung durch eine 30minütige Inkubation in Puffer 2. Zum Detektieren der Hybride wurden die Schnitte mit einem anti-Dig-AP-Antikörper (Roche) in einer Verdünnung von 1:500 in Puffer 2 über Nacht bei RT in einer feuchten Kammer (Equilibrierungslösung Puffer 1) inkubiert. Die Objektträger wurden zweimal 15 min in Puffer 1 gewaschen. Durch eine Inkubation (1 min) in Puffer 3 erfolgte die pH-Wert Einstellung. Zum Visualisieren der Hybride wurde eine Färbelösung verwendet, in der die Schnitte je nach Intensität der Färbung 30-90 min inkubiert wurden. Die an den sekundären Antikörper gekoppelte alkalische Phosphatase dephosphoryliert BCIP (5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl Phosphate p-Toluidin Salz). Das entstehende Produkt reagiert in einer Redoxreaktion mit NBT (Nitro Blue Tetrazolium) zu einem wasserunlöslichen Farbstoff, der die Anwesenheit des sekundären Antikörpers anzeigt. Nach dem

Abstoppen der Reaktion in TE-Puffer wurden die Präparate in Glycerin-Gelatine (1:1) eingedeckt.

Puffer 1: 0,1 M Tris/HCl, 150 mM NaCl, pH 7,5
Puffer 2: 0,5 % (w/v) Blocking-Reagenz (Roche) in Puffer 1
Puffer 3: 0,1 M Tris/HCl, 100 mM NaCl, 50 mM MgCl₂, pH 9,5
Färbelösung: 4,5 µl/ml NBT, 3,5 µl/ml BCIP, 1 mM Levamisol in Puffer 3

2.3 Biochemische Methoden

2.3.1 Methoden zur Bestimmung der Proteinkonzentration

Proteinbestimmung nach Bradford

Für die Proteinbestimmung nach Bradford (1976) wurde das Roti-Quant-Reagenz (Roth) nach Angaben des Herstellers verwendet. Zur Kalibrierung diente in H₂O verdünntes BSA (1 µg - 10 µg). Die Proteinkonzentration wurde bei einer OD von 595 nm photometrisch bestimmt.

Proteinbestimmung mit Hilfe von Extinktionskoeffizienten

Bei Kenntnis der Aminosäuresequenz eines Proteins konnte dessen Konzentration über die Messung der Absorption bei 280 nm bestimmt werden. Mit einem Spektralphotometer wurde die Absorption der Proteinlösung in Quarzklasküvetten gemessen. Aus den Aminosäuren Tryptophan (W), Tyrosin (Y) und Cystein (C) wurde der molare Extinktionskoeffizient des Proteins mit folgender Formel berechnet:

$$\varepsilon_{280} [M^{-1}cm^{-1}] = (W) \cdot 5500 + (Y) \cdot 1490 + (C) \cdot 125 \quad (2.1)$$

Unter Anwendung des Lambert-Beerschen Gesetzes wurde die Konzentration der Proteinlösung über den ermittelten Extinktionskoeffizienten wie folgt berechnet:

$$OD = c \cdot d \cdot \varepsilon_{280} \quad (2.2)$$

Wobei OD = optische Dichte, c = Konzentration, d = Dicke der Küvette ist.

Amido-Schwarz-Proteinbestimmung

Die Amido-Schwarz-Färbemethode eignet sich für Proteinlösungen, die Detergenzien enthalten. Die Proteine (1,5 -3,0 µl der Proteinlösung) wurden in einem Gesamtvolumen von

310 µl mit 60 µl 104 % (w/v) TCA (Trichloressigsäure), 20 µl 10 % (w/v) SDS und 30 µl 1 M Tris-HCl/1 % (w/v) SDS, pH 7,5 über einen Zeitraum von 30 min bei Raumtemperatur präzipitiert. Ein Milliporefilter (Typ HA) wurde auf die Fritte einer Saugflasche gelegt und dreimal mit je 1 ml TCA (6 % (w/v)) gespült. Die Proteinlösung wurde auf den Membranfilter pipettiert und der Filter weitere dreimal mit 1 ml 6 % (w/v) TCA gewaschen. Für die Farbreaktion wurde der Filter für 3 min in Amido-Schwarz-Färbelösung überführt und anschließend 1 min in H₂O inkubiert. Danach erfolgte das Waschen in Entfärbelösung. Die Proteinkonzentration wurde anhand einer parallel durchgeführten Färbung mit einer BSA-Standardlösung (1-5 µg) abgeschätzt.

Amido Schwarz-Färbelösung: 45 % (v/v) Methanol, 10 % (v/v) Essigsäure, 0,5 % (w/v) Amido Schwarz
 Amido Schwarz-Entfärbelösung: 90 % (v/v) Methanol, 2 % (v/v) Essigsäure

2.3.2 SDS-PAGE nach Laemmli

Die Auftrennung von Proteinen unter denaturierenden Bedingungen erfolgte mit einem SDS-Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese-System (SDS-PAGE) nach Laemmli (1970). Dazu wurden diskontinuierliche Gele (Trenngel 10–14 % Acrylamidlösung (Roth), Sammelgel 3 % Acrylamidlösung) verwendet. Für die Auftrennung von Proteinen aus Bienenhirn wurde dieses zuvor homogenisiert, mit 160 µl H₂O versetzt und die festen Bestandteile bei 13.000 UpM (Biofuge pico) abzentrifugiert. Alle verwendeten Proben wurden vor dem Auftragen mit 0,2 Vol. SDS-Probenpuffer (Roth) versetzt und 5 min bei 95°C denaturiert. Je nach Konzentration der Proteine wurden 3-10 µl auf das Gel aufgetragen. Die Auftrennung erfolgte in SDS-Laufpuffer bei 80 mV im Sammelgel und 150 mV im Trenngel. Je nach weiterer Verwendung wurden die Gele danach mit Coomassie G250 (Serva) gefärbt oder die Proteine auf Nitrozellulosemembranen transferiert (siehe 2.3.3). Als Molekulargewichtsstandard dienten LMW (Low Molecular Weight, Dalton Mark VII - L Sigma) und HMW (High Molecular Weight Standard Mixture, Sigma).

Acrylamid-Lösung: 30 % Acrylamid/0,8 % Bis-Acrylamid im Verhältnis 37,5:1 (Roth)
 Trenngel-Puffer: 375 mM Tris/HCl, 0,2 % (w/v) SDS, pH 8,8
 Sammelgel-Puffer: 125 mM Tris/HCl, 0,2 % (w/v) SDS, pH 6,8
 SDS-Laufpuffer: 25 mM Tris, 250 mM Glycin, 0,1 % (w/v) SDS, pH 8,8
 Coomassie-Färbelösung: 0,1 % (w/v) Coomassie G250, 50 % (v/v) Methanol, 20 % (v/v) Essigsäure
 Entfärbelösung: 10 % (v/v) Methanol, 7 % (v/v) Essigsäure

2.3.3 Westernblot

Um die Proteine eines SDS-Gels elektrophoretisch auf eine Nitrozellulose-Membran (Protran nitrocellulose transfer membran, Schleicher & Schuell BioScience, Dassel) zu trans-

ferieren, wurde das „*Semidry*“-Verfahren in einem diskontinuierlichen Puffersystem angewendet. Auf der Anode der Blotkammer wurden sechs in Anodenpuffer I und drei in Anodenpuffer II getränkte Filterpapiere (Amersham Bioscience) angeordnet. Darauf folgten die Nitrozellulosemembran, das SDS-Gel und neun in Kathodenpuffer getränkte Filterpapiere. Der Proteintransfer erfolgte für 90 min bei 54 mA pro Gel. Die Effizienz des Transfers wurde durch Färbung mit Ponceau-Rot (Serva) überprüft.

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

2.3.4 Immundetektion

Auf Nitrocellulosemembran transferierte Proteine (z.B. homogenisierte Gehirne von *Apis mellifera*, Membranproteine transfizierter Zellen, Fusionsproteine) werden mit Hilfe von Antikörpern nachgewiesen. Zunächst wurden unspezifische Bindungsstellen durch 30 min Inkubation des Westernblots in TBST/5 % (w/v) Magermilchpulver (Bio-Rad) abgesättigt. Die Inkubation des Primärantikörpers (Verdünnung in TBST siehe unten) erfolgte über einen Zeitraum von 3 h bei affinitätsgereinigten Antikörpern (siehe 2.3.10) bzw. 1 h bei kommerziell erhältlichen Antikörpern. Nach dreimaligem Waschen mit TBST für 5 min erfolgte eine Inkubation mit dem sekundären Antikörper (verdünnt in TBST) für 1 h. Nach erneutem dreimaligen Waschen mit TBST erfolgte die Detektion der gebundenen Antikörper durch Chemilumineszenz mit dem ECL-System (Super Signal West Pico Chemiluminescent Substrate, Pierce) auf X-OMAT-AR-Filmen (Kodak).

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

Nachfolgend sind die verwendeten Antikörper aufgelistet.

Antikörper	Herkunft	Verdünnung
anti-HA	Roche	1:3.000
anti-5-HT7	Pineda Antikörper Service / Affinitätschromatographie	1:5.000
Präimmunseren	Pineda Antikörper Service	1:500-1:10.000

Tabelle 2.4: Primäre Antikörper und deren eingesetzte Verdünnung

Antikörper	Herkunft	Verdünnung
goat-anti-rabbit-HRP	American Qualex	1:10.000
goat-anti-rabbit-Cy3	Jackson ImmunoResearch Laboratories, West Grove, USA	1:200
goat-anti-rabbit-Cy2	Rockland, Gilbertsville, Pa., USA	1:200
goat-anti-rat-HRP	Jackson ImmunoResearch Laboratories	1:5.000

Tabelle 2.5: Sekundäre Antikörper und deren eingesetzte Verdünnung

2.3.5 Präabsorption

Durch dieses Experiment sollte die Spezifität des affinitätsgereinigten Antikörpers getestet werden. Hierzu wurde der primäre Antikörper vor der Inkubation mit dem Westernblot mit einem spezifischen Antigen (das für die Immunisierung verwendete Fusionsprotein) inkubiert. Das Fusionsprotein wurde in Konzentrationen von 5-15 $\mu\text{g/ml}$ eingesetzt. Die Inkubation erfolgte über Nacht bei 4°C.

2.3.6 Expression von Fusionsproteinen

Kompetente BL21-Zellen wurden mit prokaryotischen Expressionsplasmiden, die die entsprechenden cDNA-Fragmente enthielten, transformiert. Ausgehend von einer 5 ml Übernachtskultur (LB-Medium mit dem entsprechenden Antibiotikum) wurde eine 250 ml LB-Medium-Kultur beimpft. Diese Kultur wurde bis zu einer OD_{600} von 0,4-0,6 im Warmluftschüttler bei 37°C kultiviert. Die Proteinexpression wurde durch Zugabe von 1 mM IPTG induziert. Die Kulturen wurden weitere 4 h bei 37°C bzw. über Nacht bei 30°C inkubiert. Es erfolgte eine Zentrifugation bei 5.500 UpM (Biofuge pico) für 10 min. Das Pellet wurde in 1 ml TE-Puffer resuspendiert und mit einem Stabsonifizierer dreimal 30 s sonifiziert. Zur Trennung der löslichen und unlöslichen Bestandteile wurde 10 min bei 15.300 UpM zentrifugiert. Mittels SDS-PAGE wurde analysiert, ob sich das Fusionsprotein im Überstand (löslich) oder im Pellet (unlöslich) befindet. Bei löslichen Proteinen konnte der Überstand sofort für die folgende Aufreinigung verwendet werden. Bei unlöslichen Proteinen wurde unter denaturierenden Bedingungen gearbeitet. Dafür wurde das Pellet in 4 ml Lysepuffer resuspendiert. Es erfolgte eine Inkubation von 30 min auf Eis. Anschließend wurde fünfmal 30 s sonifiziert und 30 min bei 15.300 UpM und 4°C zentrifugiert. Das Pellet wurde in 6 M Guanidium-Hydrochlorid resuspendiert und 15 min bei RT inkubiert. Nach einer erneuten Zentrifugation bei 15.300 UpM für 15 min erhielt man einen Überstand, der das Fusionsprotein enthielt.

Lysepuffer: 10 mM Imidazol, 50 mM NaPO_4 , 300 mM NaCl, 1 mg/ml Lysozym

2.3.7 Reinigung von Fusionsproteinen mittels Amylose-Säulenchromatographie

Durch Verwendung des pMal-c2X Vektors wurden Fusionsproteine aus einem spezifischen Teil des Rezeptors und dem Maltosebindeprotein (MBP, kodiert durch das *malE* Gen) synthetisiert. Die Reinigung erfolgte durch Affinitätschromatographie über Amylose-Matrizes (New England Biolabs). Die Proteinlösung wurde im Verhältnis 1:5 mit Säulenpuffer versetzt. Eine Leersäule (Biorad) wurde mit 50 % Amylosematerial befüllt, so dass ein Endsäulenvolumen von 3 ml erhalten wurde. Das Säulenmaterial wurde mit 15 ml Säulenpuffer äquilibriert. Das Solubilisat mit dem Fusionsprotein wurde auf die Säule aufgetragen. Die Säule wurde mit 10 Säulenvolumen Säulenpuffer gewaschen. Die Elution des Fusionsproteins erfolgte in fünf Fraktionen mit je 1 ml Elutionspuffer. Die Proteinreinigung wurde auf einem SDS-Gel überprüft. Um eine möglichst hohe Konzentration des Fusionsproteins für die Immunisierung zu erreichen, wurden die Proben mit Hilfe eines Vivaspin-6-Zentrifugenkonzentrators (Vivascience, Hannover) aufkonzentriert, wodurch eine Endkonzentration von 2,1-2,8 mg/ml erreicht werden konnte.

Säulenpuffer: 200 mM NaCl, 20 mM Tris-HCl, pH7,4, 10 mM β -Mercaptoethanol, 1 mM EDTA
Elutionspuffer: 200 mM NaCl, 20 mM Tris-HCl, pH7,4, 10 mM β -Mercaptoethanol, 1 mM EDTA,
20 mM Maltose

Spaltung der MBP-Fusionsproteine mit Faktor Xa

Für Antikörpertests konnten die MBP-Fusionsproteine mit der Protease „Faktor Xa“ gespalten werden. Für die Reaktion wurden in einem Endvolumen von 50 μ l 1 μ g Faktor Xa (New England Biolabs) eingesetzt. Der Verdau erfolgte bei 23°C für mindestens 6 h in dem unten angegebenen Puffer.

Puffer: 20 mM Tris-HCl, 100 mM NaCl, 2 mM CaCl_2 , pH 8,0

2.3.8 Reinigung von Fusionsproteinen mittels Nickel-NTA-Säulenchromatographie

Der Vektor pET-30a trägt N-terminal eine His-Tag-Sequenz, die für 6 Histidinreste kodiert. Dies ermöglichte eine Reinigung des exprimierten Fusionsproteins mittels Ni-Chelat-Säulen (HIS-Select HF Nickel Affinity Gel System, Sigma), an die Histidinreste spezifisch binden. Zu der Proteinlösung wurden 2 ml der Ni-NTA (Nitrilo-Tri-Essigsäure)-Agarose gegeben und für 45 min auf einem Schüttler inkubiert. Anschließend wurden die Proben

3 min bei 15.000 UpM (Biofuge 15R) zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, das Pellet in Waschpuffer resuspendiert, und erneut zentrifugiert. Dieser Vorgang wurde zweimal wiederholt. Nach erneutem Resuspendieren in Waschpuffer wurde die Lösung in eine Leersäule (Bio-Rad) überführt. Die Elution des gebundenen Fusionsproteins erfolgte in vier Fraktionen mit je 500 µl mit Elutionspuffer. Die Proteinreinigung wurde auf einem SDS-Gel überprüft.

Waschpuffer: 20 mM Imidazol, 50 mM NaPO₄, 300 mM NaCl
Elutionspuffer: 250 mM Imidazol, 50 mM NaPO₄, 300 mM NaCl

2.3.9 Herstellung polyklonaler Antiseren

Für die Gewinnung eines polyklonalen Antiserums wurden zwei Fusionsproteine benötigt. Ein charakteristischer Teil der Rezeptor-cDNA wurde durch eine PCR mit spezifischen Primern amplifiziert. Die Primer verfügten über Schnittstellen für Restriktionsenzyme, welche eine Subklonierung der erhaltenen Fragmente in die Vektoren pET-30a und pMal-c2X Vektor ermöglichten. Am 3'-Ende wurde dem Fragment über die Primer ein Stopp-Kodon angefügt. Es erfolgte eine Überexpression der Konstrukte (siehe 2.3.6) und eine anschließende Aufreinigung der Fusionsproteine. Das durch die Expression des pMal-c2X-Konstrukts entstandene Fusionsprotein wurde für die Immunisierung verwendet. Das pET-30a-Konstrukt diente zur Expression des Antigens für die spätere Affinitätsreinigung des polyklonalen Antiserums. Die Herstellung der polyklonalen Antikörper wurde bei der Firma Pineda (<http://www.pineda-abservice.de>, Berlin) in Auftrag gegeben. Um vor der Immunisierung eine Auswahl geeigneter Tiere zu treffen, wurden Präimmuseren von insgesamt vier Kaninchen mittels Westernblotanalyse getestet. Die zwei Tiere, deren Seren die geringste Kreuzreaktion mit dem zur Immunisierung vorgesehenen Fusionsprotein zeigten, wurden für die Immunisierung nach dem Standardprotokoll der Firma Pineda ausgewählt.

2.3.10 Affinitätschromatografie polyklonaler Antikörper

Als Antigen für die Affinitätsreinigung des polyklonalen Antikörpers mittels HiTrap NHS-activated HP-Säulen (Amersham Bioscience) wurde das HIS-Tag-Fusionsprotein eingesetzt. Vom gereinigten Antigen (0,8-0,9 mg/ml) wurden 2 ml auf die Säule überführt. Die Kopplung des Antigens und die weiteren Waschschrte wurden entsprechend des Amersham Bioscience-Protokolls (für HiTrap NHS-activated HP-Säulen) mit Hilfe einer Niedrig-Druck-Flüssigkeits-Chromatographie-Anlage durchgeführt. Das Beladen der Säule mit dem Antiserum erfolgte über Nacht, indem 50 ml des Antiserums in einem Kreislauf

über die Säule gepumpt wurden. Nach dreimaligem Waschen mit 10 mM Tris/HCl, pH 7,5, wurden die gebundenen Antikörper durch einen pH-Gradienten eluiert (100 mM Glycin, pH 2,5). Die OD₂₈₀ der Proben wurden spektroskopisch bestimmt, um die Antikörperkonzentrationen abzuschätzen.

2.3.11 Kultivierung von Pilzkörperzellen

Es wurden die Pilzkörperkelche adulter Sammlerinnen präpariert und in L15 (Leibovitz)-Medium (Gibco) zwischengelagert. Nach einer 20minütigen Inkubation bei 37°C in einem Collagenase/Dispatase-enthaltenden, Ca²⁺-freien Ringer, wurden die Calyces dreimal mit L15-Medium gewaschen. Zwischen den Waschschritten erfolgte jeweils eine Zentrifugation für 3 min bei 1.000 UpM. Danach wurden die Pilzkörper-Zellen in 300 µl L15-Medium aufgenommen. In eine Kulturschale wurde die Suspension von insgesamt sieben Pilzkörpern überführt und nach 30 min mit BM3-Medium aufgefüllt. Nach einer Inkubation der Zellen über Nacht bei 37°C, wurden sie von der Kulturschale geschabt und in PBS/SDS-Probenpuffer aufgenommen. Nach der Denaturierung der Proteine für 5 min bei 95°C wurden sie gelelektrophoretisch aufgetrennt (siehe 2.3.2).

BM3-Medium: L15 (Leibovitz) Medium, (Sigma), 15% (v/v) fetal calf serum

2.4 Heterologe Expression in HEK 293-Zellen und Funktionalitätsnachweis

2.4.1 Konstruktion eines Expressionsvektors

Für die heterologe Expression in eukaryotischen Zellen wurde die Rezeptor-kodierende DNA modifiziert. Durch eine PCR mit spezifischen Primern wurde eine Kozak-Konsensus-Sequenz (Kozak, 1984) direkt vor das am 5'-Ende befindlichen ATG-Start-Kodon angefügt (Primer siehe 5.1). In zwei weiteren PCR-Reaktionen wurde das Stopp-Kodon am 3'-Ende entfernt und eine Haemagglutinin A (HA)-Tag-kodierende Sequenz (YPYDVPD-YA) angefügt. Dadurch war der Nachweis der heterologen Expression des Proteins mittels eines kommerziell erhältlichen anti-HA-Antikörpers möglich. Die Ligation der vollständigen, modifizierten cDNA erfolgte in den eukaryotischen Expressionsvektor pcDNA3.1(+) Vektor mit Hilfe der durch Primer eingefügten Schnittstellen (siehe 2.2.4).

2.4.2 Herstellung stabiler Zelllinien

Von der modifizierten, in den pcDNA3.1-Vektor integrierten cDNA wurden 8 µg in exponentiell wachsende HEK 293-Zellen (2×10^5 Zellen, 5 cm-Petrischale) durch Calciumphosphatpräzipitation (Chen and Okayama, 1987) transfiziert. Nach einer Inkubation bei 37°C über Nacht wurden die Präzipitate entfernt und 2×10^4 Zellen erneut ausgesät. Am folgenden Tag erfolgte ein Mediumwechsel gegen ein Medium (MU2), das zur Selektion transfizierter Zellen das Antibiotikum G418 (Gentamycinsulfat, 1 mg/ml) enthielt. Nach einer Inkubation über Nacht wurde das Medium erneut gewechselt, wobei G418 in einer Konzentration von 1,2 mg/ml eingesetzt wurde. Nach einem weiteren Mediumwechsel am nächsten Tag (1 mg/ml G418) erfolgte die Selektion der Zellklone über ca. 14 Tage mit Mediumwechsel im Abstand von drei Tagen. Einzelne Zellklone wurden abgelöst und in Multiwellschalen vermehrt. Bei eindeutig stabil transfizierten Linien wurde das Antibiotikum auf 0,8 mg/ml reduziert. Durch Membranpräparationen der Zellen und anschließende Westernblotanalyse (siehe 2.3.3) wurde die stabile Expression der Proteine nachgewiesen.

MU2-Medium: MEM + GlutaMAXTMI (Invitrogen), 2% (w/v) Ultrosor G (Ciphergen, Cergy-Saint-Christophe, Frankreich), 1% nicht essentielle AS, 1 x Penicillin/Streptomycin, 800 µg/ml G418

2.4.3 Präparation von Membranproteinen

Aus 5 cm-Schalen wurde das Kulturmedium abgesaugt und die Zellen zweimal mit 1x PBS gewaschen. Der PBS-Puffer wurde entfernt und die Zellen in 1 ml PBS mit einem Gummischer abgelöst, in ein ER überführt und 5 min bei 2.000 UpM zentrifugiert. Das Pellet wurde in Lyse-Puffer resuspendiert und anschließend mit einem Pistill homogenisiert. Nach 10 min Inkubation auf Eis wurden die Proben für 30 min bei 13.000 UpM zentrifugiert. Der Überstand mit den zytosolischen Proteinen wurde separat aufbewahrt. Das Membran-Sediment wurde in Puffer I resuspendiert. Nach Zugabe von 2 % (w/v) CHAPS (3-[(3-Cholamidopropyl)dimethylammonio]-1-propansulfonat) wurden die Membranproteine durch 10 min Inkubation auf Eis solubilisiert. Es folgte eine Zentrifugation für 5 min bei 12.000 UpM. Der Überstand enthielt die Membranproteine. Durch eine Amido-Schwarz-Proteinbestimmung (siehe 2.3.1) wurde die Konzentration der Membranproteine ermittelt.

Lyse Puffer: 10 mM NaCl, 25 mM HEPES, pH 7,5, 2 mM EDTA, Protease-Inhibitor:
Pefablock 500 mg/ml, Verdünnung 1:250

Puffer I: 200 mM NaCl, 50 mM HEPES, pH 7,5, Pefablock 500 mg/ml

2.4.4 Deglykosylierung von Membranproteinen

Für die Deglykosylierung wurden 20 µg der Membranproteine aus transfizierten HEK 293-Zellen eingesetzt und mit H₂O auf ein Volumen von 22,5 µl aufgefüllt. Nach der Zugabe von 1x Denaturierungspuffer erfolgte eine Inkubation von 10 min. Zu dem Ansatz wurden 1/10 Vol. 0,5 M Natriumphosphat (pH 7,5) und 1/10 Vol. 10 % NP-40 gegeben. Anschließend wurde der Ansatz mit 500 U PNGase F (New England Biolabs) versetzt und 2 h bei 37°C inkubiert. In einem Parallelansatz erfolgte anstelle der Enzymzugabe nur eine Zugabe von H₂O. Der Nachweis der Deglykosylierung erfolgte durch Westernblotanalyse (siehe 2.3.3).

10x Denaturierungspuffer: 5 % (w/v) SDS, 10 % (v/v) β-Mercaptoethanol

2.4.5 cAMP Assay

Die stabil transfizierten Zellen (siehe 2.4.2) wurden in 6er Multiwellplatten mit einer Dichte von 1×10^5 /Well ausgesät. Nach zwei Tagen wurde den Zellen über Nacht 3 mM Butyrat (Endkonzentration) pro Well zugesetzt. Nach dem Absaugen des Mediums wurde zweimal in 1x PBS/100 µM IBMX (Isobutylmethylxanthin, Phosphodiesterase-Hemmer) gewaschen. Anschließend erfolgte eine 30minütige Inkubation bei 37°C in PBS/IBMX und verschiedenen Konzentrationen der Test-Liganden. Die Zellen wurden durch Zugabe von 1 ml eiskaltem Ethanol lysiert und zur Freisetzung des gebildeten cAMPs für 2 h bei 4°C auf einem Taumler inkubiert. Die Zellysate wurden in ERs überführt und in einer Vakuumzentrifuge 2 h lyophilisiert. Die cAMP-Konzentration der Zellysate wurde mit dem TRK 432-cAMP-Assay-Kit (Amersham Bioscience) bestimmt. Für jeden Messwert wurden Doppelbestimmungen von zwei unabhängigen Transfektionen durchgeführt. Die intrazellulären cAMP-Konzentrationen der Lysate wurden anhand einer Kalibrierung, die parallel aus Standardkonzentrationen von radioaktiv markiertem cAMP erstellt wurde, abgelesen. Die Daten wurden mit Hilfe der Software PRISM (Version 4.01; GraphPad, San Diego, USA) ausgewertet.

2.5 Bioinformatische Analysen

Für die Suche nach Datenbankeinträgen und BLAST-Analysen (Altschul et al., 1997), wurden die online verfügbaren Datenbanken des *National Center of Biotechnology Information* (NCBI, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/index.html>) genutzt. Durch

die Verwendung der Datenbank des Bienengenom-Projektes (Honey Bee Genome Project, <http://www.hgsc.bcm.tmc.edu/projects/honeybee/>) konnten annotierte Sequenzen von gesuchten Genen ermittelt und die entsprechenden cDNA-Fragmente durch PCR-Reaktionen amplifiziert werden. Außerdem war es durch das Genom-Projekt möglich, Aussagen über die Genstruktur zu erhalten. Cluster-Analysen wurden mit Hilfe des Programms ClustalX (Version 1.81; Thompson et al., 1994) durchgeführt und die Ergebnisse mit TreeView (Version 1.6.6; Page, 1996) dargestellt. Für sonstige Analysen und Darstellungen wurde das Programm BioEdit (Version 5.0.9.; Hall, 1999) verwendet.

, verstärkte Chemolumineszenz

Kapitel 3

Ergebnisse

3.1 Der Am5-HT₇-Rezeptor

3.1.1 Isolierung der Am5-ht7 cDNA

Zur Klonierung einer cDNA, die für einen Serotonin-Rezeptor der Honigbiene kodiert, wurden PCRs mit degenerierten Oligonukleotidsequenzen durchgeführt. Die Primer-Sequenzen (siehe Anhang Tab. 5.1) wurden aus konservierten Sequenzabschnitten bekannter biogener Amin-Rezeptoren verschiedener Arthropoden abgeleitet. Der 5' Primer lag im Bereich der TM VI. Die Sequenz des 3' Primers deckte hoch konservierte Sequenzen innerhalb der TM VII biogener Amin-Rezeptoren ab. Beide Primer waren mit einer *EcoRI* Schnittstelle ausgestattet, um die Subklonierung der PCR-Produkte in den pBluescript SK⁻ Vektor zu erleichtern. Es wurde ein 160 bp langes Fragment aus der *Apis mellifera* cDNA-Bibliothek amplifiziert. Ein Vergleich mit der Datenbank des NCBI zeigte, dass das Fragment zur 5-HT₇-Rezeptor-Sequenz von *Drosophila melanogaster* (Witz *et al.*, 1990) homolog ist.

Dieses Fragment wurde als Sonde zum Durchmustern der cDNA-Bibliothek (siehe 2.2.12) verwendet. Die durch Autoradiographie identifizierten sechs rekombinanten Klone wurden mittels „*in vivo excision*“ (siehe 2.2.13) isoliert. Die Sequenzierung zeigte, dass kein Klon für einen vollständigen Rezeptor kodierte.

Aus diesem Grund erfolgte ein erneutes Durchmustern der cDNA-Bibliothek mit einem 200 bp langen *EcoRI/XhoI*-Restriktionsfragment, das vom 5' Ende des längsten isolierten Klons stammt. Es konnten zwölf weitere Rekombinante identifiziert werden. Ein Klon enthielt die vollständige cDNA eines Serotonin-Rezeptors: Am5-ht7 (Abb. 3.1). Die Nukleotidsequenz ist in der EBI Datenbank unter der *Accession Number* AM076717 hinterlegt.

```

GGCACGAGTATCTCCCTAGTCAGCTAGGGAAGTCGAAGCAACAGGACGAAGCTCAAAACAGATCGTTTCGAACTTGCAGCATGGACTTTCTCCCTTCGCTAA 100
ACGATCGTTGTGCAAACTATCGTTAAGTTATCAATATATAATCTTTTCCCTTAAACAAAAAAAGTGATGATTGAAAGTGAAGCTGTCCATTGGTTAACA 200
AATTAATTGAATTTCAATTAATTGAATTCGATAAATATCGATTTGAAAAAATAAGTATTCAATGAATTACAATCATTATATAATGTAATATTGTTCAGA 300
ATATTGAAAGATATTAGTTCGGAAGAGAAAGTGTGTTGGAACATGTGAAAAATCATAGAGCAACGATATAAAAAAAATTAATAAGTTTTTTTATTTCGTAA 400
GAAATCGTTCAATCAAAAAAGTAAATGAAAAGAAAGTATAAGCAAAAAAGAAATCGCCATTAGGAAATTCATAAAAAAAAGCTCTAGATTAAAAAAAATCT 500
TTTTCTTTCTTCATTTATTTTCGTGCTCAAATATCGTACGTAAAATGGAAGATACGCAGAAATTCGATGTTTTTATTTCTTTCTCTTTTAAAT 600
TTCTTTCTACTTTCATCAAGTGTGAGAAAAGAAAGGAGTGTGGAATAAGTGTAAAGATAGGATAAAGGTCAACGTACCTGTTTTGTTTCACCTACAG 700
TTCAACTGTAGTCGTTATTTTCCGGGCAGTTGGAATAGTGTGTTGAAATGGTAATTACATTGGAGTGTGTGAACAGTTTCTGGTGATCTCGACGAAG 800
TTTCTCGAGAGATGAATTAACCATGCAAGGATCGACGATCGATTGGGAGATAAAGGAATCCAATGGAACTGGTATTCCTGTATTTGCAGTACTTCGATA 900
AGAGCATCGCATATTTGTTTCTACAAAGGAATACCTGAACGGCACACCGCCGATGTACTACTCATCATCCAGCATTATGATCAATTCATATGATGTT 1000
TCCGAGAGTGGATAGTGTGAGCTGTAACAAACAACAAATTGAGGTAGATTGTAGTCTTTGGAATCGAGGGAAGATTTCCATGCACGGATCAAGCCTTCCT 1100
GGAATCTATGGTCGAGAAAGGAGGGAAGGAGCATGACGTAGCCGTCGACTTTGGGGGGCGCTTCGGATGCTCCAGATTGCCGATTAGTCTCGTATGAG 1200
GGGAGGACGCAATCACCCTGAAGACATCCTGCTTTTAAACCTGACCACACAAGACGTCGACGGCTTCTCCAAGGATTTCCCGGCAAAACCTCGCCCT 1300
ATACGGTCAACCCAGGCAACTTATCGCCTTGGTGTCTCGGAGTATCATCGTCGGGACGTGTATCGGTAACATTCTGGTTTGGCTCCCGCTATTCCTCGT 1400
TAGGAAGCTGCGAAGCCCTTGAACACTATCTTGGTTAGCCTTGCAGTTAGCGATCTCTGCGTTCGCTTCTTGGTAAATGCCGATGGCCCTACTCTACGAG 1500
GGGAGGACGCAATCACCCTGAAGACATCCTGCTTTTAAACCTGACCACACAAGACGTCGACGGCTTCTCCAAGGATTTCCCGGCAAAACCTCGCCCT 1600
CTGTGGACCGATTCTGTGCCATAACGAAGCCGTTGAAATACGGGGTGAAGGACGCCACGAAGAATGATCGTCTATGTCAGCCTTGTGGCTAGGGGC 1700
AGCCTGCATAGTCTGCCACCATTTGTTGATTTATGGGAAATGAGCACACTTATTTCTGAAACTGGACCATCCCATTTGCGTGTGTTGCGCAGAAATTTCTTCTAC 1800
CAGATTTACGCCACCGTTCCTATATACCTTTTATTCGTGATGATTCAGGTACTACAAAATATTTCTGCGCGCGCGGTAGGATAGTTCTGGAAG 1900
AAAGAAGAGCGCAGAGCCATTTGGAAGCACATTGTTACTTTGATATAGAGCCAACAGTGAACAGCATCAGCCAGTACTGTGAATCGTCAATTAATTC 2000
CGATGTGCAGCCAGGACATGGTAGTCCGCCGTAAGCAACATCGAAATTCGAGCGCTCGACCCAGTGTAGTGGTCATACAGTACGGTGTGTTTACCAGT 2100
GGTCTTCGCAAAAGTCAATGAATCGAATGTCCTGAGAACTGAGAGGCGCTCCTCTCTTCAATCCAGCAACAGCATCCCGCATGACATCGA 2200
CCAAGTCGACGATTGTGAGAAACCATTGAAACAGCACCTGTAGTGAACAAATTCGCGCATCAGAAGAAATTAAGGTTCCATCTGGCAAAAGAAAGAAA 2300
AGCCAGCACTACATTAGGAATCATAATGAGCGCTTTCATAGTTTGTGGTTACCCGTTCTTGTATTAGCCTTGGTCAGGCCATTCCTTAAGAAATCCAGAT 2400
GCTATCCCAGCATTTTATCCAGTCTATTTCTTTGGCTTGGTTATGCAACAGTCTATTGAATCCATCATCTATGCGACTCTGAACAGGATTTTCGAA 2500
AACCATTTCCCGAGATCCTTTACTTCCGTTGCGAGTAACTTGAACCATATGATGAGAGAAGAAATTTTATCAGAGCCAATACGGGATCCTTATTAATAATTG 2600
TGAGATCAAGGCTGGCGAAATAGACGCTGAGCGTCTCAATAATCAAGGTATCGAATCAATCGACATTCGTCGAAACGCTCCTAATGAGAGCTTCTCTG 2700
TCCGGGATAATCTCGATCATCGAGTCAATCGCAAAAGTCTTGAACAAATTTGAATCCACCATAATTGATTTTCATTTTCGATTTTCACGAACAAAACACT 2800
GATTTGAGAGTATTTGATTCGAATGTTATAAATTTTTAAATTTGATTTTCACTATATAACTGTGATGTGATAGTTCATTCGCTTACACATTTAAC 2900
ATGAGAAATGAAAGAAATGAAATGAAATCAAGCTATATTTAATTTATAAAAAATCAAGATCAATTAATAAATAAATAAATAAATTTTCTGAAATTA 3000
TTAAGTATTTGTAATAATCATAATCCACATTTAATAATCATATATATAACACGTTCAATCCGGATAATGACTTAACACACAAAATCTTTATACAAA 3100
TAGAGAAGTAATGTAATGAAATAAATCTTTTATATAATCCTTATAAAACCAAATTTTGTTCAAAATATATAGGTAATATAACATAGTTAGAAAACCTTAT 3200
TAAAAATAAATGAAATAAATTTCTTTATTTTATTTAATAATAAAGTTTATTAATATTTGCGATTGTTTTATTTGTAATACAAGTTTTTTGTTTGA 3300
ATATAAGTTAATATTGATTAATCAAATTAATTTTATTTATTTAGAGAAATCTTAAACAAAATTAATAGTATTAATATAAATAAATAAATACATAT 3400
AATAGAAACAATTTTAAATGAGTTCAATCTCTTAAAAATTTCTTCTGAAATAATATTATGACAACAATAATTAATTTTGTGATATATAAATAAAA 3500
ATGAATCAAATCTTACTTTTACTGTTTAAAGATCCGGGTTGAATATGTTAAAAACTGAATATGTTAAATAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTA 3600
TCACTTGAACAGTGGTGAAGAAATCTGTTCCAGAGATATATAGCTATTGGCTCGATTCATTTTTCACATGATCAGATGTCCAAACAAAACCTCGTTAAA 3700
TCTTTTCCGTTTTCATGACAAGGAAAGGATGATCTCTGTACTATCTTTGCGAAGTAAATAGAAAAAGAAAGATCTAACAAATCGGAACAGACACTTTTTG 3800
ACTAACTAGATCATGTGAAGAGTGGCATCAAGAAGAAGAAATGTTGAAGAAATTTCTTAAGGGTTTAAACGTGATTATCTCGATTGGATAATCGAA 3900
AATGAAACATTCGAAAAATAGAATGATTAGAAAAGATCGATATTAATATACATTCGCTTAAAGGTGTGATATACGAATAAAGCAAAAGTTTCATGTTTCGAAA 4000
AATATGTTATATTATGTACATAGAACATATGATAAATAATTTATGTAGTGTGATCAATAATCCTGAAATATGTAATTAATAAAAAAAAAAAAAA 4097

```

Abbildung 3.1: Nukleinsäuresequenz des Am5-ht7-cDNA-Klons. Die Nukleotidabfolge ist in 5'-3'-Richtung dargestellt. Die Position des letzten Nukleotids jeder Zeile ist rechts neben der Sequenz angegeben. Das Start-Kodon (ATG) sowie das Stopp-Kodon (TGA) ist schwarz unterlegt.

3.1.2 Strukturelle Eigenschaften der Am5-ht7 cDNA und Organisation des Am5-ht7-Gens

Die isolierte cDNA (Am5-ht7) besteht aus 4.097 bp. Das Start-Kodon (ATG), das den Translationsstart des längsten offenen Leserahmens markiert, befindet sich an Position 1195-1197. In 5'-Richtung sind vor dem Initiationskodon in allen drei Leserahmen Stopp-Kodons vorhanden. Der längste offene Leserahmen wird durch ein Stopp-Kodon (TGA; Position 2698-2700) beendet. Der 3' nicht kodierende Bereich besteht aus 1397 Nukleotiden und wird durch einen Poly(dA)-Schwanz bestehend aus 16 Resten abgeschlossen.

Die Analyse der genomischen Organisation (Abb. 3.2) des Am5-ht7 Gens zeigt, dass das Gen aus mindestens sieben Exons besteht, die auf sechs, nicht überlappende Contigs verteilt sind: contig13443 (#AADG05013443), contig6992 (#AADG05006992), contig8165 (#AADG05008165), contig9136 (#AADG05009136), contig10192 (#AADG05010192),

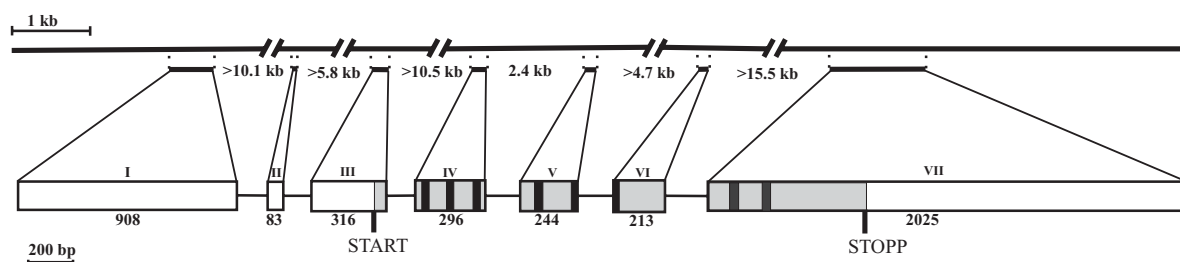


Abbildung 3.2: **Genomische Organisation des Am5-ht7-Gens.** Das Honigbienen Genom (Version 2.0, <http://www.hgsc.bcm.tmc.edu/projects/honeybee>) wurde mit der Am5-ht7 cDNA Sequenz durchmustert. Die Verteilung der Exons (I-VII) ist unterhalb der genomischen DNA (obere schwarze Linie) schematisch dargestellt. Die minimale Größe der Introns ist in kb angegeben. Die Unterbrechungen stellen unbekannte Intronlängen dar. Die cDNA ist als Kasten dargestellt. Die Zahlen unter den Kästen geben die Größe der Exons in bp an. Nicht-kodierende Bereiche sind weiß gekennzeichnet. Das Start- und Stopp-Kodon definieren den kodierenden Bereich (graue Kästen). Die Position der sieben Transmembrandomänen wird durch schwarze Kästen angezeigt.

und contig7017 (#AADG05007017). Die Exons sind durch sehr große Introns voneinander getrennt. Der kodierende Bereich des Rezeptor-Proteins ist auf fünf Exons verteilt. Interessanterweise befindet sich eine der Exon/Intron-Grenzen innerhalb des Sequenzbereiches, der für die TM V kodiert. Weitere Exon/Intron Übergänge liegen im N-Terminus und in der zweiten und dritten zytoplasmatischen Schleife.

Exon	cDNA-Position	Contig-Nr.	Contig-Position	Spleißdonor-stelle	Spleißakzeptor-stelle
I	8-915	6992	15508-16427	—	TATTA/gttcc
II	916-998	7017	6374-6456	gccag/TTGTT	ATGAT/gtacg
III	999-1314	8165	13620-13303	tccag/GTTTG	CCCAG/gtaaa
VI	1315-1610	9136	4630-4927	ttag/GCAAT	GACCG/gtgag
V	1611-1854	9136	7385-7632	catag/ATTCT	TTCAG/gtaag
VI	1855-2067	10192	549-766	ttcag/GTATA	CCACG/gtgag
VII	2068-4092	13443	18526-16506	tacag/TGTAG	—

Tabelle 3.1: **Genomische Organisation des Am5-ht7 Gens.** Die Exon/Intron Übergänge sind für das jeweilige 5'- und 3'-Ende des Exons angegeben. Für die Intron-Sequenz wurden Kleinbuchstaben verwendet, Exon-Sequenzen sind als Großbuchstaben dargestellt.

3.1.3 Eigenschaften der abgeleiteten Aminosäuresequenz

Der längste offene Leserahmen der Am5-ht7-cDNA kodiert für ein 501 Aminosäuren langes Protein (Am5-HT₇). Das Protein hat eine berechnete Molekularmasse von 56.1 kDa (Abb. 3.4).

Das Hydropathieprofil des Am5-HT₇-Proteins (Abb. 3.3) zeigt sieben hydrophobe Bereiche, die eine ausreichende Länge haben, um die Membran vollständig zu durchspannen

(TM I - VII).

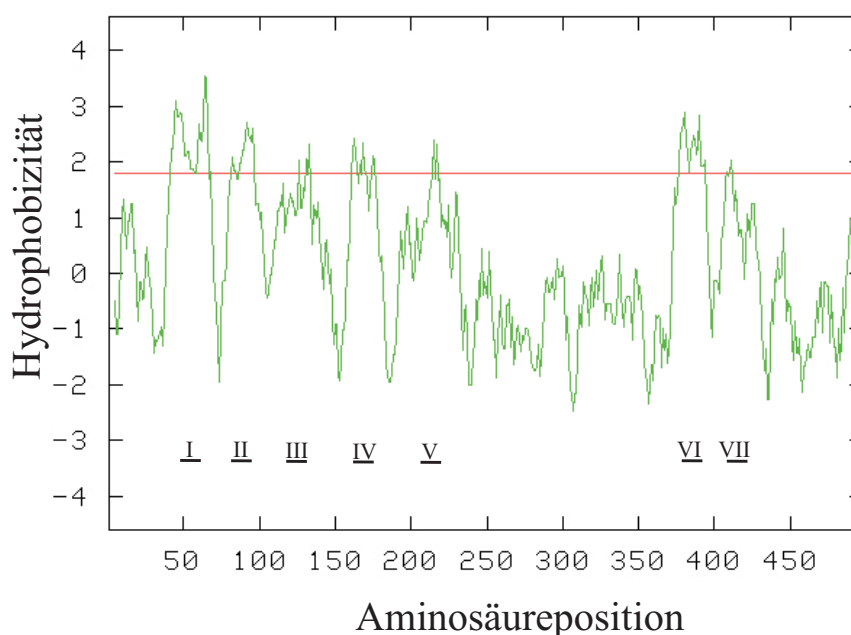


Abbildung 3.3: **Hydrophathieprofil der abgeleiteten AS-Sequenz des Am5-HT₇-Rezeptors.** Die Hydrophobizität wurde nach Kyte und Doolittle (1982) mit einer Fensterweite von 19 Aminosäuren ermittelt und gegen die jeweilige Aminosäure-Position aufgetragen. Hydrophobizitätswerte > 1,6 gelten als Kriterium, dass eine Transmembranregion vorliegt. Die potentiellen Transmembranregionen sind eingezeichnet.

In allen Rhodopsin-ähnlichen GPCRs ist der N-Terminus extrazellulär lokalisiert. Dieser Abschnitt besteht bei Am5-HT₇ aus 44 Aminosäuren (Abb. 3.4). Im Aminoterminus (N₁₆LT) und der ersten extrazellulären Schleife (N₁₀₆WS) sind Konsensusstellen für N-Glykosylierung vorhanden (N-x-S/T; Kornfeld und Kornfeld, 1985). An den Positionen T₁₅₄, T₂₉₆, und S₃₃₅ befinden sich Konsensusstellen für die Phosphorylierung durch die Proteinkinase C (S/T-X-R/K).

Die Am5-HT₇-Sequenz enthält weitere Aminosäurereste, die in der Familie der biogenen Amin-Rezeptoren hoch konserviert sind. Dazu gehören unter anderem ein Aspartat-Rest (D₁₂₁) in der TM III und ein Phenylalanin-Rest in der TM VI (F₃₈₁). Der Phenylalanin-Rest interagiert mit dem aromatischen Katecholring des Liganden. Die protonierte Aminogruppe des Liganden bindet an den Aspartat-Rest der TM III (Strader *et al.*, 1989). Die Hydroxylgruppe des Liganden bildet Wasserstoffbrückenbindungen zu einem Aminosäure-Rest in der TM V aus. Im Am5-HT₇-Rezeptor ist dies ein Threonin-Rest (T₂₀₇), der charakteristisch für an die Adenylat-Zyklase gekoppelte Rezeptoren ist (Donnelly *et al.*, 1994).

```

ATGGAGGGGAAGGACGCAATCACCCTGAAGACATCCTGCCTTTTAAACCTGACCACACAAGACGTCGACGGCTTCCTCCAAGGATTTCCC 90
M E G K D A I T T E D I L L L N L T T Q D V D G F L Q G F P 30
GGCAAAACTCGCCCTATACGGTCACCCAGGCAATACTTATCGCCTTGGTGCTCGGCAGTATCATCGTCGGGACTGTGATCGGTAACATT 180
G K N S P Y T V T Q A I L I A L V L G S I I V G T V I G N I 60
CTGGTTGCGTCGCCGTATTCCTCGTTAGGAAGCTGCGAAGGCCTTGAACATATCTCTTGGTTAGCCTTGCAGTTAGCGATCTCTGCGTC 270
L V C V A V F L V R K L R R P C N Y L L V S L A V S D L C V 90
GCTCTTCTGGTAATGCCGATGGCCTTACTCTACGAGATTTCCGGTAATTGGTCCTTCGGTACAATTATGTGCGACCTTTGGGTTAGCTTC 360
A L L V M P M A L L Y E I S G N W S F G T I M C D L W V S F 120
GACGTGCTCAGTTGCACGGCTAGCATCCTGAATCTCTGCATGATCTCTGTGGACCGATTCTGTGCCATAACGAAGCCGTTGAAATACGGG 450
D V L S C T A S I L N L C M I S V D R F C A I T K P L K Y G 150
GTGAAAAGGACGCCACGAAGAATGATCGTCTATGTGACGCTTGTGGTGGCTAGGGGCGAGCCTGCATTAGTCTGCCACCATTGTTGATTATG 540
V K R T P R R M I V Y V S L V W L G A A C I S L P P L L I M 180
GGAAATGAGCACACTTATTCTGAACTGGACCATCCCATTCGCTTGTGGTGGCAGAAATTCCTTCTACCAGATTTACGCCACGCTTGGGAGC 630
G N E H T Y S E T G P S H C V V C Q N F F Y Q I Y A T L G S 210
TTCTATATACCTTTATTCGTGATGATTCAGGTATACTACAAAATATTCTGCGCGCGGCTAGGATAGTTCTGGAAGAAAGAAGAGCGCAG 720
F Y I P L F V M I Q V Y Y K I F C A A R R I V L E E R R A Q 240
AGCCATTTGGAAGCACATTGTTACTTTGATATAGAGCCAACAGTGCAACAGCATCAGCCAGTGACTGTGAATCGTCAATTAATTCGGAT 810
S H L E A H C Y F D I E P T V Q Q H Q P V T V N R Q L N S D 270
GTGCAGCCAGGACATGGTAGTCCGCCCGTAAAGCAACATCGAAGTTCGAGCGCCTCGACCACGTGTAGTGGTCATACAGTACGGTGTGTTT 900
V Q P G H G S P P V K Q H R S S S A S T T C S G H T V R C F 300
ACCGTGGTTCCTCGCAAAAGTCATGAATCGCAATGTCCAATGCTTCAGAAGCTCGAGAAGCCCGTCTCTTTCATCCACGACAACGACA 990
T G G P R K S H E S Q C P M L Q K L E K P V L S S S T T T T 330
TCGCCGATGACATCGACCAAGTCGACGATTGTGAGAAACCTTTGAACAGCACCTGTAGTGTAAACAAATTCGCCGATCAGAAGAAATTA 1080
S P M T S T K S T I V R N H L N S T C S V T N S P H Q K K L 360
AGGTTCCATCTGGCAAAAGAAAAGAAAGCCAGCACTACATTAGGAATCATAATGAGCGCTTTCATAGTTTGTGGTTACCGTTCTTTGTA 1170
R F H L A K E R K A S T T L G I I M S A F I V C W L P F F V 390
TTAGCCTTGGTACAGGCATTCCTTAAGAATCCAGATGCTATCCAGCATTATTTATCCAGTCTATTTCTTGGCTTGGTTATTGCAACAGT 1260
L A L V R P F L K N P D A I P A F L S S L F L W L G Y C N S 420
CTATTGAATCCTATCATCTATGCGACTCTGAACAGGGATTTTCGAAAACATTTTCGCGAGATCCTTTACTTCCGTTGCAGTAACCTTGAAC 1350
L L N P I I Y A T L N R D F R K P F R E I L Y F R C S N L N 450
CATATGATGAGAGAAGAATTTTATCAGAGCCAATACGGCGATCCTATTAATAAATGTGAGATCAAGGCTGGCGAAATAGACGCTGAGCGT 1440
H M M R E E F Y Q S Q Y G D P I N N C E I K A G E I D A E R 480
CTCAATAATCAAGGTATCGAATCAATCGACATTGCTGCAACGCTCCTAATGAGAGCTTCTGTGA 1506
L N N Q G I E S I D I A A N A P N E S F L * 501

```

Abbildung 3.4: Abgeleitete Aminosäuresequenz der *Am5-ht7*-cDNA. Die Position der letzten Aminosäure bzw. der letzten Nukleinsäure jeder Zeile ist rechts neben der Sequenz angegeben. Die Positionen der potentiellen Transmembransegmente (TM I-VII) sind grau unterlegt. Konsensusstellen für N-Glykosylierung sind mit ▼ gekennzeichnet, potentielle Konsensusstellen für Phosphorylierung durch PKC mit •.

Interessanterweise ist der Tyrosin-Rest des konservierten „DRY“ Motivs am 3' Ende der TM III, durch ein Phenylalanin (F₁₄₀) ersetzt. Weiterhin konserviert ist ein Abschnitt in der zweiten intrazellulären Schleife direkt im Anschluss an das „DRY“ Motiv: DRYXXV/IXXPL. Dieses Motiv wechselwirkt mit C-terminalen Aminosäureresten des G-Proteins (Moro *et al.*, 1993). Ein Motiv in der TM VI (F₃₈₁XXXWXP) ist in vielen GPCRs konserviert. In den meisten biogenen Amin-Rezeptoren folgen auf dieses Motiv Phenylalanin-Reste (F₃₈₉). In der TM VII befindet sich ebenso ein konserviertes N₄₂₃PXXY Motiv, das an der Rezeptor-Aktivierung beteiligt ist (Barak *et al.*, 1994). Der C-Terminus von Am5-HT₇ besteht aus 71 Aminosäureresten. Er enthält zwei Cystein-Reste (C₄₄₆, C₄₆₉), die potentiell palmitoyliert werden können (Jin *et al.*, 1999). Ebenso enthält der C-Terminus ein Bindungsmotiv (E₄₉₈SFL) für PDZ-Domänen-Proteine.

Vergleicht man die Am5-HT₇-Sequenz mit Aminosäuresequenzen anderer biogener Amin-Rezeptoren, so besteht die größte Sequenzähnlichkeit mit 56% zu dem 5-HT₇-Rezeptor von *Aedis aegypti* (Aae5-HT₇; Pietrantonio *et al.*, 2001) und mit 54% zu dem 5-HT₇ Rezeptor von *Drosophila melanogaster* (Dm5-HT₇; Witz *et al.*, 1990). Insgesamt sind 45% bzw. 42% der Aminosäuren identisch (Abb. 3.5). In den Transmembrandomänen sowie in den intrazellulären Bereichen sind die Rezeptor-Sequenzen am stärksten konserviert. Eine Ausnahme bildet die dritte zytoplasmatische Schleife, die nur sehr wenige konservierte Aminosäuren enthält. Ähnliches gilt für die extrazellulären Regionen und den C-Terminus.

Das Dendrogram (Abb. 3.6) zeigt die stammesgeschichtliche Verwandtschaft zwischen Serotonin-Rezeptoren verschiedener Insekten und anderen, bereits charakterisierten Honigbienen-Rezeptoren. Der Am5-HT₇ Rezeptor bildet mit Dm5-HT₇ (Witz *et al.*, 1990) und dem 5-HT₇-Rezeptor aus *Aedis aegypti* (Pietrantonio *et al.*, 2001) sowie einem bisher noch nicht charakterisierten Rezeptor von *Anopheles gambiae* einen eigenen Zweig.

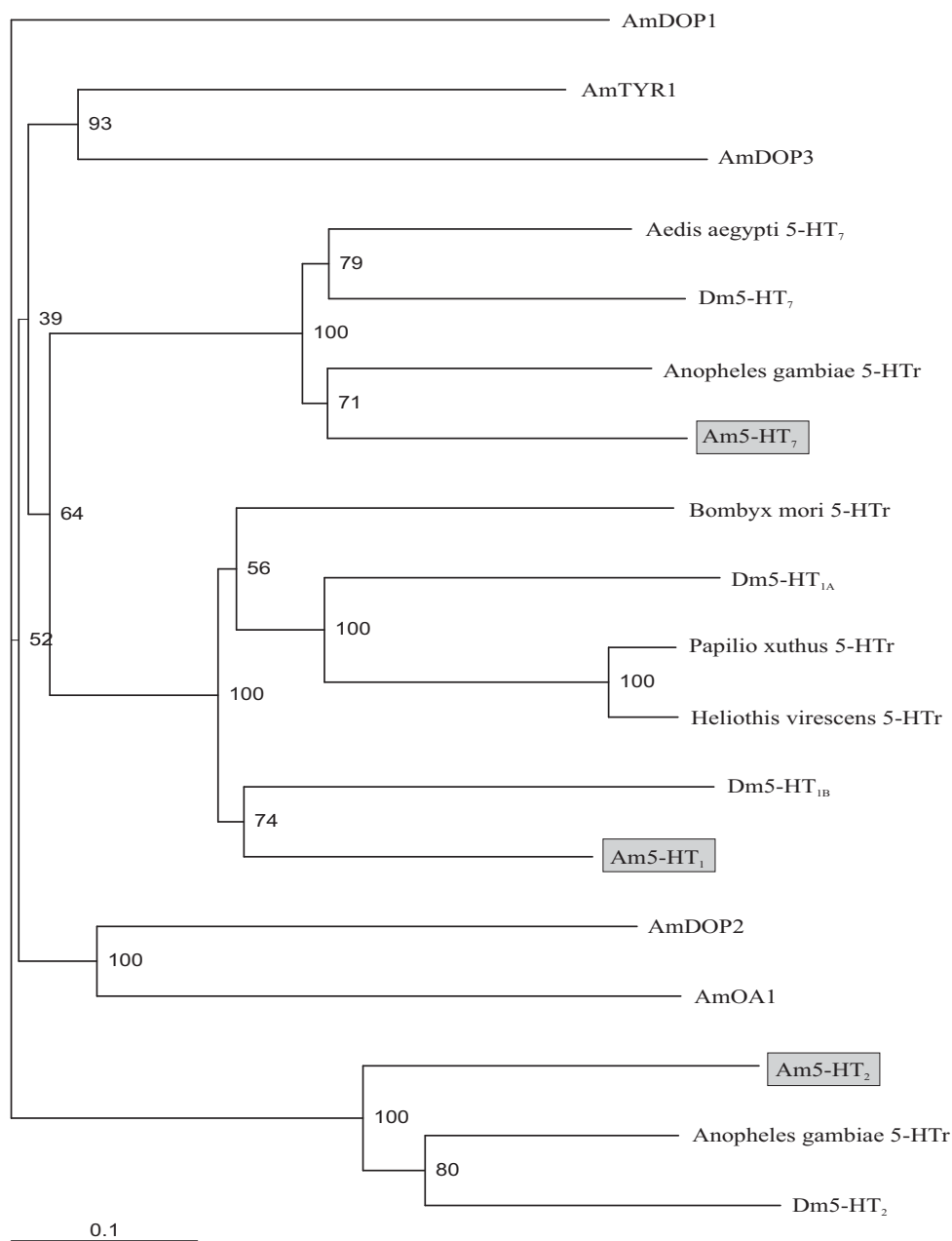


Abbildung 3.6: Dendrogram im Rahmen dieser Arbeit klonierter 5-HT-Rezeptoren und anderer charakterisierter biogener Amin-Rezeptoren der Honigbiene, sowie bisher charakterisierte 5-HT-Rezeptoren aus der Klasse der Insekten. Durch die Länge der Linien wird die durch ClustalX (Version 1.81) berechnete genetische Distanz angegeben. Die Sequenzen mit der zugehörigen Accession Number sind in der Reihenfolge der Abbildung aufgeführt: *A. mellifera* AmDOP1 (#CAA73841), *A. mellifera* Tyramine AmTYR1 (#CAB76374), *A. mellifera* AmDOP3 (#NP_001014983), *Aedis aegypti* 5-HT₇ (#AAG49292), *D. melanogaster* Dm5-HT₇ (#NP_524599), *Anopheles gambiae* 5-HTr (Aga12908; #EAA08564), *A. mellifera* Am5-HT₇ (diese Arbeit), *Bombyx mori* 5-HTr (BMSERB150; #CAA64862), *D. melanogaster* Dm5-HT_{1A} (#NP_523789), *Papilio xuthus* (#BAD72868), *Heliothis virescens* (HVSEK15; #CAA64863), *D. melanogaster* Dm5-HT_{1B} (#NP_476802), *A. mellifera* Am5-HT₁ (diese Arbeit), *A. mellifera* AmDOP2 (#NP_001011567), *A. mellifera* AmOA1 (#NP_001011565), *A. mellifera* Am5-HT₂ (diese Arbeit), *Anopheles gambiae* 5-HTr (Aga4842; #EAA13071), *D. melanogaster* Dm5-HT₂ (#NP_524223)

3.1.4 Expressionsmuster des Am5-*ht7* Gens

Das gewebsspezifische Expressionsmuster von Am5-*ht7* wurde mittels RT-PCR qualitativ untersucht. Die verwendeten Primer amplifizierten den Bereich der dritten zytoplasmatischen Schleife des Rezeptors. Diese Region stellt ein ausreichend langes Fragment mit nur sehr geringen Homologien zu anderen biogenen Amin-Rezeptoren dar. Die Primer wurden so gewählt, dass sie in zwei Exons (V und VI) liegen, die von einem > 4,7 kb großen Intron unterbrochen werden (siehe Abb. 3.2). Dies macht die Amplifikation eines PCR-Produkts auf genomischer DNA nahezu unmöglich.

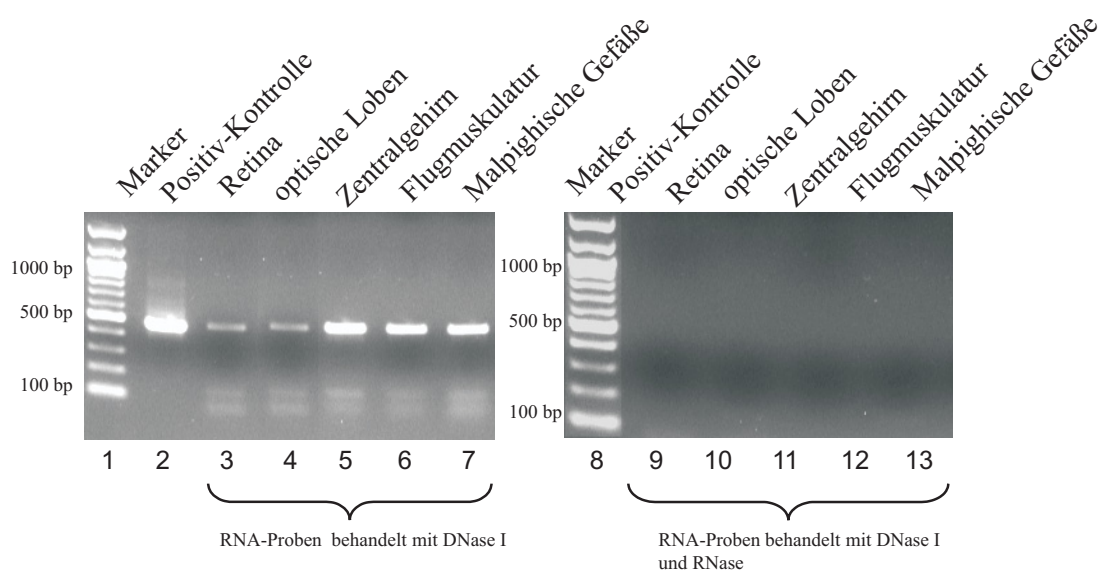


Abbildung 3.7: **Expression von Am5-HT₇ in verschiedenen Geweben von *Apis mellifera*.** Der 100 bp-DNA-Marker wurde in den Bahnen 1 und 8 aufgetragen. Als Positivkontrolle wurde eine Amplifikation auf der Am5-*ht7*-cDNA durchgeführt (Bahn 2). Die übrigen Bahnen zeigen die RT-PCR Produkte verschiedener Gewebe: Retina (3), optische Loben (4), Zentralgehirn (5), Flugmuskulatur (6), und Malpighischen Gefäße (7). Die amplifizierten Fragmente haben die erwartete Größe von 482 bp. Nach einem RNase-Verdau konnten in keiner Probe PCR-Produkte amplifiziert werden (Negativkontrolle, Bahnen 9 bis 13).

Das Transkript des Am5-*ht7*-Gens wird im Zentralgehirn, in der Flugmuskulatur und in den Malpighischen Gefäßen stark exprimiert (Abb. 3.7). Geringere Mengen wurden in den optischen Loben und in der Retina nachgewiesen. Für Kontroll-Experimente wurden die RNA-Proben mit RNase verdaut. Wie erwartet konnte nach dem Verdau kein Rezeptor-Transkript nachgewiesen werden.

Um genauere Aussagen über die Expression des Am5-*ht7*-Gens treffen zu können, wurde eine *in situ*-Hybridisierung an Gefrierschnitten von Gehirnen adulter Bienen durchgeführt. Als Sonde wurde ein Rezeptor-Fragment benutzt, das für die dritte zytoplasmatische Schleife kodiert. Durch *in vitro*-Transkription (siehe 2.2.14) wurden Digoxigenin-

markierte „sense“- und „antisense“-Sonden hergestellt. Die Länge der Fragmente betrug 337 bp.

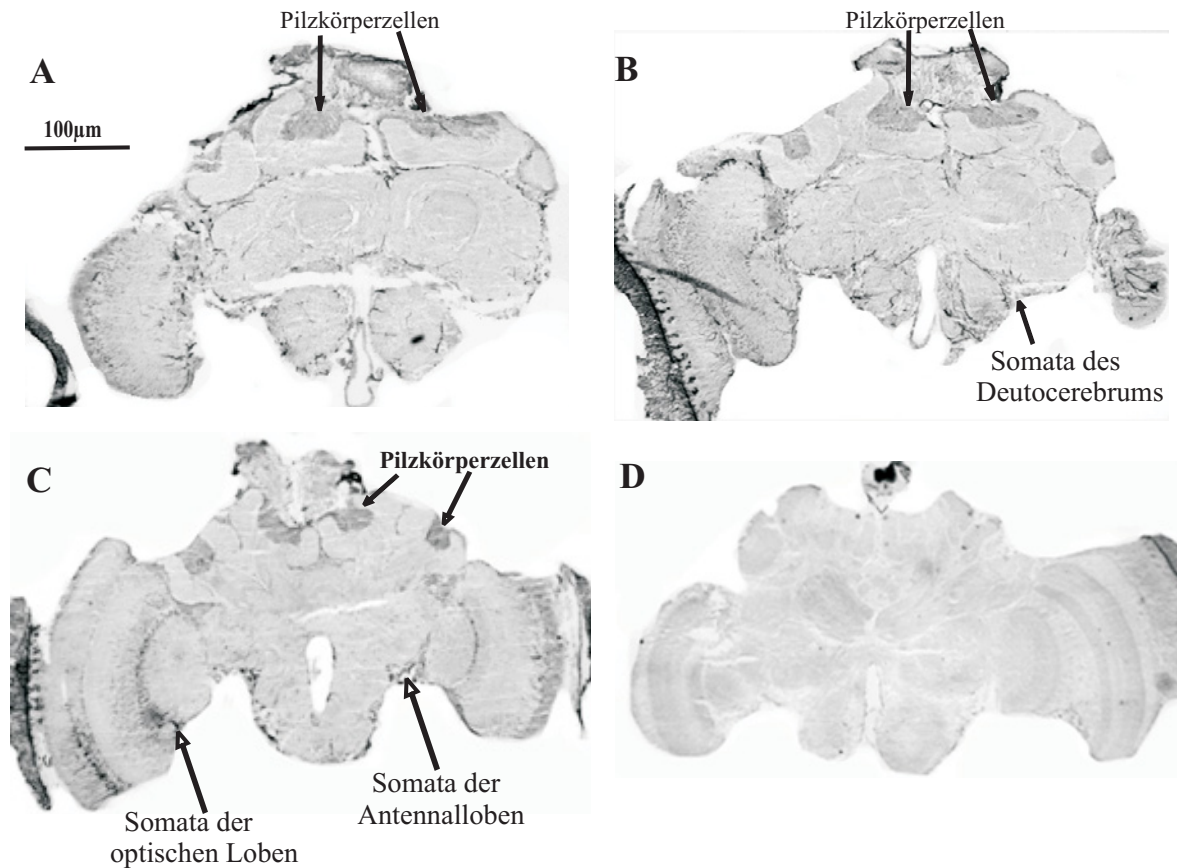


Abbildung 3.8: *In situ* Hybridisierung an Gehirnschnitten von adulten Sammler-Bienen. A-C: *In situ* Hybridisierung mit der Am5-ht7 „antisense“-Sonde. Die Markierung des Rezeptor-Transkripts ist als dunkle Färbung zu erkennen. Die Zellkörpermarkierung im Bereich der Pilzkörper, des Deutocerebrum bzw. der Antennalloben und der optischen Loben ist durch Pfeile markiert. D: *In situ* Hybridisierung mit der Am5-ht7 „sense“-Sonde. Es wurde keine Markierung nachgewiesen.

Mit der „antisense“-RNA-Sonde (Abb. 3.8) werden spezifische Hybridisierungssignale in den Zellsomata der meisten Neurone des Gehirns gefunden. Neurone der optischen Loben, intrinsische Pilzkörperneurone (Kenyon-Zellen) sowie Neurone des Deutocerebrums exprimieren das Am5-ht7-Gen. Mit der „sense“-Sonde als Negativkontrolle wurde keine Färbung beobachtet.

3.1.5 Immunologischer Nachweis des Am5-HT₇-Proteins auf Westernblots

Es wurde ein polyklonales Antiserum gegen den C-Terminus des Am5-HT₇-Rezeptors generiert und affinitätschromatografisch gereinigt (= anti Am5-HT₇) (siehe 2.3.9). Die

berechnete Größe des Am5-HT₇-Proteins beträgt 56,1 kDa. Auf Westernblots mit Proteinen des *Apis mellifera* Gehirns und Membranfraktionen kultivierter Pilzkörper-Neurone (Abb. 3.9) detektiert der Antikörper ein Protein von ca. 66 kDa. Der Unterschied zwischen der berechneten und der apparenten Molekularmasse des Am5-HT₇-Rezeptorproteins könnte auf die Glykosylierung des nativen Rezeptors zurückzuführen sein, wodurch das Wanderungsverhalten in der SDS-Page verlangsamt wird. Um diese Hypothese zu prüfen, wurden Experimente mit den stabil in HEK 293-Zellen exprimierten Am5-HT₇-Rezeptoren durchgeführt (siehe 3.1.6).

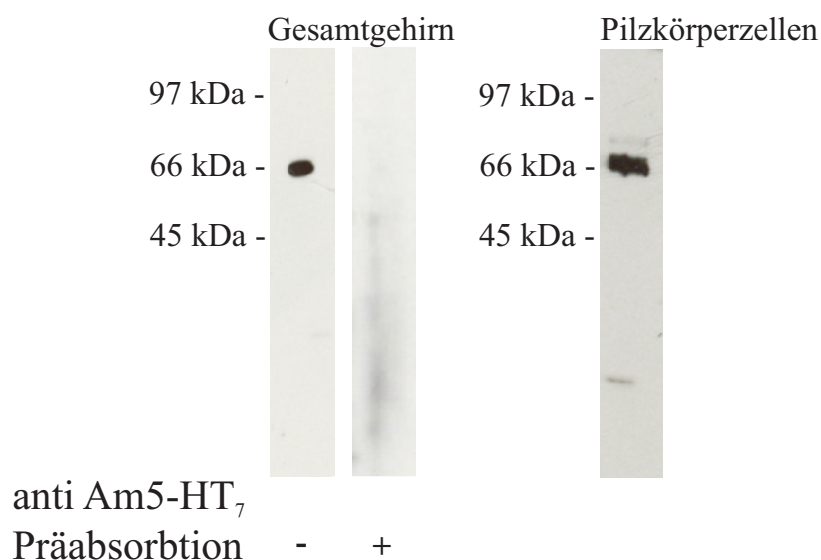


Abbildung 3.9: **Westernblot-Analyse von Proteinfractionen des Bienengehirns und isolierter Pilzkörperzellen.** Bahn 1, Proteine des Gesamtgehirns: Inkubation des Westernblots mit anti Am5-HT₇. Bahn 2, Proteine des Gesamtgehirns: Inkubation mit anti Am5-HT₇ nach Präabsorption. Bahn 3, Proteine isolierter Pilzkörperzellen, nach 12 h in Kultur: Inkubation mit anti-Am5-HT₇. Verdünnung: 1. Antikörper (anti Am5-HT₇) 1:5000, 2. Antikörper (goat-anti-rabbit-HRP) 1:10.000; Marker: LMW (Sigma); Expositionszeit: 30 s

Die Spezifität des Antikörpers wurde durch eine Präabsorption des gereinigten Antikörpers an das zur Immunisierung verwendete Fusionsprotein (siehe 2.3.5) überprüft. Nach der Inkubation des Antikörpers mit dem Antigen wird das 66 kDa-Protein auf dem Blot nicht angefärbt.

3.1.6 Funktionelle Expression des Rezeptorproteins in HEK 293 Zellen

Immunologischer Nachweis des heterolog exprimierten Am5-HT₇-Rezeptors auf Westernblots

Zum Nachweis der Expression des Am5-HT₇-HA-Proteins in HEK 293 Zellen auf Westernblots wurde sowohl der anti Am5-HT₇-Antikörper als auch ein anti HA-Antikörper verwendet (Abb. 3.10 A). Es wurden zwei unabhängige, stabil transfizierte Zelllinien (1 und 4), sowie nicht-transfizierte HEK 293-Zellen untersucht. Die Membranproteine wurden präpariert (siehe 2.4.3) und ein Teil der Proteine mit PNGase F inkubiert (siehe 2.4.4). Dieses Enzym entfernt alle N-glykosidisch gebundenen Zuckerreste von einem glykosylierten Protein.

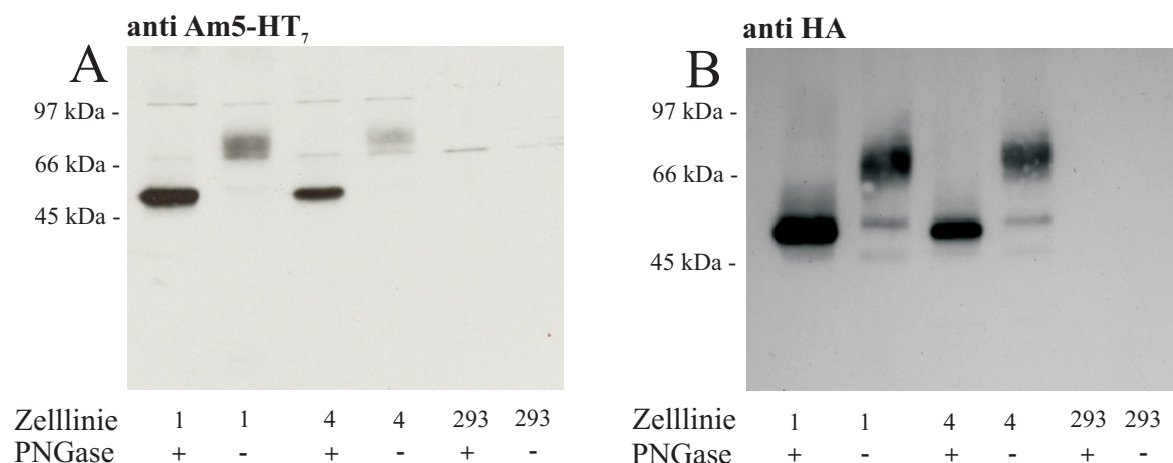


Abbildung 3.10: **Westernblot-Analyse der Membranproteine von Am5-HT₇-Rezeptor-Zelllinien und HEK 293-Zellen.** Membranproteine von zwei Am5-HT₇-Zelllinien (1 und 4) sowie nicht transfizierten (293) Zellen wurden präpariert. Ein Teil der Membranproteine wurde mit PNGase F verdaut. Die Proben wurden auf 12% PAA präparativ aufgetragen. Marker: LMW (Sigma) (A) Inkubation mit dem anti Am5-HT₇-Antikörper. (B) Inkubation mit einem anti HA-Tag-Antikörper.

In Fraktionen der Membranproteine der Zelllinien 1 und 4 markiert der anti Am5-HT₇-Antikörper eine einzelne Proteinbande bei ca. 70 kDa. Nach dem PNGase-Verdau detektiert der Antikörper ein Protein mit einer Molekularmasse von ca. 56 kDa. Diese Größe stimmt sehr gut mit der berechneten Größe des unmodifizierten Rezeptorproteins überein (siehe oben). Offensichtlich wird der Rezeptor in HEK 293-Zellen stark glykosyliert.

In den Spuren des Westernblots die Membranproteine nicht-transfizierter Zellen (293) enthalten, erkennt der anti-Am5-HT₇-Antikörper kein Protein.

Da der Am5-HT₇-Rezeptor mit einem HA-Tag modifiziert war (siehe 2.4.1) wurde ein

identischer Westernblot mit einem anti HA-Tag-Antikörper hergestellt (Abb. 3.10 B). Die Größen der von diesem Antikörper markierten Proteine stimmen mit denen des anti-Am5-HT₇-Antikörper überein: Ohne PNGase F-Behandlung wird in beiden Am5-HT₇-Zelllinien eine Bande von ca. 70 kDa angefärbt. Nach dem PNGase F-Verdau wird ein Protein von ca. 56 kDa nachgewiesen. In den nicht-transfizierten Zellen (293) ist kein Protein markiert.

Da die Molekularmassen der Rezeptor-Proteine in den Gewebeproben und nicht PNGase F behandelten Proben der Zelllinien sehr ähnlich sind, müssen auch die nativen Rezeptor-Proteine stark glykosyliert vorliegen.

Immunhistochemischer Nachweis des Rezeptorproteins an Am5-HT₇-HA-transfizierten HEK 293-Zellen

Stabil transfizierter HEK 293 Zellen wurden mit dem anti HA-Tag- sowie mit dem anti Am5-HT₇-Antikörper inkubiert, um die Expression und Verteilung des Am5-HT₇-Rezeptors zu dokumentieren (Abb. 3.11).

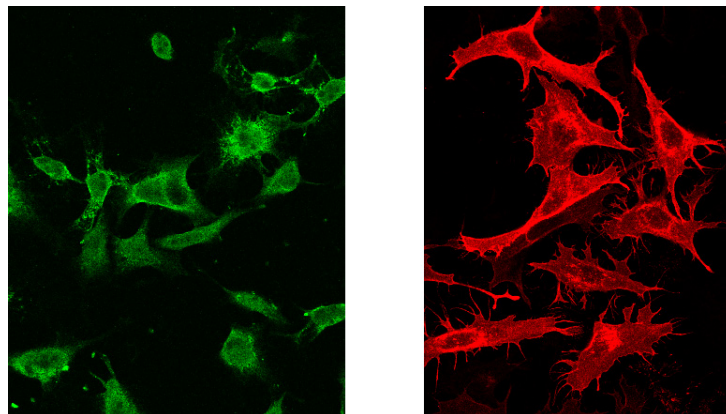


Abbildung 3.11: **Immunhistochemischer Nachweis von Am5-HT₇ in stabil transfizierten HEK 293-Zellen.** Links: Inkubation der Zellen mit dem anti Am5-HT₇-Antikörper. Der Cy2-konjugierte sekundäre anti-rabbit Antikörper wurde durch Blaulichtanregung sichtbar gemacht. Rechts: Inkubation der HEK 293 Zellen mit dem anti HA-Tag-Antikörper; der Cy3-konjugierte sekundäre anti-rat Antikörper wurde durch Grünlichtanregung sichtbar gemacht. Die Abbildung zeigt das Ergebnis für Zelllinie 4. In der Zelllinie 1 wurden identische Ergebnisse erzielt.

In beiden untersuchten Zelllinien (Linie 1 und 4) konnte das Rezeptorprotein sowohl durch den anti Am5-HT₇-Antikörper als auch durch den anti HA-Tag-Antikörper nachgewiesen werden. In nicht-transfizierten Zellen war bei beiden Antikörper keine Färbung sichtbar (hier nicht gezeigt).

Funktionelle Charakterisierung des Am5-HT₇-Rezeptors

Für die funktionelle Charakterisierung des Rezeptors wurden zwei Zelllinien verwendet, die das Am5-HT₇-Rezeptorprotein stabil exprimieren (Linie 1 und 4). Interessanterweise erhöht sich bereits durch die Expression des Rezeptorproteins die basale intrazelluläre cAMP Konzentration ($[cAMP]_i$) (Abb. 3.12).

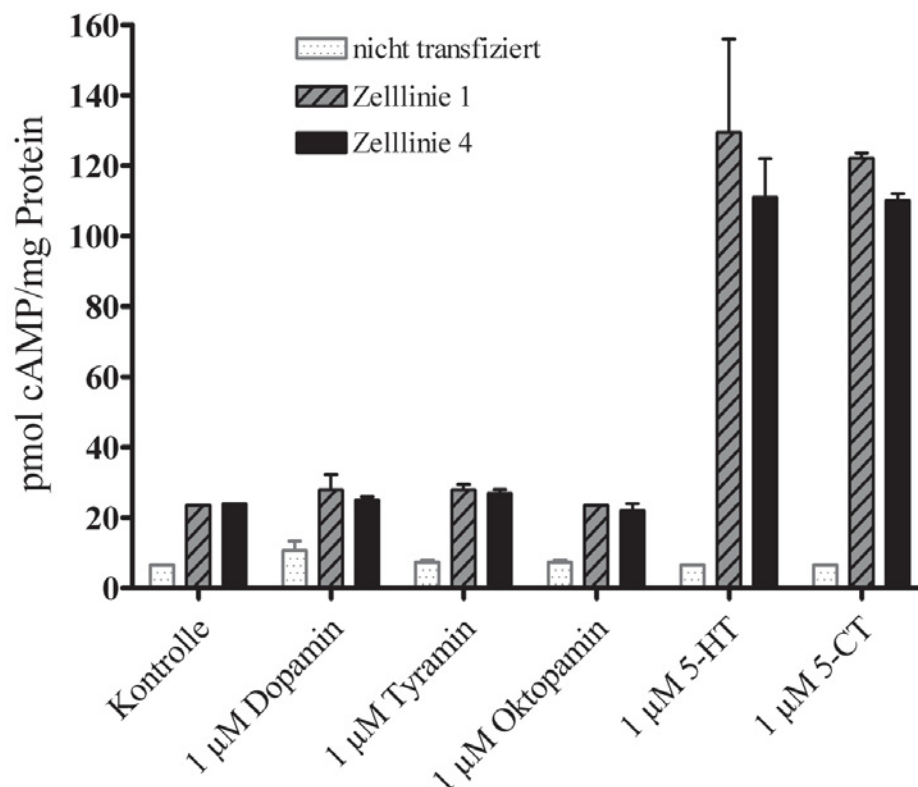


Abbildung 3.12: **Einfluss verschiedener biogener Amine und des Serotonin-Rezeptor Agonisten 5-CT auf die intrazelluläre cAMP-Konzentration.** Es wurden HEK 293-Zellen, die den Am5-HT₇-HA-Rezeptor stabil exprimieren (Zelllinie 1 und 4), und nicht-transfizierte Zellen mit den Liganden inkubiert. Die cAMP-Konzentration ist in pmol cAMP/mg Protein angegeben. Die ermittelten Werte sind Mittelwerte aus Doppelbestimmungen von je zwei unabhängigen Experimenten. Die Fehlerbalken stellen den Standardfehler dar. Alle Messungen erfolgten in Gegenwart von IBMX (100 µM). Um die basale $[cAMP]_i$ zu ermitteln, erfolgte eine Inkubation mit 100 µM IBMX in Abwesenheit jeglicher Liganden.

Bei transfizierten Zellen ist die basale $[cAMP]_i$ im Vergleich zu den nicht-transfizierten Zellen ca. dreifach erhöht. Daraus lässt sich schließen, dass der Am5-HT₇ Rezeptor auch in Abwesenheit eines Liganden teilweise in seiner aktiven Konformation vorliegt. Dieses Phänomen wird als konstitutive Aktivität bezeichnet.

Um die Ligandenspezifität von Am5-HT₇ zu testen, wurde die Wirkung verschiedener biogener Amine auf die cAMP-Produktion transfizierter und nicht transfizierter Zellen analy-

siert. Bei einer Konzentration von 1 μM löste nur Serotonin einen Anstieg der $[\text{cAMP}]_i$ in den transfizierten Zellen aus. Dopamin, Tyramin, und Oktopamin hatten keine Wirkung auf die $[\text{cAMP}]_i$. In den nicht-transfizierten Zellen blieb die $[\text{cAMP}]_i$ in Anwesenheit aller Liganden auf dem Niveau der basalen $[\text{cAMP}]_i$.

Das 5-HT Analogon 5-Carboxamidotryptamine (5-CT), ein selektiver Agonist an 5-HT₇- und 5-HT₁-Rezeptoren der Säuger, stimulierte $[\text{cAMP}]_i$ vergleichbar wie Serotonin. In nicht transfizierten Zellen hatte 5-CT keine Wirkung.

Konzentrationsabhängigkeit der cAMP-Produktion

Die Konzentrationsabhängigkeit der cAMP-Synthese in den verschiedenen Zelllinien wurde mit 5-HT-Konzentrationen von 10^{-10} bis 10^{-5} M untersucht (Abb. 3.13).

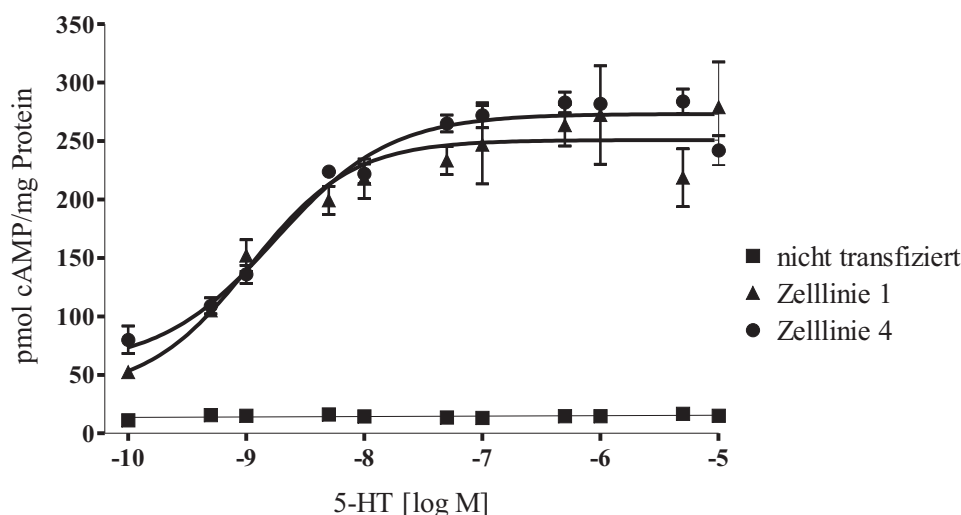


Abbildung 3.13: **cAMP-Produktion in Abhängigkeit der 5-HT-Konzentration.** Die Am5-HT₇-Rezeptor-Zelllinien sowie nicht transfizierte HEK 293-Zellen wurden mit steigenden 5-HT-Konzentrationen (10^{-10} bis 10^{-5} M) inkubiert. Die cAMP-Konzentration ist in pmol cAMP/mg Protein angegeben. Dargestellt sind Mittelwerte aus Doppelmessungen von je zwei unabhängigen Experimenten. Die Fehlerbalken stellen die Standardfehler dar.

Die Auswertung der Dosis-Wirkungs-Kurve ergab einen EC_{50} -Wert von 1,06 nM 5-HT ($\log\text{EC}_{50} = 8,97 \pm 0,13$, Mittelwert \pm Standardabweichung) für die Zelllinie 1 und 1,75 nM 5-HT ($\log\text{EC}_{50} = 8,76 \pm 0,07$) für die Zelllinie 4. Die Sättigung ist bei 50 nM Serotonin erreicht. Keine der in diesem Experiment getesteten Serotonin-Konzentrationen hatte einen Einfluss auf die $[\text{cAMP}]_i$ von nicht-transfizierten Zellen.

Wirkung von Antagonisten

In einem weiteren Experiment wurde die Wirkung zweier Antagonisten auf die 5-HT-stimulierte cAMP-Produktion untersucht (Abb. 3.14). Der durch Serotonin (10 μM) ver-

ursachte intrazelluläre cAMP-Anstieg wird durch Methiothepin (10 μ M) spezifisch unterdrückt. Die $[cAMP]_i$ sinkt unter die basale cAMP Konzentration der Zelllinien (Abb. 3.12). Dies ist ein gutes Indiz dafür, dass Methiothepin am Am5-HT₇-Rezeptor als inverser Agonist wirkt.

Im Gegensatz dazu inhibiert Clozapin (10 μ M), ein Antagonist an 5-HT_{1A}-, 5-HT_{2C}-, 5-HT₃-, 5-HT₆- und 5-HT₇-Rezeptoren, die Serotonin-vermittelte cAMP-Produktion nicht.

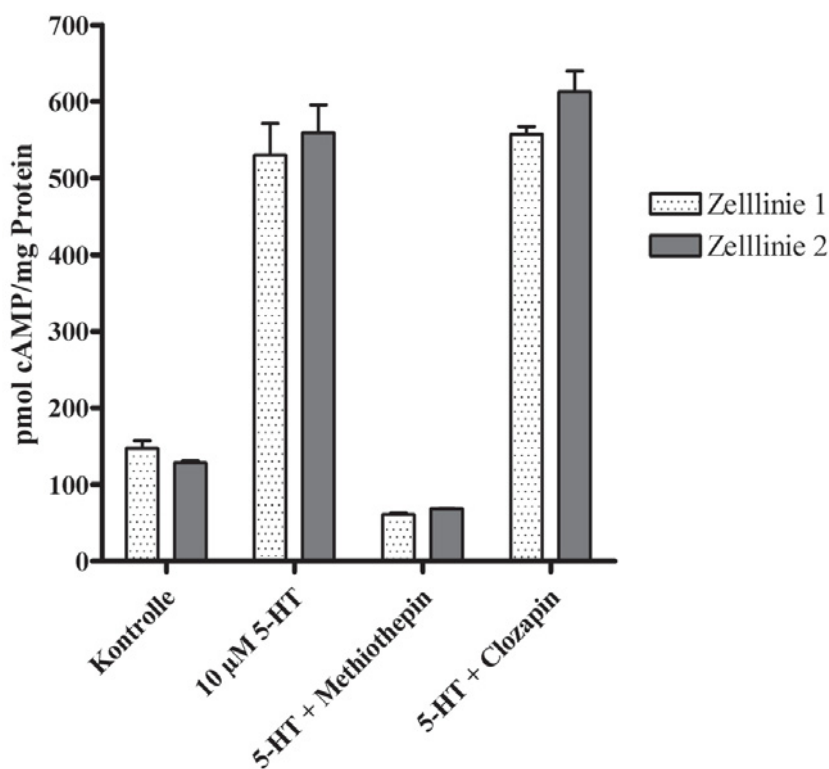


Abbildung 3.14: **Einfluss der 5-HT₇-Rezeptor Antagonisten Methiothepin und Clozapin auf die 5-HT stimulierte cAMP Produktion.** Die Antagonisten wurden in Konzentrationen von 10 μ M in Anwesenheit von 10 μ M 5-HT eingesetzt. Die cAMP Konzentration ist in pmol cAMP/mg Protein angegeben. Es sind Mittelwerte aus Doppelmessungen von je zwei unabhängigen Experimenten dargestellt. Die Fehlerbalken geben die Standardfehler an.

3.2 Der Am5-HT₂-Rezeptor

3.2.1 Isolierung der Am5-ht2 cDNA

Nach der vollständigen Entschlüsselung der genomischen Sequenz der Honigbiene *Apis mellifera* konnte die Datenbank (<http://www.hgsc.bcm.tmc.edu/projects/honeybee>) nach weiteren Serotonin-Rezeptorsubtypen durchmustert werden. Mit bekannten Rezeptorsequenzen aus *Drosophila melanogaster* (Colas *et al.*, 1995; Saudou *et al.*, 1992) wurde die cDNA-Sequenz eines weiteren potentiellen Serotonin-Rezeptors der Honigbiene (Am5-ht2) identifiziert. Anhand dieser Sequenz wurden spezifische Oligonukleotide ausgewählt und auf „random geprimter“-cDNA (siehe 2.2.10) verschiedene Fragmente des Am5-HT₂-Rezeptors amplifiziert. Die Fragmente wurden in den pGEM-T Vektor integriert und sequenziert.

Die vollständige cDNA-Sequenz (Abb. 3.15) konnte aus drei überlappenden Teilstücken zusammengesetzt werden. Klon 1 enthielt die Sequenzinformation vom Start-Kodon bis zur dritten zytoplasmatischen Schleife (Position 1-468); Klon 2 überspannte den Bereich von der TM I bis zur TM VII (Position 420-1703); Klon 3 lieferte die Information von der dritten zytoplasmatischen Schleife bis zum Stopp-Kodon (Position 997-1962). Klon 1 und Klon 3 zeigten in der dritten zytoplasmatischen Schleife keine Überlappungen, daher war die Sequenz-Information aus einem weiteren Fragment nötig.

Die Sequenz der klonierten cDNA unterscheidet sich im Bereich der dritten zytoplasmatischen Schleife von der annotierten Sequenz (Accession Number XP_394798). In der Am5-ht2-cDNA sind 48 zusätzliche Nukleotide vorhanden, die für eine Insertion von 16 Aminosäuren kodieren.

```

ATGGAGGGGGATCTGATCGCCTCTTGGACCGGCAACCTGACCGCGATGTTGCACCACCTGCCTGCAACGACACCTTCTCCACGGATGC 90
M E G D L I A S W T G N L T A M L H H L P C N D T F L H G C 30

GCGGAGGAGTGTGGACTCGCCTCGTCGGGATTTCGATCACATGTGCACGGCCGAGAAGGGAAGCTTCGCCTCGTCCATGACTCTGCTCTGC 180
A E E C G L A S S G F D H M C T A E K G S F A S S M T L L C 60

GCGCCCTGCGACTACTCCAACCTGCGACGTGAACGTGTCCTTGGTCCTCAGCGGGCTGGAGAGCGTGGAGGGCGTTTTCTGTCCAGGTG 270
A P C D Y S N C D V N V S L V L S G L E S V E G V F L S R L 90

CCGAGGTTTCGAGTGCAACGAGACCGATTTTCCCGATCAGATATTGGAGTGCACGGCGACTACGGAGAACGCGACTACGGAGGACTTGACC 360
P R F E C N E T D F P D Q I L E C T A T T E N A T T E D L T 120

ATCTCTTGCTCGCACAGGGCGAAGGGCTTGAATACGGCTGGGAGCAGAGGGCGACGTCTCGACTGGAACCTTCTCTCGTTGCTGATTT 450
I S C S H R A K G L N T A G S R G R R L D W N F L F V A V F 150

ATCGTGGCGGGTGGCTGGGGAACATACTCGTCTGCCTCGCTGTGGGGCTCGATAAAAGGCTGCACAACGTACCAATTACTCTCTTTG 540
I V A G G L G N I L V C L A V G L D K R L H N V T N Y F L L 180
    TM I
TCTCTCGCGGTGGCCGATTCTTACTCGTCAGCCTGTTTCGTCATGCCTCTGGGCGGATCCAGGCTTCTTGGGATACTGGCCATTCCGGATG 630
S L A V A D L L V S L F V M P L G A I P G F L G Y W P F G V 210
    TM II
GTGTGGTGTAACTGTACGTGACGTGCGATGTGCTGGCTTGTTCGCGAGCATAATGCACATGTGCTTCATCTCGTTGGGCCGTATCTC 720
V W C N V Y V T C D V L A C S A S I M H M C F I S L G R Y L 240
    TM III
GGCATCCGGAATCCTTTGCGGACGAGGCACACGTCCACCAAACGGATGGTCGGCTTCAAGATAGCGGCTGTGTGGTGTCTCGCCATGTG 810
G I R N P L R T R H T S T K R M V G F K I A A V W L L A M L 270
    TM IV
GTCTCCAGCTCGATCACGGTTTTGGGCATAATAAATCCTCTAAACATCATGCCACGGCCGGAGCGTGCCTGATCAACAACAGAGCGTT 900
V S S S I T V L G I I N P L N I M P R P G A C V I N N R A F 300

TTCGTGTTTCGGCTCTCTGATCGCCTTCTACATACCCATGATCGTCATGGTAGCCACTTACATTCTGACGGTGCAGCTGCTCAGGCAAAA 990
F V F G S L I A F Y I P M I V M V A T Y I L T V Q L L R Q K 330
    TM V
GCCCGTTTCATCGCGGAACATCCTGAACGAGATCAATTCGGAAGGCTGGGAGGCAGATATTTCTCGACGAGGGCTTCTCCACCGCCACC 1080
A R F I A E H P E R D Q F R R L G G R Y F S T R A S S T A T 360

TCGACCGTGGAAACCGCCACCCCTTCGTCGTCGGTATACGTGGAGGACTTCCGGCGGTGTGCGGAAGCGACAGTTTAAACCAAAATTAAC 1170
S T V E T A T P S S S R Y T W R T S G G V G S D S L T K L N 390

GCGGAGGCTCTGTGCCGTCGCAACATAACAGGTGCAGGGGGCAAGGTTCGGCCGAAAGTCTCAACCGCAGTTGAATTTCCCGCTGAAC 1260
A E A L C R R K H N R C R G A R S A A K S Q P Q L N F A V N 420

GGGCGGAGTAACCCGGCCGGAAGCGGAACCGGGGCGACGAGACTGGCGACGAAAGTGGATCAGGCGACGCAAACCGCGGAGAATATCGGC 1350
G A S N P A G S G T G A T R L A T K V D Q A T Q T P E N I G 450

CGTGAAACAAGGAATTTCACTCTGAAGGCTTTGAAGCTCCAATTAACGTCCTCCCAACACCTGAATCTCAGGTTTCTCCCGGTAGA 1440
R E T R N F T L K A L K L Q L N V T P N T L N L R F L P G R 480
    TM VI
ACGAAGAGGAGATCGTTGGCCGCGAACCGCTTGCACGAGCAGAAAGCCAGCAAGGTGTTGGGCTGGTTTTCTTCATGTTCTGTGCTC 1530
T K R R S L A A N A V A T E Q K A S K V L G L V F F M F V L 510

TGCTGGGCCCGCTTCTTTCTACTAAACATATTTTTCGCGCGTGCCTCCGAATGCTCGGTCCTCGGTACACGTGGTCAACGTGTGCTGTGG 1620
C W A P F F L L N I F F A A C P E C S V P V H V V N V C L W 540
    TM VII
CTCGGATACGTGCTCTCCACGATCAATCCGGTCATCTACACCATCTTCAATAGAAGCTTCAGGGCTGCGTTCATCAGATTGTTGAAGTGC 1710
L G Y V S S T I N P V I Y T I F N R T F R A A F I R L L K C 570

AAGTGTTCAGGTGACGCAAGCCGAGGCATCGTTTCAGTGACGGAGAGTGGACGAAACGCGATGAGCCTGTGCACCCCGACCCGCTGCCA 1800
K C S R S A R P R H R S V T E S G R N A M S L C T P T A L P 600

TTGGTCATTAGTCTTCAGGTCAGCCGTTGTTGACGCCAACCCGAATCCGACGGCGGCCACGCCGCTCGGCAACCTCTACGTGAGC 1890
L V I S L Q G T P L L T P T P N P T A A T P A S A T S Y V T 630

ATGATGCATCGCACGCCAACCTCCCTTTACCGTGACACTTTTTCATCAACACGAGCAGCATCAGAATTGTTGA 1962
M M H R T P T S L Y R D T F H Q H E H D Q N C * 653
    
```

Abbildung 3.15: Nukleotid- und abgeleitete Aminosäuresequenz der *Am5-ht2*-cDNA. Die Position der letzten Aminosäure bzw. des letzten Nukleotids jeder Zeile ist rechts neben der Sequenz angegeben. Die Positionen der potentiellen Transmembransegmente (TM I-VII) sind grau unterlegt. Konsensusstellen für N-Glykosylierung sind mit ▼ gekennzeichnet. Potentielle Konsensusstellen für Phosphorylierung durch PKC sind durch • gekennzeichnet. Schwarz hinterlegt ist die Abweichung der klonierten Sequenz von der annotierten Datenbank-Sequenz.

3.2.2 Genomische Organisation und trunkierte Varianten des *Am5-ht2*-Gens

Ein Vergleich der cDNA-Sequenz mit der genomischen DNA ergab, dass das Gen aus sieben Exons besteht (Abb. 3.16). Alle Exons befinden sich innerhalb eines Contigs (Contig3527 #AADG05003527).

Der vollständige offene Leserahmen von *Am5-ht2* besteht aus 1962 bp.

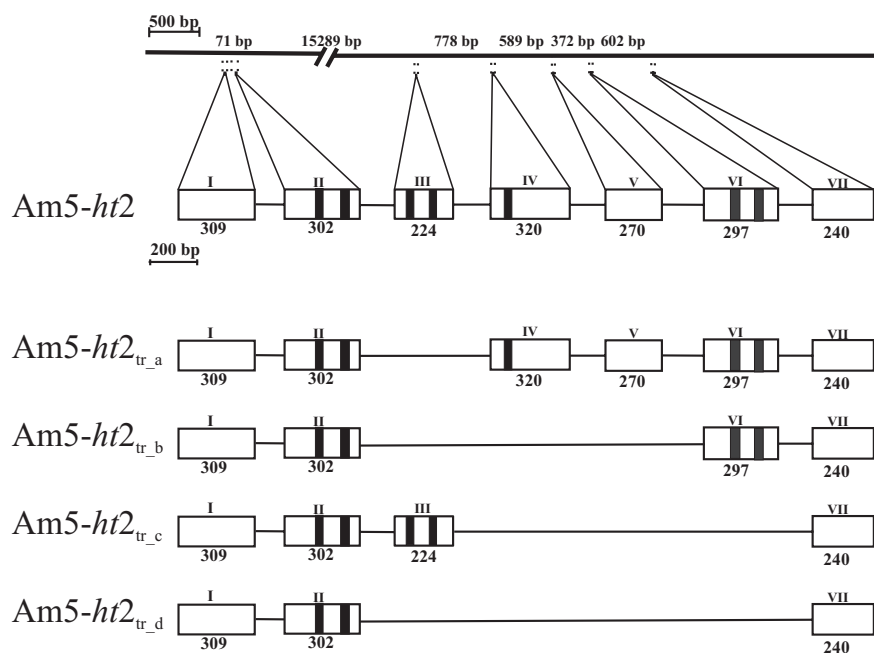


Abbildung 3.16: **Genomische Organisation und trunkierte Varianten von *Am5-ht2***. Alle Längen sind in bp angegeben. Die Verteilung der Exons (I-VII) ist unterhalb der genomischen DNA (obere schwarze Linie) schematisch dargestellt. Die cDNA ist als Kästen dargestellt. Die Darstellung zeigt die vollständige *Am5-ht2* cDNA vom Start-Kodon bis zum Stopp-Kodon. Die Zahlen unter den Kästen geben die Größe des Exons in bp an. Die Position der sieben Transmembransegmente wird durch schwarze Kästen angezeigt. Weiterhin sind klonierte trunkierte Formen der *Am5-ht2*-cDNA schematisch dargestellt.

Die Introns des Gens haben Längen zwischen 71 bp und 15289 bp. Die Exon/Intron Übergänge befinden sich im N-Terminus, der ersten und zweiten extrazellulären Schleife, der dritten zytoplasmatischen Schleife und im C-Terminus.

Auf der cDNA wurden zusätzlich zur vollständigen Sequenz mehrere trunkierte Formen des *Am5-ht2*-Gens amplifiziert. Es handelt sich dabei um Varianten, denen verschiedene Teile der vollständigen cDNA fehlen (Abb. 3.16). *Am5-ht2tr_a* fehlt das dritte Exon. In der Sequenz von *Am5-ht2tr_b* fehlt Exon drei bis fünf, in *Am5-ht2tr_c* fehlt Exon vier bis sechs. In einer weiteren Variante (*Am5-ht2tr_d*) ist Exon drei bis sechs nicht vorhanden. In den Sequenzen aller trunkierten Formen stimmen die Spleiß-Übergänge mit den im Genom identifizierten Exon/Intron Übergängen überein (Tab. 3.2). Aus der Intensität der in den PCR-Reaktionen erhaltenen Bandenmuster (hier nicht gezeigt) wurde deutlich,

Exon	cDNA-Position	Contig-Position	Spleißdonor- stelle	Spleißakzeptor- stelle
I	1-309	99991-99683	—	ATCAG/gtgaa
II	310-611	99612-99308	cacag/ATATT	CTTGG/gtgag
III	612-835	84019-83785	tgcag/GATAC	TTTGG/gtaaa
VI	836-1155	83007-82688	cccag/GCATA	GACAG/cgaag
V	1156-1425	82144-81869	tccag/TTAAC	CTCAG/gttcg
VI	1426-1722	81497-81192	cccag/GTTTC	TCCAG/gtcag
VII	1723-1962	80590-80344	tccag/GTCAG	—

Tabelle 3.2: **Genomische Organisation des Am5-ht2 Gens.** Die Exon/Intron Übergänge sind für das jeweilige 5'- und 3'-Ende des Exons angegeben. Für die Intron-Sequenz wurden Kleinbuchstaben verwendet, Exon-Sequenzen sind als Großbuchstaben dargestellt.

dass die Am5-ht2tr_a-Variante neben der vollständigen Am5-ht2-cDNA am häufigsten vorkommt. Eine Analyse der Exon/Intron-Übergänge, die am Entstehen dieser Variante beteiligt sind, zeigt Abb. 3.17.

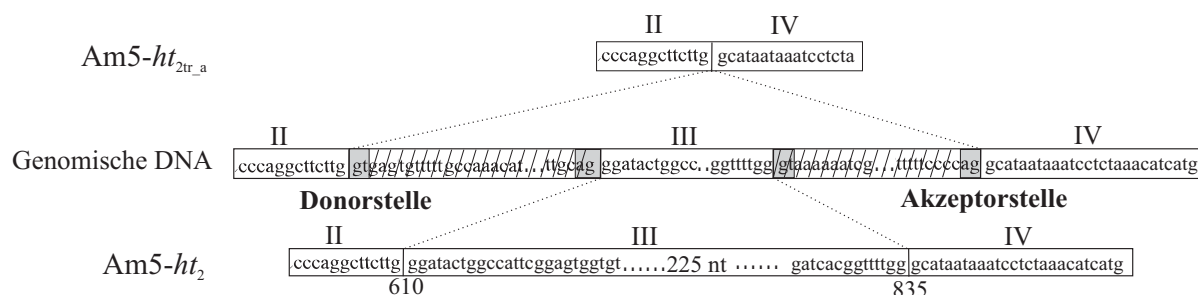


Abbildung 3.17: **Spleiß-Übergänge der Am5-ht2tr_a.** Schematisch dargestellt sind die trunkierte Variante Am5-ht2tr_a, die genomische DNA und die vollständige Am5-ht2-cDNA. Über den Boxen ist die Nummer des Exons angegeben. Schraffierte Kästen geben ein Intron an. Grau hinterlegt sind die Konsensussequenzen der 5'-Donorstelle und der 3'-Akzeptorstelle. Die Position des gespleißten Exons auf Nukleotidebene ist anhand der Am5-ht2-cDNA angegeben.

Aussagen darüber, ob eine Translation der trunkierten Varianten in ein Protein stattfindet, können noch nicht getroffen werden. Es ist jedoch anzunehmen, dass keine funktionellen Rezeptorproteine entstehen, da die fehlenden Exons für Bereiche der Transmembrandomänen kodieren. Damit fehlen den trunkierten Varianten Strukturen, die eine entscheidende Rolle in der Ligandenbindung und G-Protein-Kopplung spielen: Die Transmembrandomänen III, VI und VI enthalten Aminosäurereste, die essentiell für die Formung der Liganden-Bindungstasche und Bindung des Liganden sind. In der Region der dritten zytoplasmatischen Schleife, die den meisten trunkierten Varianten fehlt, findet die G-Protein-Kopplung statt (Kroeze *et al.*, 2002).

Ein Vergleich der orthologen Dm5-HT₂-cDNA aus *Drosophila melanogaster* (Colas *et al.*,

1995) mit der genomischen DNA von *Drosophila melanogaster* zeigt, dass dieses Gen ebenfalls aus mehreren Exons besteht. Die oben genannten Spleißstellen, die zur Entstehung der häufig auftretenden Am5-*ht2tr*_a-Variante beitragen, sind in *Drosophila melanogaster* konserviert (Abb. 3.18). In den cDNAs beider Rezeptoren befinden sich diese Exon/Intron Grenzen in der zweiten extrazellulären Schleife und am 5'-Ende der dritten intrazellulären Schleife. Von den restlichen 4 Exon/Intron Übergängen sind zwei weitere in Dm5-*ht2* konserviert. Es handelt sich dabei um die Grenzen von Exon VI/V und V/VI, die beide innerhalb der dritten zytoplasmatischen Schleife liegen.

Dm5-HT ₂	GATCTCCTGGTCAGTTTGTGGTATGCCCATGGGCGCGATACCAGCTTTTTGGGGTATTGGCCACTTGGCTTACCTGGTGCAACATT 1080
	D L L V S L F V M P M G A I P A F L G Y W P L G F T W C N I
	TM II
Dm5-HT ₂	TATGTGACGTGTGACGTACTGGCCTGCTCATCCAGTATATGACACATGTGCTTCATCGGTTTGGGACGCTATATGGGAATAAGAAATCCA 1170
	Y V T C D V L A C S S I L H M C F I G L G R Y M G I R N P
	TM III
Dm5-HT ₂	TTGGGCTCGAGGCATCGATCTACGAAACGATTGACTGGTATAAAGATAGCCATTGTTGGGTAATGGCCATGATGGTATCCAGTTCAATA 1260
	L G S R H R S T K R L T G I K I A I V W V M A M M V S S S I
	TM IV
Dm5-HT ₂	ACCGTTCCTGGTCTGGTCAATGAGAAGAGCATAATGCCCGAGCCTAACATATGCGTTATCAACAATCGCGCCTTTTTTCGTGTTGGATCT 1350
	T V I G L V N E K S I M P E P N I C V I N N R A F F V F G S
Am5-HT ₂	TCTCTCGCGGTGGCCGATTACTCGTCAGCCTGTTCTGTCATGCCTCTGGGCGCGATCCAGGCTTCTGGGATACTGGCCATTCCGGAGTG 630
	S L A V A D L L V S L F V M P L G A I P G F L G Y W P F G V
	TM II
Am5-HT ₂	GTGTGGTGAACGTGTACGTGACGTGCGATGTGCTGGCTTGTCCCGCAGCATAATGCACATGTGCTTCATCTCGTTGGGCCGGTATCTC 720
	V W C N V Y V T C D V L A C S A S I M H M C F I S L G R Y L
	TM III
Am5-HT ₂	GGCATCCGGAATCCTTTGCGGACGAGGCACACGTCCACCAAACGGATGGTCGGCTTCAAGATAGCGGCTGTGTGGTTGCTCGCCATGTTG 810
	G I R N P L R T R H T S T K R M V G F K I A A V W L L A M I
	TM IV
Am5-HT ₂	GTCFCCAGCTCGATCACGGTTTGGGCATAATAAATCCTCTAAACATCATGCCACGGCCGGGAGCGTGCCTGATCAACAACAGAGCGTTT 900
	V S S S I T V L G I I N P L N I M P R P G A C V I N N R A F

Abbildung 3.18: Vergleich der Spleißstelle von Dm5-HT₂ und Am5-*ht2*. Abgebildet ist ein Ausschnitt der Sequenzen von Dm5-*ht2* (oben) und Am5-*ht2* (unten). Schwarz hinterlegt sind die Übergänge der beiden „konservierten“ Exons.

3.2.3 Eigenschaften der abgeleiteten Aminosäuresequenz

Die Am5-*ht2* cDNA kodiert ein 653 Aminosäuren langes Protein (Am5-HT₂), mit einer Molekularmasse von 71.5 kDa (Abb. 3.15). Wie für Am5-HT₇ zeigt das Hydrophathieprofil (Abb. 3.19) des Am5-HT₂-Rezeptors sieben hydrophobe Bereiche, die die Membran durchspannen können (TM I - VII).

Am5-HT₂ besitzt einen sehr langen N-Terminus von 148 Aminosäuren. Innerhalb des N-Terminus befinden sich drei Konsensusstellen für N-Glykosylierung: N₇₁VS, N₉₆ET und N₁₁₃AT. In der Aminosäuresequenz sind neun Konsensusstellen für die Phosphorylierung

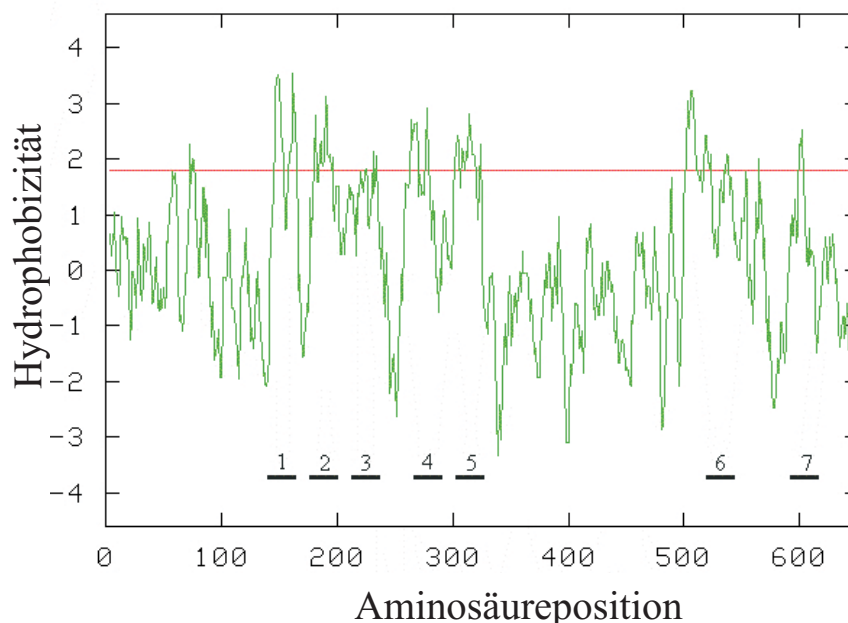


Abbildung 3.19: **Hydrophathieprofil der abgeleiteten AS-Sequenz des Am5-HT₂-Rezeptors.** Die Hydrophobizität wurde nach Kyte und Doolittle (1982) mit einer Fensterweite von 19 Aminosäuren ermittelt und gegen die jeweilige Aminosäure-Position aufgetragen. Hydrophobizitätswerte > 1,6 gelten als Kriterium für die Existenz einer Transmembranregion. Die potentiellen Transmembranregionen sind als Balken eingezeichnet.

durch die PKC vorhanden. Sie befinden sich in der zweiten und dritten zytoplasmatischen Schleife und im C-Terminus.

Die Aminosäuresequenz des Am5-HT₂-Rezeptors enthält die, für biogene Amin-Rezeptoren charakteristischen Aminosäurereste. Wie in Am5-HT₇ existiert ein Aspartat-Rest (D₂₂₀) in der TM III sowie ein Phenylalanin-Rest in der TM VI (F₅₀₈). Ein Serin-Rest in der TM V (S₃₀₅) ist in den, an den IP₃-Signalweg gekoppelten Rezeptoren, konserviert (Donnelly *et al.*, 1994) und auch in Am5-HT₂ zu finden. Das hoch konservierte „DRY“-Motiv am 3' Ende der TM III liegt auch bei diesem Rezeptor in einer abgewandelten Form vor (G₂₃₇RY). Das in der TM VI befindliche F₅₀₈XXXWXP-Motiv und das N₅₄₉PXXY-Motiv in der TM VII sind bei Am5-HT₂ konserviert.

Der C-Terminus von Am5-HT₂ besteht aus 97 Aminosäuren. Drei Cysteine (C₅₇₀, C₅₇₂, C₅₉₄) sind potentielle Stellen für eine posttranslationale Palmitoylierung.

Die größte Sequenzähnlichkeit des Am5-HT₂-Rezeptors besteht mit 58% (46% der AS sind identisch) zu einem bis jetzt noch nicht charakterisierten Rezeptor von *Anopheles gambiae* und mit 44% (32% identische AS) zu dem 5-HT₂-Rezeptor von *Drosophila melanogaster* (Dm5-HT₂; Colas *et al.*, 1995) (Abb. 3.20). Auffallend sind die langen N-Termini aller drei 5-HT₂-Rezeptoren.

Dm 5-HT2	MEMQSYSGRGPSTGTSETATATAAVASASASDTAATFTLRHFNCRLLEADWPGPRQPF	58
Dm 5-HT2	IDCEGSHTNSTSYTPSSLPTSKNLI EGPNNTFQCARQAIDEAEHNAFYSCDGESPLSENC	118
Am 5-HT2	MEGDLIASWTGNLTAMLHLLPCNDTFLHGCAEE	33
Dm 5-HT2	TLRLKARLLRWPEAYEHIRLAINGALSDYASDKLSDSSSCDEGGMVLQCKLGQAHELLL	178
Am 5-HT2	CGLASSGFDMCTAEKGSFASMTLLCAPCDYSNCDVNVSLVLSGLESVEGVFLSRLPRF	93
Ano 5-HTr	MN	2
Dm 5-HT2	CHLQQLEREPLREVGSAAEESFNDSLLQAFQIELGAERDGLWSFLNLSSELMPEDHGFLGI	238
Am 5-HT2	ECNETDFPDQILECTATTENATTEEDLTISCSHRAKGLNTAGSRGRRLDWNFLFVAVFIVA	153
Ano 5-HTr	VELRNALVSPTWLNGAEHHAVALAGWNQTQLLGELPAGGDTAPGRYEWSEFLFVILFIFA	62
Dm 5-HT2	MNVNTSLDMFLPNLTALNTTSTASTADMATEFAVTKSFLDYSPHGYDELFLFVVFVIFA	298
	<div style="display: flex; justify-content: space-around; width: 100%;"> TM 1 TM 2 </div>	
Am 5-HT2	GGLGNILVCLAVLDKRLHNVTNYFLSLAVADLLVSLFVMPIGAIPCFLGYWPFVGVWC	213
Ano 5-HTr	GGLGNILVCLAVLDKRLONVTNYFLSLAVADLLVSLFVMPIGAIPCFLGYWPFVGVWC	122
Dm 5-HT2	GGLGNILVCLAVLDKRLONVTNYFLSLAVADLLVSLFVMPIGAIPCFLGYWPFVGVWC	358
	<div style="display: flex; justify-content: space-around; width: 100%;"> TM 3 TM 4 </div>	
Am 5-HT2	NVYVTCDLVACSASIMHMCFTSLGRYLGIRNPLRTRHTSTKRMVGFKIAAVVLLAMVSS	273
Ano 5-HTr	NIYVTCDLVACSASIMHMCFTSLGRYLGIRNPLGRHSTKRLTGKIALVWLLAMVSS	182
Dm 5-HT2	NIYVTCDLVACSASIMHMCFTSLGRYLGIRNPLGRHSTKRLTGKIALVWVWAMVSS	418
	<div style="display: flex; justify-content: space-around; width: 100%;"> TM 5 </div>	
Am 5-HT2	SITVLGIINPLNIMPRPGACVINNRAFFVFGSLVAFYIPMVMVATYILTVQLLRKARF	333
Ano 5-HTr	SITVLGMINQNNIMPGPNECVINNRAFFVFGSLVAFYIPMVMVATYILTVQLLRKARF	242
Dm 5-HT2	SITVLGLVNEKSIMPEPNICVINNRAFFVFGSLVAFYIPMVMVATYILTVQLLRKARF	478
Am 5-HT2	IAEHPERDQFRRLGGRYFSTR-----	354
Ano 5-HTr	LEQHP-----	248
Dm 5-HT2	AAEHPSEPFRRLLGGRFTLRPQHSQQQLQMFSSFSGSNNKFLSMGDGNRNFNTEGEMEEG	538
Am 5-HT2	-----	354
Ano 5-HTr	-----	248
Dm 5-HT2	GAPSRRSVGEPAERPLMQORTASSRSMGTVSFRNVVNGTSGAAGSGRRTTGTAHSSFRFS	598
Am 5-HT2	-----ASSTATSVETATPSSSRYTWRTSGGVGSDSLTKLNAEALCRKHNRRCRG	404
Ano 5-HTr	-----	248
Dm 5-HT2	GAGILRHSSSSPASSCHSTSTRSSSFWRKHGGYPNMDRLAIHLRLSLVPPSSHPNRRRA	658
Am 5-HT2	ARSAAKSOPOLNEAV-----NGASNPAGSG-----TGATRLATKVD	440
Ano 5-HTr	---GSMSHPHLGYSN-----CGNRTMAGK-----RSRTVCD	276
Dm 5-HT2	SVRVTIISOPOLGYPTNVGGNGRRTVGATEVGCAGGSSAGRTSNSSLGGTSLMKIATIQG	718
Am 5-HT2	QATQTPENIGR-----ETRNFTLKALKLQLNVTPN---TLNLRFLPGRTK	482
Ano 5-HTr	QGTQTPDSIER-----ETRRQKFCSFRIHLNSVPTPAINFNLKFL-GSKK	320
Dm 5-HT2	PILNQSQAAGGNHMVQVKVPTALKPEEPQRNKVRPFKFAFNRVATP---TLNLRFLNRSK	776
	<div style="display: flex; justify-content: space-around; width: 100%;"> TM 6 </div>	
Am 5-HT2	RRSLAANAVATEQKASKVLGLVFFMFVLCWAPFFILNIFFAACECSVPVHVNVCLWLWG	542
Ano 5-HTr	RTNLSANAVATEQKAKVLGLVFFMFVLCWAPFFILNIFFAAPEAKVPERIVSICLWLWG	380
Dm 5-HT2	RNLSANAVATEQKAKVLGLVFFMFVLCWSPFFILNIFFAACECQVPEHVNVNTCLWLWG	836
	<div style="display: flex; justify-content: space-around; width: 100%;"> TM 7 </div>	
Am 5-HT2	YVSTINPVIYTI FNRTFRAAFIRLLKCKCRSARPRHRSVTESGRNAMSLCTPTALPLV	602
Ano 5-HTr	YVSTINPVIYTI FNKTFRAAFIRLLKCRCSRSGRPPRYRSVTDSDRGASLCTPSALPLA	440
Dm 5-HT2	YVSTINPVIYTI FNRTFRAAFIRLLKCNCKR	868
Am 5-HT2	VISLQGTPLLTPNPNTAATPASATSYVTMMHRTPTSLYRDTFHQHEHDQNC	653
Ano 5-HTr	ISLQGSLLTPSTTQATPLSDFRGSYEITDDDC	473

Abbildung 3.20: **Aminosäure-Sequenzvergleich.** Die Aminosäuresequenz des Am5-HT₂ Rezeptors ist mit orthologen Rezeptoren von *Drosophila melanogaster* (Dm5-HT₂; #NP_524223) und *Anopheles gambiae* (#EAL42015) dargestellt. Schwarz hinterlegt sind identische Aminosäurereste zwischen allen drei Rezeptoren. Konservativ ausgetauschte Reste sind grau hinterlegt. Die grauen Balken über der Sequenz stellen die sieben Transmembransegmente (TM I-TM VII) dar. Die Aminosäureposition des letzten Rests jeder Zeile ist rechts angegeben. (-) markieren Lücken, die zur Optimierung des Alignments eingefügt wurden.

Im Dendrogram (siehe Abb. 3.6) bildet Am5-HT₂ mit Dm5-HT₂ und dem Rezeptor aus *Anopheles gambiae* einen eigenen Zweig.

3.2.4 Expressionsmuster des Am5-ht2-Gens

Mittels RT-PCR wurde das gewebsspezifische Expressionsmuster von Am5-ht2 qualitativ untersucht. Da dieser Rezeptor in verschiedenen Spleißvarianten auftritt, wurden die Primer für die RT-PCR nicht innerhalb der dritten zytoplasmatischen Schleife ausgewählt. In diesem Fall wäre eine Differenzierung der zwei häufig auftretenden Formen Am5-ht2 und Am5-ht2tr_a nicht möglich gewesen, da in beiden die dritte zytoplasmatische Schleife vollständig vorhanden ist. Durch die Verwendung eines 5'-Primers in der TM I und eines 3'-Primers am Ende der dritten zytoplasmatischen Schleife, gelang es zwischen den Spleiß-Varianten zu unterscheiden. Für das Am5-ht2-Transkript wurde ein Produkt von 949 bp erwartet, das Am5-ht2tr_a-Transkript sollte ein 722 bp großes Produkt ergeben.

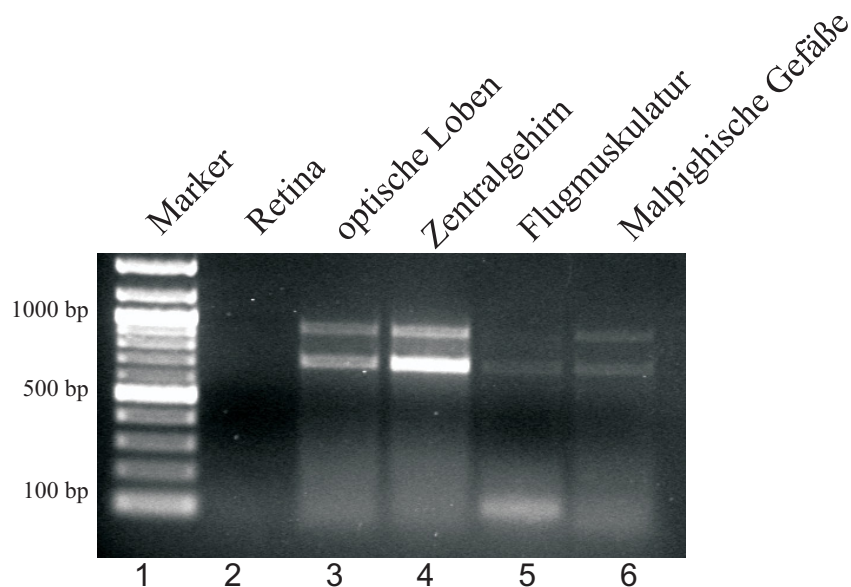


Abbildung 3.21: **Expression von Am5-HT₂ in verschiedenen Geweben von *Apis mellifera*.** Der 100 bp DNA Marker wurde in Bahn 1 aufgetragen. Die übrigen Bahnen zeigen RT-PCR Produkte aus: Retina-RNA (2), RNA der optischen Loben (3), Zentralgehirn-RNA (4), Flugmuskulatur-RNA (5), und RNA der Malpighischen Gefäße (6). Die amplifizierte Fragmente haben die erwartete Größe von 949 bp bzw 722 bp.

Im Zentralgehirn und den optischen Loben liegt eine hohe Expression beider Spleiß-Formen vor (Abb. 3.21). Die Bande des Am5-ht2tr_a-Transkripts erscheint intensiver als die des Am5-ht2-Transkripts. Geringere Mengen beider Transkripte werden in den Malpighischen Gefäßen und der Flugmuskulatur exprimiert. In der Retina wurde kein

Rezeptortranskript detektiert.

Die Expression des *Am5-ht2*-Gens im Gehirn der Honigbiene wurde mittels *in situ*-Hybridisierung untersucht. Aus dem Bereich der dritten zytoplasmatischen Schleife von *Am5-ht2* wurden Digoxigenin-markierte „sense“- bzw. „antisense“-Sonden mit einer Länge von 378 bp hergestellt.

Das Expressionsmuster des *Am5-ht2*-Gens gleicht dem des *Am5-ht7*-Gens sehr stark. Auch hier wird mit der „antisense“-RNA-Sonde (Abb. 3.22) ein spezifisches Hybridisierungssignal in den Zellsomata der meisten Neurone des Gehirns beobachtet. Neurone der optischen Loben, intrinsische Pilzkörperneurone (Kenyon-Zellen) sowie Neurone der Antennalloben exprimieren die *Am5-ht2*-mRNA. Mit der „sense“-Sonde als Negativkontrolle (nicht gezeigt), wurde keine Färbung sichtbar.

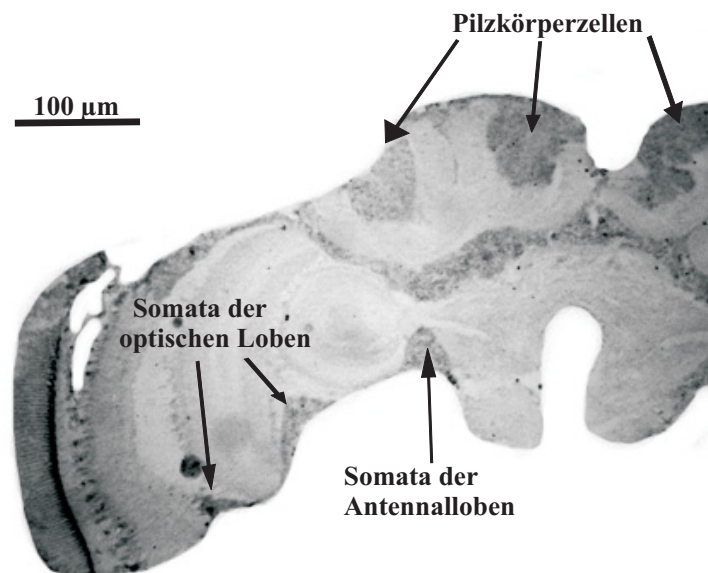


Abbildung 3.22: *In situ*-Hybridisierung der *Am5-ht2*-„antisense“-Sonde an Gehirnschnitten von adulten Sammlerinnen. Die spezifische Markierung ist als braune Färbung zu erkennen. Die markierten Zellkörper im Bereich der Pilzkörper, der Antennalloben und der optischen Loben sind durch Pfeile markiert.

3.3 Der *Am5-HT₁*-Rezeptor

3.3.1 Isolierung der *Am5-ht1* cDNA

Ein erneutes Durchmustern der genomischen Datenbank der Honigbiene *Apis mellifera* (<http://www.hgsc.bcm.tmc.edu/projects/honeybee>) mit einer bekannten Rezeptorsequenz von *Drosophila melanogaster* (*Dm5-HT_{1A}*, Saudou *et al.*, 1992) identifizierte die

Am5-*ht1*-cDNA. Mit spezifischen Oligonukleotiden wurden auf der „random geprinten“-cDNA (siehe 2.2.10) verschiedene Fragmente des Am5-HT₁-Rezeptors amplifiziert.

```

      ▼                ▼
ATGGAGGAACACGTGAACCAGACCTCGAGAAACTCGTCCTCGGACGGGTTGGTTTTTCACGGATGCCTCGATCATTCTCAGAACATTGGTG 90
M E E H V N Q T S R N S S S D G L V F T D A S I I L R T L V 30

CTGGGTCTCTTGATACTCGTCACCGTTGTGCGGAATCTGTTCTGTATAGCTGCGATCCTGCTCGAGCGGAACCTGCAATCGGTGGCCAAT 180
L G L L I L V T V V G N L F V I A A I L L E R N L Q S V A N 60

      TM I
TATTTGATCGTCACTTGGCCGTGGCCGATCTCATGGTCGCCTGTCTGGTCAATGCCTCTCGGTGCGGTTTACGAGATAAACTCGGAATGG 270
Y L I V S L A V A D L M V A C L V M P L G A V Y E I N S E W 90

      TM II
TCGCTCGGGCCCGAGCTTTGCGACATGTGGACCAGCAGCGACGTTCTCTGCTGCACTGCCTCGATATTGCATCTGGTGGCTATCGCGGTC 360
S L G P E L C D M W T S S D V L C C T A S I L H L V A I A V 120

      TM III
GACAGATATTGGGCAGTACCCGATCTCAATTATATACAGGCGAGGAATCCACGACGGATTGGTATGTGATCGTCGCGCTCTGGGTGGTG 450
D R Y W A V T D L N Y I Q A R N P R R I G M L I V A V W V V 150

      TM IV
TCGAGGATCCCGCATAACCAGATCTTCGCCACTTGCAGCGACGTTCTATCTACCCCTGTTGGTTATTCTATTCTGTACTGGAGGATATTT 540
S Q D P A Y Q I F A T C A T F Y L P L L V I L F L Y W R I F 180

      TM V
CAAGCGGCGCGGAAGCGGATCAGAAGGAGGCCGGAACCATTGTGCAGCCAGCTCGTGAAAGAAGAGGCATCCTTAGATACGTCACAAAA 630
Q A A R K R I R R R P G T I V Q P A R E R R G I L R Y V T K 210

AGACCGAGGGAGGAATCGACAGCGTTACAGATAACGAGATCCACGCCGATCATTTCGTCGATCTCGCCTGAGAAATCGTCGTTTACAAC 720
R P R E E S T A F T I T R S T P D H S S I S P E K S S S Y N 240

GGGGCGAACCGCACCAATCGACCACGGTCACCCCGTGCACCGTCTCGACGACCACGACCACCACCACCACGACAGTGACGAATCCT 810
G A N A T Q S T T V T P S T V S T T T T T T T T V T N P 270
      •
TCGAGCAGCCACTCGACCCACTCGTCGAGCAAAGGACGCGGACACTATCGAGTCGAAGCGGAGAAGAAAGCCGCGAAAACGCTGGCG 900
S S S H S T H S S S K R T R D T I E S K R E K K A A K T L A 300

ATAATCACCGGGCGTTCGTCGCGTGTGGTTGCCTTCTTCTGTTGTGCGTTGCTCCGCGCCACTTGCCAGGCCTGCGAGCCACCTGAG 990
I I T G A F V A C W L P F F V V A L L R A T C Q A C E P P E 330

      TM VI
CTCATAGCAAGCGTCTTCTGTGGCTGGGCTATTTCACAGCACCCTGAACCTGTGATATACACTGTATTCTCACCAGAGTTCAGGCAA 1080
L I A S V F L W L G Y F N S T L N P V I Y T V F S P E F R Q 360

      TM VII
GCCTTCAAGAGGATGCTTTGCGGTGGTTCCAGGATAATTTCGCTGA 1125
A F K R M L C G G S R I I R * 374

```

Abbildung 3.23: Nukleotid- und abgeleitete Aminosäuresequenz der Am5-*ht1*-cDNA. Die Position der letzten Aminosäure bzw. des letzten Nukleotids jeder Zeile steht rechts neben der Sequenz. Die potentiellen Transmembransegmente (TM I-VII) sind grau unterlegt. Konsensusstellen für N-Glykosylierung sind mit ▼ gekennzeichnet. Potentielle Konsensusstellen für Phosphorylierung durch PKC sind durch • gekennzeichnet.

Aus drei überlappenden Klonen wurde die vollständige Sequenzinformation (Abb. 3.23) zusammengesetzt: Klon 1 enthielt die Sequenz vom Start-Kodon bis zur zweiten Transmembrandomäne (Position 1-203); Klon 2 lieferte die Information von der TM I bis zur dritten zytoplasmatischen Schleife (Position 121-695); die Sequenz von Klon 3 enthielt den Bereich von der vierten Transmembrandomäne bis zum Stopp-Kodon (Position 433-1125).

3.3.2 Genomische Organisation des Am5-*ht1*-Gens

Der vollständige offene Leserahmen von Am5-*ht1* besteht aus 1125 bp. Das Am5-*ht1*-Gen besteht aus sechs Exons (Abb. 3.24). Diese befinden sich alle innerhalb eines Contigs (Contig4802 #AADG05004802).

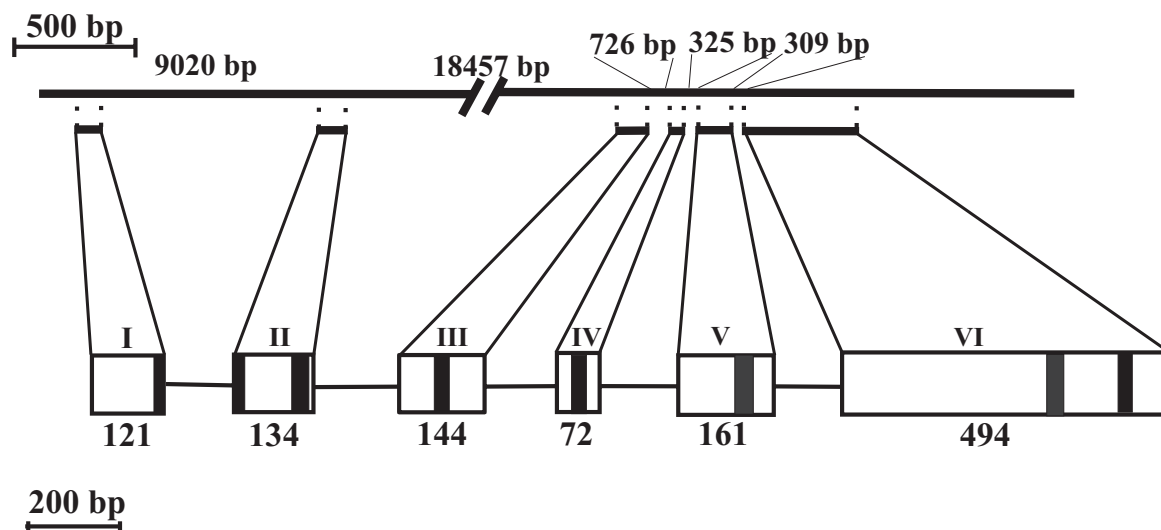


Abbildung 3.24: **Genomische Organisation des Am5-*ht1*-Gens.** Alle Längen sind in bp angegeben. Die Verteilung der Exons (I-VII) ist unterhalb der genomischen DNA (obere schwarze Linie) schematisch angegeben. Die cDNA ist als Kasten dargestellt. Die Abbildung zeigt die vollständige Am5-*ht1* cDNA vom Start-Kodon bis zum Stopp-Kodon. Die Zahlen unter den Boxen geben die Größe des Exons in bp an. Die Position der sieben Transmembransegmente wird durch schwarze Kästen angezeigt.

Exon	cDNA-Position	Contig-Position	Spleißdonor-stelle	Spleißakzeptor-stelle
I	1-121	11880-12001	—	TGTCG/gtaag
II	122-255	21021-21155	tccag/GGAAT	ACGAG/gtatt
III	256-399	39612-39762	tacag/ATAAA	TACAG/gttaa
VI	400-471	40488-40549	tccag/GCGAG	ACCAG/gttgg
V	472-631	40874-41037	tgcag/ATCTT	AAAAG/gttcc
VI	632-1125	41346-41540	tgcag/ACCGA	—

Tabelle 3.3: **Genomische Organisation des Am5-*ht1* Gens.** Die Exon/Intron Übergänge sind für das jeweilige 5'- und 3'-Ende des Exons angegeben. Für die Intron-Sequenz wurden Kleinbuchstaben verwendet, Exon-Sequenzen sind als Großbuchstaben dargestellt.

Die Exon/Intron Übergänge befinden sich in der ersten Transmembrandomäne, der ersten und zweiten extrazellulären Schleife und der zweiten und dritten zytoplasmatischen Schleife. Die in der ersten extrazellulären Schleife vorhandene Exon/Intron Grenze ist in *Drosophila melanogaster* konserviert.

3.3.3 Eigenschaften der abgeleiteten Aminosäuresequenz

Die *Am5-htt1* cDNA kodiert ein 374 Aminosäuren langes Protein (Am5-HT_1), mit einer Molekularmasse von 41 kDa (Abb. 3.23). Wie für die beiden zuvor beschriebenen Rezeptoren, sind im Hydropathieprofil (Abb. 3.19) des Am5-HT_1 -Rezeptors sieben hydrophobe Bereiche zu erkennen, welche eine ausreichende Länge haben um die Membran zu durchspannen (TM I - VII).

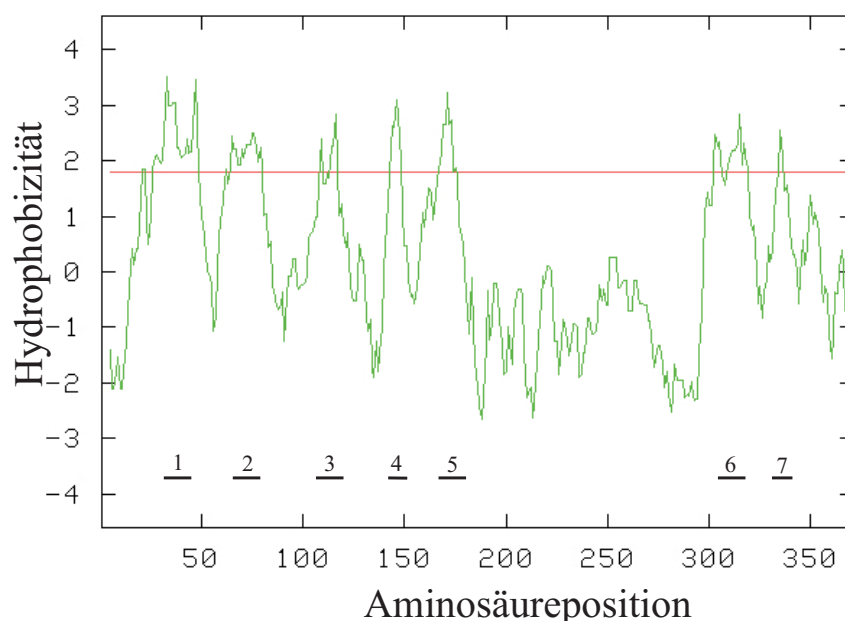


Abbildung 3.25: **Hydropathieprofil der abgeleiteten AS-Sequenz des Am5-HT_1 -Rezeptors.** Die Hydrophobizität wurde nach Kyte und Doolittle (1982) mit einer Fensterweite von 19 Aminosäuren ermittelt und gegen die jeweilige Aminosäure-Position aufgetragen. Hydrophobizitätswerte $> 1,6$ gelten als Kriterium für die Existenz einer Transmembranregion. Die potentiellen Transmembranregionen sind als Balken eingezeichnet.

Am5-HT_1 besitzt einen sehr kurzen N-Terminus von nur 28 Aminosäuren. Innerhalb des N-Terminus befinden sich zwei Konsensusstellen für N-Glykosylierung: N_6QT , N_{11}SS . In der dritten zytoplasmatischen Schleife des Am5-HT_1 -Rezeptors sind drei Konsensusstellen für die Phosphorylierung durch die PKC vorhanden.

In der Aminosäuresequenz des Am5-HT_1 -Rezeptors sind die oben genannten, für biogene Amin-Rezeptoren charakteristische Aminosäurereste vorhanden (siehe 3.1.3 und 3.2.3), ausgenommen das DRYXXV/IXXPL -Motiv. Das „DRY“-Motiv ist in diesem Rezeptor konserviert. Der C-Terminus des Am5-HT_1 -Rezeptors besteht aus 20 Aminosäuren. Das vorhandene Cystein (C_{367}) könnte posttranslational palmitoyliert werden. Des Weiteren ist im C-Terminus des Rezeptors ein Klasse 1 PDZ Domänen-Bindemotiv (S_{370}RI) vorhanden. Die größte Sequenzähnlichkeit des Am5-HT_1 -Rezeptors besteht mit 62% (44% der AS sind

identisch) zu einem Serotonin-Rezeptor von *Papilio xuthus* und mit 61% (43% identische AS) zu dem 5-HT₁-Rezeptor von *Panulirus interruptus*.

3.3.4 Expressionsmuster des *Am5-ht1*-Gens

Die Primer für die RT-PCR wurden innerhalb der dritten zytoplasmatischen Schleife ausgewählt, da dies ein Rezeptor-spezifischer Bereich ist. Sie befanden sich innerhalb von zwei verschiedenen Exons (V und VI) (Abb. 3.24), so dass eine Amplifikation von genomischer DNA durch das Vorhandensein eines größeren Produkts ersichtlich wäre. Erwartet wurde ein 210 bp großes Fragment.

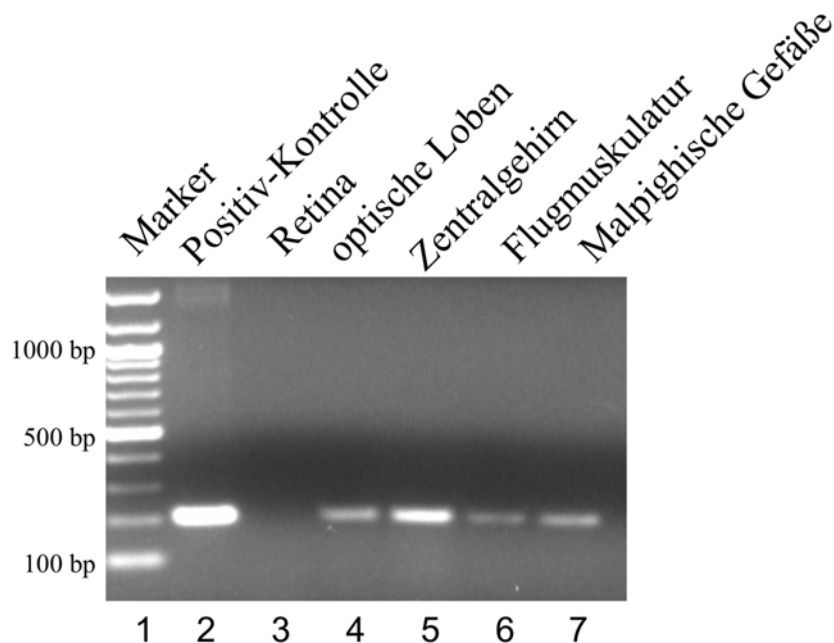


Abbildung 3.26: **Expression von Am5-HT₁ in verschiedenen Geweben von *Apis mellifera*.** Der 100 bp DNA Marker wurde in Bahn 1 aufgetragen. Die übrigen Bahnen zeigen amplifizierte RT-PCR Produkte aus: Retina-RNA (2), RNA der optischen Loben (3), Zentralgehirn-RNA (4), Flugmuskulatur-RNA (5), und RNA der Malpighischen Gefäße (6). Die amplifizierten Fragmente haben die erwartete Größe von 210 bp.

Eine sehr hohe Expression des *Am5-ht1*-Transkripts liegt im Zentralgehirn vor (Abb. 3.26). Geringere Mengen werden in den Malpighischen Gefäßen, den optischen Loben und der Flugmuskulatur exprimiert. In der Retina wurde kein Rezeptortranskript detektiert.

Der identische Bereich der dritten zytoplasmatischen Schleife des *Am5-ht1*-Gens wurde Digoxigenin-markiert und als Sonde für eine *in situ*-Hybridisierung verwendet. Das

Expressionsmuster des *Am5-ht1*-Gens gleicht dem der beiden anderen, oben gezeigten Rezeptoren sehr stark. Es wurde ein spezifisches Hybridisierungssignal in den Zellsomata der meisten Neurone des Gehirns beobachtet (Abb. 3.27). Die *Am5-ht1*-mRNA wird von den Neuronen der optischen Loben, intrinsischen Pilzkörperneuronen (Kenyon-Zellen) sowie Neuronen der Antennalloben exprimiert. Die Negativkontrolle („*sense*“-Sonde) blieb ohne eine sichtbare Färbung (nicht gezeigt).

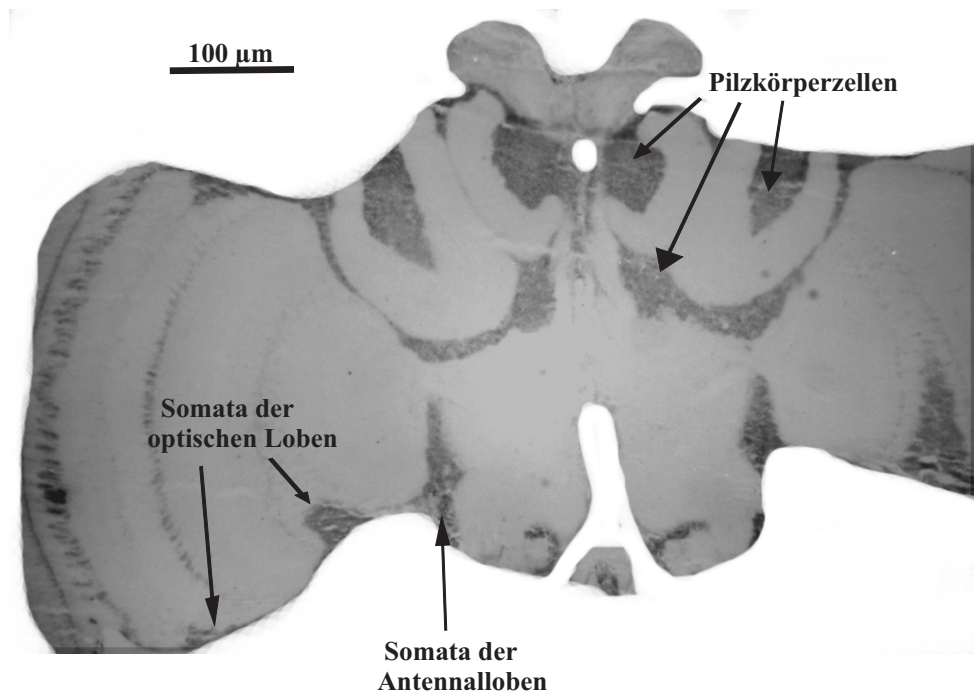


Abbildung 3.27: *In situ*-Hybridisierung der *Am5-ht1*-„*antisense*“-Sonde an Gehirnschnitten von adulten Sammlerinnen. Die spezifische Markierung ist als braune Färbung zu erkennen. Die markierten Zellkörper im Bereich der Pilzkörper, der Antennalloben und der optischen Loben sind durch Pfeile markiert.

Kapitel 4

Diskussion

G-Protein-gekoppelte Rezeptoren bilden die größte Gen-Familie, die Membranproteine kodiert. Sie ermöglichen in Vertebraten und Invertebraten die Kommunikation mit der Außenwelt (Sehvermögen, Geruch, Geschmack) und beeinflussen eine Vielzahl physiologischer Vorgänge, z.B. die Erregungsübertragung zwischen Nervenzellen, die Herzfunktion und die Hormonausschüttung. Die Weitergabe der Information erfolgt bei allen GPCRs nach dem gleichen Prinzip: Die Bindung eines spezifischen Liganden induziert eine Konformationsänderung des Rezeptors und aktiviert intrazelluläre heterotrimere G-Proteine oder direkt an den Rezeptor gekoppelte Signalwege (Reviews siehe Heuss und Gerber, 2000; Brzostowski und Kimmel, 2001).

Eine Untergruppe der GPCRs bilden die Serotonin-Rezeptoren. Serotonin moduliert in den verschiedensten Tierstämmen Verhaltensweisen wie die Nahrungsaufnahme, das Sexual- und Aggressionsverhalten, sowie Lernen und Gedächtnisbildung (Review siehe Weider, 1997). Störungen des serotonergen Systems führen beim Menschen zu Krankheitsbildern, wie z.B. Depressionen, Phobie, Schizophrenie und Panikattacken. Hinzu kommt eine Beteiligung bei Migräne, Bluthochdruck, pulmonaler Hypertonie, Essstörungen und Übelkeit. Die Möglichkeit diese Krankheiten durch Medikamente zu beeinflussen, die modulierend auf Serotonin-Rezeptoren wirken, macht die Funktionsweise der Rezeptoren zu einem interessanten Forschungsgebiet. In Säugetieren werden die vielseitigen Wirkungen von Serotonin durch 13 verschiedene GPCRs und einen Liganden-gesteuerten Ionenkanal vermittelt (Review siehe Hoyer *et al.*, 2002). Es wird angenommen, dass in Insekten ein ähnlich komplexes serotonerges System vorhanden ist (Review siehe Tierney, 2001). Bis zum jetzigen Zeitpunkt wurden Serotonin-Rezeptoren aus *Drosophila melanogaster* (Witz *et al.*, 1990; Saudou *et al.*, 1992; Colas *et al.*, 1995), *Bombyx mori* und *Heliothis virescens* (Nickisch-Rosenegk *et al.*, 1996), *Papilio xuthus* (Ono und Yoshikawa, 2004) und *Aedis aegypti* (Pietrantonio *et al.*, 2001) kloniert und charakterisiert. Trotz der Bedeutung des

serotonergen Systems bei den gut studierten Lern- und Gedächtnisprozessen der Honigbiene *Apis mellifera*, war bisher kein Serotonin-Rezeptor bekannt. Daher war die Klonierung und funktionelle Charakterisierung von Serotonin-Rezeptoren das Ziel der vorliegenden Arbeit.

Die folgende Diskussion gliedert sich in fünf Abschnitte: Der erste Abschnitt behandelt die strukturellen Eigenschaften der cDNA, sowie der Aminosäuresequenz der klonierten Serotonin-Rezeptoren. Im zweiten Teil wird auf die Gewebsverteilung und die Expressionsmuster eingegangen. Im dritten Abschnitt wird die funktionelle Charakterisierung des Am5-HT₇-Rezeptors diskutiert. Der vierte Abschnitt geht auf die möglichen Funktionen der Rezeptoren in der Honigbiene ein. Zum Schluß folgt ein Ausblick auf mögliche nachfolgende Experimente.

4.1 Genomische Organisation der 5-HT-Rezeptoren

Konservierung von Spleißstellen

In der genomischen DNA von Eukaryoten befinden sich kodierende (= Exons) und nicht kodierende (= Introns) Bereiche. Bei der Transkription entsteht zunächst eine prä-mRNA, die sowohl Introns als auch Exons enthält. Durch das Spleißen an konservierten Nukleotidsequenzen werden die Introns entfernt und die angrenzenden Exons miteinander verknüpft.

Mit Hilfe des vollständig sequenzierten Bienengenoms war es möglich die genomische Struktur der in dieser Arbeit untersuchten Serotonin-Rezeptoren zu ermitteln. Interessant ist es, diese mit der Struktur orthologer Rezeptorgene anderer Spezies zu vergleichen, um zu ermitteln ob und welche Exon/Intron-Übergängen konserviert sind. Neben dem Genom der Honigbiene, ist unter anderem das von *Drosophila melanogaster* verfügbar. Da die orthologen Serotonin-Rezeptoren bekannt sind, bietet sich ein Vergleich der beiden Arten an.

Das Gen des Dm5-HT₇-Rezeptors (Witz *et al.*, 1990), das Ortholog zu Am5-HT₇, besteht aus einem Exon. Im Gegensatz dazu ist das Bienengen (Am5-ht7) gespleißt. Beim Vergleich der orthologen 5-HT₂- und 5-HT₁-Rezeptoren zeigen sich jedoch Ähnlichkeiten. Von den sechs Exon/Intron-Übergängen in der kodierenden Sequenz von Am5-ht2 sind in Dm5-HT₂ (Colas *et al.*, 1995) vier konserviert (siehe Abb. 3.17). Es handelt sich dabei um die Spleißstellen in der ersten und zweiten extrazellulären Schleife und um zwei Spleißstellen in der dritten zytoplasmatischen Schleife. Die in der ersten extrazellulären Schleife vorhandene Exon/Intron-Grenze des Am5-HT₁-Rezeptors (Abb. 3.24) ist in Dm5-HT_{1A} (Saudou *et al.*, 1992) ebenso konserviert.

Am5-HT₁ weist eine große Sequenzähnlichkeit zu dem Serotonin-Rezeptor von *Papilio xuthus* auf (Ono und Yoshikawa, 2004). Die Klonierung der genomischen DNA dieses Rezeptors ermöglicht auch hier eine Analyse der genomischen Organisation. Zwischen *Papilio xuthus* und Am5-*ht1* sind zwei Spleißstellen konserviert. Die in dem Am5-HT₁- und Dm5-HT_{1A}-Rezeptor konservierte Exon/Intron-Grenze in der ersten extrazellulären Schleife ist auch in *Papilio xuthus* vorhanden. Des Weiteren ist die in der TM I vorhandene Spleißstelle des Am5-HT₁-Rezeptors konserviert.

Apis mellifera gehört der Ordnung der Hymenopteren an, die innerhalb der holometabolen Insekten eine Schwestergruppe der Mecopteroïden darstellen, zu denen die Lepidopteren (*Papilio xuthus*) und Dipteren (*Drosophila melanogaster*) zählen (Pashley *et al.*, 1993; Castro und Dowton, 2005). Obwohl sich *Drosophila melanogaster* und *Papilio xuthus* phylogenetisch näher stehen, sind mehr Spleißstellen zwischen den 5-HT-Rezeptoren von *Papilio xuthus* und *Apis mellifera* konserviert. Die Konservierung der Spleißstellen weist auf die Abstammung der 5-HT₁-Rezeptoren von einem gemeinsamen Vorfahren vor der Aufspaltung von Hymenopteren und Mecopteroïden hin. Es ist wahrscheinlich, dass die Spleißstellen von *Drosophila melanogaster* im Laufe der Evolution abgewandelt wurden, während die von *Papilio xuthus* und *Apis mellifera* erhalten blieben.

Alternatives Spleißen von Am5-*ht2*

Durch das Spleißen an konservierten Nukleotidsequenzen beginnen Introns fast immer mit der Sequenz GU („Spleiß-Donor“) und enden mit AG („Spleiß-Akzeptor“). Die Exon/Intron-Grenzen des Am5-HT₇-, Am5-HT₂- sowie Am5-HT₁-Rezeptors entsprechen diesen Konsensussequenzen, abgesehen von einer Ausnahme im Am5-HT₂-Rezeptor beim Übergang in das vierte Intron (Tab. 3.1, 3.2, 3.3).

Für den Am5-HT₇- und Am5-HT₁-Rezeptor wurden keine alternativ gespleißten mRNAs gefunden. Der Am5-HT₂-Rezeptor zeigt jedoch verschiedene Varianten des „*Exon Skipping*“, d.h. Exons werden deletiert und nicht in die mRNA eingebaut.

Es wurden vier verschiedene trunkierte Varianten des Am5-HT₂-Rezeptors kloniert (Abb. 3.16). Die am häufigsten auftretende Form ist Am5-*ht2tr_a*, die sich durch das Fehlen des dritten Exons auszeichnet (Abb. 3.21). Die dazu beitragenden Spleißstellen sind in Dm5-HT₂ konserviert. In Am5-*ht2tr_a* sind TM III und TM IV sowie die zweite zytoplasmatische Schleife nicht vorhanden, sowie Teilabschnitte der extrazellulären Schleifen zwei und drei. Ob aus der vorhandenen mRNA ein Polypeptid gebildet wird, konnte im Rahmen dieser Arbeit nicht untersucht werden. Es kann jedoch davon ausgegangen werden, dass dieses Rezeptorprotein nicht funktionsfähig ist, da für die Funktion entscheidende Strukturen nicht vorhanden sind. Dies sind z.B. Aminosäurereste in der TM III, die

für die Bindung des Liganden essentiell sind (Review siehe Strader *et al.*, 1995), die zweite zytoplasmatische Schleife, die an der G-Protein-Kopplung beteiligt ist (Visiers *et al.*, 2001) und die konservierten Aminosäuren des „DRY“-Motivs (Mirzadegan *et al.*, 2003), die bei der Rezeptoraktivierung eine entscheidende Rolle spielen (Kroeze *et al.*, 2002). Interessanterweise wurden auch in der Ratte, der Maus und im Menschen trunkierte Varianten des 5-HT_{2C}-Rezeptors nachgewiesen (Canton *et al.*, 1996). Die in diesen drei Arten konservierte Deletion betrifft ebenfalls den Bereich der zweiten zytoplasmatischen Schleife und die TM IV. Im Gegensatz zu An5-HT₂ führt sie bei diesen Rezeptoren zu einer Leserahmenverschiebung mit einem frühzeitigem Stopp-Kodon. Ob ein Protein gebildet wird, wurde bisher nicht untersucht.

Alternatives Spleißen ist ein evolutionär bedeutsamer Mechanismus, der die Flexibilität der Genexpression in Eukaryoten erhöht. Durch die Entstehung neuer Proteine kann sich der Organismus an veränderte Lebensbedingungen schneller und leichter anpassen (Boue *et al.*, 2003; Kopelman *et al.*, 2005). Es gibt eine Reihe von Serotonin-Rezeptoren, von denen Spleißvarianten bekannt sind (Gerald *et al.*, 1995; Canton *et al.*, 1996; Heidmann *et al.*, 1997; Bender *et al.*, 2000; Huang *et al.*, 2002). Sie unterscheiden sich im Vorkommen, in der Ligandenkopplung und den intrazellulären Signalwegen die sie aktivieren (Review siehe Kilpatrick *et al.*, 1999). Wie schon erwähnt, ist im Falle der 5-HT₂-Rezeptoren zu vermuten, dass durch das Spleißen keine funktionellen Proteine entstehen. Durch Untersuchungen von Schoneberg *et al.* (1995) und Ehlert *et al.* (2004) ergibt sich jedoch die Vermutung, dass auch die trunkierten Varianten translatiert und in die Plasmamembran eingebaut werden. Anhand trunkierter muskarinischer Acetylcholin-Rezeptoren bzw. Chemokin-Rezeptoren konnten sie zeigen, dass für die Insertion in die Plasmamembran kein vollständiger Rezeptor nötig ist. Der Einbau hängt lediglich von dem Vorhandensein der N-terminalen Aminosäuren der TM I ab (Hartmann *et al.*, 1989). Da in den trunkierten Formen des 5-HT₂-Rezeptors die TM I vorhanden ist, könnten auch diese Proteine in die Membran eingebaut werden. Funktionelle Rezeptoren entstehen mit großer Wahrscheinlichkeit trotzdem nicht. Kobilka *et al.* (1988) und Maggio *et al.* (1993) konnten zwar zeigen, dass sich trunkierte Varianten von GPCRs zu einer funktionellen Einheit zusammenlagern können, es handelt sich dabei jedoch um einen jeweils vollständigen C-terminalen und N-terminalen Abschnitt des Rezeptors. Den trunkierten An5-HT₂-Rezeptoren fehlt jedoch ein mittlerer Abschnitt des Rezeptors. Ein Zusammenlagern zu einem vollständigen Rezeptor erscheint deshalb unmöglich.

Baxter und Barker (1999) klonierten eine Dopamin-Rezeptor Spleiß-Variante aus *C. elegans*, in der die TM VI und TM VII nicht vorhanden sind. Obwohl das Protein gebildet wird, war der heterolog exprimierte Rezeptor nicht in der Lage, eine intrazelluläre Antwort

hervorzurufen. Bei einer Koexpression mit dem vollständigen Rezeptor, wirkte sich das Vorhandensein der trunkierten Form inhibierend auf die Funktion des vollständigen Rezeptors aus. Interaktionen zwischen trunkierten Rezeptoren und den vollständigen Varianten wurden auch bei anderen biogenen Amin-Rezeptoren vermutet (Elmhurst *et al.*, 2000; Karpa *et al.*, 2000; Ehlert *et al.*, 2004). Ein weiteres Beispiel für den Einfluss trunkierter Formen auf den vollständigen Rezeptor ist der humane Vasopressin-Rezeptor V₂. Die trunkierte Form verhindert durch Heterodimerisierung mit dem vollständigen Rezeptor den Einbau in die Plasmamembran (Sarmiento *et al.*, 2004). Ob der native Am5-HT₂-Rezeptor durch die trunkierten Formen beeinflusst wird, kann hier nicht entschieden werden. Untersuchungen hierzu wären jedoch interessant um mehr über funktionelle Rezeptorregulation zu erfahren.

4.2 Eigenschaften der Aminosäuresequenz

Charakteristisch für GPCRs: die heptahelikale Struktur

G-Protein-gekoppelte Rezeptoren besitzen eine für sie typische Struktur. Sie besteht aus einem extrazellulären N-Terminus, sieben hydrophoben Transmembran-Helices, die durch drei extrazelluläre und drei intrazelluläre, hydrophile Schleifen miteinander verbunden sind, und einem intrazellulären C-Terminus (Strader *et al.*, 1995). Das Hydropathieprofil des Am5-HT₁-, Am5-HT₂- sowie des Am5-HT₇-Rezeptors deutet auf das Vorhandensein dieses charakteristischen Aufbaus hin (Abb. 3.3, 3.19, 3.25).

5-HT-Rezeptorsubtyp spezifische Liganden-Bindungstaschen

In der abgeleiteten Aminosäuresequenz der Familie der biogenen Amin-Rezeptoren gibt es eine Reihe konservierter Aminosäure-Reste. Darunter sind solche, die für die Bindung des Liganden essentiell sind. Die Bindungstasche für den Liganden wird durch die Transmembrandomänen geformt, wobei Aminosäure-Reste der TM III, TM V und TM VI von Bedeutung sind. Ein Asparaginsäure-Rest in der TM III bindet die basische Aminogruppe des Liganden. Der aromatische Indolring des Liganden interagiert mit einem Phenylalanin-Rest in der TM VI, während die Hydroxylgruppe des Liganden Wasserstoffbrückenbindungen zu einem Serin-Rest in der TM V ausbildet (Almaula *et al.*, 1996, Reviews siehe Probst *et al.*, 1992; Strader *et al.*, 1995; Kroeze *et al.*, 2002).

Diese an der Ligandenbindung beteiligten Aminosäure-Reste sind zum Teil in den untersuchten Rezeptoren konserviert (Abb. 3.4, 3.15, 3.23). Der Asparaginsäure-Rest in der TM III und der Phenylalanin-Rest in der TM VI ist in allen drei Serotonin-Rezeptoren

der Honigbiene konserviert. Der Serin-Rest in der TM V jedoch nicht. Dieser ist nur in dem Am5-HT₂-Rezeptor zu finden. In dem Am5-HT₇- und Am5-HT₁-Rezeptor ist das Serin konservativ gegen ein Threonin ausgetauscht. Phylogenetische Analysen von Donnelly *et al.* (1994) haben gezeigt, dass die Serotonin-Rezeptorsubfamilien sich in ihren Bindungsstellen unterscheiden. Der Serin-Rest ist in Rezeptoren vorhanden, die den IP₃-Signalweg regulieren, also 5-HT₂-Rezeptoren. Bei Rezeptoren, die an Adenylatzyklen koppeln, ist das Serin gegen ein Threonin oder Cystein ausgetauscht. Dies deckt sich mit der Sequenz des Am5-HT₇- und Am5-HT₁-Rezeptors.

GPCRs, die nicht „DRY“ sind

Im inaktiven Zustand des Rezeptors wechselwirken die zytoplasmatisch orientierten Bereiche der TM III und TM VI miteinander. Bei der Aktivierung des Rezeptors durch die Bindung eines Liganden kommt es durch die Entfernung dieser beiden TMs voneinander zu Konformationsänderungen (Gether *et al.*, 1997; Gether und Kobilka, 1998). Das hoch konservierte „DRY“-Motiv am Ende der TM III vermittelt diesen Vorgang. Der Arginin-Rest (R) interagiert mit dem benachbarten Asparaginsäure-Rest (D) und einem konservierten Glutamat-Rest in der TM VI. Mutationen, die diese Verbindung unterbrechen führen zu konstitutiver Aktivität des Rezeptors (Shapiro *et al.*, 2002). Obwohl der Tyrosin-Rest ebenso in vielen GPCRs konserviert ist, wurde seine Funktion noch nicht untersucht (Review siehe Flanagan, 2005).

Interessanterweise ist in zwei der drei untersuchten Honigbienen-Rezeptoren das „DRY“-Motiv nicht konserviert. Der Am5-HT₇-Rezeptor besitzt anstelle des Tyrosin-Rests (Y) einen Phenylalanin-Rest (F₁₄₀). Der 5-HT₂-Rezeptor der Languste *Panulirus interruptus* besitzt den identischen Austausch, auch hier steht an der Stelle des Tyrosin-Rests (Y) ein Phenylalanin-Rest (F) (Clark *et al.*, 2004). Diese Modifikation des konservierten „DRY“-Motivs führt zu einer Agonist-unabhängigen Aktivität des Rezeptors. Den Beweis hierfür erbrachte die Wiederherstellung des „DRY“-Motivs durch gerichtete Mutagenese, die in einer Abnahme der konstitutiven Aktivität resultierte.

In der Sequenz des Am5-HT₂-Rezeptors ist der Asparaginsäure-Rest (D) des „DRY“-Motivs durch einen Glycin-Rest (G₂₃₇) ersetzt. In 86% der GPCRs befindet sich an dieser Stelle ein saurer Asparaginsäure- oder Glutaminsäure-Rest (Mirzadegan *et al.*, 2003). Untersuchungen zeigten, dass die saure Seitenkette regulierend auf die Rezeptoraktivierung wirkt (Ballesteros *et al.*, 2001). Scheer *et al.* (1996) ersetzten in Mutagenese-Studien den Asparaginsäure-Rest durch einen Arginin-Rest. Da diese Mutation zu einer hohen konstitutiven Aktivität des Rezeptors führt, lässt sich eine Bedeutung dieser Aminosäure in der Aktivierung des Rezeptors ableiten. Demnach lässt sich vermuten, dass der Am5-

HT₂-Rezeptor in funktionelle Untersuchungen ebenso eine Agonist-unabhängige Aktivität aufweisen könnte.

Das stark konserviert „NPXXY“-Motiv

Das in den meisten GPCRs hoch konservierte „NPXXY“-Motiv in der TM VII, ist in den drei Serotonin-Rezeptoren der Honigbiene vorhanden. Barak *et al.* (1994) zeigten, dass es durch die Mutation des Tyrosin-Rests (Y) zu einer Reduzierung der Agonist-induzierten Aktivierung des Rezeptors kommt, obwohl die Kopplung an G-Proteine und intrazelluläre Botenstoffe unbeeinflusst blieb. Passend zu diesem Ergebnis lieferten Sealfon *et al.* (1995) den Nachweis, dass Aminosäure-Reste dieses „NPXXY“-Motivs über Wasserstoffbrücken die TM II und TM VII miteinander verknüpfen, wodurch eine für die Rezeptoraktivierung entscheidende Konformation entsteht.

Des Weiteren kann die Bindung von monomeren GTP-bindenden-Proteinen, z.B. Rho und ARF an das „NPXXY“-Motiv erfolgen (Hall *et al.*, 1999; Robertson *et al.*, 2003). Durch die Assoziation mit diesen monomeren GTPasen ist der Rezeptor an den Phospholipase D (PLD)-Signalweg gekoppelt (Mitchell *et al.*, 1998). Mutationen innerhalb des Motivs führen zu einer Störung der Assoziation des Rezeptors mit diesen Proteinen und der Unterbrechung des PLD-Signalwegs. Es ist also möglich, dass ARF und Rho auch mit den Serotonin-Rezeptoren der Honigbiene wechselwirken und dadurch die Rezeptoren an den PLD-Signalweg koppeln.

Palmitoylierung ermöglicht optimale G-Protein-Kopplung

Im C-Terminus jedes Serotonin-Rezeptors der Honigbiene befindet sich mindestens ein Cystein-Rest, wodurch sich die Möglichkeit der posttranslationalen Palmitoylierung ergibt (Jin *et al.*, 1999). Durch die Verankerung des hydrophoben Schwanzes der Palmitinsäure in der Plasmamembran entsteht eine zusätzliche intrazelluläre Schleife, wodurch der C-Terminus optimal für die G-Protein-Interaktion positioniert wird. O'Dowd *et al.* (1989) zeigten, dass ein durch den Austausch des Cystein-Rests nicht-palmitoylierter Rezeptor eine reduzierte G-Protein-Kopplung aufweist. Abhängig von den vorhandenen Cystein-Resten, könnte der Am5-HT₇-Rezeptor und der Am5-HT₂-Rezeptor zwei zusätzliche intrazelluläre Schleifen bilden, bei dem Am5-HT₁-Rezeptor ist die Bildung einer langen zusätzlichen Schleife möglich (Ponimaskin *et al.*, 2002).

N-Glykosylierung für die Anordnung in der Zellmembran

G-Protein-gekoppelte-Rezeptoren besitzen häufig eine oder mehrere Konsensusstellen für N-Glykosylierung, die meist im N-terminalen Abschnitt des Proteins liegen. Es wird angenommen, dass diese Modifikation für die richtige Anordnung des Rezeptors in der Zellmembran und möglicherweise auch für den gerichteten Transport zur Zellmembran benötigt wird (Clagett-Dame und McKelvy, 1989; Rands *et al.*, 1990). Am5-HT₂ besitzt drei, Am5-HT₁ und Am5-HT₇ besitzen zwei Konsensusstellen für N-Glykosylierung. Mindestens eine der Konsensusstellen des Am5-HT₇-Rezeptors wird glykosyliert (siehe Abschnitt 4.4).

Inaktivierung durch Phosphorylierung

GPCRs werden durch die Phosphorylierung intrazellulärer Serin/Threonin-Reste inaktiviert. Die Phosphorylierung des Rezeptors erfolgt in den meisten Fällen in der dritten intrazellulären Schleife und im C-Terminus durch die cAMP aktivierte PKA, die Diacylglycerol und Ca²⁺ aktivierte PKC oder durch G-Protein-gekoppelte Rezeptorkinasen (Freedman *et al.*, 1995; Raymond, 1991). Der Am5-HT₁-, Am5-HT₂- und Am5-HT₇-Rezeptor besitzt einige Konsensusstellen für die Phosphorylierung durch die PKC (S/T-X-R/K). Im Falle des Am5-HT₁-Rezeptors liegen alle Konsensusstellen in der dritten zytoplasmatischen Schleife. In der Sequenz des Am5-HT₇- und Am5-HT₂-Rezeptors ist, neben denen in der dritten zytoplasmatischen Schleife, jeweils eine weitere Konsensusstelle in der zweiten zytoplasmatischen Schleife zu finden. Ob die Serotonin-Rezeptoren durch die Phosphorylierung dieser Aminosäure-Reste von der nachfolgenden Signalkaskade entkoppelt werden, wurde im Rahmen dieser Arbeit nicht untersucht. Konsensusstellen für die Phosphorylierung durch die PKA (R-R-X₁-S/T-X₂) sind in keinem der untersuchten Rezeptoren vorhanden.

Eine PDZ-Domäne ermöglicht verschiedenste Protein-Interaktionen

PDZ-Domänen sind die am häufigsten vorkommenden Protein-Interaktionsdomänen. Der Am5-HT₇-Rezeptor enthält am extremen C-Terminus ein PDZ-Domänen-Bindemotiv (E₄₉₉SFL) der Klasse 1 (Sheng und Sala, 2001). Ein Vergleich mit orthologen Rezeptoren aus *Drosophila melanogaster* (Witz *et al.*, 1990), *Aedis aegypti* (Pietrantonio *et al.*, 2001) und *C. elegans* (Hobson *et al.*, 2003) zeigt, dass diese Rezeptoren identische C-terminale Sequenzen besitzen. Auch der Am5-HT₁-Rezeptor besitzt ein Klasse 1 PDZ-Domänen-Bindemotiv (S₃₇₀RI), welches sich jedoch nicht am extremen C-Terminus befindet. Becamel *et al.* (2004) zeigten mit Bindungsstudien, dass auch Aminosäuren, die

fünf bis acht Positionen vom absoluten C-Terminus entfernt sind, mit PDZ-Domänen bindenden Proteinen interagieren. Eine Reihe anderer 5-HT-Rezeptoren enthalten ebenfalls PDZ-Domänen, z.B. alle humanen 5-HT₂-Rezeptoren sowie der humane 5-HT₄-Rezeptor (Becamel *et al.*, 2004; Gavarini *et al.*, 2004). Es wurden verschiedene Interaktionspartner dieser Rezeptoren identifiziert, unter anderem das synaptische Protein PSD-95, die Adapterproteine Veli-3, MUPP1 und das „Septate junction“-Protein Dlg3. Bis zum jetzigen Zeitpunkt wurde jedoch noch kein Invertebraten-Rezeptor auf vorhandene Interaktionspartner getestet. Das Vorhandensein einer PDZ-Domäne lässt jedoch vermuten, dass die Serotonin-Rezeptoren der Honigbiene als Adapterproteine fungieren, die Signalmoleküle zu einem Signaltransduktionskomplex vereinigen bzw. organisieren (Bockaert *et al.*, 2003, Reviews siehe Harris und Lim, 2001; Hung und Sheng, 2002). Außerdem beeinflussen die PDZ-Domänen bindenden Proteine die Lokalisation, den intrazellulären Signalweg und die Internalisierung und Desensibilisierung von GPCRs (Xia *et al.*, 2003a,b, Review siehe Bockaert *et al.*, 2004).

Die PDZ-Domänen beider Rezeptoren enthalten einen Serin-Rest, über dessen Phosphorylierung die Interaktion mit den PDZ-Domänen-bindenden Proteinen reguliert werden könnte (Parker *et al.*, 2003). Im inaktiven Zustand ist das Protein an den Rezeptor gebunden. Durch Aktivierung und Phosphorylierung des Rezeptors wird die Interaktion gestört, das PDZ-Domänen bindende Protein löst sich vom Rezeptor und kann intrazelluläre Reaktionen auslösen.

4.3 Expressionsmuster der Serotonin-Rezeptoren

Die Expression der Serotonin-Rezeptoren der Honigbiene wurde mittels RT-PCR und *in situ*-Hybridisierung untersucht. Die *in situ*-Hybridisierungen zeigten, dass Serotonin-Rezeptoren in nahezu allen Regionen des adulten Bienenhirns exprimiert werden. Ähnliche Expressionsmuster wurden auch für zwei Dopamin-Rezeptoren (AmDOP1, Blenau *et al.*, 1998; AmDOP3, Beggs *et al.*, 2005), einen Tyramin-Rezeptor (AmTYR1, Blenau *et al.*, 2000) und einen Oktopamin-Rezeptor (AmOA1, Grohmann *et al.*, 2003) der Honigbiene beschrieben.

Hohe Expression der Rezeptoren im Zentralgehirn

Die RT-PCR-Experimente wurden für alle drei Rezeptoren mit denselben mRNA-Proben durchgeführt. Die Transkripte der Am5-HT₁, Am5-HT₂- und Am5-HT₇-Rezeptoren sind im Zentralgehirn stark exprimiert (siehe Abb. 3.7, 3.21 und 3.26). Durch die *in situ*-Hybridisierungen wurde deutlich, dass sich die Expression im Zentralgehirn auf die Anten-

nalloben und die Somata der intrinsischen Pilzkörperzellen (Kenyon-Zellen) beschränkt. In den Kelchen jedes Pilzkörpers sind rund 170.000 Kenyon-Zellen angesiedelt (Witthöft, 1967). Diese Zellen bestehen aus zwei Gruppen: dicht gepackte Zellen im Innern der Kelche mit einem kleinen Durchmesser und Zellen mit größerem Durchmesser, die den restlichen Teil der Kelche füllen (Farris *et al.*, 1999). Die Transkripte aller drei Serotonin-Rezeptoren wurden in den Somata beider Kenyon-Zelltypen nachgewiesen. Übereinstimmend mit den Resultaten der *in situ*-Hybridisierungen beschrieben Erber *et al.* (1991) durch autoradiographische Untersuchungen mit radioaktiv markiertem Serotonin eine sehr hohe Dichte von Serotonin-Bindungsstellen in den Pilzkörpern. Erstaunlich ist jedoch die nicht vorhandene Serotonin-Immunreaktivität im Bereich der Kelche (Schürmann und Klemm, 1984). Zusammengefasst zeigen diese Ergebnisse, dass Serotonin-Rezeptoren in den Pilzkörperkelchen exprimiert werden, jedoch zumindest keine umfangreiche Innervierung der Zellen durch Serotonin-immunreaktive Fasern vorhanden ist. Serotonin, das in anderen Bereichen des Gehirns freigesetzt wird, diffundiert demnach über weite Entfernungen zu den Rezeptoren. Ähnlich große Unterschiede zwischen der Immunreaktivität des Neurotransmitters und den entsprechenden Bindungsstellen wurden für Dopamin und Oktopamin beschrieben (Schafer und Rehder, 1989; Erber *et al.*, 1991; Kreissl *et al.*, 1994; Blenau *et al.*, 1998).

Zusätzlich zu den Kenyon-Zellen, deren Somata innerhalb der Kelche lokalisiert sind, befinden sich ca. 14.000 Zellkörper außerhalb der Kelche (Strausfeld, 2002). Mit den gegen die Am5-HT₂- und Am5-HT₁-mRNAs gerichteten Sonden, wurden diese Zellsomata angefärbt. Die Untersuchungen von Schürmann und Klemm (1984) zeigten in diesem Bereich Cluster von Serotonin immunreaktiven Zellkörpern. Ob es sich um die durch die *in situ*-Hybridisierungen angefärbten Zellsomata handelt, kann nicht eindeutig nachvollzogen werden.

Die hohe Expression der Serotonin-Rezeptoren im Gehirn der Honigbiene deckt sich mit Untersuchungen an anderen Organismen. Serotonin-Rezeptortranskripte wurden durch RT-PCR und Northern-Blot-Analysen in großen Mengen im zentralen Nervensystem von *Drosophila melanogaster* (Witz *et al.*, 1990; Saudou *et al.*, 1992), *Aplysia californica* (Angers *et al.*, 1998; Barbas *et al.*, 2005), *Heliothis virescens* (Nickisch-Rosenegk *et al.*, 1996), *Aedes aegypti* (Lee und Pietrantonio, 2003) und *Papilio xuthus* (Ono und Yoshikawa, 2004) nachgewiesen. In Säugetieren zeigt sich eine ähnlich weite Verbreitung von Serotonin-Rezeptoren im zentralen Nervensystem, beispielsweise im Thalamus, Hypothalamus, Hippocampus und im frontalen Cortex (Review, siehe Hoyer *et al.*, 2002).

Expression in den optischen Loben

Die Expression der drei Rezeptortranskripte innerhalb der optischen Loben ist, bezogen auf das Ergebnis der RT-PCR, deutlich geringer als im Zentralgehirn. Die Färbung der *in situ*-Hybridisierungen zeigt, dass sich die Expression auch hier auf die Somata der Neurone beschränkt. Es ergibt sich ein ähnliches Expressionsmuster für alle drei Serotonin-Rezeptoren im anterioren ventralen Bereich zwischen Lobula und Medulla und zwischen Medulla und Lamina. Im Bereich zwischen Lobula und Medulla wurde ebenso eine Serotonin-Immunreaktivität in 20-30 Somata nachgewiesen (Schürmann und Klemm, 1984). Ob es sich um die identischen Zellkörper handelt, die durch die *in situ*-Hybridisierungen angefärbt wurden, kann hier nicht eindeutig nachvollzogen werden.

Expression in peripheren Geweben

Es wurden zwei weitere Gewebe mit Hilfe der RT-PCR untersucht: die Malpighischen Gefäße und die Flugmuskulatur. Der Am5-HT₇-Rezeptor wird in beiden Geweben stark exprimiert. Dies korrespondiert mit der Lokalisation des 5-HT₇-Rezeptors von *Aedes aegypti* in angrenzenden Tracheolen der Malpighischen Gefäßen (Pietrantonio *et al.*, 2001). Die Transkripte der beiden anderen Serotonin-Rezeptoren konnten hier, im Vergleich zu dem Am5-HT₇-Rezeptor, nur in geringen Mengen detektiert werden. Auch in anderen Organismen scheint die Expression von Serotonin-Rezeptoren hauptsächlich auf das zentrale Nervensystem beschränkt zu sein. Rezeptoren aus *Drosophila melanogaster* konnten in der Peripherie bisher nicht nachgewiesen werden (Witz *et al.*, 1990; Saudou *et al.*, 1992). Auch das Transkript des Serotonin-Rezeptors aus *Papilio xuthus* wurde in den thorakalen Muskeln nicht detektiert (Ono und Yoshikawa, 2004). In Säugern sind Serotonin-Rezeptoren jedoch auch in der Peripherie weit verbreitet und konnten z.B. in der Milz, der Niere, dem Herz und dem Magen-Darm-Trakt nachgewiesen werden (Review, siehe Hoyer *et al.*, 2002).

Nachweis des Am5-HT₇-Rezeptorproteins

Übereinstimmend mit den Ergebnissen der RT-PCR und der *in situ*-Hybridisierung konnte das Am5-HT₇-Rezeptorprotein im Homogenat des gesamten Gehirns der Honigbiene mit einem spezifischen Antikörper im Western-Blot nachgewiesen werden (siehe Abb. 3.9). Auch auf Western-Blots mit dem Homogenat kultivierter intrinsischer Pilzkörperzellen detektiert der Antikörper eine Proteinbande, die der Größe des Am5-HT₇-Rezeptors entspricht.

4.4 Funktionelle Charakterisierung des Am5-HT₇-Rezeptors

Für die funktionelle Charakterisierung und pharmakologische Untersuchungen wurde die Am5-HT₇-Rezeptor-cDNA stabil in HEK 293 Zellen integriert. In vorhergehenden Studien wurden diese Zellen erfolgreich verwendet, um die pharmakologischen Eigenschaften vieler klonierter biogener Amin-Rezeptoren, unter anderem der Honigbiene zu untersuchen (Blenau *et al.*, 1998, 2000; Grohmann *et al.*, 2003; Beggs *et al.*, 2005).

Nachweis der Am5-HT₇-Rezeptor-Expression in den HEK 293 Zellen

Die Expression des Am5-HT₇-Proteins in HEK 293 Zellen wurde zunächst durch zwei verschiedene Antikörper überprüft. Zusätzlich zu dem, gegen den Am5-HT₇-Rezeptor gerichteten Antikörper (anti 5-HT₇), konnte durch die C-terminale Modifikation des Rezeptorproteins (siehe 2.4.1) ein Antikörper gegen einen HA-Tag zum Nachweis der Expression verwendet werden. Diese Modifikation hat keinen Einfluss auf die Funktion des Rezeptors (Koller *et al.*, 1997; Balfanz *et al.*, 2005).

Die Expression des Am5-HT₇-Rezeptors konnte sowohl mittels Westernblot-Analysen von Membranproteinen transfizierter Zellen (siehe 3.10) als auch immunzytochemisch an transfizierten HEK 293 Zellen (siehe 3.9) mit beiden Antikörpern nachgewiesen werden.

Der Am5-HT₇-Rezeptor wird glykosyliert

Die Behandlung der Membranprotein-Fraktion mit dem Enzym PNGase F, das spezifisch alle N-glykosidisch gebundenen Zuckerreste von Proteinen entfernt, zeigt, dass die transfizierten HEK 293 Zellen den Rezeptor in glykosylierter Form exprimieren (siehe 3.10). Wie zuvor bereits erwähnt, besitzt der Am5-HT₇-Rezeptor zwei Konsensusstellen für die N-Glykosylierung. An mindestens einer dieser Konsensusstellen ist ein Zuckerrest gebunden, wodurch sich das Laufverhalten des Proteins im SDS-Gel ändert.

Nach dem PNGase F-Verdau wird ein Protein der erwarteten Größe von 56,1 kDa detektiert. Ohne die PNGase F-Behandlung ist in den Membranprotein-Fractionen ein Protein mit der Molekularmasse von 66 kDa markiert. Da die Größe dieses Proteins genau der des im Bienenhirn und den Pilzkörper-Zellen detektierten Proteins entspricht, kann man davon ausgehen, dass auch der native Rezeptor glykosyliert wird.

Konsensusstellen für die N-Glykosylierung sind in allen bisher charakterisierten, biogenen Amin-Rezeptoren der Honigbiene (Blenau *et al.*, 1998, 2000; Grohmann *et al.*, 2003; Beggs *et al.*, 2005) sowie in zahlreichen Serotonin-Rezeptoren anderer Organismen vor-

handen (z.B. Albert *et al.*, 1990; Gerald *et al.*, 1995; Li *et al.*, 1995; Smith *et al.*, 2003). Über die Bedeutung der Glykosylierung für den Rezeptor wurde im Abschnitt 4.2 bereits diskutiert.

Der Am5-HT₇-Rezeptor ist ein funktioneller Serotonin-Rezeptor

Verschiedene biogene Amine wurden auf ihre Fähigkeit, den Am5-HT₇-Rezeptor zu aktivieren, getestet. Im Gegensatz zu Serotonin sind Dopamin, Tyramin und Oktopamin keine Agonisten am Am5-HT₇-Rezeptor (siehe 3.12). Serotonin ist das einzige biogene Amin, das einen Anstieg der intrazellulären cAMP-Konzentration bewirkt. Der Am5-HT₇-Rezeptor ist demnach ein funktioneller Serotonin-Rezeptor. Im Gegensatz zu der spezifischen cAMP-Antwort, ändert der aktivierte Rezeptor die intrazelluläre Ca²⁺-Konzentration nicht (Daten nicht gezeigt). Daraus kann geschlossen werden, dass der Am5-HT₇-Rezeptor ausschließlich heterotrimere G-Proteine (Gs) aktiviert, die Adenylatzyklen stimulieren. Die Zugabe von Serotonin zu Am5-HT₇-exprimierenden Zellen erhöhte die intrazelluläre cAMP-Konzentration dosisabhängig (siehe 3.13). Der EC₅₀-Wert von 1,06 nM (5-HT), ist im Vergleich zu anderen 5-HT₇-Rezeptoren äußerst niedrig. Die halbmaximale Stimulierung des 5-HT₇-Rezeptors von *Aedes aegypti* wird erst bei 39,5 nM 5-HT erreicht (Lee und Pietrantonio, 2003), die des Rezeptors von *C. elegans* bei 7,53 nM (Hobson *et al.*, 2003). Der EC₅₀-Wert des 5-HT₇-Rezeptors von *D. melanogaster* liegt bei 13 nM (Obosi *et al.*, 1996). Der einzige 5-HT₇-Rezeptor mit einem ähnlich niedrigen EC₅₀-Wert von 1,2 nM ist aus der Ratte bekannt (Ruat *et al.*, 1993).

Neben Serotonin ist 5-CT ein weiterer wirksamer Agonist des Am5-HT₇-Rezeptors (Leopoldo, 2004). In Rezeptor-exprimierenden Zellen verursachte 5-CT einen mit Serotonin vergleichbaren Anstieg der [cAMP]_i. Da 5-CT auch ein wirksamer Agonist des 5-HT₇-Rezeptors vom Menschen (Bard *et al.*, 1993; Thomas *et al.*, 1998; Hobson *et al.*, 2003) und anderer Vertebraten (Plassat *et al.*, 1993; Tsou *et al.*, 1994) ist, kann der untersuchte Serotonin-Rezeptor der Honigbiene als Mitglied der 5-HT₇-Rezeptorfamilie angesehen werden (siehe Review Leopoldo, 2004). Die 5-HT₇-Rezeptoren der Säugetiere haben jedoch eine höhere Affinität für 5-CT als für 5-HT (Gerhardt und van Heerikhuizen, 1997). Die Pharmakologie des Am5-HT₇-Rezeptors gleicht daher eher dem 5-HT₇-Rezeptors von *Aedes aegypti* und *Drosophila melanogaster*, bei denen 5-HT der stärkste Agonist ist (Lee und Pietrantonio, 2003; Witz *et al.*, 1990).

Am5-HT₇-Rezeptor ist konstitutiv aktiv

Einen Hinweis auf eine mögliche Agonist-unabhängige (konstitutive) Aktivität des Am5-HT₇-Rezeptors gibt die Erhöhung der basalen cAMP-Konzentration transfizierter HEK 293 Zellen im Vergleich zu nicht transfizierten Zellen (siehe 3.12). Durch die Verwendung eines Serum-freien Mediums wurden die Effekte eventueller endogener Rezeptor-aktivatoren eliminiert und damit als Grund für diesen Anstieg der cAMP-Konzentration ausgeschlossen.

Konstitutive Aktivität ist für viele biogenen Amin-Rezeptoren der Vertebraten (Review Milligan, 2003) und Invertebraten (Mustard *et al.*, 2003; Clark *et al.*, 2004) beschrieben. Für konstitutiv aktive 5-HT₇-Rezeptoren des Menschen (Thomas *et al.*, 1998; Krobert und Levy, 2002) und *C. elegans* (Hobson *et al.*, 2003) sind Methiothepin und Clozapin wirksame inverse Agonisten, d.h. sie inhibieren die Agonist-unabhängige Aktivität des Rezeptors (Review siehe Leurs *et al.*, 1998). Beiden Substanzen wurden am Am5-HT₇-Rezeptor mit dem Ergebnis getestet, dass Methiothepin auch hier ein inverser Agonist ist (siehe 3.14). Methiothepin wirkt der zellulären Antwort auf Serotonin entgegen und reduziert die intrazelluläre cAMP-Konzentration unter das Niveau nicht stimulierter Zellen. Clozapine hat auf den Am5-HT₇-Rezeptor keine Wirkung. Es wirkt weder als Antagonist noch als inverser Agonist.

Es ist bislang unklar, worauf die konstitutive Aktivität des Am5-HT₇-Rezeptor zurückzuführen ist. Es gibt viele Untersuchungen an GPCRs, die Modifikationen verschiedener intrazellulärer Regionen dafür verantwortlich machen. So spielt zum einen die Länge (Claeysen *et al.*, 1999) und Palmitoylierung (Ponimaskin *et al.*, 2002) des C-Terminus eine Rolle. Zum anderen haben Aminosäuren der dritten zytoplasmatischen Schleife eine Bedeutung an der Entstehung Agonist-unabhängiger Aktivität (Samama *et al.*, 1993; Niswender *et al.*, 1999; Purohit *et al.*, 2005). Ebenso führen Modifikationen des „DRY“-Motivs zu konstitutiver Aktivität (Alewijuse *et al.*, 2000; Scheer *et al.*, 1996). Clark *et al.* (2004) untersuchten einen Crustaceen-Rezeptor, in dem die Abwandlung des „DRY“- in ein „DRF“-Motiv zu konstitutiver Aktivität führte. Nach der Wiederherstellung des „DRY“-Motivs durch gerichtete Mutagenese reduzierte sich die Agonist-unabhängige Aktivität. Wie bereits erwähnt, besitzt auch der Am5-HT₇-Rezeptor dieses „DRF“-Motiv. Es liegt nahe zu spekulieren, dass auch diese Modifikation die konstitutive Aktivität mit verursacht.

Es gibt inzwischen Hinweise, dass konstitutive Aktivität ein physiologisch relevantes Phänomen darstellt (Morisset *et al.*, 2000; Seifert und Wenzel-Seifert, 2002). Es wird vermutet, dass die konstitutive Aktivität eines Rezeptors *in vivo* geeignet ist, die Stärke der Agonist-induzierten Antwort zu modulieren. Konstitutiv aktive GPCRs können durch natürlich

auftretende inverse Agonisten, die die basale Aktivität verringern, reguliert werden (Review siehe de Ligt *et al.*, 2000). Beispiele sind das Agouti-Protein, das als endogener inverser Agonist des G-Protein-gekoppelten Melanocortin-Rezeptors auftritt (Lu *et al.*, 1994) und IP-10 (Interferon- γ -induziertes Protein 10), das auf einen viralen GPCR des menschlichen Herpesvirus als inverser Agonist wirkt (Geras-Raaka *et al.*, 1998).

Eine Vielzahl von Krankheiten ist auf konstitutive Aktivität von GPCRs zurückzuführen, z.B. sind Mutationen des Rhodopsins Auslöser für Nachtblindheit und Retinitis pigmentosa, einer Augenkrankheit, die zur Zerstörung der Netzhaut führt (Review siehe Leurs *et al.*, 1998). Das Verständnis der Entstehung konstitutiver Aktivität G-Protein-gekoppelter Rezeptoren und deren Modulation durch inverse Agonisten könnte potentiell zur Entwicklung wirksamer Medikamente führen, und macht die Untersuchung dieser Rezeptoren zu einem interessanten Forschungsgebiet.

4.5 Mögliche Funktionen der Serotonin-Rezeptoren in der Honigbiene

Modulation von Lernvorgängen durch Aktivierung der cAMP-Kaskade

Der Botenstoff cAMP führt in der zellulären Signaltransduktion insbesondere zu einer Aktivierung von Proteinkinasen. Die Beteiligung der cAMP-Kaskaden an grundlegenden Funktionen beim Lernen und der Gedächtnisbildung ist bei Insekten, Mollusken sowie bei Säugetieren bewiesen (Davis, 1996; Brandon *et al.*, 1997; Abel und Kandel, 1998). In der Klasse der Insekten zeigt sich die Bedeutung der cAMP-Signalwege besonders an den *Drosophila melanogaster*-Lernmutanten *dunce* und *rutabaga*. Das *rutabaga*-Gen kodiert für eine Ca^{2+} /Calmodulin-abhängige Adenylatzyklase, also ein Enzym dessen Aktivierung zur Bildung von cAMP führt (Levin *et al.*, 1992). Das *dunce*-Gen hingegen kodiert für eine Phosphodiesterase, die cAMP abbaut (Qiu *et al.*, 1991). Beide Mutanten zeichnen sich durch Lerndefizite und Defizite in der Gedächtnisbildung aus, z.B. ist es nicht möglich *dunce*-Mutanten auf einen olfaktorischen Reiz zu konditionieren (Dudai *et al.*, 1976).

Durch cAMP wird die Proteinkinase A (PKA) aktiviert. Drain *et al.* (1991) bewiesen die allgemeine Beteiligung der PKA an Lernprozessen in *D. melanogaster*. In der Honigbiene reguliert die PKA-Aktivität z.B. die Verarbeitung olfaktorischer Signale in den Antennalloben (Hildebrandt und Müller, 1995; Fiala *et al.*, 1999) und ist während des Lernens für die Ausbildung des Langzeitgedächtnisses erforderlich (Müller, 2000). Des Weiteren phosphoryliert die PKA in der Honigbiene für die Gedächtnisbildung essentielle Transkriptionsfaktoren (Frank und Greenberg, 1994; DeZazzo und Tully, 1995). Daraus folgt,

dass die cAMP-Signalwege über die Aktivierung der PKA, am Lernen und der Gedächtnisbildung beteiligt sind (Review siehe Menzel, 1999). Es wird angenommen, dass für die Initiierung der biochemischen Kaskaden des cAMP-Signalwegs biogene Amine essentiell sind. Dopamin und Oktopamin bewirken in der Honigbiene durch die Bindung an G-Protein gekoppelte-Rezeptoren einen Anstieg der intrazellulären cAMP-Konzentration (Blenau *et al.*, 1998; Grohmann *et al.*, 2003). In der vorliegenden Arbeit wurde gezeigt, dass auch ein Serotonin-Rezeptor, der die Adenylatzyklase stimuliert, in der Honigbiene existiert. Ein Einfluss von Serotonin auf die Lernvorgänge der Honigbiene und das Abrufen gelerntes Verhaltens ist bereits nachgewiesen worden (Review siehe Bicker, 1999; Menzel *et al.*, 1994). Der hier untersuchte Am5-HT₇-Rezeptors ist in der Lage, effektiv die intrazelluläre cAMP-Konzentration zu erhöhen und damit ein potentieller Kandidat für die Vermittlung der Serotoninwirkung bei Lernvorgängen der Biene.

Modulation von Lernvorgängen durch Aktivierung der Phospholipase C

Funktionelle Untersuchungen des Am5-HT₂- bzw. Am5-HT₁-Rezeptors konnten im Rahmen dieser Arbeit nicht durchgeführt werden. Hinweise auf den intrazellulären Signalweg kann jedoch schon die Struktur eines Rezeptors geben. An die Phospholipase C gekoppelte Rezeptoren besitzen einen langen C-Terminus, so auch der Am5-HT₂-Rezeptor (vgl. Li *et al.*, 1995). Die Sequenzähnlichkeiten des Am5-HT₂-Rezeptors zu orthologen Rezeptoren lassen ebenso einen an die Phospholipase C gekoppelten Rezeptor vermuten. Demnach würde die Aktivierung des Rezeptors zu einem Anstieg in der intrazellulären Ca²⁺-Konzentration führen. Ca²⁺-Ionen spielen durch die Kontrolle enzymatischer Aktivitäten und die Modulation der Aktivitäten von Ionenkanälen eine entscheidende Rolle für viele zelluläre Vorgänge (Review siehe Berridge *et al.*, 2000).

Neben der intrazellulären Ca²⁺-Erhöhung bewirkt die Phospholipase C die Synthese von Diacylglycerol, welches, gemeinsam mit Ca²⁺, die Proteinkinase C aktiviert. Wie die PKA phosphoryliert auch die PKC eine Reihe von Proteinen, verändert deren Eigenschaften und löst damit intrazelluläre Signalwege aus. Die Beeinflussung des Lernverhaltens durch die PKC wurde an transgenen Fliegen nachgewiesen, deren PKC-Aktivität reduziert war. Diese Fliegen zeigen bei der Balz-Konditionierung kein Lernverhalten, entwickeln aber ein normales Gedächtnis (Kane *et al.*, 1997). Ebenso wurde bei *Apis mellifera* eine Beteiligung der PKC am assoziativen, olfaktorischen Lernen nachgewiesen (Grunbaum und Müller, 1998). Wie der Am5-HT₇-Rezeptor könnte demnach auch der Am5-HT₂-Rezeptor potentiell an der Modulation von Lernvorgängen beteiligt sein.

Expression in für Lern- und Gedächtnisleistungen entscheidenden Strukturen

Weitere Hinweise zur möglichen Funktion der Serotonin-Rezeptoren gibt deren Expressionsmuster. Auffällig ist die hohe Expression aller drei untersuchten Rezeptoren in den Pilzkörpern, welche für die Lern- und Gedächtnisleistungen der Honigbiene entscheidende Strukturen darstellen (Erber *et al.*, 1987). Die hohe Expression der Serotonin-Rezeptoren korreliert mit einer hohen Konzentration der PKA (Müller, 1997) sowie der PKC (Kamikouchi *et al.*, 2000). Wie schon diskutiert, spielen beide Proteinkinasen, eventuell in Abhängigkeit von biogenen Amin-Rezeptoren, beim Lernen und der Gedächtnisbildung eine Rolle. Die hohe Expression in den Pilzkörpern ist also ein weiteres Indiz dafür, dass durch die Serotonin-Rezeptoren Signalwege induziert werden könnten, die für Lern- und Gedächtnisvorgänge von Bedeutung sind.

Bedeutung für olfaktorische Lern- und Gedächtnisleistungen

Zwei Gehirnstrukturen der Honigbiene sind am olfaktorischen Lernen und der Gedächtnisbildung beteiligt: die Pilzkörper und die Antennalloben (Erber *et al.*, 1980; Menzel, 1999; Hammer, 1997). Die Antennalloben sind die primären olfaktorischen Neuropile. Die Pilzkörper speichern und vernetzen die verschiedensten sensorischen Informationen. Das Entfernen der Pilzkörper führt zu Defiziten im olfaktorischen Lernen (de Belle und Heisenberg, 1994). Zusätzlich zu dem Nachweis der Expression der PKA in beiden Strukturen (Eisenhardt *et al.*, 2001) zeigte Müller (1997), dass sowohl in den Pilzkörpern als auch in den Antennalloben die PKA-Aktivität durch Serotonin induziert wird. Interessanterweise werden die Serotonin-Rezeptoren ebenso in beiden Strukturen exprimiert, was zu der Vermutung führt, dass sie an der Verarbeitung olfaktorischer Informationen beteiligt sind.

4.6 Ausblick

Die vorliegende Arbeit beschreibt die Klonierung des ersten Serotonin-Rezeptorgens (*Am5-ht7*) der Honigbiene, Untersuchungen zur gewebespezifischen Expression des Rezeptors, die Bestimmung der pharmakologischen Eigenschaften sowie des intrazellulären Signalwegs, der vom Am5-HT₇-Rezeptor reguliert wird. Weiterführende Untersuchungen sollten sich auf die *in vivo* Funktion des Rezeptors konzentrieren. Ob der Rezeptor Lern- und Gedächtnisprozesse sowie sensorische Systeme der Honigbiene reguliert, ist bisher noch nicht geklärt. Es besteht jedoch die Möglichkeit, die Wirkung spezifischer Rezeptor-Liganden auf das Verhalten der Biene zu überprüfen. Im Rahmen dieser Arbeit wurden ein wirksamer Agonist (5-CT) und ein Antagonist (Methiothepin) des Am5-HT₇-Rezeptors identifiziert. Mittels Druckinjektion könnten diese Substanzen in definierte Regionen des Bienenhirns eingebracht und die Auswirkungen auf den Rüsselreflex (Erber *et al.*, 1993), das Antennenab tastverhalten (Pribbenow und Erber, 1996) oder die richtungsspezifische Antennenantwort (Erber und Kloppenburg, 1995) der Biene untersucht werden. So könnte eine Beteiligung des Rezeptors an Gedächtnis- und Lernleistungen sowie sein Einfluss auf das olfaktorische und visuelle System festgestellt werden.

Eine weitere Möglichkeit die Funktion des Rezeptors zu untersuchen, bieten molekulare „*knock-down*“ Technologien. Die Injektion von einzelsträngiger DNA (Fiala *et al.*, 1999) bzw. doppelsträngiger RNA (Farooqui *et al.*, 2003) wurde erfolgreich in der Biene genutzt, um die Expression von Proteinen zu reduzieren. Die Anwendung dieser Methoden, in Kombination mit den oben genannten Verhaltensexperimenten, könnte zusätzlich Hinweise auf die physiologische Bedeutung des Rezeptors liefern.

Des Weiteren könnte die Funktion des Am5-HT₇-Rezeptors anhand der Proteine untersucht werden, die durch den Rezeptor aktiviert werden. Es ist nahe liegend, dass durch den Serotonin-induzierten Anstieg der intrazellulären cAMP-Konzentration die cAMP-abhängige Proteinkinase A aktiviert wird. Die Lokalisation der PKA im Gehirn korreliert mit der Expression des Serotonin-Rezeptors. Die Bedeutung der PKA bei Lern- und Gedächtnisleistungen der Honigbiene wurde bereits beschrieben (Drain *et al.*, 1991; Müller, 2000). Würde die Aktivierung des Am5-HT₇-Rezeptors zu einer Erhöhung der PKA-Aktivität führen, wäre das ein weiterer Hinweis auf den Einfluss des Rezeptors auf Lern- und Gedächtnisprozesse.

Die Expression des *Am5ht7*-Gens sowie zwei weiterer, noch nicht vollständig klonierter Serotonin-Rezeptorgene wurde in dieser Arbeit an Gehirnschnitten adulter Sammlerinnen untersucht. Es wäre nun interessant, die Expression der Rezeptoren während der Ontogenese der Honigbiene (Larvenstadien, Puppe, Imago) zu bestimmen, um auf die Bedeutung der Rezeptoren in den verschiedenen Entwicklungsstadien schließen zu können. Des Wei-

teren könnte die Expression der Rezeptorgene in Abhängigkeit von der Kaste (Ammen, Wächter, Sammlerinnen usw.) analysiert werden. Verhaltens- und altersabhängige Unterschiede im Serotonin-Gehalt von Bienengehirnen wurden bereits beschrieben (Harris und Woodring, 1992; Taylor *et al.*, 1992; Schulz und Robinson, 1999). Aussagen über die Expressionsstärke der verschiedenen Serotonin-Rezeptoren würden diese Befunde komplettieren. Die alters- bzw. verhaltensabhängige Expression könnte durch RT-PCR oder Northern-Blot-Analysen untersucht werden.

Im Rahmen dieser Arbeit ist es gelungen, den intrazellulären Signalweg, der vom Am5-HT₇-Rezeptor gesteuert wird, aufzuklären. Ähnliche Untersuchungen für den Am5-HT₁- und den Am5-HT₂-Rezeptor stehen noch aus. Die cDNA des Am5-HT₁-Rezeptors müsste dazu stabil in eine Zelllinie transfiziert werden, z.B. in HEK 293-Zellen, um das Protein konstitutiv zu exprimieren. An den transfizierten Zellen kann die Serotonin-vermittelte zelluläre Antwort, bspw. die Reduktion der intrazellulären cAMP-Konzentration, untersucht werden. Der intrazelluläre Signalweg des Am5-HT₂-Rezeptors, bei dessen Aktivierung ein Anstieg der Ca²⁺-Konzentration angenommen wird, könnte mit Ca²⁺-Imaging-Methoden an transfizierten Zellen untersucht werden.

Sowohl der Am5-HT₁- als auch der Am5-HT₇-Rezeptor besitzen eine PDZ-Domäne. Die Rezeptoren könnten G-Protein-unabhängig, intrazelluläre Signalwege regulieren bzw. in größere Signalkomplexe eingebunden sein. Mit Hilfe des Hefe-Doppelhybrid-Systems wäre das Identifizieren von Proteinen, die mit den Serotonin-Rezeptoren über deren PDZ-Domänen interagieren, möglich. Mittelfristig könnte so auch herausgefunden werden, ob und wie Signalkomplexe im Bienen Gehirn aufgebaut sind.

Des Weiteren könnten die Spleiß-Varianten des Am5-HT₂-Rezeptors untersucht werden. Es wäre interessant zu prüfen, ob sie tatsächlich *in vivo* translatiert werden. Bei der Herstellung eines Antikörpers gegen den vollständigen Am5-HT₂-Rezeptor sollte ein Bereich gewählt werden, der auch in den trunkierten Varianten vorhanden ist. In Western-Blots sollte der Antikörper neben dem vollständigen Protein auch die trunkierten Varianten detektieren. Werden auch die trunkierten Varianten translatiert, könnte nachfolgend untersucht werden, ob sie in die Plasmamembran eingebaut werden. Es wäre möglich, die trunkierten Formen mit der Sequenz eines HA-Tags zu versehen und die so modifizierte cDNA in ein heterologes Expressionssystem einzubringen. Ein anti HA-Antikörper bestimmt dann die zelluläre Verteilung des Proteins. Um die Funktion der trunkierten Varianten zu klären, könnte eine Koexpression mit dem vollständigen Rezeptor erfolgen. So würden Einflüsse der trunkierten Varianten auf die Funktion des vollständigen Am5-HT₂-Rezeptors pharmakologisch untersucht werden.

Literaturverzeichnis

- Abel, T. and Kandel, E. (1998). Positive and negative regulatory mechanisms that mediate long-term memory storage. *Brain Res Brain Res Rev*, **26**(2-3), 360–378.
- Albert, P. R., Zhou, Q. Y., Tol, H. H. V., Bunzow, J. R., and Civelli, O. (1990). Cloning, functional expression, and mRNA tissue distribution of the rat 5-hydroxytryptamine1a receptor gene. *J Biol. Chem.*, **265**(10), 5825–5832.
- Alewijnse, A. E., Timmerman, H., Jacobs, E. H., Smit, M. J., Roovers, E., Cotecchia, S., and Leurs, R. (2000). The effect of mutations in the DRY motif on the constitutive activity and structural instability of the histamine h2 receptor. *Molecular Pharmacology*, **57**, 890–898.
- Almaula, N., Ebersoles, B. J., Zhang, D., Weinstein, H., and Sealfon, S. C. (1996). Mapping the binding site pocket of the serotonin 5-hydroxytryptamine2a receptor. *The Journal of biological chemistry*, **271**(25), 14672–14675.
- Angers, A., Storozhuk, M. V., Duchaine, T., Castellucci, V. F., and Desgroseillers, L. (1998). Cloning and functional expression of an aplysia 5-HT receptor negatively coupled to adenylate cyclase. *J Neurosci.*, **18**(15), 5586–5593.
- Balfanz, S., Strünker, T., Frings, S., and Baumann, A. (2005). A family of octopamine receptors that specifically induce cyclic AMP production or calcium release in *Drosophila melanogaster*. *Journal of Neurochemistry*, **10**.
- 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. *J Biol. Chem.*, **276**(31), 29171–29177.
- 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. *J Biol. Chem.*, **269**(4), 2790–2795.
- Barbas, D., Campbell, A., Castellucci, V. F., and Desgroseillers, L. (2005). Comparative localization of two serotonin receptors and sensorin in the central nervous system of *Aplysia californica*. *J Comp Neurol.*, **490**(3), 295–304.
- Bard, J. A., Zgombick, J., Adham, N., Vaysse, P., Branchek, T. A., and Weinshank, R. L. (1993). Cloning of a novel human serotonin receptor (5-HT₇) positively linked to adenylate cyclase. *J Biol. Chem.*, **268**(31), 23422–23426.
- Barnes, N. M. and Sharp, T. (1999). A review of central 5-HT receptors and their function. *Neuropharmacology*, **38**(1083), 1152.
- Barron, A. B. and Robinson, G. E. (2005). Selective modulation of task performance by octopamine in honey bee (*Apis mellifera*) division of labour. *J Comp Physiol A Neuroethol. Sens. Neural Behav. Physiol.*, **191**(7), 659–668.
- Baxter, G. D. and Barker, S. C. (1999). Isolation of an cDNA for an octopamine-like, G-protein coupled receptor from the cattle tick, *Boophilus microplus*. *Insect Biochemistry and molecular Biology*, **29**, 461–467.
- Becamel, C., Gavarini, S., Chanrion, B., Alonso, G., Galeotti, N., Dumuis, A., Bockaert, J., and Marin, P. (2004). The serotonin 5-HT_{2A} and 5-HT_{2C} receptors interact with specific sets of PDZ proteins. *J Biol. Chem.*, **279**(19), 20257–20266.
- 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*. *Insect Biochem Mol. Biol.*, **35**(8), 873–882.
- Bender, E., Pindon, A., Oers van, I., Zhang, Y. B., Gommeren, W., Verhasselt, P., Jurzak, M., Leysen, J., and Luyten, W. (2000). Structure of the human serotonin 5-HT₄ receptor gene and cloning of a novel 5-HT₄ splice variant. *J Neurochem.*, **74**(2), 478–489.
- 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. *Br. J Pharmacol.*, **73**(3), 729–738.
- Berridge, M. J., Lipp, P., and Bootman, M. D. (2000). The versatility and universality of calcium signalling. *Nat. Rev Mol. Cell Biol.*, **1**(1), 11–21.

- Bettler, B., Kaupmann, K., Mosbacher, J., and Gassmann, M. (2004). Molecular structure and physiological functions of GABA(B) receptors. *Physiol Rev*, **84**(3), 835–867.
- Bicker, G. (1999). Biogenic amines in the brain of the honeybee: Cellular distribution, development, and behavioral functions. *Microsc. Res. Tech.*, **44**, 166–178.
- Bicker, G. and Menzel, R. (1989). Chemical codes for the control of behaviour in arthropods. *Nature*, **337**(6202), 33–39.
- Blenau, W. and Baumann, A. (2001). Molecular and pharmacological properties of insect biogenic amine receptors: Lessons from *Drosophila melanogaster* and *Apis mellifera*. *Arch. Insect Biochem. Physiol.*, **48**(1), 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. *J Neurochem.*, **70**(1), 15–23.
- Blenau, W., Balfanz, S., and Baumann, A. (2000). Amtyr1: Characterization of a gene from honeybee (*Apis mellifera*) brain encoding a functional tyramine receptor. *Journal of Neurochemistry*.
- Bockaert, J. and Pin, J. P. (1999). Molecular tinkering of G protein-coupled receptors: an evolutionary success. *EMBO J*, **18**(7), 1723–1729.
- Bockaert, J., Marin, P., Dumuis, A., and Fagni, L. (2003). The 'magic tail' of G protein-coupled receptors: an anchorage for functional protein networks. *FEBS Lett.*, **546**(1), 65–72.
- Bockaert, J., Roussignol, G., Becamel, C., Gavarini, S., Joubert, L., Dumuis, A., Fagni, L., and Marin, P. (2004). GPCR-interacting proteins (GIPs): nature and functions. *Biochem Soc. Trans.*, **32**(Pt 5), 851–855.
- Bond, R. A., Leff, P., Johnson, T. D., Milano, C. A., Rockman, H. A., McMinn, T. R., Apparsundaram, S., Hyek, M. F., Kenakin, T. P., Allen, L. F., and . (1995). Physiological effects of inverse agonists in transgenic mice with myocardial overexpression of the beta 2-adrenoceptor. *Nature*, **374**(6519), 272–276.
- Boue, S., Letunic, I., and Bork, P. (2003). Alternative splicing and evolution. *Bioessays*, **25**(11), 1031–1034.

- Brandon, E. P., Idzerda, R. L., and McKnight, G. S. (1997). PKA isoforms, neural pathways, and behaviour: making the connection. *Curr. Opin. Neurobiol.*, **7**(3), 397–403.
- Brzostowski, J. A. and Kimmel, A. R. (2001). Signaling at zero G: G-protein-independent functions for 7-TM receptors. *Trends Biochem Sci.*, **26**(5), 291–297.
- Canals, M., Marcellino, D., Fanelli, F., Ciruela, F., de Benedetti, P., Goldberg, S. R., Neve, K., Fuxe, K., Agnati, L. F., Woods, A. S., Ferre, S., Lluís, C., Bouvier, M., and Franco, R. (2003). Adenosine A2A-dopamine D2 receptor-receptor heteromerization: qualitative and quantitative assessment by fluorescence and bioluminescence energy transfer. *J Biol. Chem.*, **278**(47), 46741–46749.
- 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. *Mol. Pharmacol.*, **50**(4), 799–807.
- Carman, C. V. and Benovic, J. L. (1998). G-protein-coupled receptors: turn-ons and turn-offs. *Curr. Opin. Neurobiol.*, **8**(3), 335–344.
- Castro, L. R. and Dowton, M. (2005). The position of the Hymenoptera within the holometabola as inferred from the mitochondrial genome of *Perga condei* (Hymenoptera: Symphyta: Pergidae). *Mol. Phylogenet. Evol.*, **34**(3), 469–479.
- Claeysen, S., Sebben, M., Becamel, C., Bockaert, J., and Dumuis, A. (1999). Novel brain-specific 5HT₄ receptor splice variants show marked constitutive activity: Role of the C-terminal intracellular domain. *Molecular Pharmacology*, **55**, 910–920.
- Clagett-Dame, M. and McKelvy, J. F. (1989). N-linked oligosaccharides are responsible for rat striatal dopamine D2 receptor heterogeneity. *Arch. Biochem Biophys.*, **274**(1), 145–154.
- Clark, M. C., Dever, T. E., Dever, J. J., 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. *The Journal of Neuroscience*, **24**(13), 3421–3435.
- Colas, J. F., Launay, J. M., Kellermann, O., Rosay, P., and Maroteaux, L. (1995). *Drosophila* 5-HT serotonin receptor: Coexpression with fushi-tarazu during segmentation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **92**, 5441–5445.

- Coleman, C. M. and Neckameyer, W. S. (2005). Serotonin synthesis by two distinct enzymes in *Drosophila melanogaster*. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology*, **59**, 12–31.
- Crider, J. Y., Williams, G. W., Drace, C. D., Katoli, P., Senchyna, M., and Sharif, N. A. (2003). Pharmacological characterization of a serotonin receptor (5-HT7) stimulating cAMP production in human corneal epithelial cells. *Invest Ophthalmol. Vis. Sci.*, **44**(11), 4837–4844.
- Davis, R. L. (1996). Physiology and biochemistry of *Drosophila* learning mutants. *Physiol. Rev.*, **76**, 299–317.
- de Belle, J. S. and Heisenberg, M. (1994). Associative odor learning in *Drosophila* abolished by chemical ablation of mushroom bodies. *Science*, **263**(5147), 692–695.
- de Ligt, R. A., Kourounakis, A. P., and IJzerman, A. P. (2000). Inverse agonism at G protein-coupled receptors: (patho)physiological relevance and implications for drug discovery. *Br. J Pharmacol.*, **130**(1), 1–12.
- DeZazzo, J. and Tully, T. (1995). Dissection of memory formation: from behavioral pharmacology to molecular genetics. *Trends Neurosci.*, **18**(5), 212–218.
- Donnelly, D., Findlay, J. B. C., and Blundell, T. L. (1994). The evolution and structure of aminergic G protein-coupled receptors. *Receptors and Channels*, **2**, 61–78.
- Drain, P., Folkers, E., and Quinn, W. G. (1991). cAMP-dependent protein kinase and the disruption of learning in transgenic flies. *Neuron*, **6**(1), 71–82.
- Dudai, Y., Jan, Y. N., Byers, D., Quinn, W. G., and Benzer, S. (1976). *Dunce*, a mutant of *Drosophila* deficient in learning. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **73**(5), 1684–1688.
- Ehlert, J. E., Addison, C. A., Burdick, M. D., Kunkel, S. L., and Strieter, R. M. (2004). Identification and partial characterization of a variant of human cxcr3 generated by posttranscriptional exon skipping. *J Immunol.*, **173**(10), 6234–6240.
- Eisenhardt, D., Fiala, A., Braun, P., Rosenboom, H., Kress, H., Ebert, P. R., and Menzel, R. (2001). Cloning of a catalytic subunit of cAMP-dependent protein kinase from the honeybee (*Apis mellifera*) and its localization in the brain. *Insect Mol. Biol.*, **10**(2), 173–181.

- 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. *Brain Res Mol. Brain Res*, **80**(1), 63–74.
- Elofsson, R. and Klemm, N. (1972). Monoamine-containing neurons in the optic ganglia of crustaceans and insects. *Z. Zellforsch. Mikrosk. Anat.*, **133**(4), 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.) behavioral analysis of the motion-sensitive antennal reflex. *J. Comp. Physiol. [A]*, **176**, 111–118.
- Erber, J., Masuhr, T., and Menzel, R. (1980). Localization of short-term memory in the brain of the bee, *Apis mellifera*. *Physiological Entomology*, **5**, 343–358.
- Erber, J., Homberg, U., and Gronenberg, W. (1987). Functional roles of the mushroom bodies in insects. In A. P. Gupta, editor, *Arthropod brain: Its evolution, development, structure, and functions*, book chapter 21, pages 485–511. John Wiley & Sons, Inc.
- Erber, J., Kloppenburg, P., and Scheidler, A. (1991). Neuromodulation in the honeybee: autoradiography, behaviour and electrophysiology. In L. J. Goodman and R. C. Fisher, editors, *The behaviour and pharmacology of bees*, book chapter 19, pages 273–287. CAB International.
- Erber, J., Kloppenburg, P., and Scheidler, A. (1993). Neuromodulation by serotonin and octopamine in the honeybee: behaviour, neuroanatomy and electrophysiology. *Experientia*, **49**, 1073–1083.
- Farooqui, T., Robinson, K., Vaessin, H., and Smith, B. H. (2003). Modulation of early olfactory processing by an octopaminergic reinforcement pathway in the honeybee. *J Neurosci.*, **23**(12), 5370–5380.
- Farris, S. M., Robinson, G. E., Davis, R. L., and Fahrback, S. E. (1999). Larval and pupal development of the mushroom bodies in the honey bee, *Apis mellifera*. *J. Comp. Neurol.*, **414**(1), 97–113.
- Fiala, A., Muller, U., and Menzel, R. (1999). Reversible downregulation of protein kinase a during olfactory learning using antisense technique impairs long-term memory formation in the honeybee, *Apis mellifera*. *J Neurosci.*, **19**(22), 10125–10134.
- Flanagan, C. A. (2005). A GPCR that is not 'DRY'. *Mol. Pharmacol.*, **68**(1), 1–3.

- Frank, D. A. and Greenberg, M. E. (1994). CREB: a mediator of long-term memory from mollusks to mammals. *Cell*, **79**(1), 5–8.
- 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. *J Biol. Chem.*, **270**(30), 17953–17961.
- Fuchs, E., Dustmann, J. H., Stadler, H., and Schürmann, F. W. (1989). Neuroactive compounds in the brain of the honeybee during imaginal live. *Comp. Biochem. Physiol. [C]*, **92**(2), 337–342.
- Gaddum, J. H. and Picarelli, Z. P. (1997). Two kinds of tryptamine receptor. 1957. *Br. J Pharmacol.*, **120**(4 Suppl), 134–139.
- Gavarini, S., Becamel, C., Chanrion, B., Bockaert, J., and Marin, P. (2004). Molecular and functional characterization of proteins interacting with the C-terminal domains of 5-HT₂ receptors: emergence of 5-HT₂ ‘receptosomes’. *Biol. Cell*, **96**(5), 373–381.
- Gerald, C., Adham, N., Kao, H. T., Olsen, M. A., Laz, T. M., Schechter, L. E., Bard, J. A., Vaysse, P. J., Hartig, P. R., Branchek, T. A., and . (1995). The 5-HT₄ receptor: molecular cloning and pharmacological characterization of two splice variants. *EMBO J*, **14**(12), 2806–2815.
- Geras-Raaka, E., Varma, A., Ho, H., Clark-Lewis, I., and Gershengorn, M. C. (1998). Human interferon-gamma-inducible protein 10 (IP-10) inhibits constitutive signaling of kaposi’s sarcoma-associated herpesvirus G protein-coupled receptor. *J Exp. Med.*, **188**(2), 405–408.
- Gerhardt, C. C. and van Heerikhuizen, H. (1997). Functional characteristics of heterologously expressed 5-HT receptors. *European Journal of Pharmacology*, **334**, 1–23.
- Gether, U. and Kobilka, B. K. (1998). G protein-coupled receptors II. mechanism of agonist activation. *J Biol. Chem.*, **273**(29), 17979–17982.
- 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. *EMBO J*, **16**(22), 6737–6747.
- Giurfa, M. (2003). The amazing mini-brain: lessons from a honey bee. *Bee World*, **84**(1), 5–18.

- 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. *Journal of Neurochemistry*, **86**, 725–735.
- Grunbaum, L. and Müller, U. (1998). Induction of a specific olfactory memory leads to a long-lasting activation of protein kinase C in the antennal lobe of the honeybee. *J Neurosci.*, **18**(11), 4384–4392.
- Guillet-Deniau, I., Burnol, A. F., and Girard, J. (1997). Identification and localization of a skeletal muscle serotonin 5-HT_{2a} receptor coupled to the Jak/STAT pathway. *The Journal of Biological Chemistry*, **272**(23), 14825–14829.
- Hall, R. A., Premont, R. T., and Lefkowitz, R. J. (1999). Heptahelical receptor signaling: beyond the G protein paradigm. *J Cell Biol.*, **145**(5), 927–932.
- Hammer, M. (1997). The neural basis of associative reward learning in honeybees. *Trends Neurosci.*, **20**, 245–252.
- Harmar, A. J. (2001). Family-B G-protein-coupled receptors. *Genome Biol.*, **2**(12), REVIEWS3013.
- Harris, B. Z. and Lim, W. A. (2001). Mechanism and role of PDZ domains in signaling complex assembly. *J Cell Sci.*, **114**(Pt 18), 3219–3231.
- Harris, J. W. and Woodring, J. (1992). Effects of stress, age, season, and source colony on levels of octopamine, dopamine and serotonin in the honey bee (*Apis mellifera* L.) brain. *J. Insect Physiol.*, **38**(1), 29–35.
- Hartmann, E., Rapoport, T. A., and Lodish, H. F. (1989). Predicting the orientation of eukaryotic membrane-spanning proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **86**(15), 5786–5790.
- Hedlund, P. B. and Sutcliffe, J. G. (2004). Functional, molecular and pharmacological advances in 5-HT₇ receptor research. *Trends Pharmacol. Sci.*, **25**(9), 481–486.
- Hedlund, P. B., Danielson, P. E., Thomas, E. A., Slanina, K., Carson, M. J., and Sutcliffe, J. G. (2003). No hypothermic response to serotonin in 5-HT₇ receptor knockout mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **100**(3), 1375–1380.

- Heidmann, D. E., Metcalf, M. A., Kohen, R., and Hamblin, M. W. (1997). Four 5-hydroxytryptamine₇ (5-HT₇) receptor isoforms in human and rat produced by alternative splicing: species differences due to altered intron-exon organization. *J Neurochem.*, **68**(4), 1372–1381.
- Heuss, C. and Gerber, U. (2000). G-protein-independent signaling by G-protein-coupled receptors. *Trends Neurosci.*, **23**(10), 469–475.
- Hildebrandt, H. and Müller, U. (1995). PKA activity in the antennal lobe of honeybees is regulated by chemosensory stimulation *in vivo*. *Brain Res*, **679**(2), 281–288.
- Hobson, R. J., Geng, J., Gray, A. D., and Komuniecki, R. W. (2003). SER-7b, a constitutively active galphas coupled 5-HT₇-like receptor expressed in the *Caenorhabditis elegans* m4 pharyngeal motorneuron. *Journal of Neurochemistry*, **10**.
- Hoyer, D., Hannon, J. P., and Martin, G. R. (2002). Molecular, pharmacological and functional diversity of 5-HT receptors. *Pharmacol. Biochem. Behav.*, **71**, 533–554.
- Huang, X., Xiao, H., Rex, E., 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*. *Journal of Neurochemistry*, **83**, 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. *J. Neurobiol.*, **55**(3), 315–330.
- Hung, A. Y. and Sheng, M. (2002). PDZ domains: structural modules for protein complex assembly. *J Biol. Chem.*, **277**(8), 5699–5702.
- Hunter, T. (2000). Signaling–2000 and beyond. *Cell*, **100**(1), 113–127.
- Hunyady, L., Vauquelin, G., and Vanderheyden, P. (2003). Agonist induction and conformational selection during activation of a G-protein-coupled receptor. *Trends Pharmacol. Sci.*, **24**(2), 81–86.
- Jin, H., Xie, Z., George, S. R., and O’Dowd, B. F. (1999). Palmitoylation occurs at cysteine 347 and cysteine 351 of the dopamine D₁ receptor. *Eur J Pharmacol.*, **386**(2-3), 305–312.

- Kamikouchi, A., Takeuchi, H., Sawata, M., Natori, S., and Kubo, T. (2000). Concentrated expression of Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II and protein kinase C in the mushroom bodies of the brain of the honeybee *Apis mellifera* L. *J Comp Neurol.*, **417**(4), 501–510.
- Kane, N. S., Robichon, A., Dickinson, J. A., and Greenspan, R. J. (1997). Learning without performance in PKC-deficient *Drosophila*. *Neuron*, **18**(2), 307–314.
- 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. *Mol. Pharmacol.*, **58**(4), 677–683.
- Kenyon, F. C. (1896). The brain of the bee. *Journal of Comparative Neurology*, **3**, 132–215.
- Kilpatrick, G. J., Dautzenberg, F. M., Martin, G. R., and Eglén, R. M. (1999). 7TM receptors: the splicing on the cake. *Trends Pharmacol. Sci.*, **20**(7), 294–301.
- Kjelsberg, M. A., Cotecchia, S., Ostrowski, J., Caron, M. G., and Lefkowitz, R. J. (1992). Constitutive activation of the alpha 1b-adrenergic receptor by all amino acid substitutions at a single site. evidence for a region which constrains receptor activation. *J Biol. Chem.*, **267**(3), 1430–1433.
- Kloppenburg, P. and Erber, J. (1995). The modulatory effects of serotonin and octopamine in the visual system of the honeybee (*Apis mellifera* L.) II. Electrophysiological analysis of motion-sensitive neurons in the lobula. *J. Comp. Physiol. [A]*.
- Kobilka, B. K., Kobilka, T. S., Daniel, K., Regan, J. W., Caron, M. G., and Lefkowitz, R. J. (1988). Chimeric alpha 2-,beta 2-adrenergic receptors: delineation of domains involved in effector coupling and ligand binding specificity. *Science*, **240**(4857), 1310–1316.
- Koller, K. J., Whitehorn, E. A., Tate, E., Ries, T., Aguilar, B., Chernov-Rogan, T., Davis, A. M., Dobbs, A., Yen, M., and Barrett, R. W. (1997). A generic method for the production of cell lines expressing high levels of 7-transmembrane receptors. *Anal. Biochem.*, **250**(1), 51–60.
- Kopelman, N. M., Lancet, D., and Yanai, I. (2005). Alternative splicing and gene duplication are inversely correlated evolutionary mechanisms. *Nat. Genet.*, **37**(6), 588–589.
- Kornfeld, R. and Kornfeld, S. (1985). Assembly of asparagine-linked oligosaccharides. *Annu. Rev Biochem.*, **54**, 631–664.

- Kreissl, S., Eichmuller, S., Bicker, G., Rapus, J., and Eckert, M. (1994). Octopamine-like immunoreactivity in the brain and subesophageal ganglion of the honeybee. *J Comp Neurol.*, **348**(4), 583–595.
- Krobert, K. A. and Levy, F. O. (2002). The human 5-HT₇ serotonin receptor splice variants: constitutive activity and inverse agonist effects. *Br. J. Pharmacol.*, **135**, 1563–1571.
- Kroeze, W. K., Kristiansen, K., and Roth, B. L. (2002). Molecular biology of serotonin receptors - structure and function at the molecular level. *Current Topics in Medicinal Chemistry*, **2**, 507–528.
- Kyte, J. and Doolittle, R. F. (1982). A simple method for displaying the hydropathic character of a protein. *J Mol. Biol.*, **157**(1), 105–132.
- Lean, A. D., Stadel, J. M., and Lefkowitz, R. J. (1980). A ternary complex model explains the agonist-specific binding properties of the adenylylate cyclase-coupled beta-adrenergic receptor. *J Biol. Chem.*, **255**(15), 7108–7117.
- Lee, D. W. and Pietrantonio, P. V. (2003). *In vitro* expression and pharmacology of 5-HT₇-like receptor present in the mosquito *Aedes aegypti* tracheolar cells and hindgut-associated nerves. *Insect Molecular Biology*, **12**(6), 561–569.
- Leopoldo, M. (2004). Serotonin₇ receptors (5-HT₇ rs) and their ligands. *Current Medicinal Chemistry*, **11**, 1241–1253.
- Leurs, R., Smit, M. J., Alewijnse, A. E., and Timmerman, H. (1998). Agonist-independent regulation of constitutively active G-protein-coupled receptors. *Trends Biochem. Sci.*, **23**, 418–422.
- Levin, L.-R., Han, P.-L., Hwang, P. M., Feinstein, P. G., Davis, R. L., and Reed, R. R. (1992). The *Drosophila* learning and memory gene rutabaga encodes a Ca²⁺/calmodulin-responsive adenylyl cyclase. *Cell*, **68**, 479–489.
- Li, X.-C., Giot, J. F., Kuhl, D., Hen, R., and Kandel, E. R. (1995). Cloning and characterization of two related serotonergic receptors from the brain and the reproductive system of *Aplysia* that activate phospholipase C. *J. Neurosci.*, **15**, 7585–7591.
- Lu, D., Willard, D., Patel, I. R., Kadwell, S., Overton, L., Kost, T., Luther, M., Chen, W., Woychik, R. P., Wilkison, W. O., and . (1994). Agouti protein is an antagonist of the melanocyte-stimulating-hormone receptor. *Nature*, **371**(6500), 799–802.

- Maggio, R., Vogel, Z., and Wess, J. (1993). Reconstitution of functional muscarinic receptors by co-expression of amino- and carboxyl-terminal receptor fragments. *FEBS Lett.*, **319**(1-2), 195–200.
- Menzel, R. (1999). Memory dynamics in the honeybee. *J. Comp. Physiol. [A]*, **185**(323-340).
- Menzel, R. and Müller, U. (1996). Learning and memory in honeybees: From behavior to neural substrates. *Annu. Rev. Neurosci.*, **19**, 379–404.
- Menzel, R., Durst, C., Erber, J., Eichmüller, S., Hammer, M., Hildebrandt, H., Mauelshagen, J., Müller, U., Rosenboom, H., Rybak, J., Schäfer, S., and Scheidler, A. (1994). The mushroom bodies in the honeybee: From molecules to behaviour. In K. Schildberger and N. Elsner, editors, *Neural Basis of Behavioural Adaptations (Fortschritte der Zoologie, Band/Vol. 39)*, pages 81–102. Gustav Fischer Verlag, 1 edition.
- Menzel, R., Heyne, A., Kinzel, C., Gerber, B., and Fiala, A. (1999). Pharmacological dissociation between the reinforcing, sensitizing, and response-releasing functions of reward in honeybee classical conditioning. *Behav. Neurosci.*, **113**(4), 744–754.
- 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*. *J. Comp. Physiol. [A]*, **145**, 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*. *Cell Tissue Res*, **234**(3), 655–677.
- Milligan, G. (2003). Constitutive activity and inverse agonists of G protein-coupled receptors: a current perspective. *Mol. Pharmacol.*, **64**(6), 1271–1276.
- Mirzadegan, T., Benko, G., Filipek, S., and Palczewski, K. (2003). Sequence analyses of G-protein-coupled receptors: similarities to rhodopsin. *Biochemistry*, **42**(10), 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. *Nature*, **392**(6674), 411–414.
- Müller, U. (1997). Neuronal cAMP-dependent protein kinase type II is concentrated in mushroom bodies of *Drosophila melanogaster* and the honeybee *Apis mellifera*. *J. Neurobiol.*, **33**(1), 33–44.

- Müller, U. (2000). Prolonged activation of cAMP-dependent protein kinase during conditioning induces long-term memory in honeybees. *Neuron*, **27**(1), 159–168.
- Morisset, S., Rouleau, A., Ligneau, X., Gbahou, F., Tardivel-Lacombe, J., Stark, H., Schunack, W., Ganellin, C. R., Schwartz, J. C., and Arrang, J. M. (2000). High constitutive activity of native H3 receptors regulates histamine neurons in brain. *Nature*, **408**(6814), 860–864.
- Moro, O., Lamah, J., Högger, P., and Sadée, W. (1993). Hydrophobic amino acid in the i2 loop plays a key role in receptor-G protein coupling. *The Journal of biological chemistry*, **268**(30), 22273–22276.
- 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. *Mol. Brain Res.*, **113**, 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. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **71**(3), 797–801.
- Nickisch-Rosenegk, E. V., 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*). *Insect Biochem. Mol. Biol.*, **26**, 817–827.
- Niswender, C. M., Copeland, S. C., Herrick-Davis, K., Emeson, R. B., and Sanders-Bush, E. (1999). RNA editing of the human serotonin 5-hydroxytryptamine 2c receptor silences constitutive activity. *The Journal of biological chemistry*, **274**(14), 9472–9478.
- 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*. *J Biol. Chem.*, **276**(22), 19452–19460.
- Obosi, 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. *FEBS Lett.*, **381**(3), 233–236.

- O'Dowd, B. F., Hnatowich, M., Caron, M. G., Lefkowitz, R. J., and Bouvier, M. (1989). Palmitoylation of the human b2-adrenergic receptor. *Journal of Biological Chemistry*, **264**(13), 7564–7569.
- 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. *Insect Biochemistry and molecular Biology*, **34**, 1247–1256.
- Page, R. E. and Erber, J. (2002). Levels of behavioral organization and the evolution of division of labor. *Naturwissenschaften*, **89**(3), 91–106.
- Palea, S., Lluel, P., Barras, M., Duquenne, C., Galzin, A. M., and Arbilla, S. (2004). Involvement of 5-hydroxytryptamine (HT)7 receptors in the 5-HT excitatory effects on the rat urinary bladder. *BJU. Int.*, **94**(7), 1125–1131.
- Park, P. S. and Palczewski, K. (2005). Diversifying the repertoire of G protein-coupled receptors through oligomerization. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A*, **102**(25), 8793–8794.
- Park, P. S., Filipek, S., Wells, J. W., and Palczewski, K. (2004). Oligomerization of G protein-coupled receptors: past, present, and future. *Biochemistry*, **43**(50), 15643–15656.
- Parker, L. L., Backstrom, J. R., Sanders-Bush, E., and Shieh, B. H. (2003). Agonist-induced phosphorylation of the serotonin 5-HT_{2C} receptor regulates its interaction with multiple PDZ protein 1. *J Biol. Chem.*, **278**(24), 21576–21583.
- Pashley, D. P., McPheron, B. A., and Zimmer, E. A. (1993). Systematics of holometabolous insect orders based on 18s ribosomal RNA. *Mol. Phylogenet. Evol.*, **2**(2), 132–142.
- Pietrantonio, P. V., Jagge, C., and McDowell, C. (2001). Cloning and expression analysis of a 5HT₇-like serotonin receptor cDNA from mosquito *Aedes aegypti* female excretory and respiratory systems. *Insect Molecular Biology*, **10**(4), 357–369.
- Plassat, J. L., Amlaiky, N., and Hen, R. (1993). Molecular cloning of a mammalian serotonin receptor that activates adenylate cyclase. *Mol. Pharmacol.*, **44**(2), 229–236.
- Ponimaskin, E. G., Heine, M., Joubert, L., Sebben, 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. *The Journal of biological chemistry*, **277**(4), 2534–2546.

- Pribbenow, B. and Erber, J. (1996). Modulation of antennal scanning in the honeybee by sucrose stimuli, serotonin, and octopamine: Behavior and electrophysiology. *Neurobiol. Learn. Mem.*, **66**, 109–120.
- Probst, W. C., Snyder, L. A., Schuster, D. I., Brosius, J., and Sealfon, S. C. (1992). Sequence alignment of the G-protein coupled receptor superfamily. *DNA Cell Biol.*, **11**(1), 1–20.
- Purohit, A., Smith, C., Herrick-Davis, K., and Teitler, M. (2005). Stable expression of constitutively activated mutant h5HT6 and h5HT7 serotonin receptors: inverse agonist activity of antipsychotic drugs. *Psychopharmacology*, **179**(461), 469.
- Qiu, Y. H., Chen, C. N., Malone, T., Richter, L., Beckendorf, S. K., and Davis, R. L. (1991). Characterization of the memory gene *dunce* of *Drosophila melanogaster*. *J Mol. Biol.*, **222**(3), 553–565.
- 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. *J Biol. Chem.*, **265**(18), 10759–10764.
- Raymond, J. R. (1991). Protein kinase C induces phosphorylation and desensitization of the human 5-HT_{1A} receptor. *J Biol. Chem.*, **266**(22), 14747–14753.
- 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. *Pharmacology and Therapeutics*, **92**, 179–212.
- Roberts, A. J., Krucker, T., Levy, C. L., Slanina, K. A., Sutcliffe, J. G., and Hedlund, P. B. (2004). Mice lacking 5-HT receptors show specific impairments in contextual learning. *Eur J Neurosci.*, **19**(7), 1913–1922.
- Robertson, D. N., Johnson, M. S., Moggach, L. O., Holland, P. J., Lutz, E. M., and Mitchell, R. (2003). Selective interaction of arf1 with the carboxy-terminal tail domain of the 5-HT_{2A} receptor. *Mol. Pharmacol.*, **64**(5), 1239–1250.
- Roeder, T. (2002). Biochemistry and molecular biology of receptors for biogenic amines in locusts. *Microscopy Research and Technique*, **56**, 237–247.
- Ruat, M., Traiffort, E., Leurs, R., Tardivel-Lacombe, J., Diaz, J., Arrang, J. M., and Schwartz, J. C. (1993). Molecular cloning, characterization, and localization of a high-affinity serotonin receptor (5-HT₇) activating cAMP formation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **90**(18), 8547–8551.

- Samama, P., Cotecchia, S., Costa, T., and Lefkowitz, R. J. (1993). A mutation-induced activated state of the beta 2-adrenergic receptor. Extending the ternary complex model. *J Biol. Chem.*, **268**(7), 4625–4636.
- Sambrook, J. and Russell, R. W. (2001). Molecular cloning: A laboratory manual, 3rd ed. *Cold Spring, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press*.
- Sarmiento, J. M., Anazco, C. C., Campos, D. M., Prado, G. N., Navarro, J., and Gonzalez, C. B. (2004). Novel down-regulatory mechanism of the surface expression of the vasopressin v2 receptor by an alternative splice receptor variant. *J Biol. Chem.*, **279**(45), 47017–47023.
- 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. *EMBO J*, **11**(1), 7–17.
- Schafer, S. and Rehder, V. (1989). Dopamine-like immunoreactivity in the brain and suboesophageal ganglion of the honeybee. *J Comp Neurol.*, **280**(1), 43–58.
- Scheer, A., Fanelli, F., Costa, T., Benedetti, P. G. D., and Cotecchia, S. (1996). Constitutively active mutants of the alpha 1B-adrenergic receptor: role of highly conserved polar amino acids in receptor activation. *EMBO J*, **15**(14), 3566–3578.
- Schäfer, S. and Bicker, G. (1986). Common projection areas of 5-HT and GABA-like immunoreactive fibres in the visual system of the honeybee. *Brain Research*, **380**, 368–370.
- Schoneberg, T., Liu, J., and Wess, J. (1995). Plasma membrane localization and functional rescue of truncated forms of a G protein-coupled receptor. *J Biol. Chem.*, **270**(30), 18000–18006.
- Schürmann, F. W. and Klemm, N. (1984). Serotonin-immunoreactive neurons in the brain of the honeybee. *J. Comp. Neurol.*, **225**, 570–580.
- 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. *J. Comp. Physiol. [A]*, **184**, 481–488.
- 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. *J Biol. Chem.*, **270**(28), 16683–16688.

- Seidel, C. and Bicker, G. (1996). The developmental expression of serotonin-immunoreactivity in the brain of the pupal honeybee. *Tissue Cell*, **28**(6), 663–672.
- Seifert, R. and Wenzel-Seifert, K. (2002). Constitutive activity of G-protein-coupled receptors: cause of disease and common property of wild-type receptors. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.*, **366**(5), 381–416.
- 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. *J Biol. Chem.*, **277**(13), 11441–11449.
- Sheng, M. and Sala, C. (2001). PDZ domains and the organization of supramolecular complexes. *Annu. Rev Neurosci.*, **24**, 1–29.
- Smith, M. W., Borts, T. L., Emkey, R., Cook, C. A., Wiggins, C. J., and Gutierrez, J. A. (2003). Characterization of a novel G-protein coupled receptor from the parasitic nematode *H. contortus* with high affinity for serotonin. *Journal of Neurochemistry*, **86**, 255–266.
- Sprouse, J., Reynolds, L., Li, X., Braselton, J., and Schmidt, A. (2004). 8-OH-DPAT as a 5-HT7 agonist: phase shifts of the circadian biological clock through increases in cAMP production. *Neuropharmacology*, **46**(1), 52–62.
- Strader, C. D., Candelore, M. R., Hill, W. S., Sigal, I. S., and Dixon, R. A. F. (1989). Identification of two serin residues involved in agonist activation of the b-adrenergic receptor. *J. Biol. Chem.*, **264**(23), 13572–13578.
- Strader, C. D., Fong, T. M., Graziano, M. P., and Tota, M. R. (1995). The family of G-protein-coupled receptors. *FASEB J.*, **9**, 745–754.
- Strausfeld, N. J. (2002). Organization of the honey bee mushroom body: representation of the calyx within the vertical and gamma lobes. *J Comp Neurol.*, **450**(1), 4–33.
- 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. *J. Comp. Physiol. [A]*, **170**, 715–721.
- Thomas, D. R., Gittins, S. A., Collin, L. L., Middlemiss, D. N., Riley, G., Hagan, J., Gloger, I., Ellis, C. E., Forbes, I. T., and Brown, A. M. (1998). Functional characterisation of the human cloned 5-HT7 receptor (long form); antagonist profile of sb-258719. *Br. J Pharmacol.*, **124**(6), 1300–1306.

- Tierney, A. J. (2001). Structure and function of invertebrate 5-HT receptors: a review. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A*, **128**, 791–804.
- Tsou, A. P., Kosaka, A., Bach, C., Zuppan, P., Yee, C., Tom, L., Alvarez, R., Ramsey, S., Bonhaus, D. W., Stefanich, E., and . (1994). Cloning and expression of a 5-hydroxytryptamine₇ receptor positively coupled to adenylyl cyclase. *J Neurochem.*, **63**(2), 456–464.
- Visiers, I., Hassan, S. A., and Weinstein, H. (2001). Differences in conformational properties of the second intracellular loop (IL2) in 5HT_{2c} receptors modified by RNA editing can account for G protein coupling efficiency. *Protein Engineering*, **14**(6), 409–414.
- von Frisch, K. (1967). The dance language and orientation of bees. *Cambridge*.
- Wagener-Hulme, C., Kuehn, J. C., Schulz, D. J., and Robinson, G. E. (1999). Biogenic amines and division of labor in honey bee colonies. *J. Comp. Physiol. [A]*, **184**, 471–479.
- Weider, A. W. (1997). Serotonergic modulation of behaviour: a phylogenetic overview. *Biol. Rev.*, **72**, 61–95.
- Wess, J. (1997). G-protein-coupled receptors: molecular mechanisms involved in receptor activation and selectivity of G-protein recognition. *FASEB J*, **11**(5), 346–354.
- Willets, J. M., Challiss, R. A., and Nahorski, S. R. (2003). Non-visual GRKs: are we seeing the whole picture? *Trends Pharmacol. Sci.*, **24**(12), 626–633.
- Witthöft, W. (1967). Absolute Anzahl und Verteilung der Zellen im Hirn der Honigbiene. *Z. Morph. Tiere*, **61**, 160–184.
- 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. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **87**, 8940–8944.
- Xia, Z., Gray, J. A., Compton-Toth, B. A., and Roth, B. L. (2003a). A direct interaction of PSD-95 with 5-HT_{2A} serotonin receptors regulates receptor trafficking and signal transduction. *J Biol. Chem.*, **278**(24), 21901–21908.
- Xia, Z., Hufeisen, S. J., Gray, J. A., and Roth, B. L. (2003b). The PDZ-binding domain is essential for the dendritic targeting of 5-HT_{2A} serotonin receptors in cortical pyramidal neurons in vitro. *Neuroscience*, **122**(4), 907–920.

Kapitel 5

Anhang

5.1 Verwendete Primer

Name	Primersequenz	Position	Verwendung
Am5-HT7Csen	5'-TTTGAATTCCTGAACAGGGATTTTCG	1288-1305	5' Primer Antikörper Herstellung
Am5-HT7Cant	5'-TTTAAGCTTCAGGAAGCTCTCATTAG	1487-1504	3' Primer Antikörper Herstellung
Am5-HT7FIL3	5'-TTTGAATTCGCGCGTAGGATAGTTCTGG	686-703	5' Primer RT-PCR, <i>in situ</i> Hybridisierung
Am5-HT7RIL3	5'-CAATCGTCTGACTTGGTCGATG	1001-1021	3' Primer <i>in situ</i> Hybridisierung
Am5-HT7RT	5'-TGTGCCATAACGAAGCCGTT	420-440	5' Primer RT-PCR
Am5-HT7Ex5s	5'-TTTAAGCTTCCACCATGGAGGGGAAGGACGC	1-17	5' Ende des Expressionskonstrukts (5' Primer)
Am5-HT7Ex5a	5'-CTTCTCGAGCTTCTGAAGC	942-961	5' Ende des Expressionskonstrukts (3' Primer)
Am5-HT7Ex3s	5'-GCTTCAGAAGCTCGAGAAG	942-961	3' Ende des Expressionskonstrukts (5' Primer)
Am5-HT7Ex3a	5'-TCGTATGGGTACAGGAAGCTCTCATTAGG	1486-1504	3' Ende des Expressionskonstrukts (3' Primer)
Am5-HT7Ex3b	5'-TTTCTAGATTAAGCGTAGTC TGGGACGTCGTATGGGTACAGGAA	1498-1504	3' Ende des Expressionskonstrukts (2.3' Primer)
TM6	5'-CgCgAATTCCgATCTgYTggYTICCITTYTT		5' degenerierter Primer TM6
TM7p1	5'-gCggAATTCggATCgYRTADATIAYIggRTT		3' degenerierter Primer TM7

Tabelle 5.1: Primer, die für den Am5-HT7-Rezeptor verwendet wurden

Name	Primersequenz	Position	Verwendung
Am5HT ₁ KF	5'-TTTGAATTCATGGCTACGTTCTGGTG	1-18	Amplifizieren des vollständigen 5' Endes
Am5HT ₁ F2	5'-TTTGAATTC AACCTGCAATCGGTGGCC	446-463	Amplifizieren des vollständigen 5' Endes
Am5HT ₁ R	5'-TTTCTCGAGCTTGAAGGCTTGCCTGAAC	1440-1458	Amplifizieren des vollständigen 3' Endes
Am5HT ₁ KR	5'-TTTTCTAGATCAGCGAATTATCCTGGA	1476-1494	Amplifizieren des vollständigen 3' Endes
5-HT ₁ CPLFa	5'-TTTGAATTCGGGCAGTCACCGATCTCAATT	656-676	5' Primer RT-PCR, in situ Hybridisierung
Am5HT ₁ IL3R	5'-GTCGACGGGGTGACCGTG	1113-1130	3' Primer RT-PCR, in situ Hybridisierung

Tabelle 5.2: Primer, die für den Am5-HT₁-Rezeptor verwendet wurden

Name	Primersequenz	Position	Verwendung
Am5HT ₂ KF	5'-TTTGAATTCATGGAGGGGGATCTGATC	1-18	Amplifizieren des vollständigen 5' Endes
5-HT ₂ TM7	5'-TTTCTCGAGAACAATCTGATGAACGCAGC	1637-1657	Amplifizieren des vollständigen 3' Endes
5-HT ₂ TM1/2	5'-TTTGAATTCGTTGCTGTATTTATCGTGGC	440-459	Amplifizieren des vollständigen 5' Endes
Am5HT ₂ KR	5'-TTTCTCGAGTCAACAATTCTGATCGTG	1897-1914	Amplifizieren des vollständigen 3' Endes
Am5HT ₂ IL3F	5'-TTTGAATTC TTCATCGCGGAACATCCTG	998-1016	5' Primer RT-PCR, in situ Hybridisierung
Am5HT ₂ IL3R	5'-TTTCTCGAGTTATTCACGGCCGATATTCTC	1292-1309	3' Primer RT-PCR, in situ Hybridisierung

Tabelle 5.3: Primer, die für den Am5-HT₂-Rezeptor verwendet wurden

Danksagung

Ich danke Dr. Wolfgang Blenau für die Überlassung des Themas und die Übernahme der Betreuung dieser Arbeit. Ebenso danke ich ihm für die Einarbeitung in ein für mich völlig neues Themengebiet sowie für seine ständige Gesprächsbereitschaft bei Fragen und Problemen.

Mein besonderer Dank gilt PD Dr. Arnd Baumann. Bei ihm möchte ich mich für die Unterstützung in allen Fragen der Molekularbiologie und Biochemie sowie für die vielen praktischen Ratschläge und Tipps bedanken. Des Weiteren danke ich ihm und Sabine Balfanz für die vielen cAMP-Messungen und den immer wieder freundlichen Empfang im Forschungszentrum Jülich.

Der gesamten AG Walz danke ich für die angenehme Arbeitsatmosphäre. Insbesondere sei PD Dr. Otto Baumann für die Anregungen im Bereich der Immunzytochemie und Hilfestellungen in der Mikroskopie gedankt. Auch Angela Hubig sei für das gut organisierte Molekularbiologie-Labor und die lustige Gesellschaft gedankt.

Schließlich bedanke ich mich bei Karoline Franz und der AG Neurobiologie der Freien Universität Berlin, die mir die benötigten Bienen zur Verfügung gestellt haben. Weiterhin danke ich Dr. Bernd Grunewald und Stefanie Seifert (FU Berlin), unter deren Anleitung ich die Kultivierung von Kenyon-Zellen erlernt habe.

Der AG Fürst sei für die uneingeschränkte Bereitstellung vieler Geräte und Verbrauchsmittel gedankt. Besonderer Dank gilt hier Mirko Himmel und Thomas Löwe, die stets für Tipps, die den Laboralltag effizienter werden ließen, bereit waren und mir zu einem Antikörper verhelfen. Danke auch für den gemeinsam erzeugten Spaß im und außerhalb des Biochemielabors!

Dank zu sagen gilt es auch allen Diplomanden und Doktoranden der AG Walz, mit denen auch außerhalb des Labors viel zu erleben war. Den Mitgliedern des Graduiertenkollegs „Functional Insect Science“ danke ich für die Aufnahme als ideelles Mitglied und die Möglichkeit der Teilnahme an zahlreichen Symposien, Vorträgen und Seminaren.

Mein letzter, aber sehr großer Dank gilt meiner Mutter, meiner Schwester Maria und meinem Freund Thomas, die mir in allen Situationen zur Seite standen. Danke für die Fürsorge und Anteilnahme! Thomas danke ich außerdem für die Unterstützung bei kleinen und großen LaTeX-Problemen.

Lebenslauf

Name

Jana Schlenstedt

Geburtsdatum

03.01.1978

Geburtsort

Rathenow

Berufliche Tätigkeit

2003-2005

Wissenschaftliche Angestellte/Promotionsstudentin
an der Universität Potsdam
im Institut für Biochemie und Biologie
in der Arbeitsgruppe Zoophysiologie

Studium

1997-2002

Studium der Biologie an der Freien Universität Berlin
Diplomarbeit: „Zwischenartliche Beziehungen und
Raumpräferenzen von Przewalski-Pferden, Mufflons
und Damwild in einem Semireservat in der Schorfheide“
Abschluß: Diplom-Biologin

Schulausbildung

1994-1997

Friedrich-Ludwig-Jahn Gymnasium, Rathenow
Abschluß: Abitur

1984-1994

Juri-Gagarin Gesamtschule, Rhinow

Selbständigkeitserklärung

Hiermit erkläre ich, die vorliegende Arbeit selbständig ohne fremde Hilfe verfasst und nur die angegebene Literatur und Hilfsmittel verwendet zu haben.

Potsdam, 19. Dezember 2005

Jana Schlenstedt