Institut für Biochemie und Biologie
Abteilung Zoophysiologie

Biogene Aminrezeptoren bei der Honigbiene *Apis mellifera*:

Charakterisierung des Tyramin-2-Rezeptors
und die Beteiligung der Octopamin- und Tyraminrezeptoren
an der Steuerung der altersabhängigen Arbeitsteilung

- Dissertation –
zur Erlangung des akademischen Grades
„doctor rerum naturalium“
(Dr. rer. nat.)
in der Wissenschaftsdisziplin
„Tierphysiologie“

eingereicht an der
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Universität Potsdam

von
TINA REIM

Potsdam, den 01.04.2015

Online veröffentlicht auf dem
Publikationsserver der Universität Potsdam:
URN urn:nbn:de:kobv:517-opus4-80982
http://nbn-resolving.de/urn:nbn:de:kobv:517-opus4-80982

Zusammenfassung

Die Honigbiene *Apis mellifera* zeigt innerhalb einer Kolonie eine an das Alter gekoppelte Arbeitsteilung. Junge Honigbienen versorgen die Brut (Ammenbienen), während ältere Honigbienen (Sammlerinnen) außerhalb des Stocks Pollen und Nektar eintragen. Die biogenen Amine Octopamin und Tyramin sind an der Steuerung der Arbeitsteilung maßgeblich beteiligt. Sie interagieren mit Zielzellen über die Bindung an G-Protein-gekoppelte Rezeptoren. *A. mellifera* besitzt fünf charakterisierte Octopaminrezeptoren (AmOctαR1, AmOctβR1-4), einen charakterisierten Tyraminrezeptor (AmTyr1) sowie einen weiteren putativen Tyraminrezeptor.

In der vorliegenden Arbeit wurde dieser putative Aminrezeptor als zweiter Tyraminrezeptor (AmTyr2) identifiziert, lokalisiert und pharmakologisch charakterisiert.

Die von der cDNA abgeleitete Aminosäuresequenz weist strukturelle Eigenschaften und konservierte Motive von G-Protein-gekoppelten Rezeptoren auf. Phylogenetisch ordnet sich der AmTyr2-Rezeptor bei den Tyramin-2-Rezeptoren anderer Insekten ein. Die funktionelle und pharmakologische Charakterisierung des putativen Tyraminrezeptors erfolgte in modifizierten HEK293 Zellen, die mit der Rezeptor-cDNA transfiziert wurden. Die Applikation von Tyramin aktiviert Adenylylcyclasen in diesen Zellen und resultiert in einem Anstieg des intrazellulären cAMP Gehalts. Der AmTyr2-Rezeptor kann durch Tyramin in nanomolaren Konzentrationen halbmaximal aktiviert werden. Während es sich bei Octopamin um einen wirkungsvollen Agonisten des Rezeptors handelt, sind Mianserin und Yohimbin effektive Antagonisten. Für die Lokalisierung des Rezeptorproteins wurde ein polyklonaler Antikörper generiert. Eine AmTyr2-ähnliche Immunreaktivität zeigt sich im Gehirn in den optischen Loben, den Antennalloben, dem Zentralkomplex und in den Kenyon Zellen der Pilzkörper.

Des Weiteren wurde die Rolle der Octopamin- und Tyraminrezeptoren bei der Steuerung der altersabhängigen Arbeitsteilung analysiert.

Die Genexpression des AmOctαR1 in verschiedenen Gehirnteilen korreliert unabhängig vom Alter mit der sozialen Rolle, während sich die Genexpression von AmOctβR3/4 und den Tyraminrezeptoren AmTyr1 und AmTyr2 maximal mit dem Alter aber nicht der sozialen Rolle ändert. Sammlerinnen weisen einen höheren Octopamingehalt im Gesamtgehirn auf als Ammenbienen; bei Tyramin zeigen sich keine Unterschiede. Während Tyramin offensichtlich keine direkte Rolle spielt, werden durch Octopamin gesteuerte Prozesse der altersabhängigen Arbeitsteilung bei der Honigbiene vermutlich über den AmOctαR1 vermittelt.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen die wichtige Rolle von biogenen Aminen, insbesondere Octopamin bei der sozialen Organisation von Insektenstaaten.

Abstract

The honey bee *Apis mellifera* exhibits an age-dependent division of labour. Young bees take care of the brood (nurse bees), while older honey bees (foragers) leave the hive to provide the colony with pollen and nectar. The biogenic amines octopamine and tyramine are significantly involved in regulating the division of labour. They interact with target cells via binding to G protein-coupled receptors. *A. mellifera* has five characterised octopamine receptors (AmOctαR1, AmOctβR1-4), one characterised tyramine receptor (AmTyr1) and an additional putative tyramine receptor.

In the present study, the putative amine receptor was identified as a second tyramine receptor (AmTyr2), was localized and characterised pharmacologically.

The deduced amino acid sequence shows structural properties and conserved motifs of G protein-coupled receptors. Phylogenetically the AmTyr2 receptor clusters with tyramine 2 receptors from other insect species. Functional and pharmacological characterisation of the putative tyramine receptor was carried out using modified HEK293 cells transfected with the receptor cDNA. Application of tyramine activates adenylyl cyclases in these cells, which leads to an elevated intracellular cAMP level. Half maximal activation can be achieved by applying tyramine with concentrations in the nanomolar range. While octopamine is an effective agonist of the receptor, mianserin and yohimbine are the most effective antagonists. A polyclonal antibody was generated for the localisation of the receptor protein. AmTyr2-like immunoreactivity can be observed in the optic lobes, the Kenyon cells of the mushroom bodies, the antennal lobes and the central complex of the brain.

Furthermore, the role of the octopamine and tyramine receptors in regulating the age-dependent division of labour was analysed.

The gene expression of the AmOctαR1 in different brain neuropiles correlates with the social role of the honey bee, while the gene expression of AmOctβR3/4, AmTyr1 and AmTyr2 mostly changes with age but not social role. Additionally, foragers have higher octopamine brain titres than nurse bees. No differences can be observed for the titre of tyramine. Octopamine-regulated processes in age-dependent division of labour are probably mediated via the AmOctαR1. Tyramine has obviously no direct impact on the age-dependent division of labour.

The present study shows the important role of biogenic amines, particularly octopamine in the social organisation of insect societies.

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis ..... **iv**

Abbildungsverzeichnis ..... **vii**

Tabellenverzeichnis ..... **viii**

1 Einleitung **1**

1.1 Altersabhängige Arbeitsteilung 1

1.2 Die biogenen Amine Octopamin und Tyramin 3

1.3 Octopamin- und Tyraminrezeptoren 5

1.4 Zielstellung der Arbeit 7

2 Material und Methoden **9**

2.1 Chemikalien 9

2.2 Versuchstiere 9

2.3 Gewebepräparation 10

2.4 Molekularbiologische Methoden 11

2.4.1 RNA-Extraktion 11

2.4.2 RNA-/DNA-Konzentrationsbestimmung 12

2.4.3 Komplementäre DNA-Synthese 12

2.4.4 Polymerase-Kettenreaktion 14

2.4.5 Quantitative Echtzeit-PCR 15

2.4.6 Agarose-Gelelektrophorese 16

2.4.7 DNA-Fragment Reinigung 17

2.4.8 DNA-Konzentrierung 17

2.4.9 DNA-Restriktionsverdau 17

2.4.10 Ligation 18

2.4.11 Transformation von *Escherichia coli* 18

2.4.12 Präparation von Plasmid-DNA 19

2.5 Biochemische Methoden 20

2.5.1 Bestimmung der Proteinkonzentration 20

2.5.2 Isolierung von Membran- und cytosolischen Proteinen 20

2.5.3 Deglykosylierung von Membranproteinen 21

2.5.4 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese 21

2.5.5 Coomassie-Färbung 22

2.5.6 Western Blot ... 22
2.5.7 Immundetektion ... 23
2.5.8 Expression und Reinigung von Maltose-Bindeprotein-Fusionsproteinen ... 24
2.5.9 Expression und Reinigung von His-Tag-Fusionsproteinen ... 25
2.5.10 Generierung und Aufreinigung polyklonaler Antikörper ... 26
2.5.11 Immunzytochemische Analysen an fixierten Zellen ... 27
2.5.12 Immunhistochemische Analysen an fixiertem Gewebe ... 28
2.5.13 Mikroskopie und Bildbearbeitung ... 28
2.6 Heterologe Expression und pharmakologische Charakterisierung des AmTyr2-Rezeptors in flpTM-Zellen ... 29
2.6.1 Expressionsvektoren ... 29
2.6.2 Herstellung einer stabilen flpTM-AmTyr2 Zelllinie ... 29
2.6.3 Calciumfluorometrie ... 30
2.7 Hochleistungsflüssigkeitschromatographie ... 31
2.8 Auswertung der Daten und Statistik ... 32

3 Ergebnisse ... 33
3.1 Charakterisierung des Tyramin-2-Rezeptors der Honigbiene ... 33
3.1.1 Isolierung und Charakterisierung der Am*tyr2*-Rezeptor-cDNA ... 33
3.1.2 Aminosäuresequenz und Proteinstruktur ... 34
3.1.3 Phylogenetische Analyse des AmTyr2-Rezeptors ... 37
3.1.4 Immunologischer Nachweis des AmTyr2-Rezeptorproteins ... 38
3.1.5 Funktionelle und pharmakologische Charakterisierung des AmTyr2-Rezeptors ... 44
3.2 Arbeitsteilung, biogene Amine und deren Rezeptoren ... 49
3.2.1 Alters- und rollenabhängige Expression der Referenzgene ... 49
3.2.2 Alters- und rollenabhängige Expression von Octopamin- und Tyraminrezeptoren in Ammenbienen und Sammlerinnen ... 50
3.2.3 Octopamin- und Tyramingehalt in den Gehirnen von Ammenbienen und Sammlerinnen ... 56

4 Diskussion ... 57
4.1 Charakterisierung des Tyramin-2-Rezeptors bei *A. mellifera* ... 58
4.1.1 Molekulare und funktionelle Eigenschaften des AmTyr2-Rezeptors ... 58
4.1.2 Posttranslationale Modifikationen des AmTyr2-Rezeptors ... 60
4.1.3 Pharmakologie der Tyraminrezeptoren von *A. mellifera* ... 61
4.1.4 Einordnung des AmTyr2-Rezeptors in das bestehende System der Tyraminrezeptoren ... 64
4.1.5 Lokalisierung und potentielle Funktionen des AmTyr2-Rezeptors ... 65

4.2 Biogene Amine und deren Rezeptoren bei der Arbeitsteilung von *A. mellifera* 71
4.2.1 Octopaminrezeptoren 72
4.2.2 Tyraminrezeptoren 77
4.3 Tyramin und Octopamin: antagonistische Neuromodulatoren? 79
4.4 Ausblick 80

5 Literaturverzeichnis 83

Abkürzungsverzeichnis 100

Anhang 101
Nukleotidsequenz des AmTyr2-Rezeptors 101
Sequenzen der verwendeten Primer und Hydrolysesonden 101
Bezugsquellen kommerziell erhältlicher Antikörper 102
Lebenslauf 103
Publikationen 104
Tagungsbeiträge 104
Ich danke… 105
Eidesstattliche Erklärung 106

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1 Biosynthese von Octopamin und Tyramin. ... 3
Abb. 2 Aufbau G-Protein gekoppelter Rezeptoren der Rhodopsin Unterfamilie ... 5
Abb. 3 Strukturelle Eigenschaften der abgeleiteten AmTyr2-Rezeptor Aminosäuresequenz. ... 34
Abb. 4 Alignment durch automatische Alinierung dem ClustalW-Algorithmus und Vergleich der Aminosäuren mit der Ähnlichkeitsmatrix PAM-250. ... 36
Abb. 5 Phylogramm charakterisierter Tyraminrezeptoren verschiedener Organismen. 37
Abb. 6 Funktionalität des Antikörpers gegen das AmTyr2-Rezeptorprotein im Western Blot. ... 39
Abb. 7 Western Blot-Analyse zur Gewebeverteilung des AmTyr2-Rezeptorproteins in Honigbienen-Arbeiterinnen. ... 39
Abb. 8 AmTyr2-ähnliche Markierung im Gehirn der Honigbiene ... 40
Abb. 9 AmTyr2-ähnliche Immunreaktivität im optischen Lobus und dem Pilzkörper von *A. mellifera*. ... 41
Abb. 10 AmTyr2-ähnliche Immunreaktivität im Zentralkomplex und dem Antennallobus von *A. mellifera*. ... 42
Abb.11 Kontrollexperimente zur Feststellung der Spezifität des anti-AmTyr2-Antikörpers (beispielhaft dargestellt in den Pilzkörpern) ... 43
Abb. 12 Nachweis des AmTyr2-Rezeptorproteins in konstitutiv transfizierten Zellen ... 44
Abb. 13 Einfluss verschiedener biogener Amine auf die intrazelluläre cAMP-Konzentration ... 45
Abb. 14 Dosis-Wirkungskurven für Tyramin an flpTM, flpTM-AmTyr2 und flpTM-AmTyr1, sowie für Octopamin an flpTM-AmTyr2 und flpTM-AmTyr1. ... 46
Abb. 15 Dosis-Wirkungskurven der Antagonisten. ... 48
Abb. 16 Expression der Referenzgen-mRNA im Gesamtgehirn von Arbeiterinnen. ... 50
Abb. 17 Relative mRNA Expression des Am*octaR1* Gens in einzelnen Gehirnteilen ... 52
Abb. 18 Relative mRNA Expression des Am*octβR3/4* Gens in einzelnen Gehirnteilen. ... 53
Abb. 19 Relative mRNA Expression des Am*tyr1*-Gens in einzelnen Gehirnteilen ... 54
Abb. 20 Relative mRNA Expression des Am*tyr2*-Gens in einzelnen Gehirnteilen ... 55
Abb. 21 Octopamin- und Tyramingehalt in den Gehirnen von Ammenbienen und Sammlerinnen. ... 56

Tabellenverzeichnis

Tab. 1 Genomische Organisation des Amtyr2-Rezeptorgens. 33

Tab. 2 Werte der halbmaximalen Stimulierung (EC_{50} [M] und log EC_{50}) der Rezeptoraktivität für AmTyr2 und AmTyr1. 47

Tab. 3 Werte der halbmaximalen Inhibierung (IC50 [M] und log IC50) für Antagonisten an Tyramin- bzw. Octopamin aktiviertem AmTyr2-Rezeptor und an Tyramin aktiviertem AmTyr1-Rezeptor. 48

1 Einleitung

Die Honigbiene (*Apis mellifera*, LINNEAEUS 1758) ist aus der Kulturlandschaft des Menschen nicht mehr wegzudenken. Schon sehr früh wurden der Honig und das Wachs der Bienen genutzt. Mit dem Aufkommen der systematischen Bienenhaltung zeigte sich auch der erhebliche Beitrag dieses Insekts bei der Bestäubung kultivierter und wild wachsender Nutzpflanzen. Abgesehen von der wirtschaftlichen Bedeutung, welche die Honigbiene zweifelsohne besitzt, ist sie einer der bedeutendsten Modellorganismen für die Erforschung von Eusozialität und Verhalten (PENNISI 2006, ZAYED & ROBINSON 2012). Sie zählt zu der Ordnung der Hautflügler (Hymenoptera), in der staatenbildende Insekten am häufigsten zu finden sind.
Vor allem die Existenz als Modellorganismus beeinflusste in hohem Maße die Entscheidung, das Genom von *A. mellifera* vollständig zu sequenzieren. Die Veröffentlichung erfolgte 2006 (THE HONEY BEE GENOME SEQUENCING CONSORTIUM, 2006). Das Vorliegen der genetischen Information von *A. mellifera* stellt einen deutlichen Vorteil für die experimentelle Biologie dar. Das erleichtert die Klonierung von kodierender DNA und somit auch die detaillierte Charakterisierung der entsprechenden Proteine erheblich.

1.1 Altersabhängige Arbeitsteilung

Ein Charakteristikum der Eusozialität ist die Arbeitsteilung (CRESPI & YANEGA 1995). In einem Honigbienenstaat ist nicht nur die reproduktive Arbeitsteilung zwischen der Königin und den Arbeiterinnen zu beobachten. Die Arbeiterinnen, welche sich morphologisch nicht voneinander unterscheiden, zeigen eine ausgeprägte Teilung der Aufgaben. Die Arbeiterinnen im Stock reinigen die Wabenzellen, kümmern sich um die Königin, betreiben Brutpflege (Ammenbienen), bauen Waben und schützen die Kolonie am Stockeingang vor Feinden und räubernden Artgenossen. Außerhalb des Stocks versorgen Sammlerinnen die Kolonie mit Nährstoffen (WINSTON 1987). Unter normalen Bedingungen ist die Abfolge dieser Arbeiten altersabhängig: junge Arbeiterinnen übernehmen Aufgaben im Zentrum des Stocks, wie die Brutpflege, während alte Bienen außerhalb des Stocks Pollen und Nektar für die Protein- und Kohlenhydratzufuhr sammeln (SEELEY 1982, SEELEY 1995, WINSTON 1987). Beim Übergang von den Aufgaben im Stock hin zum Sammeln kommt es zu Veränderungen der Drüsenentwicklung und der Physiologie. Während Ammenbienen gut entwickelte Futtersaft- und Mandibeldrüsen für die Fütterung der Brut besitzen, zei-

gen Sammlerinnen reduzierte Drüsen und höhere Sauerstoffverbrauchsraten (WINSTON 1987).

Diese Form der Aufgabenteilung ist keineswegs starr. Die altersabhängige Arbeitsteilung in einem Honigbienenstaat ist plastisch und kann den Bedürfnissen der Kolonie angepasst werden (ROBINSON 1992). Dies wird meist durch die Populationsgröße, die natürliche Altersstruktur und das Nahrungsangebot beeinflusst (ROBINSON ET AL. 1989). Die Entwicklung kann beschleunigt, verzögert oder umgekehrt werden (HUANG & ROBINSON 1996). So können junge Ammenbienen vorzeitig mit dem Sammeln beginnen, auch wenn sie erst wenige Tage alt sind und keine alten Sammlerinnen vorhanden sind (HUANG & ROBINSON 1996, ROBINSON ET AL. 1989). Genauso können ca. drei Wochen alte Sammlerinnen Brutpflegeverhalten zeigen und zu Ammenbienen revertieren, wobei sie wieder funktionsfähige Futtersaftdrüsen entwickeln (HUANG & ROBINSON 1996, BLOCH & ROBINSON 2001). Durch experimentelle Manipulation einer Bienenkolonie, wie das Entfernen von Ammenbienen oder das Wegfangen der Sammlerinnen, können diese Veränderungen künstlich herbeigeführt werden (ROBINSON 1992).

Wie wird diese Form der Arbeitsteilung gesteuert? Wodurch wissen einzelne Arbeiterinnen in einer Bienenkolonie mit bis zu 60 000 Individuen, welche Aufgabe durchgeführt werden muss und für welche dieser Tätigkeiten sie ihrem Alter entsprechend geeignet ist?

Eine bedeutende Theorie für die Erklärung der Arbeitsteilung ist das Reaktionsschwellen Modell (*response threshold model*). Es nimmt an, dass Arbeiterinnen eine interne Reizschwelle für aufgabenspezifische Stimuli besitzen (BESHERS & FEWELL 2001). Begegnet einer Arbeiterin ein spezifischer Reiz und überschreitet dieser ihre interne Reizschwelle, so fängt sie an, die mit diesem Reiz verbundene Aufgabe zu verrichten. Wichtige Impulse, z.B. für das Sammelverhalten bei Honigbienen, stellen gustatorische und olfaktorische Reize, wie Zucker und das Brutpheromon dar (PANKIW ET AL. 1998, SCHEINER ET AL. 2004). Abweichungen und Veränderungen in den internen Reizschwellen der einzelnen Arbeiterin bringen dadurch die Arbeitsteilung hervor (BESHERS & FEWELL 2001, ROBINSON 1987). Tatsächlich wurden Unterschiede in der gustatorischen Reizschwelle zwischen Ammenbienen und Sammlerinnen nachgewiesen. So reagieren Sammlerinnen empfindlicher auf Zuckerwasser als Ammenbienen (THAMM & SCHEINER 2014). Außerdem sind Bienen mit einer hohen gustatorischen Empfindlichkeit auch empfindlicher gegenüber Reizen anderer Sinnesmodalitäten, wie olfaktorischen und visuellen Stimuli (ERBER ET AL. 2006, SCHEINER ET AL. 2004). Die Reizschwellen der Arbeiterinnen sind dabei nicht starr festgelegt, sondern variabel. So haben SCHEINER ET AL. (2002) gezeigt, dass die Empfindlichkeit

gegenüber Zucker durch biogene Amine, wie Octopamin und Tyramin, gesteigert werden kann. Ebenso erhöht die Octopamingabe die Empfindlichkeit gegenüber olfaktorischen Reizen (BARRON ET AL. 2002, MERCER & MENZEL 1982, PANKIW & PAGE 2003).

1.2 Die biogenen Amine Octopamin und Tyramin

Octopamin ist in vielerlei Hinsicht in die Regulation der Arbeitsteilung bei Honigbienen involviert. Allgemein weisen Sammlerinnen einen höheren Octopamingehalt in den Gehirnen auf als Ammenbienen (WAGENER-HULME ET AL. 1999) und die Applikation von Octopamin bei Ammenbienen führt zu einem vorzeitigen Sammelverhalten und allgemein zu einer höheren Sammelaktivität (BARRON & ROBINSON 2005, SCHULZ & ROBINSON 2001). Octopamin wurde zum ersten Mal in den Speicheldrüsen von *Octopus vulgaris* entdeckt (ERSPAMER 1948, ERSPAMER & BORETTI 1951). Es ist ein Strukturanalogon von Norepinephrin und wird aus der essentiellen Aminosäure Tyrosin über die Zwischenstufe Tyramin synthetisiert (Abb. 1).

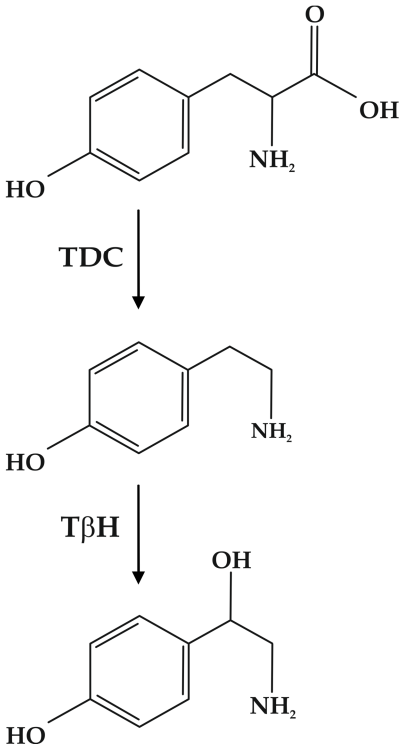


Abb. 1 Biosynthese von Octopamin und Tyramin. Die Aminosäure Tyrosin wird durch die TDC zu Tyramin decarboxyliert. Durch das Anfügen einer Hydroxygruppe durch die TβH wird aus Tyramin Octopamin. TDC = Tyrosindecarboxylase, TβH = Tyramin-β-Hydroxylase

Durch das Enzym Tyrosindecarboxylase wird aus Tyrosin Tyramin. Bei einem Fehlen der Tyrosindecarboxylase kann Tyramin über einen anderen Syntheseweg aus Dopamin hergestellt werden (ROEDER 2005). Tyramin selbst ist das Substrat für das Enzym Tyramin-β-Hydroxylase, welches für die Octopaminsynthese verantwortlich ist (ROEDER 2005).

Octopamin wirkt als Neurotransmitter, Neurohormon und Neuromodulator (ORCHARD 1982). Außer der genannten Bedeutung für die Arbeitsteilung der Honigbiene beeinflusst Octopamin eine Reihe von physiologischen Prozessen bei Insekten. In der Peripherie wirkt es stimulierend auf die Laufbein- und Flugmuskulatur, den Fettkörper und das Herz; Voraussetzungen für eine hohe Bewegungsrate in der Kampf- oder Fluchtreaktion (*fight or flight*) (MALAMUD ET AL. 1988, ORCHARD ET AL. 1982, PAPAEFTHIMIOU & THEOPHILIDIS 2011, ROEDER 2005). Passend hierzu wird auch das Aggressionsverhalten durch Octopamin moduliert (HOYER ET AL. 2008, RILLICH ET AL. 2010, STEVENSON ET AL. 2005, ZHOU ET AL. 2008). Weiterhin beeinflusst es verschiedene Sinnesmodalitäten. So führt die Octopaminapplikation zu einer gesteigerten Reaktion auf visuelle, olfaktorische und gustatorische Stimuli (BARRON ET AL. 2002, ERBER & KLOPPENBURG 1995, KLOPPENBURG & ERBER 1995, LINN & ROELOFS 1986, SCHEINER ET AL. 2002). Nicht zuletzt hat Octopamin einen positiven Effekt auf das Lernen und das Gedächtnis (FAROOQUI ET AL. 2003, MERCER & MENZEL 1982).

Im Vergleich zum Octopamin sind die bisherigen Kenntnisse der tyraminergen Beteiligung an physiologischen Prozessen bei Insekten begrenzt. Das biogene Amin Tyramin wurde lange Zeit ausschließlich als Vorläufermolekül des Octopamins betrachtet, ohne eine Funktion als eigenständiger Neuromodulator. Inzwischen hat Tyramin durch die Entdeckung ausschließlich tyraminerger Neurone (NAGAYA ET AL. 2002) und eigener Rezeptoren (BAYLISS ET AL. 2013, BLENAU ET AL. 2000, CAZZAMALI ET AL. 2005, HUANG ET AL. 2009, OHTA ET AL. 2003) den Status einer echten neuroaktiven Substanz (DOWNER ET AL. 1993, LANGE 2009, ROEDER 2005). Die bisherigen Studien mit Tyramin zeigen, dass dieses Amin die gustatorische Empfindlichkeit bei Honigbienen verändert und eine funktionelle Rolle im olfaktorischen System von *Drosophila* spielt (KUTSUKAKE ET AL. 2000, SCHEINER ET AL. 2002). Weiterhin ist es an der Steuerung der Lokomotorik von Fruchtfliegen und der Auslösung des Hungerverhaltens bei Schmeißfliegen beteiligt (NISIMURA ET AL. 2005, SARASWATI ET AL. 2004). Es scheint auch einen Einfluss auf den Phasenwechsel bei Wüstenheuschrecken zu haben (ROGERS ET AL. 2004).

Da verhaltensbiologische und physiologische Prozesse durch Octopamin und Tyramin beeinflusst werden, ist eine detaillierte Untersuchung der beteiligten Rezeptoren für ein Verständnis des Zusammenhangs zwischen den biogenen Aminen und der Arbeitsteilung in einer Honigbienenkolonie unabdingbar.

1.3 Octopamin- und Tyraminrezeptoren

Octopamin und Tyramin interagieren mit der Zelle über membranständige G-Protein gekoppelte Rezeptoren (*G-protein coupled receptor*, GPCR) der Unterfamilie der Rhodopsin-ähnlichen Rezeptoren (BLENAU & BAUMANN 2001, 2003). Diese Rezeptoren sind Transmembranproteine und verfügen über sieben hydrophobe α-helikale Transmembrandomänen, einen extrazellulären Amino-Terminus (*N*-Terminus) und einen intrazellulären Carboxy-Terminus (*C*-Terminus) (BLENAU & BAUMANN 2001, PROBST ET AL. 1992, STRADER ET AL. 1995) (Abb. 2).

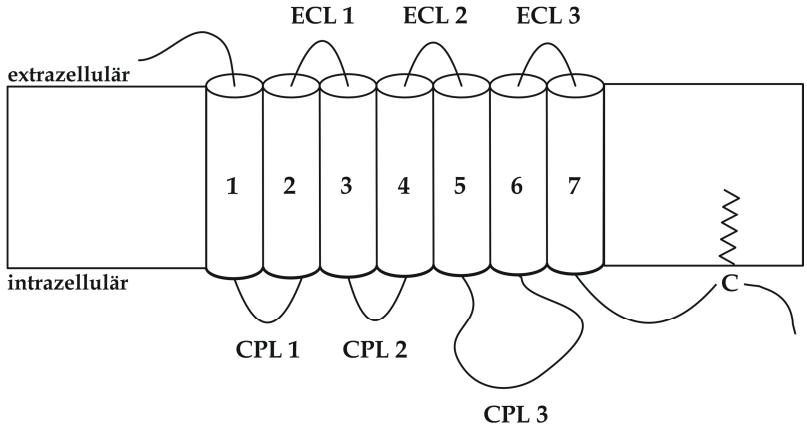


Abb. 2 Aufbau G-Protein gekoppelter Rezeptoren der Rhodopsin Unterfamilie (nach BLENAU & BAUMANN 2001). Sieben Transmembrandomänen durchspannen die Plasmamembran und sind alternierend durch cytoplasmatische und extrazelluläre Schleifen verbunden. Die CPL3 ist bei dieser Rezeptorfamilie deutlich länger als die anderen Schleifen. Die Verankerung eines palmitoylierten Cysteinrests in der Plasmamembran führt zur Ausbildung einer vierten cytoplasmatischen Schleife. C = Cysteinrest, CPL = cytoplasmatische Schleife (*cytoplasmatic loop*), ECL = extrazelluläre Schleife (*extracellular loop*)

G-Protein gekoppelte Rezeptoren wandeln extrazelluläre Signale in zelluläre, physiologische Antworten um. Die Bindung eines spezifischen Liganden (z.B. ein biogenes Amin) führt zur Lageveränderung der Transmembrandomänen und somit zur Konformationsänderung des Rezeptors (GETHER 2000, GETHER & KOBILKA 1998). Dadurch kommt es zur Aktivierung heterotrimerer G-Proteine, bestehend aus je einer α-, einer β- und einer γ-Untereinheit. Aktivierte G-Proteine wiederum lösen eine Kaskade sekundä-

rer Botenstoffe im Zellinneren aus (GUDERMANN ET AL. 1997, VANDEN BROECK 2001). Die Kopplung an G_s-Proteine führt hierbei zur Aktivierung von Adenylylcyclasen, was zu einem Anstieg des cyclischen Adenosinmonophosphats im Zellinneren ($[cAMP]_i$) führt; die Kopplung an G_i-Proteine hingegen inhibiert Adenylylcyclasen (STRYER & BOURNE 1986). Bei der Honigbiene wurden eine cytosolische Adenylylcyclase und sechs membrangebundene Adenylylcyclasen identifiziert, wovon bisher drei pharmakologisch charakterisiert und im Bienengehirn lokalisiert werden konnten (BALFANZ ET AL. 2012, FUSS ET AL. 2010, WACHTEN ET AL. 2006). Ist der Rezeptor an $G_{q,o}$-Proteine gekoppelt, wird die Phospholipase C und hierdurch der Inositoltriphosphat-Signalweg aktiviert, was zu einer Ausschüttung von Calcium aus intrazellulären Speichern führt und in einem Anstieg des Calciums im Cytoplasma ($[Ca^{2+}]_i$) resultiert (BLENAU & BAUMANN 2001).

Die meisten GPCRs weisen konservierte Motive für posttranslationale Modifikationen auf. Dazu gehören Glykosylierungen, Palmitoylierungen oder Phosphorylierungen. Solche Modifikationen können bei der Rezeptorexpression und –stabilität sowie der intrazellulären Kopplung an Effektorproteine eine Rolle spielen (PROBST ET AL. 1992). Phosphorylierungen durch Proteinkinasen führen zur Desensibilisierung des Rezeptors (BOUVIER ET AL. 1988); neben der Steuerung der Transkription und der Translation ein schnell wirkender Mechanismus, um die Dauerstimulation von Neuronen zu verhindern (LEFKOWITZ 1998, PROBST ET AL. 1992).

Octopaminrezeptoren werden anhand der durch die Ligandenbindung ausgelösten *second messenger* Signalkaskaden in α- und β-Rezeptoren unterteilt (EVANS & MAQUEIRA 2005). Die Aktivierung von α-Rezeptoren führt gemeinhin zu einem Anstieg des $[Ca^{2+}]_i$, die Aktivierung von β-Rezeptoren zu einem Anstieg des $[cAMP]_i$ (EVANS & MAQUEIRA 2005). Die Aktivierung von Tyraminrezeptoren führt zu einem Absinken des $[cAMP]_i$ oder einem Anstieg des $[Ca^{2+}]_i$ (CAZZAMALI ET AL. 2005).

A. mellifera besitzt fünf Octopaminrezeptoren, die in einen α-Rezeptor (AmOctαR1) und vier β-Rezeptoren (AmOctβR1-4) aufgeteilt werden (BALFANZ ET AL. 2014, GROHMANN ET AL. 2003). AmOctβR3 und AmOctβR4 weisen dabei eine Besonderheit auf. In beiden Rezeptoren stimmen zwei kodierende DNA Bereiche, die Exons 3 und 4, vollkommen überein; es handelt sich vermutlich um Spleißvarianten ein- und desselben Gens (BALFANZ ET AL. 2014). Weiterhin konnte ein Tyraminrezeptor identifiziert und charakterisiert werden (BLENAU ET AL. 2000), sowie ein bislang nicht charakterisierter

Rezeptor, der aufgrund der Sequenzhomologie zu Tyraminrezeptoren bei *Drosophila melanogaster* als putativer zweiter Tyraminrezeptor gilt (HAUSER ET AL. 2006).
Die *second messenger* Calcium und cAMP haben die verschiedensten Funktionen in der Zelle. Der Botenstoff cAMP aktiviert die Proteinkinase A, ein Enzym das wiederum andere Proteine phosphoryliert und somit zur Änderung ihrer Eigenschaften führt. Zu den Substraten gehören unter anderem Ionenkanäle und Transkriptionsfaktoren (NEVES ET AL. 2002). Calcium kann an verschiedene Proteine binden, welche dadurch selbst aktiviert werden oder aber entsprechende Effektorproteine modulieren. Zu den calciumbindenden Proteinen gehören u. a. die Proteinkinase C, Calmodulin und Arrestin (CLAPHAM 1995). Die resultierenden Änderungen des Zellgleichgewichts beeinflussen Prozesse der Physiologie und des Verhaltens (NEVES ET AL. 2002).

1.4 Zielstellung der Arbeit

Biogene Amine spielen bei der Verhaltensmodulation der Honigbiene eine große Rolle. Als molekularem Partner kommt den entsprechenden Rezeptoren für die Signaltransduktion vom extrazellulären in den intrazellulären Bereich eine wichtige Aufgabe zu. Neben den Dopaminrezeptoren (BEGGS ET AL. 2005, BLENAU ET AL. 1998, MUSTARD ET AL. 2003), den Serotoninrezeptoren (SCHLENSTEDT ET AL. 2006, THAMM ET AL. 2010, THAMM ET AL. 2013) und einem Tyraminrezeptor (BLENAU ET AL. 2000) wurden inzwischen auch alle Octopaminrezeptoren der Honigbiene molekular und physiologisch charakterisiert (BALFANZ ET AL. 2014, GROHMANN ET AL. 2003). Der letzte fehlende putative Tyraminrezeptor wurde in der vorliegenden Arbeit strukturell und durch heterologe Expression in einem etablierten Zellsystem pharmakologisch analysiert. Die phylogenetische Einordnung in das bestehende System und die Lokalisierung im Bienengehirn durch einen spezifischen Antikörper runden die Charakterisierung des Rezeptors ab. Für das vertiefende Verständnis der Bedeutung des Tyramins bei Honigbienen war die Analyse des fehlenden Rezeptors unabdingbar. Damit werden die gezielte Manipulation und das Ausschalten aller Tyraminrezeptoren bei *A. mellifera* möglich. Die entsprechenden Auswirkungen auf die Physiologie und das Verhalten können die Kenntnisse über die Wirkung von Tyramin bei Insekten erweitern.
Im Anschluss wurde die potenzielle Beteiligung der Octopamin- und Tyraminrezeptoren an der Regulation der Arbeitsteilung einer Honigbienenkolonie untersucht. Aufgrund des Einflusses von Octopamin und Tyramin auf die sensorische Empfindlichkeit und das

Verhalten von *A. mellifera* handelte es sich bei den entsprechenden Rezeptoren um aussichtsreiche Kandidaten auf der Suche nach Regulationsmechanismen der Arbeitsteilung. Mit der Analyse der Genexpression der Octopamin- und Tyraminrezeptoren kann nicht nur eine Aussage getroffen werden, ob diese in einem speziellen Gehirnareal exprimiert werden, sondern auch, wie stark Expressionsunterschiede zwischen verschiedenen Altersgruppen oder sozialen Rollen sind.

Da der Aufgabenwechsel zwischen den Arbeiterinnen innerhalb des Stocks subtiler ist als der Übergang zur Sammlerin, konzentrierten sich die Experimente auf einen Vergleich zwischen Stockbienen, welche die Brut versorgen, und Sammlerinnen. Die Experimente erfolgten vorwiegend mit einzelnen Gehirnteilen, die am wahrscheinlichsten in die Regulation der Arbeitsteilung involviert sind: das Subösophagealganglion, die Antennalloben, die optischen Loben und die Pilzkörper. Die Genexpressionsstudien erfolgten nicht nur mit Bienen aus Kolonien mit normaler Altersstruktur, sondern auch mit Bienen aus *single cohort* Kolonien und Bienen aus Reversionskolonien, um das Alter von der sozialen Rolle loszulösen. Bei den Arbeiterinnen einer *single cohort* Kolonie handelt es sich ausschließlich um junge Bienen gleichen Alters, was zur Entwicklung vorzeitiger Sammlerinnen führt. Im Gegensatz dazu besteht eine Reversionskolonie aus älteren Sammlerinnen, was zu einer Reversion einiger Sammlerinnen zu Ammenbienen führt. Auf diese Weise können Unterschiede in der Rezeptorexpression zwischen Ammenbienen und Sammlerinnen entweder auf das unterschiedliche Alter oder die unterschiedliche soziale Rolle zurückgeführt werden.

2 Material und Methoden

2.1 Chemikalien

Die im Folgenden angegebenen und verwendeten Chemikalien wurden, wenn im Text nicht anders vermerkt, von den Firmen Merck (Darmstadt), Roth (Karlsruhe), Serva (Heidelberg) und Sigma Aldrich (München) bezogen. Die Hersteller und Bezugsquellen kommerziell erhältlicher Kits sind direkt an entsprechender Stelle im Text angegeben. Oligonukleotide wurden von der TIB MOLBIOL Syntheselabor GmbH (Berlin) synthetisiert. Die Sequenzierung von Plasmid-DNA erfolgte durch die GATC Biotech AG (Konstanz). Medien und Verbrauchsmaterialien wurden vor Benutzung 20 min bei 121 °C in einem Varioklav® 500 (Thermo Scientific, Bonn) sterilisiert. Wenn nicht anders vermerkt wurden die Lösungen mit sterilem, doppelt destilliertem Wasser (ddH_2O) angesetzt. Zur Verdünnung bzw. zum Auffüllen von Proben wurde Ribonuklease (RNase)-freies DEPC-Wasser verwendet. Hierfür wurde ddH_2O 0,1% Diethylpyrocarbonat (DEPC) zugesetzt, über Nacht auf einem Magnetrührer vermischt und anschließend autoklaviert.

2.2 Versuchstiere

Als Versuchstier wurde die europäische Honigbiene *A. mellifera* (Hymenoptera, Apidae) verwendet. Die Haltung erfolgte in Kolonien mit typischer Altersstruktur in handelsüblichen Beuten auf dem Gelände der Universität Potsdam, Campus Golm. Einige Experimente erforderten eine genaue Feststellung des Alters der Versuchstiere. Hierfür wurde vorab eine Wabe mit verdeckelter Brut kurz vor dem Schlupf aus der Kolonie entnommen und in einen Inkubator bei 34 °C und 60 % Luftfeuchtigkeit platziert. Die frischgeschlüpften Bienen wurden mit einem farbigen Punkt auf dem Thorax markiert. Hierfür wurden Farbpigmente (Modulor, Berlin) in Schelllack gelöst und mit einem Pinsel aufgetragen. Anschließend erfolgte das Zurücksetzen der Tiere in die Ursprungskolonie. Stockbienen wurden nach Öffnen der Beute direkt von den Waben in kleine Gläschen abgesammelt. Arbeiterinnen, welche den Kopf in offene Brutzellen mit Rundmaden steckten und ausgeprägte Futtersaftdrüsen besaßen wurden als Ammenbienen identifiziert (WINSTON 1987). Sammlerinnen wurden am Stockeingang abgefangen. Pollensammlerinnen wurden anhand der beidseitigen großen Pollenhöschen erkannt. Zurückkehrende Bienen mit einem verlängerten, breiten Abdomen ohne Pollenhöschen wurden als Nektarsammlerinnen betrachtet. Für die Evaluierung der Referenzgene wurden neben frischgeschlüpften Bie-

nen, Pollen- und Nektarsammlerinnen Bienen im Alter von sechs und zwölf Tagen aus dem Stock gesammelt.

Zur weiteren Untersuchung der Alters- oder Rollenabhängigkeit der Expression der biogenen Aminrezeptoren wurde die soziale Rolle der Biene von ihrem physiologischen Alter entkoppelt. Dies erfolgte mit *single cohort*- und Reversionskolonien. Für den Aufbau einer *single cohort*-Kolonie wurden 2 000 frischgeschlüpfte Bienen, wie oben beschrieben, farblich markiert. Gemeinsam mit einer begatteten Königin sowie einer Pollenwabe, einer Honigwabe und einer Wabe mit junger Brut wurden die frischgeschlüpften Bienen in eine kleine Beute gegeben und ca. 24 h bei vollkommener Dunkelheit und verschlossenem Flugloch gelagert. Am darauffolgenden Tag wurde das Flugloch der *single cohort*-Kolonie auf dem Außengelände geöffnet. Spätestens zehn Tage nach dem Aussetzen der Kolonie konnte Flug- und Sammelaktivität beobachtet werden. Zu diesem Zeitpunkt wurden Ammenbienen und frühzeitige Sammlerinnen, wie oben beschrieben, identifiziert und gesammelt. Für den Aufbau einer Reversionskolonie diente eine Mini-Beute mit einem Volk von ca. 5 000 Bienen normaler Altersstruktur als Ausgangskolonie. An einem Nachmittag bei hoher Flugaktivität wurde diese Kolonie durch eine leere Beute ausschließlich mit einer begatteten Königin, sowie einer Pollenwabe, einer Honigwabe und einer Wabe mit junger Brut ersetzt. Die Ausgangskolonie mit den Stockbienen wurde entfernt. Die zurückkehrenden Sammlerinnen wurden durch den alten Standplatz, die Königin und die Brut angelockt und bildeten die neue Reversionskolonie. Sieben Tage nach Etablierung dieser Kolonie konnte Brutpflegeverhalten beobachtet werden, welches durch zu Ammenbienen revertierte Sammlerinnen zu erklären ist. Sammlerinnen und revertierte Ammenbienen wurden wie oben beschrieben identifiziert und gesammelt.

2.3 Gewebepräparation

Nach dem Entfernen der Antennen wurde zunächst die Kopfkapsel oberhalb der Antennenbasis und entlang der Komplexaugen geöffnet. Die aufliegenden Futtersaftdrüsen, Speicheldrüsen und Tracheen wurden entfernt. Das freigelegte Gehirn wurde nach Durchtrennung des Ösophagus in eine kleine Petrischale mit eiskaltem Ringer überführt. Hier wurde das Gehirn von der Retina und Tracheenresten befreit. Sofern für einzelne Experimente notwendig, wurden einzelne Gehirnteile (optische Loben, Subösophagealganglion, Antennalloben und Pilzkörper) separiert. Danach wurde das Gewebe sofort in

einem Reaktionsgefäß in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bis zur weiteren Verarbeitung bei -80 °C gelagert.

Ringer: 270 mM NaCl; 3,2 mM KCl; 10 mM $MgCl_2$; 1,2 mM $CaCl_2$;
10 mM 3-(N-Morpholino)Propansulfonsäure; pH 7,3

2.4 Molekularbiologische Methoden

2.4.1 RNA-Extraktion

Die RNA-Extraktion erfolgte mit drei verschiedenen Methoden. Für die Charakterisierung des AmTyr2-Rezeptors wurde die Gesamt-RNA mit dem TRIzol™ LS Reagent (Life Technologies GmbH, Darmstadt) und daraus die mRNA mit dem Micro-FastTrack™ 2.0 Kit (Life Technologies GmbH, Darmstadt) extrahiert. Die RNA-Extraktion für die quantitative Echtzeit-PCR (qPCR) erfolgte mit dem RNeasy-Kit (Qiagen, Hilden).

Gesamt-RNA-Extraktion mit TRIzol™LS Reagent

Für die Gesamt-RNA-Extraktion wurden 50 tiefgefrorene Bienengehirne mit 750 µl TRIzol™ versetzt und mit einem Glas-Teflon-Homogenisator zerkleinert. Die weitere Aufarbeitung erfolgte nach dem Protokoll des Herstellers. Am Ende wurde die extrahierte RNA in 50 µl DEPC-Wasser gelöst und nach Konzentrationsbestimmung sowie Zugabe von 1/10 Volumen 4 M LiCl und dem 2,5fachen Volumen absolutem Ethanol bei -80 °C bis zur weiteren Verwendung gelagert.

Messenger RNA-Extraktion mit dem Micro-FastTrack™ 2.0 Kit

Aus der Gesamt-RNA konnte die *messenger* RNA (mRNA) mit dem Micro-FastTrack™ 2.0 Kit durch Verwendung von Oligo(dT)-Zellulose isoliert werden. Zu Beginn wurde die gefällte Gesamt-RNA bei 13 000 × g und 4 °C für 15 min zentrifugiert und das Pellet mit 100 µl absolutem Ethanol gewaschen. Die Probe wurde wiederum bei 13 000 × g und 4 °C für 15 min zentrifugiert und die RNA luftgetrocknet. Das Resuspendieren der RNA erfolgte mit 10 µl Elutionspuffer. Die mRNA-Extraktion erfolgte gemäß dem Protokoll des Herstellers. Der eluierten mRNA wurden nach der Konzentrationsbestimmung 10 µl Glycogencarrier (2 mg/ml), 30 µl 2 M Natriumacetat und 600 µl absolutes Ethanol zugegeben und die Lösung bei -80 °C bis zur weiteren Verwendung gelagert.

Gesamt-RNA-Extraktion mit dem RNeasy Kit

Das tiefgefrorene Gehirngewebe wurde in dem Reaktionsgefäß mit einem Pistill manuell homogenisiert. Die RNA-Extraktion erfolgte gemäß den Angaben des Herstellers. Zusätzlich wurde ein *on-column* Desoxyribonuklease (DNase) Verdau mit je 30 Kunitz Units pro Reaktion (Qiagen, Hilden) durchgeführt. Anschließend wurde die RNA zur Aufkonzentrierung unter Zugabe von 3 M LiCl und absolutem Ethanol über Nacht bei -80 °C gefällt. Die Intaktheit der RNA wurde zum Test der Extraktionsmethode stichprobenartig auf einem 1 %igen Agarosegel (w/v) getestet.

2.4.2 RNA-/DNA-Konzentrationsbestimmung

Zur Quantifizierung wurde die RNA- bzw. DNA-Konzentration spektrophotometrisch bei 260 nm, dem Absorptionsmaximum von Nukleinsäuren, bestimmt (GeneQuant 1300, GE Healthcare, München). 40 µg/ml RNA bzw. 50 µg/ml doppelsträngige DNA entspricht einer $OD_{260\,nm}$ von 1. Die Messung der Proben erfolgte gegen eine Referenzlösung. Über das Verhältnis $OD_{260\,nm}$ zu $OD_{280\,nm}$ konnten Kontaminationen mit Proteinen ausgeschlossen werden.

2.4.3 Komplementäre DNA-Synthese

Die Synthese der komplementären DNA (*complementary DNA*, cDNA) erfolgte mit zwei verschiedenen Methoden. Für die Charakterisierung des AmTyr2-Rezeptors wurde die mRNA mit dem Accuscript™ High Fidelity 1st Strand cDNA Synthesis Kit (Agilent Technologies, Böblingen) in cDNA umgeschrieben. Die cDNA-Synthese für die qPCR erfolgte mit dem SuperScript™III First-Strand Synthesis SuperMix für qRT-PCR Kit (Life Technologies GmbH, Darmstadt).

cDNA-Synthese mit dem Accuscript™ High Fidelity 1st Strand cDNA Synthesis Kit

Die extrahierte mRNA (siehe 2.4.1) wurde bei 16 000 × g und 4 °C für 15 min zentrifugiert, das Ethanol vollständig entfernt und das Pellet luftgetrocknet. Das Pellet wurde mit DEPC-Wasser auf 0,5 µg/µl gelöst. Die cDNA-Synthese wurde zum einen mit Oligo$(dT)_{18}$-Primern und zum anderen mit *Random 9-mers*-Primern durchgeführt.

Folgende Reagenzien wurden jeweils zusammengegeben und vermischt:

	Oligo(dT)$_{18}$	***Random 9-mers***
10× AccuScript RT Puffer	2 µl	2 µl
Oligo(dT)$_{18}$-Primer (0,5 µg/µl)	1 µl	-
Random 9-mers-Primer (0,1 µg/µl)	-	1 µl
dNTP Mix (25 mM je dNTP)	0,8 µl	0,8 µl
mRNA (1 µg)	2 µl	2 µl
RNasefreies Wasser	11,2 µl	11,2 µl

Die Ansätze wurden 5 min bei 65 °C inkubiert und für die Primerhybridisierung 5 min bei 20 °C inkubiert. Anschließend erfolgte bei beiden Ansätzen die Zugabe von 2 µl 100 mM DTT, 0,5 µl AccuScript *Reverse transcriptase* (reverse Transkriptase, RT) und 0,5 µl *RNase Block ribonuclease inhibitor* (40 U/µl). Die cDNA-Synthese wurde bei folgenden Temperaturprogrammen durchgeführt:

Oligo(dT)$_{18}$	***Random 9-mers***
42 °C für 60 min	25 °C für 10 min
70 °C für 10 min	42 °C für 50 min
	70 °C für 10 min

Die Ansätze wurden auf Eis gekühlt, damit die Primer sich an die cDNA anlagern konnten. Die folgenden Schritte erfolgten parallel für den Oligo(dT)$_{18}$- und den *Random 9-mers*-Ansatz. Die RNA-Matrize wurde durch die Zugabe von je 1 µl RNase H und anschließender Inkubation bei 37 °C für 20 min abgebaut. Die Reinigung der cDNA erfolgte durch die Zugabe von 1 Volumen Phenol/Chloroform. Die Ansätze wurden bei 13 000 Umdrehungen pro Minute (UpM) für 1 min bei Raumtemperatur zentrifugiert und der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Nach der erneuten Zugabe von 1 Volumen Phenol/Chloroform und dem Zentrifugieren bei 13 000 UpM für 1 min wurde der Überstand mit 0,1 Volumen 4 M LiCl und 2,5 Volumen absolutem Ethanol versetzt und die cDNA über Nacht bei -20° C gefällt. Am darauffolgenden Tag wurden die Ansätze bei 13 000 UpM für 5 min zentrifugiert und das Pellet in 20 µl DEPC-Wasser gelöst. Die cDNA wurde bei -20 °C bis zur weiteren Verwendung gelagert.

cDNA-Synthese mit dem SuperScript™III First-Strand Synthesis SuperMix für qRT-PCR Kit

Die cDNA-Synthese für die qPCR Experimente erfolgte im Duplikat (technisches Replikat) entsprechend den Angaben des Herstellers. Hierfür wurden, je nach Experiment 500 ng bzw. 100 ng RNA, 10 µl 2x Reaktionsmix mit Oligo(dT)$_{20}$ und Random Hexameren, sowie 2 µl Enzymmix in einem Gesamtvolumen von 20 µl vorsichtig gemischt und bei folgendem Temperaturprogramm inkubiert: 25 °C für 10 min, 50 °C für 30 min, 85 °C für 5 min. Anschließend wurde die Template-RNA durch 2 Units RNase H für 20 min bei 37 °C abgebaut. Nach dem Reaktionsende wurden die Proben mit DEPC-Wasser auf ein Gesamtvolumen von 100 µl aufgefüllt (1:5 Verdünnung) und bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C gelagert.

2.4.4 Polymerase-Kettenreaktion

Die Polymerase-Kettenreaktion (*polymerase chain reaction*, PCR) dient der Vervielfältigung kurzer DNA-Stücke. Die Amplifikation eines definierten DNA-Abschnitts erfolgt über die Bindung zweier sequenzspezifischer Primer und der Verlängerung dieser durch eine DNA-Polymerase. Diese Methode wurde für die Herstellung der Standards in der qPCR sowie für die Herstellung verschiedener Plasmide verwendet. Hierfür wurden entweder die Taq DNA-Polymerase (Roboklon GmbH, Berlin) oder die Phusion® *High Fidelty* DNA Polymerase (New England Biolabs, Frankfurt am Main) in folgendem Reaktionsgemisch benutzt:

	Taq	**Phusion®**
cDNA bzw. Plasmid	0,5-2 µl	0,5 – 1 µl
Puffer	5 µl 10x Puffer	10 µl 5x Puffer
dNTP-Mix (20 mM)	0,5 µl	0,5 µl
forward Primer (20 µM)	0,5-1 µl	0,5 – 1 µl
reverse Primer (20 µM)	0,5-1 µl	0,5 – 1 µl
DNA-Polymerase	0,5-1 µl	0,5 µl
DEPC-Wasser	ad 50 µl	ad 50 µl

Die Sequenzen der verwendeten Primer sind im Anhang aufgelistet. Als Matrize diente entweder cDNA oder ein die Rezeptor-cDNA tragendes Plasmid. Die Reaktion wurde

unter den folgenden Temperaturbedingungen in einem T3 Thermocycler (Biometra GmbH, Göttingen) durchgeführt:

		Taq	**Phusion®**
Denaturierung		94 °C, 150 s	98 °C, 30 s
Denaturierung	35 Zyklen	94 °C, 40 s	98 °C, 10 s
Hybridisierung	35 Zyklen	65-66,5 °C, 40 s	59,5 - 65 °C, 30 s
Elongation	35 Zyklen	72 °C, 60-90 s	72 °C, 20-90 s
Finale Elongation		72 °C, 600 s	72 °C, 600 s

2.4.5 Quantitative Echtzeit-PCR

Die Quantifizierung der Expression bestimmter Gene wurde mit Hilfe der qPCR unter Verwendung der TaqMan Technologie analysiert. Hierbei wurden sequenzspezifische Hydrolyse-Sonden (TaqMan-Sonden) verwendet, welche am 5´-Ende einen Reporter-Fluoreszenzfarbstoff und am 3´-Ende einen BlackBerry Quencher (BBQ) besaßen. Diese Sonden binden spezifisch an das zu analysierende Gen. Ist die Sonde intakt, verhindert die Nähe des Quenchers zum Reporter-Fluoreszenzfarbstoff das Fluoreszenzsignal. Während der Extension des Amplifikats in der PCR-Reaktion werden die Sonden hydrolysiert und setzen den Fluoreszenzfarbstoff frei. Dieses Fluoreszenzsignal wird während jedes PCR-Zyklus detektiert und dessen Stärke ist proportional zur amplifizierten Menge des Rezeptor- bzw. Referenzgen-PCR-Produkts. Je höher die Menge an eingesetzter cDNA, desto früher erhält man einen signifikanten Anstieg des Fluoreszenzsignals. Dies ermöglicht wiederum Rückschlüsse auf die Ausgangsmenge der mRNA des analysierten Gens.
Die Sequenzen der verwendeten Primer und Hydrolyse-Sonden, sowie die Produktlängen für die verschiedenen Gene sind im Anhang gelistet. Um beide Spleißvarianten des AmOctβR3/4 Gens zu amplifizieren, wurden die entsprechenden Primer und die Hydrolyse-Sonde auf die in beiden Varianten vorhandenen Exons gelegt. Die Messung jeder Probe erfolgte als Triplikat (technisches Replikat). Hierfür wurden 0,25 µM eines jeden Primers, 0,1 µM Sonde, 12,5 µl 2x Rotor-Gene Multiplex PCR Master Mix (Qiagen, Hilden) und 5 µl der verdünnten cDNA in einem Gesamtvolumen von 25 µl vermischt. Die Reaktion erfolgte auf dem qPCR-System Rotor Gene Q (Qiagen, Hilden) unter Verwendung des folgenden Temperaturprogramms: 60 °C für 1 min, 95 °C für 5 min (Enzymaktivierung) und 50 Zyklen bei 95 °C für 20 s (Denaturierung) und 60 °C für 1 min (Primerhybridisierung und Elongation). Die Spezifität des Fluoreszenzsignals ergab sich aus der

Sequenzspezifität der Hydrolyse-Sonde. Für die weitere Berechnung wurde ein Schwellenwert in jedem Lauf festgelegt, bei welchem die Kurve des Fluoreszenzsignals des Gens eine exponentielle Zunahme zeigt. Dieser Wert wird als Quantifizierungszyklus (*quantification cycle*, C_q-Wert) bezeichnet. Für den C_q-Wert jeder cDNA-Probe wurde das geometrische Mittel aus den C_q-Werten des Triplikats gebildet. Der C_q-Wert für die gesamte Probe ergab sich wiederum aus dem arithmetischen Mittel der C_q-Werte beider cDNA Duplikate. Zusätzlich zu den Proben wurde in jedem qPCR-Lauf eine Reihe von Standardkonzentrationen des jeweiligen Gens mitgeführt, welche zur Berechnung der Kopienanzahl des Gens in den Proben verwendet wurde (Standardkurvenmethode). Bei den Standards handelte es sich um PCR-Produkte von Plasmiden, welche die cDNA des Gens trugen. Die Effizienz der PCR-Reaktion für jeden Lauf wurde von dem Auswertungsprogramm Rotor-Gene Q Series Software (Version 2.0.2, Qiagen, Hilden) nach folgender Formel berechnet: $E = 10^{-1/\text{Anstieg}} - 1$.

Die Quantifizierung des PCR-Produkts des Zielgens erfolgte relativ in Bezug auf ein Referenzgen. Auf diese Weise können Variationen in der Ausgangsmenge der eingesetzten RNA ausgeglichen werden, welche nicht auf Expressionsunterschieden beruhen. Das Referenzgen sollte in allen Versuchsgruppen und Altersstufen stabil exprimiert werden. Aus diesem Grund erfolgte zuerst eine Validierung der drei potentiellen Referenzgene *elongation factor 1 alpha-f1* (*ef1a*), *glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase* (*gapdh*) und *ribosomal protein L32* (*rpl32*). Daraus resultierend wurde die Expression der biogenen Aminrezeptoren in den anschließenden Experimenten auf das Referenzgen *ef1a* normiert. Hierfür wurde die Kopienanzahl des Zielgens durch die Kopienanzahl des Referenzgens dividiert.

2.4.6 Agarose-Gelelektrophorese

Zur Kontrolle der PCR-Produkte wurden diese anhand ihrer Größe mit Hilfe der Elektrophorese in einem Agarosegel aufgetrennt. Hierfür wurde die entsprechende Menge Agarose in 1 x TAE-Puffer durch Erhitzen gelöst und mit 40 µg Ethidiumbromid versetzt. Zu einem Teil des PCR-Produkts wurde ein Fünftel Volumen DNA-Ladepuffer gegeben. Die so behandelten Proben wurden auf ein 1 %iges (w/v) Agarosegel aufgetragen und bei 80 V der Größe entsprechend aufgetrennt. Zur Bestimmung der Größe der PCR-Produkte wurde zusätzlich ein DNA-Größenstandard (1 Kilo-Basenpaare (kb) oder 100 Basenpaare (bp), beide New England Biolabs, Frankfurt am Main) aufgetragen. Die Detektion und Dokumentation erfolgte unter UV-Licht (300-365 nm, Biostep, Jahnsdorf)

DNA-Ladepuffer: 0,002 % (w/v) Orange G; 15 % (v/v) Glycerol

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

2.4.7 DNA-Fragment Reinigung

Die Aufreinigung der PCR-Produkte erfolgte mit dem High Pure PCR Product Purification Kit (Roche Applied Science, Mannheim) entsprechend den Angaben des Herstellers entweder direkt aus der Lösung oder über ein präparatives Agarosegel. Die PCR-Produkte konnten dabei über eine Säule aufgereinigt und nach mehreren Waschschritten in ein Reaktionsgefäß eluiert werden. Erfolgte die Aufreinigung über ein präparatives Agarosegel, wurde die entsprechende Bande unter UV-Licht Anregung (365 nm, Vilber Lourmat, Marne La Vallee) mit einem Skalpell ausgeschnitten, in ein Reaktionsgefäß überführt und entsprechend den Angaben des Kit Herstellers aufgereinigt.

2.4.8 DNA-Konzentrierung

Damit die DNA nach der Aufreinigung für die weitere Handhabung in der gewünschten Konzentration vorlag, wurde sie durch Alkoholfällung aufkonzentriert. Hierfür wurde das jeweilige DNA-Produkt mit dem 0,1 fachen Volumen einer 3 M Natriumacetatlösung (pH 5,2) und dem 2,5 fachen Volumen absolutem Ethanol versetzt und mindestens 2 h bei -20 °C gefällt. Die DNA wurde anschließend durch Zentrifugation bei 13 000 UpM für 5 min pelletiert und Salzreste durch das Waschen mit 70 % Ethanol entfernt. Das Lösen der DNA erfolgte in entsprechender Menge DEPC-Wasser.

2.4.9 DNA-Restriktionsverdau

Sowohl das PCR-Produkt (das sogenannte Insert) als auch der entsprechende Vektor wurden vor der Ligation mit Restriktionsenzymen verdaut. Die DNA (100-500 ng) wurde mit dem entsprechenden Enzym (FastDigest EcoRI oder FastDigest HindIII, Thermo Scientific, Bonn) und 10×*FastDigest* Puffer versetzt und 1 h bei 37 °C inkubiert. Diese Methode wurde ebenfalls für die Kontrolle von hergestellten Plasmiden verwendet. Der Kontrollverdau des pGEM®-Vektors erfolgte mit BstZI (Promega, Mannheim) für 2 h bei 50 °C. Die Analyse und Aufreinigung der geschnittenen DNA erfolgte wie bereits beschrieben (siehe 2.4.6, 2.4.7).

2.4.10 Ligation

Die Ligation erfolgte im Verhältnis Insert zu Vektor von 1:3, 1:1 und 3:1. Die Berechnung für die entsprechend einzusetzenden Mengen erfolgte mit der Formel:

$$Menge\ Insert\ (ng) = \frac{Länge\ Insert\ (kB)}{Länge\ Vektor\ (kB)} \times Menge\ Vektor\ (ng)$$

Gereinigte PCR-Produkte wurden mit dem pGEM® T-Vektor System in den pGEM-T® Vektor (Promega, Mannheim) ligiert. PCR-Produkt und Vektor wurden in den genannten Verhältnissen zusammengegeben und mit 5 µl 2× *Rapid Ligation* Puffer und 1 µl T4 DNA Ligase (3 Weiss Units) versetzt. Bei Vektoren und Fragmenten, welche durch Restriktion erhalten wurde, bestand der Ligationsansatz neben der berechneten Menge an Insert und Vektor aus der T4 DNA Ligase (1-3 Weiss Units) sowie dem 10× *Rapid Ligation* Puffer (Promega, Mannheim). Die Ligation erfolgte jeweils bei 4 °C in Eiswasser über Nacht.

2.4.11 Transformation von *Escherichia coli*

Zu dem Ligationsansatz wurden 100 µl kompetente *E. coli* Bakterienzellen (Stamm JM109 oder BL21) gegeben und 30 min auf Eis inkubiert. Daran schloss sich ein Hitzeschock für 1 min bei 42 °C an und ein 2 minütiges Abkühlen auf Eis. Die so behandelten Bakterienzellen wurden mit 900 µl LB-Medium versetzt und 45 min bei 37 °C und 350 UpM (Thermomixer Comfort, Eppendorf, Hamburg) inkubiert. Die so gewachsenen Zellen wurden für 2 min bei 7 000 UpM sedimentiert, in 100 µl LB-Medium resuspendiert und auf LB-Agar-Platten mit dem vektorspezifischen Antibiotikum ausgestrichen. Sollte eine Blau-Weiß-Selektion möglich sein, wurde LB-Agar-Platten zunächst 37,5 µl X-Gal (75 µg/ml) und 2,5 µl 1 M IPTG zugefügt. Das Wachstum der Bakterienkolonien erfolgte bei 37 °C über Nacht.

Antibiotikazusatz (LB-Agar-Platten): 30 µg/ml Kanamycin oder 30 µg/ml Carbenicillin

2.4.12 Präparation von Plasmid-DNA

Die Gewinnung von Plasmid-DNA erfolgte entweder über eine Mini- oder Midi-Präparation.

Mini-Präparation

Für die Gewinnung von Plasmid-DNA wurden 5 ml LB-Medium inklusive dem entsprechenden Antibiotikazusatz mit einer Bakterienkolonie beimpft und über Nacht bei 37 °C und 260 UpM inkubiert. Die Aufreinigung von Plasmid-DNA aus der Bakterienkultur erfolgte mit dem PeqGOLD Plasmid Miniprep Kit I (PEQLAB Biotechnologie GmbH, Erlangen) nach Angaben des Herstellers.

Antibiotikazusatz (LB-Medium): 30 µg/ml Kanamycin; 50 µg/ml Carbenicillin

Midi-Präparation

50 ml LB-Medium wurden mit Carbenicillin versetzt, einer Bakterienkolonie beimpft und über Nacht bei 37 °C und 185 UpM inkubiert. Die Kulturflüssigkeit wurde in ein 50 ml Falconröhrchen überführt und bei 5 000 UpM und 4 °C für 10 min sedimentiert. Der Überstand wurde entfernt. Die Resuspension des Pellets erfolgte in 5 ml Lösung I. Diese Suspension wurde mit 10 ml Lösung II versetzt und invertiert bis eine klare, visköse Lösung entstand. Diese wurde nun mit 10 ml Lösung III versetzt und invertiert. Der Ansatz wurde bei 5500 UpM und 4 °C für 10 min zentrifugiert und der Überstand durch einen Faltenfilter in ein neues Falconröhrchen filtriert. Es erfolgte die Zugabe von 12 ml 2-Propanol und das Invertieren der Lösung. Nach dem erneuten Zentrifugieren bei 5500 UpM und 4 °C für 10 min wurde der Überstand dekantiert, das Pellet in 1,45 ml ddH_2O gelöst und mit 2,5 ml 4 M LiCl und 50 µl 1 M Tris-HCl (pH 7,5) versetzt. Die Lösung wurde in ein 15 ml Falconröhrchen überführt und für 10 min auf Eis inkubiert. Nach dem Zentrifugieren bei 5500 UpM und 4 °C für 10 min wurde der Überstand auf zwei 15 ml Falconröhrchen verteilt und mit je 5 ml absolutem Ethanol versetzt. Es folgte ein Inkubationsschritt für 1 h bei -20°C. Anschließend wurden die Ansätze erneut zentrifugiert, der Überstand verworfen und die Pellets in je 500 µl TE-Puffer und 2 µl RNase-Cocktail (Ambion, Austin) resuspendiert. Nach dem Überführen der Lösungen in ein Reaktionsgefäß erfolgte eine Inkubation für 30 min bei 37 °C. Nach der Zugabe von 1 Volumen Phenol/Chloroform und dem Vortexen wurde die Lösung bei 14 000 UpM für 2 min bei Raumtemperatur zentrifugiert und die wässrige Phase mit der DNA in ein neues

Reaktionsgefäß pipettiert. Die Phenol/Chloroform-Extraktion wurde wiederholt. Danach wurde die wässrige Phase auf zwei Reaktionsgefäße verteilt und mit je 25 µl 3 M LiCl und 800 µl absolutem Ethanol versetzt. Es folgte eine Zentrifugation bei 14 000 UpM und Raumtemperatur für 5 min. Das Pellet wurde mit je 200 µl 70 % Ethanol gewaschen und bei 14 000 UpM für 5 min zentrifugiert. Nach dem Entfernen des Überstands wurde das Pellet getrocknet und in jeweils 100 µl TE-Puffer aufgenommen.

Antibiotikazusatz (LB-Medium):	100 µg/ml Carbenicillin (Midipräp)
Lösung I:	50 mM Glukose; 25 mM Tris-HCl (pH 8,0); 10 mM EDTA
Lösung II:	0,2 M NaOH; 1 % (w/v) SDS
Lösung III:	3 M Kaliumacetat; 11,5 % (v/v) Essigsäure; pH 4,8
TE-Puffer:	10 mM Tris; 1 mM EDTA; pH 7,5

2.5 Biochemische Methoden

2.5.1 Bestimmung der Proteinkonzentration

Die Konzentrationsbestimmung von in Lösung befindlichen Proteinen erfolgte mit der Proteinbestimmung nach BRADFORD (1976). Hierfür wurden 1-5 µl Probe mit DEPC-Wasser auf 800 µl aufgefüllt und nach Zugabe von 5× Roti®-Nanoquant gut vermischt. Nach 5 min erfolgte die Messung der Absorption bei 595 nm (GeneQuant 1300, GE Healthcare, München). Zur Berechnung der Proteinkonzentration in den zu untersuchenden Proben wurde zeitgleich eine Standardkurve mit definierten Mengen des Referenzproteins bovines Serumalbumin (BSA) ermittelt. Für die Standardkurve wurden sieben ansteigende BSA-Konzentrationen gemessen.

2.5.2 Isolierung von Membran- und cytosolischen Proteinen

Für die Untersuchung zur Lokalisierung des AmTyr2-Rezeptors wurden die Gehirnhomogenate von Honigbienen in eine cytosolische Fraktion und die Membranfraktion separiert. Hierfür wurden tiefgefrorene Gehirne (siehe 2.3) homogenisiert, mit 150-250 µl Puffer A versetzt und 10 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurden die Proben 30 min bei 4 °C und 60 000 UpM zentrifugiert (Optima™TL *Ultracentrifuge*, Beckman Coulter GmbH, Krefeld). Der entnommene Überstand enthielt die cytosolischen Proteine. Das Pellet wurde in 45-50 µl Puffer B resuspendiert und mit 1 Volumen einer 2 %igen (3-[(3-Cholamidopropyl)-dimethylammonio]-propan-sulfonat (CHAPS)-Lösung versetzt. Nach 15 min Inkubation auf Eis erfolgte die Zentrifugation der Proben 10 min bei

4 °C und 10 100 UpM (Heraeus Biofuge Primo R, Thermo Scientific, Bonn). Der Überstand enthielt die Membranproteine.

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

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

2.5.3 Deglykosylierung von Membranproteinen

Glykosylierungen von Proteinen verändern die Laufeigenschaften in der Polyacrylamidgelelektrophorese und können in den Analysen häufig zur falschen Einschätzung der Größe eines Proteins führen. Aus diesem Grund wurde das Enzym Peptid:*N*-Glycosidase F (PNGase F, New England Biolabs, Frankfurt am Main) verwendet, um potentielle *N*-Glykosylierungen der Rezeptorproteine in der Membranfraktion abzuspalten. Hierfür wurden 20 µg Membranprotein mit DEPC-Wasser auf 45 µl aufgefüllt, mit 5 µl Denaturierungspuffer versetzt und 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend erfolgte die Zugabe von je 6 µl G7-Puffer und NP-40 (10 %), sowie 2 µl PNGase F. Die Negativkontrolle enthielt statt dem Enzym DEPC-Wasser. Der Abbau der *N*-Glykosylierungen fand für 2 h bei 37 °C statt.

2.5.4 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese

Mit der Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (*sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis*, SDS-PAGE) wurden Proteine nach Komplexbildung mit SDS anhand ihres Molekulargewichts in einem elektrischen Feld aufgetrennt. Hierfür erfolgte zuerst die Herstellung eines Trenngels. Dieses wurde mit n-Butanol überschichtet, um eine ebenmäßige Oberkante und Grenze zum Sammelgel zu erhalten. Nach dem vollständigen Auspolymerisieren konnte das n-Butanol abgesaugt und das Trenngel mit dem Sammelgel überschichtet werden. Die Bildung einzelner Taschen für das Einfüllen der Proben wurde durch das Einstecken eines Teflonkamms in das Sammelgel gewährleistet.

Die Zusammensetzung des Trenn- und Sammelgels ist im Folgenden dargestellt:

	Trenngel (12 %)	**Sammelgel (4,5 %)**
Acrylamidlösung	2,4 ml	300 µl
Puffer	1,5 ml (L-Puffer)	500 µl (M-Puffer)
ddH_2O	2,1 ml	1,2 ml
10 % (w/v) Ammoniumpersulfat	35 µl	15 µl
Tetramethylethylendiamin (TEMED)	6 µl	2 µl

Die Proben wurden mit 1 Volumen LöA-Puffer versetzt und auf das Gel aufgetragen. Die Elektrophorese erfolgte in Kammerpuffer bei 80 V, 60 mA und 40 W bis die Proben das Sammelgel durchlaufen haben. Die weitere Auftrennung erfolgte bei 120 V, 60 mA und 40 W.

L-Puffer: 1,5 M Tris; 0,8 % (w/v) SDS

M-Puffer: 0,5 M Tris; 0,8 % (w/v) SDS

LöA-Puffer: 9 M Harnstoff; 10 % (w/v) SDS; 5 % (v/v) β-Mercaptoethanol; 0,2 % (w/v) Bromphenolblau

Kammerpuffer: 25 mM Tris; 192 mM Glycin; 0,1 % (w/v) SDS

2.5.5 Coomassie-Färbung

Die Coomassie-Färbung diente dem Sichtbarmachen der aufgetrennten Proteine nach der SDS-PAGE. Hierfür wurde das fertige Gel 30 min in einer Coomassielösung bei Raumtemperatur auf einem Schüttler inkubiert. Anschließend erfolgte das einstündige Entfärben bei Raumtemperatur auf dem Schüttler. Die Lösung wurde währenddessen einmal gewechselt. Die Größenbestimmung der aufgetrennten Proteine erfolgte im Vergleich zu einem Proteinstandard mit definierten Molekulargewichten (Precision Plus Protein™ Standards, Bio-Rad Laboratories GmbH, München).

Coomassielösung: 0,1 % (w/v) CB R250; 50 % (v/v) Methanol; 10 % (v/v) Essigsäure

Entfärber: 10 % (v/v) Methanol; 7 % (v/v) Essigsäure

2.5.6 Western Blot

Bei dem Western Blot wurden die Proteine eines SDS-Polyacrylamidgels elektrophoretisch auf eine Polyvinylidenfluorid-Membran (PVDF, Immobilon P, Roth, Karlsruhe) übertragen. Der Blotvorgang selbst fand in einer Halbtrockenzelle (Trans-Blot® SD Semi Dry transfer cell, Bio-Rad Laboratories GmbH, München) bei 20 V, 54 mA pro Blot (Fläche in

cm^2 x 0,8) und 4 W für 90 min statt. Hierfür wurde folgende Schichtung verwendet: sechs Filterpapiere (Electrode Paper Novablot, GE Healthcare, München) getränkt in Anodenpuffer 1, drei Filterpapiere getränkt in Anodenpuffer 2, die PVDF-Membran nach 5 minütiger Äquilibrierung in Methanol und kurzem Spülen in Anodenpuffer 2, das SDS-Gel, neun Filterpapiere getränkt in Kathodenpuffer. Mögliche Luftblasen zwischen den einzelnen Schichten wurden vor dem Blotvorgang durch eine Walze entfernt. Anschließend wurden die Proteinbanden 5 min bei Raumtemperatur auf einem Schüttler reversibel mit 0,2 % Ponceau S in Trichloressigsäure angefärbt, um den erfolgreichen Transfer der Proteine auf die PVDF-Membran zu kontrollieren, und fixiert. Die Entfärbung des Blots erfolgte mit vollentsalztem Wasser (VE-Wasser). Bei nicht sofortiger Verwendung wurde der Blot bei maximal 37 °C getrocknet und anschließend bei 4 °C gelagert.

Anodenlösung 1:	0,3 M Tris; 20 % (v/v) Methanol
Anodenlösung 2:	25 mM Tris; 20 % (v/v) Methanol
Kathodenlösung:	40 mM 6-Amino-n-Hexansäure; 20 % (v/v) Methanol

2.5.7 Immundetektion

Um die auf dem Blot befindlichen Antigene darzustellen, wurden diese mit spezifischen Antikörpern markiert. Zunächst wurden unspezifische Bindungsstellen 30 min bei Raumtemperatur mit einer 5 %igen (w/v) Trockenmilchlösung in Tween-Puffer abgesättigt. Anschließend wurde der spezifische Primärantikörper in Tween-Puffer verdünnt und gegen die Trockenmilchlösung ausgetauscht. Sofern nicht anders angegeben, erfolgte die Inkubation der Primärantikörper über Nacht bei 4 °C auf einem Schüttler. Am nächsten Tag wurde der Blot mit Tween-Puffer dreimal für jeweils 5 min bei Raumtemperatur gewaschen. Danach erfolgte ein 3 minütiger Inkubationsschritt mit Harnstoffpuffer. Anschließend wurde wieder 5 min mit Tween-Puffer gewaschen. Der Sekundärantikörper, welcher gegen Epitope des Spendertiers des Primärantikörpers gerichtet war, wurde in Tween-Puffer in entsprechender Verdünnung gelöst und 1 h bei Raumtemperatur auf einem Schüttler mit dem Blot inkubiert. Danach wurde der Blot mit Tween-Puffer dreimal für jeweils 5 min bei Raumtemperatur gewaschen. Nach dem kurzen Abspülen mit ddH_2O erfolgte die Inkubation mit dem Chemolumineszenz-Substrat (Super Signal West Pico Chemoluminescent Substrate, Thermo Scientific, Bonn) für 5 min. Dieses wurde durch das Meerrettichperoxidase-Konjugat (*horseradish peroxidase*, HRP) des Sekundärantikörpers umgesetzt und setzte dabei Licht frei. Die Entwicklung erfolgte auf Kodak-Fotofilmen (CL-Xposure, Thermo Scientific, Bonn).

Tween-Puffer: 10 mM Tris; 150 mM NaCl; 0,1 % (v/v) Tween 20

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

2.5.8 Expression und Reinigung von Maltose-Bindeprotein-Fusionsproteinen

Ein spezifischer Teil des AmTyr2-Rezeptors (siehe 2.5.10) wurde über die *multiple cloning site* in den pMAL-c2X-Vektor (New England Biolabs, Frankfurt am Main) ligiert. Dieser trägt das Gen für das Maltose-Bindeprotein (MBP). Durch die Ligation wurde das Gen für das MBP mit der Rezeptor-spezifischen cDNA fusioniert. Exprimiert man dieses, erhält man ein Fusionsprotein bestehend aus dem MBP und einem Rezeptor-spezifischen Abschnitt. Das Maltose-Bindeprotein besitzt eine hohe Bindungsaffinität für Amylose und kann somit über eine Amylosesäule aufgereinigt werden.

Nach erfolgreicher Transformation von *E. coli* BL21-Zellen mit dem AmTyr2-pMAL-c2X-Konstrukt wurde eine Übernachtkultur dieser Zellen angelegt. Hierfür wurde eine Kolonie in 5 ml LB-Medium mit Chloramphenicol und Carbenicillin aufgenommen und bei 37 °C und 260 UpM über Nacht inkubiert. 250 ml LB-Medium wurde mit Chloramphenicol und Carbenicillin versetzt und 1 ml der Übernachtkultur beimpft. Die Inkubation dieser Kultur erfolgte solange bei 37 °C und 260 UpM, bis sich die Bakterien entsprechend vermehrt haben und bei 600 nm eine optische Dichte zwischen 0,6 und 0,9 aufwiesen (GeneQuant 1300, GE Healthcare, München). Die Proteinexpression wurde durch die Zugabe von 1 mM Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid (IPTG), welches als Induktor des Lactose-Operons bei *E. coli* fungiert, induziert und die Kultur bei Raumtemperatur über Nacht geschüttelt. Am darauffolgenden Tag wurden die Kulturen bei 8500 UpM und 4 °C für 5 min sedimentiert und in 5 ml TE-Puffer resuspendiert. Der Aufschluss der Zellen erfolgte mit einem Stabsonifizierer UP50H (Hielscher Ultrasonics GmbH, Teltow) ca. 5 × 30 s auf Eis, bis die Lösung nicht mehr viskös war. Die Zellbruchstücke wurden bei 8500 UpM und 4 °C für 10 min pelletiert. Der Überstand mit dem MBP-Fusionsprotein wurde mit 25 ml Säulenpuffer versetzt und bis zur weiteren Verarbeitung auf Eis gelagert. Eine Fertigsäule (Poly-Prep Chromatography Column, Bio-Rad Laboratories GmbH, München) wurde mit 6 ml 50 % Amylosegranulat (New England Biolabs, Frankfurt am Main) befüllt und das Säulenmaterial mit 15 ml Säulenpuffer äquilibriert. Der Überstand mit dem MBP-Fusionsprotein wurde auf die Säule aufgetragen und mit 25 ml Säulenpuffer gewaschen. Die Elution des gebundenen Fusionsproteins erfolgte mit 5 ml Elutionspuffer.

Antibiotikazusatz (LB-Medium):	100 µg/ml Chloramphenicol; 100 µg/ml Carbenicillin
TE-Puffer:	10 mM Tris; 1 mM EDTA; pH 7,5
Säulenpuffer:	200 mM NaCl; 20 mM Tris-HCl (pH 7,4); 10 mM β-Mercaptoethanol; 1 mM EDTA
Elutionspuffer:	200 mM NaCl; 20 mM Tris-HCl (pH 7,4); 10 mM β-Mercaptoethanol; 1 mM EDTA; 20 mM Maltose

2.5.9 Expression und Reinigung von His-Tag-Fusionsproteinen

Ein spezifischer Teil des AmTyr2-Rezeptors (siehe 2.5.10) wurde in den pET-30a(+)-Vektor (Novagen, Darmstadt) kloniert, um ein Protein bestehend aus einem Rezeptorfragment und sechs Histidinresten zu erhalten. Die Histidinreste ermöglichten die Aufreinigung über eine Nickel-Chelat-Säule.

Nach erfolgreicher Transformation von *E. coli* BL21-Zellen mit dem Vektorkonstrukt wurde eine Übernachtkultur aus 3 ml LB-Medium, Chloramphenicol und Kanamycin und einer Kolonie angesetzt und bei 37 °C und 260 UpM über Nacht inkubiert. 250 ml LB-Medium mit Kanamycin wurden mit 2 ml der Übernachtkultur beimpft und solange bei 37 °C und 260 UpM inkubiert, bis die Kultur bei 600 nm eine optische Dichte zwischen 0,6 und 0,9 (GeneQuant 1300, GE Healthcare, München) aufwies. Die Proteinexpression wurde durch die Zugabe von 1 mM IPTG induziert und die Kultur bei Raumtemperatur über Nacht geschüttelt. Anschließend wurde die Kultur bei 5500 UpM und 4 °C für 10 min sedimentiert. Das Pellet wurde mit 5 ml Lysispuffer versetzt und 30 min auf Eis inkubiert. Nach der Zugabe von 50 µl Protease-Inhibitor (*Protease inhibitor cocktail for use in purification of histidine-tagged proteins*, Sigma-Aldrich), erfolgte der Aufschluss der Zellen ca. 5 × 30 s auf Eis mit dem Stabsonifizierer. Die Lösung wurde anschließend mit DNase (*DNase I from bovine pancreas*, Sigma-Aldrich) und 10 µl 1 M $MgCl_2$ versetzt und 30 min bei 4 °C inkubiert. Das Lysat wurde bei 15 000 UpM und 4 °C für 30 min zentrifugiert und der Überstand mit dem Fusionsprotein bis zur weiteren Verwendung auf Eis gelagert. Das Säulenmaterial (*HIS-Select® HF Nickel Affinity Gel*, Sigma-Aldrich) wurde zunächst äquilibriert. Hierfür wurden 2 ml Säulenmaterial bei 5300 UpM und 4 °C für 3 min zentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Säulenmaterial wurde nacheinander mit 2 ml ddH_2O und 5 ml Waschpuffer resuspendiert und jeweils bei 5300 UpM und 4 °C für 3 min zentrifugiert. Nach dem Verwerfen des Überstandes konnte das Fusionsprotein mit dem Säulenmaterial vermischt und 1 h bei 4 °C auf einem Kippschüttler inkubiert werden. Anschließend wurde die Lösung bei 5300 UpM und 4 °C für 3 min zentrifugiert und der Überstand verworfen. Das an die Nickelmatrix gebundene Fusionsprotein wurde je

3 × mit 10 ml Waschpuffer versetzt und bei 5300 UpM und 4 °C für 3 min sedimentiert. Das Pellet wurde mit 5 ml Waschpuffer versetzt und die Lösung auf eine Fertigsäule (Poly-Prep Chromatography Column, Bio-Rad Laboratories GmbH, München) gegeben. Die Elution des Fusionsproteins erfolgte mit 2 ml Elutionspuffer. Das Eluat wurde mit 20 µl Protease-Inhibitor versetzt, um einen Abbau des Fusionsproteins zu verhindern. Es schloss sich eine Dialyse über Nacht bei 4 °C gegen 1 l Kopplungspuffer an.

Antibiotikazusatz (LB-Medium):	50 µg/ml Kanamycin; 100 µg/ml Chloramphenicol
Lysispuffer:	10 mM Imidazol; 50 mM NaH_2PO_4; 300 mM NaCl; 1 mg/ml Lysozym *from Chicken Egg White* (Sigma-Aldrich); pH 8
Waschpuffer:	20 mM Imidazol; 50 mM NaH_2PO_4; 300 mM NaCl; pH 8
Elutionspuffer:	250 mM Imidazol; 50 mM NaH_2PO_4; 300 mM NaCl; pH 8
Kopplungspuffer:	200 mM $NaHCO_3$; 500 mM NaCl; pH 8,3

2.5.10 Generierung und Aufreinigung polyklonaler Antikörper

Für die Herstellung polyklonaler Antikörper gegen den AmTyr2-Rezeptor wurde durch Klonierung und Proteinexpression ein Fusionsprotein aus Antigen und MBP hergestellt, welches zur Immunisierung von Meerschweinchen verwendet wurde. Bei dem Antigen handelte es sich um einen 76 Aminosäuren langen Teil der dritten cytoplasmatischen Schleife des AmTyr2-Rezeptors. Die Immunisierung und Versorgung der Tiere, sowie die Serumgewinnung wurde von der Firma Pineda Antikörper-Service (Berlin) durchgeführt. Vor der Immunisierung wurden Immunseren von vier Meerschweinchen getestet und davon zwei Tiere ausgewählt, welche im Western Blot die geringste Hintergrundaktivität aufwiesen. Das Serum wurde 85 Tage nach der Immunisierung entnommen.

Die Aufreinigung antigenspezifischer Antikörper erfolgte durch Affinitätschromatographie gegen das His-getaggte Antigen-Fusionsprotein über eine *HiTrap NHS-activated HP*-Säule (GE Healthcare, München). Zuerst wurde die Säule vorbereitet. Das Isopropanol der gelagerten Säule wurde mit 6 ml eiskaltem 1 mM HCl ausgewaschen. Anschließend erfolgte die Injektion von 1 ml Fusionsprotein (1 µg/ml). Für die entsprechende Bindung des Antigens an das Säulenmaterial wurde die Säule 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Zum Deaktivieren aktiver Gruppen erfolgten anschließend alternierende Waschschritte mit Puffer A und B: 6 ml Puffer A, 6 ml Puffer B, 6 ml Puffer A, 30 min Inkubation bei Raumtemperatur, 6 ml Puffer B, 6 ml Puffer A, 6 ml Puffer B. Um den pH-Wert einzustellen wurden 2 ml Bindungspuffer injiziert. Vor der Applikation des Antiserums wurde die Säule mit 3 ml Bindungspuffer und 3 ml Elutionspuffer gewaschen. Die

Äquilibrierung erfolgte mit 10 ml Bindungspuffer. Währenddessen wurden 5 ml Antiserum mit 45 ml Bindungspuffer verdünnt und filtriert (Porengröße 0,22 µm). Das Antiserum wurde mit einer Peristaltikpumpe (P-1, Pharmacia Biotech, Dübendorf) über Nacht mit einer Flussrate von 0,2-1 ml/min fortlaufend über die Säule geschickt. Am darauffolgenden Tag erfolgte das Waschen der Säule mit 10 ml Bindungspuffer und die Elution des gebundenen Antikörpers mit 3 ml Elutionspuffer in 500 µl Fraktionen. Neutralisierungspuffer wurde dem Eluat tropfenweise zugegeben, bis ein neutraler pH-Wert der Lösung erreicht war.

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

2.5.11 Immunzytochemische Analysen an fixierten Zellen

Die mit dem AmTyr2-Rezeptor transfizierten Zellen (flpTM-AmTyr2, siehe 2.6.2) sowie die Kontrollzellen (flpTM) wurden auf Deckgläschen in 24-well Platten ausgesät und sind über Nacht angewachsen. Am nächsten Morgen wurde das Medium abgesaugt und die Zellen 2 × kurz mit Phosphat gepufferter Salzlösung (*phosphate buffered saline*, PBS) gewaschen, um Medium und Serumreste zu entfernen. Es erfolgte eine Inkubation der Zellen mit 500 µl 4 % Paraformaldehyd bei Raumtemperatur auf einem Kippschüttler. Nach dem Absaugen der Lösung wurde 3 × 10 min mit PBS gewaschen. Um die Lagerungszeit der so fixierten Zellen zu verlängern wurde PBS durch PBS + 0,01 % Natriumazid ausgetauscht und die Zellen bei 4 °C aufbewahrt.

Für die Antikörperfärbung wurden die Zellen 15 min mit 500 µl PBS gewaschen und anschließend für 20 min mit 300 µl Präinkubationslösung versetzt. Der Primärantikörper (verdünnt in Inkubationslösung, 300 µl) wurde für 1 h auf die Zellen gegeben. Anschließend erfolgte ein dreimaliges Waschen mit 500 µl PBS für je 15 min. Der Sekundärantikörper (verdünnt in Inkubationslösung, 300 µl) wurde ebenfalls für 1 h auf die Zellen gegeben. Nach dem erneuten Waschen mit 500 µl PBS (3 × 15 min) konnten die Zellen in Mowiol eingedeckelt und analysiert werden.

PBS: 140 mM NaCl; 2,6 mM KCl; 8,1 mM Na_2HPO_4; 1,5 mM KH_2PO_4; pH 7,4
Präinkubationslösung: 10 % (v/v) *normal goat serum*; 0,1 % (v/v) Triton X-100 in PBS
Inkubationslösung: 5 % (v/v) *normal goat serum*; 0,5 % (v/v) Triton X-100 in PBS

Mowiol: 33,3 % (v/v) Glycerol; 16,7 % (v/v) Mowiol 4-88; 2 % (v/v) n-Propyl-Galat in PBS

2.5.12 Immunhistochemische Analysen an fixiertem Gewebe

Die präparierten Gehirne von Sammlerinnen wurden in die Fixierlösung überführt und für 1,5 h inkubiert. Anschließend wurden die Gehirne 3 × 10 min mit PBS gewaschen und einzeln in 60 °C warme Agarose (5 % in PBS) eingebettet. Nach dem Abkühlen wurden die Agaroseblöcke über Nacht im Kühlschrank in einer feuchten Kammer gelagert. Das Schneiden der Gehirne erfolgte mit einem Vibratom (Vibratome Series 1000, Technical Products International, Inc., St. Louis, MO, USA). Die Schnittdicke betrug 30 µm. Die einzelnen Gehirnschnitte wurden 30 min mit 0,1 % (w/v) Natriumborhydrid (gelöst in PBS) behandelt und danach 3 × 10 min mit PBS bei Raumtemperatur gewaschen. Die Sättigung unspezifischer Bindungsstellen erfolgte mit Blockierlösung für 30 min bei Raumtemperatur. Der Primärantikörper (verdünnt in Blockierlösung und zentrifugiert für 5 min bei 13 000 UpM) wurde für 48 h auf die Schnitte gegeben und bei 4 °C auf einem Schüttler inkubiert. Im Anschluss erfolgten drei Waschschritte für jeweils 20 min in PBS, um die nicht gebundenen Antikörper zu entfernen, und ein Inkubationsschritt von 20 min in PBS mit 0,5 % (v/v) Triton X-100. Die Gehirnschnitte wurden ein weiteres Mal für 20 min mit PBS gewaschen bevor der Sekundärantikörper (verdünnt in Blockierlösung) dazugegeben wurde. Die Inkubation erfolgte bei 4 °C auf einem Schüttler über Nacht. Die Schnitte wurden 3 × 10 min mit PBS bei Raumtemperatur gewaschen, 20 min in PBS mit 0,5 % (v/v) Triton X-100 inkubiert und wieder 20 min mit PBS gewaschen, bevor sie auf einem Objektträger in Mowiol eingedeckelt wurden.

PBS: 140 mM NaCl; 2,6 mM KCl; 8,1 mM Na_2HPO_4; 1,5 mM KH_2PO_4; pH 7,4

Fixierlösung: 3 % Paraformaldehyd, 0,2 % Pikrinsäure, 0,2 M Saccharose in 0,1 M Natriumphosphatpuffer, pH 7,4

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

Mowiol: 33,3 % (v/v) Glycerol; 16,7 % (v/v) Mowiol 4-88; 2 % (v/v) n-Propyl-Galat in PBS

2.5.13 Mikroskopie und Bildbearbeitung

Die Hellfeld- und Immunfluoreszenzaufnahmen der fixierten Zellen sowie der Gehirnschnitte erfolgten an einem konfokalen Laser Scanning Mikroskop (LSM 510 bzw. LSM 710, Zeiss, Jena) bei einer Anregungswellenlänge von 543 nm. In der Regel wurden

Bildstapel aufgenommen. Die weitere Bildbearbeitung wurde mit dem Programm ImageJ (Version 1.47) durchgeführt.

2.6 Heterologe Expression und pharmakologische Charakterisierung des AmTyr2-Rezeptors in flpTM-Zellen

Für die funktionelle und pharmakologische Charakterisierung wurde der AmTyr2-Rezeptor in flpTM-Zellen exprimiert. Bei diesen Zellen handelt es sich um HEK293 Zellen, welche zusätzlich die A2 Untereinheit des olfaktorischen *cyclic nucleotid-gated ion channels* (CNG-Kanal; LUDWIG ET AL. 1990) konstitutiv exprimieren. Der Kanal wird durch die Bindung von cAMP geöffnet. Neben monovalenten Kationen sind CNG Kanäle für Ca^{2+}-Ionen permeabel. Die Herstellung der stabilen flpTM-AmTyr2 Zelllinie, die Zellkultur sowie die Calciumfluorometrie wurden in Kooperation mit der AG von Prof. Arnd Baumann (Zelluläre Biophysik (ICS-4), Forschungszentrum Jülich) durchgeführt. Die pharmakologischen Daten zum AmTyr1-Rezeptor in flpTM-Zellen wurden von der AG Baumann zur Verfügung gestellt und werden methodisch hier nicht im Detail erläutert.

2.6.1 Expressionsvektoren

Für die Expression des AmTyr2-Rezeptors in flpTM-Zellen wurde die Rezeptor-kodierende cDNA durch eine PCR mit entsprechenden Primern modifiziert. Vor das Startcodon wurde eine HindIII Schnittstelle und eine Kozak Konsensussequenz (CCACC; KOZAK 1984) eingefügt. Das Stoppcodon wurde entfernt und am 3´-Ende eine EcoRI Schnittstelle eingefügt. Das PCR Fragment wurde in den von Dr. Markus Thamm zur Verfügung gestellten pcDNA3.1(+)Am*5-ht1*-HA-Vektor (THAMM 2009) ligiert. Dieser Vektor besitzt am 3´-Ende der Rezeptorsequenz ein Hämagglutinin (HA)-Tag. Nach dem Entfernen der Am*5-ht1*-Rezeptorsequenz mit den Restriktionsenzymen HindIII und EcoRI wurde das Am*tyr2*-Fragment unter Erhalt des Leserahmens für das HA-Tag in den Vektor ligiert (pcAm*tyr2*-HA). Dies ermöglichte den Nachweis des heterolog exprimierten Rezeptors durch einen spezifischen anti-HA Antikörper.

2.6.2 Herstellung einer stabilen flpTM-AmTyr2 Zelllinie

Die flpTM-Zellen wurden mit dem Expressionskonstrukt durch Calciumphosphatpräzipitation transfiziert (CHEN & OKAYAMA 1987). Hierzu wurden

10 µg DNA des Expressionskonstruktes pcAm*tyr2*-HA (siehe 2.6.1) mit ddH_2O auf 124 µl aufgefüllt und mit 41 µl $CaCl_2$ und 165 µl 2 × BBS vermischt. Die Lösung wurde für 20 min bei Raumtemperatur inkubiert und auf 4 × 10^5 flpTM-Zellen in einer 5 cm Petrischale pipettiert. Anschließend erfolgte die Inkubation der Zellen für 20 h bei 37 °C, 5 % CO_2 und 95 % Luftfeuchtigkeit. Das Präzipitat wurde durch einen Waschschritt mit PBS/EDTA-Lösung entfernt und die Zellen mit 300 µl Trypsin/EDTA-Lösung vom Schalenboden gelöst (~5 min bei 37 °C). Die Zellen wurden in 4,7 ml DH10-Medium resuspendiert und auf sechs 9 cm Petrischalen ausgesät. Am darauffolgenden Tag wurde das Medium gegen frisches Medium ausgetauscht und zur Selektion transfizierter Zellen mit 1 mg/ml G418 (Geneticin) und 100 µg/ml Hygromycin versetzt. Anschließend erfolgte der Medienwechsel alle drei Tage. Nach 14 Tagen wurden mit einer Pipettenspitze einzelne Zellkolonien abgelöst und in 24-Well Platten mit DH10-Medium (mit G418 und Hygromycin) vermehrt. Die konstitutive Expression des AmTyr2-Rezeptors wurde nach der Generierung und Aufreinigung des anti-AmTyr2-Antikörpers (siehe 2.5.10) mit Western Blot Analysen (siehe 2.5.6) und immunzytochemischen Analysen (siehe 2.5.11) nachgewiesen.

BBS (2 x):	50 mM N,N-Bis-(2-hydroxyethyl)-2-aminoethansulfonsäure; 280 mM NaCl; 1,5 mM Na_2HPO4, pH 6,95
PBS/EDTA-Lösung:	PBS; 2g/l EDTA
Trypsin/EDTA-Lösung:	0,05 % Trypsin; 0,2 g/l EDTA
DH10-Medium:	DMEM GlutaMAX I (*high glucose* 4,5 g/l, Invitrogen, Karlsruhe); 1 % (v/v) Antibiotika/Antimykotika; 10 % fötales Rinderserum

2.6.3 Calciumfluorometrie

In flpTM Zellen können Änderungen der intrazellulären cAMP Konzentration ($[cAMP]_i$) indirekt über die Aktivität des CNG Kanals und dem damit verbundenen Einstrom von Ca^{2+} Ionen bestimmt werden. Zur Messung der intrazellulären Ca^{2+} Konzentration ($[Ca^{2+}]_i$) wurde der Ca^{2+}-sensitive Farbstoff Fluo-4 AM (Life Technologies GmbH, Darmstadt) verwendet. Die den AmTyr2-Rezeptor exprimierende Zelllinie sowie flpTM Kontrollzellen wurden in 96-Well Platten ausgesät und über Nacht bis auf eine Dichte von ca. 1,5 × 10^4 Zellen pro Well angezogen. Das Kulturmedium wurde gegen 50 µl Beladelösung pro Well ausgetauscht und die Zellen für 90 min bei Raumtemperatur und vollkommener Dunkelheit inkubiert. Anschließend wurde die Beladelösung durch 90 µl ES-Lösung ersetzt und der Fluoreszenz-Basalwert bei einer Anregungswellenlänge von 485 nm und einer

Emissionswellenlänge von 520 nm in einem Plattenlesegerät (FLUOStar Omega, BMG Labtech, Ortenberg) gemessen. Wenn die Basalfluoreszenz einen konstanten Wert erreicht hatte, wurde 10 µl Testlösung pro Well zugegeben. Die ligandeninduzierte Änderung der Fluoreszenzsignale wurde automatisch aufgezeichnet. Die Auswertung der Daten erfolgte mit der Mars Data Analysis Software (Version 2.30 R2, BMG Labtech, Ortenberg).

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

Beladelösung: 1,7 µM FLUO-4 AM; 3 mM Probenecid; 0,02 % (w/v) Pluronic® F-127 in ES-Lösung

Testlösungen: 1 mM IBMX in ES-Lösung; 1 mM IBMX + Agonisten (10 nM-1 000 µM) in ES-Lösung; 1 mM IBMX + Agonist + Antagonist (10 nM-1 000 µM) in ES-Lösung

2.7 Hochleistungsflüssigkeitschromatographie

Die Methode der Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (*high performance liquid chromatography*, HPLC) wurde in der vorliegenden Arbeit verwendet, um biogene Amine aufzutrennen, zu identifizieren und quantitativ zu bestimmen. Die HPLC-Analysen wurden in Kooperation mit Dr. Andrew B. Barron (Macquarie University, Sydney, Australien) und seiner Arbeitsgruppe durchgeführt. Hierfür wurden die Versuchstiere komplett in flüssigem Stickstoff eingefroren. Von diesen Tieren wurde jeweils der Kopf abgetrennt und vor der weiteren Präparation bei -65 °C und 320 mTorr für 45 min gefriergetrocknet (Virtis Gefriertrockner 2KBTXL-75, Virtis). Anschließend wurde das Gehirn auf Trockeneis präpariert, um ein Auftauen zu vermeiden. Die optischen Loben, das Subösophagealganglion, die Antennalloben und die Pilzkörper wurden separiert und bis zur weiteren Verwendung bei -80 °C gelagert. Zur Extraktion der biogenen Amine wurden die jeweiligen Gehirnteile für 5 min bei 4 °C und 15 × g und anschließend durch Ultraschall in 20 µl 0,2 M Perchlorsäure mit 10 pg/µl des HPLC-Standards Dihydroxybenzylamin homogenisiert. Die Proben wurden für 20 min bei 0 °C unter Lichtausschluss inkubiert. Um die Zellbestandteile zu pelletieren erfolgte eine Zentrifugation der Proben für 15 min bei 4 °C und 15 × g. Von dem Überstand jeder Probe wurden 13 µl für die HPLC-Analyse verwendet. Bei dem verwendeten Gerät handelte es sich um ein Agilent 1200 HPLC-System (Agilent Technologies, Santa Clare, CA, USA) mit einem elektrochemischen Detektor (ESA Coulochem III), verbunden mit einer ESA 5011A hochsensitiven Zwei-Elektrodenzelle (beides ESA, Chelmsford, MA, USA). Die Auftrennung erfolgte über eine 100 mm lange Hypersil™ BDS C18-Säule mit einer Partikelgröße von 5 µm (Thermo Fisher Scientific,

Waltham, MA, USA). Die Menge an biogenen Aminen wurde relativ zu einer Standardmenge des Amins sowie relativ zu Dihydroxybenzylamin als internem Standard berechnet.

2.8 Auswertung der Daten und Statistik

Die gewonnenen Daten wurden je nach Fragestellung mit den folgenden Programmen ausgewertet bzw. graphisch dargestellt und aufbereitet: BioEdit (Version 7.0.9.0), GraphPad Prism 4 (Version 4.01), Rotor-Gene Q Series Software (Version 2.0.2), CorelDRAW X5 (Version 15.0.0.486). Die verwendeten Nukleotid- und Aminosäuresequenzen wurden, sofern nicht selbst generiert, aus der Datenbank des *National Center for Biotechnology Information* (NCBI, http://www.ncbi.nlm.nih.gov/) gewonnen. Die genomische Organisation des AmTyr2-Rezeptors wurde mit Splign (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sutils/splign/splign.cgi) analysiert und mit dem *Exon-Intron Graphic Maker* (Version 4, http://wormweb.org/exonintron) schematisch dargestellt. Das Sequenzalignment erfolgte mit BioEdit. Die Sequenzidentitäten und -ähnlichkeiten wurden mit BLAST® (http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi) festgestellt. Für die Stammbaumanalyse wurde MEGA6 (Version 6.0.5) verwendet. Strukturanalysen wurden mit dem TMHMM Server v. 20 (http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/) und ProtScale (http://web.expasy.org/protscale/) durchgeführt. Posttranslationale Modifikationsstellen wurden mit PROSITE (Version 20.99, www.expasy.org/prosite) ermittelt.

Die statistischen Analysen erfolgten mit SPSS (Version 21.0.0.0). Bei mehreren Gruppen wurden diese mit einer einfaktoriellen Varianzanalyse (*analysis of variance*, ANOVA) auf Unterschiede in den Mittelwerten hin untersucht, sofern eine Normalverteilung vorlag. Für den anschließenden paarweisen Mittelwertvergleich wurden je nach Varianzhomogenität (Levene-Test) die Post-hoc-Tests nach Tamhane oder Scheffé verwendet. Erfolgte ein Vergleich der Mittelwerte zwischen zwei Gruppen, wurde der T-Test für unabhängige Stichproben verwendet. Bei allen Analysen wurde eine Irrtumswahrscheinlichkeit von $P \leq 0{,}05$ zugrunde gelegt. Die Angabe der Mittelwerte erfolgte in Form von MW ± SE. Ausreißer wurden in die statistische Auswertung nicht mit einbezogen.

3 Ergebnisse

3.1 Charakterisierung des Tyramin-2-Rezeptors der Honigbiene

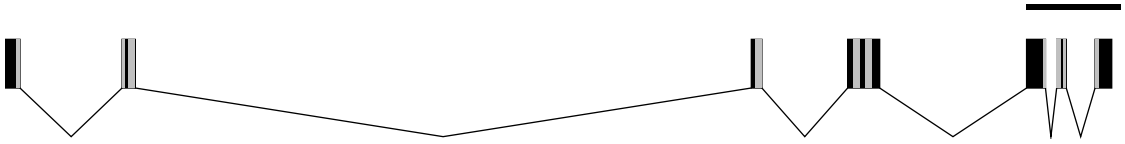
3.1.1 Isolierung und Charakterisierung der Am*tyr*2-Rezeptor-cDNA

Die vollständige Rezeptor-cDNA des putativen AmTyr2-Rezeptors konnte amplifiziert und anschließend sequenziert werden. Die cDNA besitzt einen offenen Leserahmen von 1218 bp. Im Vergleich zu der genomischen Sequenz (Referenznummer NCBI: NC_007070.3), setzt sich dieser aus sieben Exons zusammen, welche auf dem Chromosom LG1 liegen. Die Intron/Exon- bzw. Exon/Introngrenzen befinden sich in den Regionen welche für die Transmembrandomäne 1, die extrazelluläre Schleife 1, die cytoplasmatischen Schleifen 2 und 3 und die Transmembrandomänen 6 und 7 kodieren (Tab. 1).

Tab. 1 Genomische Organisation des Am*tyr*2-Rezeptorgens. Die Tabelle zeigt die Merkmale der Exons. Intronsequenzen sind in Kleinbuchstaben und Exonsequenzen in Großbuchstaben dargestellt. Das Schema zeigt die genomische Struktur. Die schwarzen Rechtecke stellen die Exons, die abgewinkelten Linien stellen die Introns dar. Grau hinterlegt sind die Bereiche, welche für die Transmembrandomänen kodieren. Der Maßstabsbalken entspricht einer Länge von 1 000 Basen.

Exon	Länge	cDNA-Position	Genom-Position	Spleiß-Akzeptor	Spleiß-Donor
I	156 bp	1 – 156	27343575 - 27343730	-	CTATA/gtaag
II	138 bp	157 – 294	27344801 – 27344938	gacag/GTGGG	TACAG/gtata
III	113 bp	295 – 407	27351394 – 27351506	cgaag/CTCAC	CACAG/gtgag
IV	334 bp	408 – 741	27352406 – 27352739	tcaag/GTATC	TCTTG/gtaag
V	196 bp	742 – 937	27354277 – 27354472	cgcag/ATCGA	CGTAG/gtagg
VI	105 bp	938 – 1042	27354590 – 27354694	tctag/GTGGA	GCTAG/gtagc
VII	176 bp	1043 – 1218	27354994 - 27355169	ttcag/GGTGG	-

Schema:



3.1.2 Aminosäuresequenz und Proteinstruktur

Die cDNA-Sequenz des putativen AmTyr2-Rezeptors kodiert für ein 405 Aminosäuren langes und 45,2 kDa schweres Protein. Mit dieser Aminosäuresequenz wurden bioinformatische Strukturanalysen durchgeführt, um die Anzahl möglicher Transmembrandomänen abzuleiten. Mit der Hydrophobizitätsanalyse nach KYTE & DOOLITTLE (1982) konnten sieben potentielle Transmembrandomänen identifiziert werden (Abb. 3A). Ein ähnliches Ergebnis lieferte die Transmembrandomänenvorhersage mit dem TMHMM Server v. 2.0 (Abb. 3B).

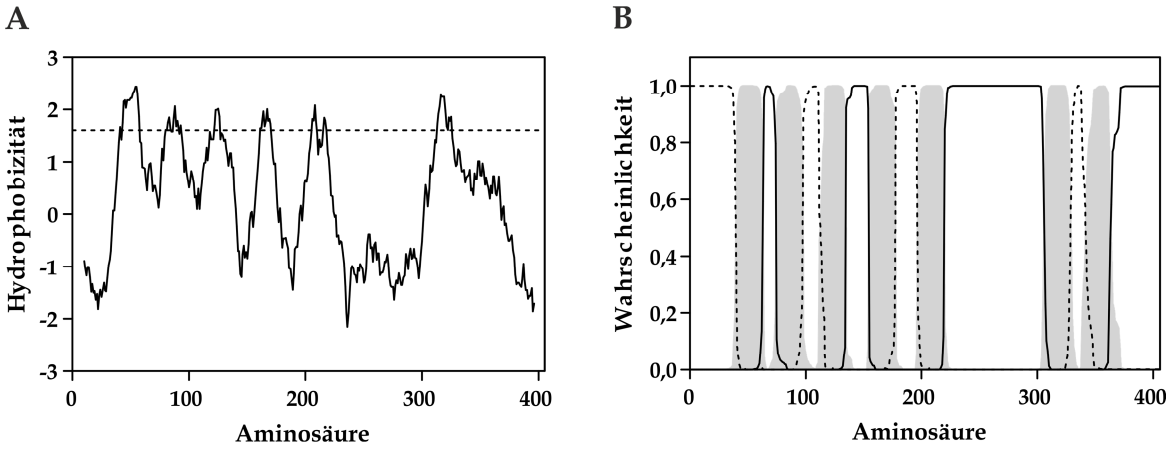


Abb. 3 Strukturelle Eigenschaften der abgeleiteten AmTyr2-Rezeptor Aminosäuresequenz.
A: Hydrophobizitätsanalyse nach KYTE & DOOLITTLE (1982). Die Fensterbreite betrug 19 Aminosäuren. Hydrophobizitätswerte über 1,6 deuten auf potentielle Transmembranbereiche hin.
B: Transmembrandomänenvorhersage des TMHMM Server v. 2.0. Putative Transmembrandomänen sind grau hinterlegt, extrazelluläre Bereiche werden durch eine gestrichelte Linie, intrazelluläre Bereiche durch eine durchgehende Linie dargestellt.

Entsprechend der allgemeinen Eigenschaften von GPCRs ist auch hier der *N*-Terminus extrazellulär lokalisiert und besitzt eine Länge von 39 Aminosäuren. Der *C*-Terminus besitzt eine Länge von 43 Aminosäuren und ist intrazellulär lokalisiert. Die Transmembrandomänen haben eine Länge von jeweils 22 Aminosäuren und sind alternierend durch intra- und extrazelluläre Schleifen miteinander verbunden. Hierbei ist die dritte cytoplasmatische Schleife (CPL, *cytoplasmatic loop*) mit 87 Aminosäuren auffallend lang. Die Aminosäuresequenz weist Stellen für posttranslationale Modifikationen auf (Abb. 4). So finden sich im *N*-Terminus drei potentielle *N*-Glykosylierungstellen mit der Konsensussequenz N-X-S/T (X ≠ P): N_3QTA, N_{16}HTV und N_{34}WTD. In der zweiten cytoplasmatischen Schleife und im *C*-Terminus befinden sich mit den Motiven RR-X-S/T und KK-X-S/T Phosphorylierungsstellen für die Proteinkinase A: RR_{150}RS und KK_{400}DT.

Potentielle Phosphorylierungsstellen für die Proteinkinase C mit der Konsensussequenz S/T-X-R/K finden sich sowohl in den intrazellulären Schleifen: T_{64}TR, T_{65}RR, S_{147}RR, S_{152}KR, T_{183}NR, S_{253}IR, T_{280}SK und S_{281}KK als auch im *C*-Terminus: T_{374}CR, S_{388}NR und T_{402}TR. In diesem existiert auch ein Cysteinrest: C_{378}, welcher nach Palmitoylierung in der Zellmembran verankert werden kann und so zu einer vierten cytoplasmatischen Schleife führt. Cysteine an den Positionen C_{111}, C_{178} und C_{190} in den ersten beiden extrazellulären Schleifen können zur Ausbildung von Disulfidbrücken führen. In der Sequenz findet sich am Übergang von der Transmembrandomäne 3 in die CPL2 ein DRY-Motiv (D_{135}RY) und in der Transmembrandomäne 7 ein NPXXY-Motiv (N_{355}PFIY). Beide Motive sind in Rhodopsin-ähnlichen GPCRs (Klasse A) hoch konserviert (EILERS ET AL. 2005). Weitere wichtige Aminosäuren, welche in GPCRs der Klasse A hochkonserviert sind, finden sich ebenfalls in der AmTyr2-Rezeptorsequenz: N_{55}, S_{78}, A_{80}, A_{82}, D_{83}, A_{124} und A_{299}. An Position 118 befindet sich ein Asparaginsäurerest, an den Positionen 202 und 206 jeweils ein Serin und an den Positionen 315, 322 und 323 ein Phenylalanin.

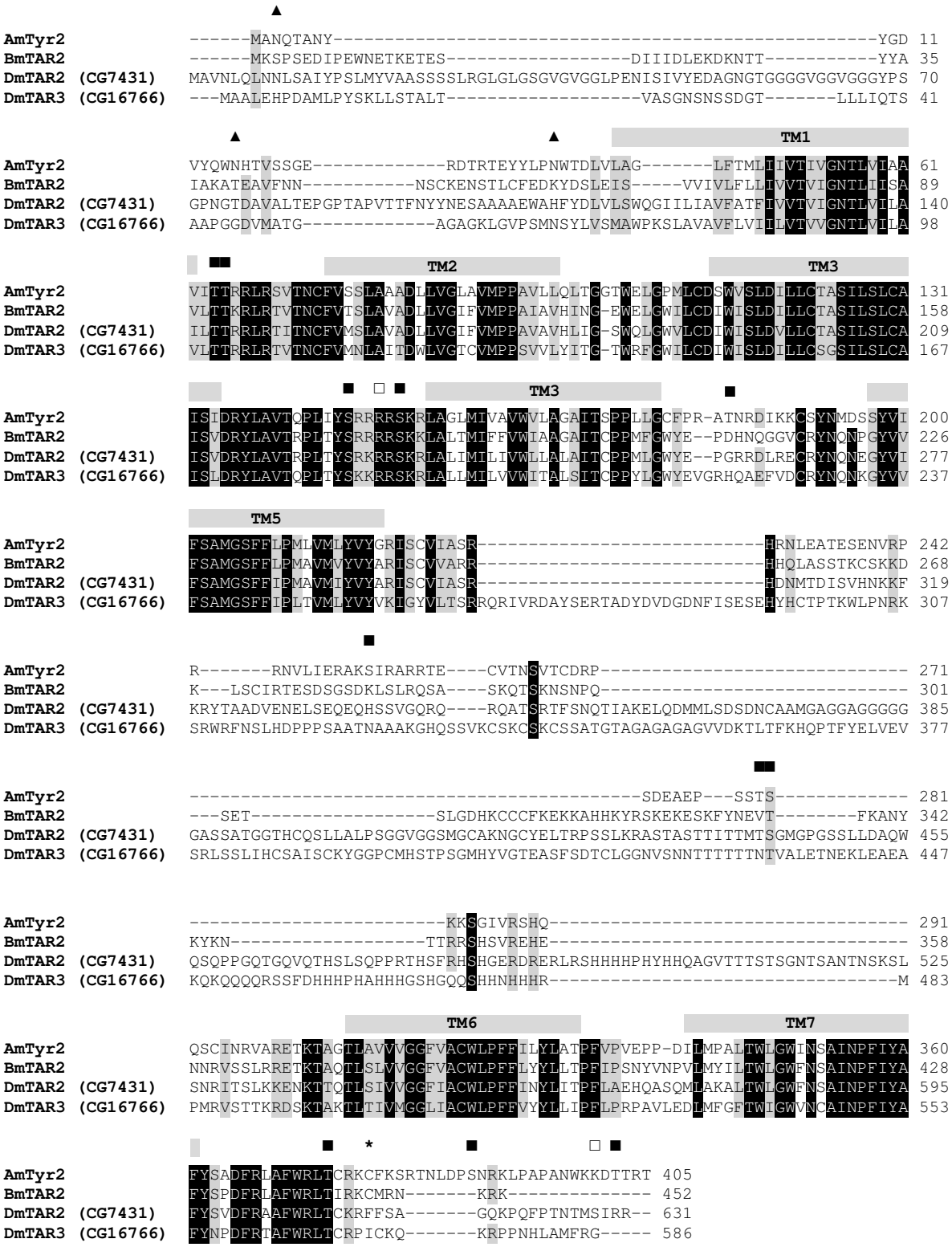


Abb. 4 Alignment durch automatische Alinierung nach dem ClustalW-Algorithmus und Vergleich der Aminosäuren mit der Ähnlichkeitsmatrix PAM-250. Dargestellt sind die identifizierten und charakterisierten Tyramin-2-Rezeptoren von *Apis mellifera* (AmTyr2), *Bombyx mori* (BmTAR2; BAI52937) und *Drosophila melanogaster* (DmTAR2 (CG7431), AAF55463; DmTAR3 (CG16766), NP_650651). Identische Aminosäuren sind schwarz, konservativ substituierte Aminosäuren grau hinterlegt. Putative Transmembrandomänen (TM) stehen über der AmTyr2-Rezeptorsequenz. Konsensusstellen für posttranslationale Modifikationen: N-Glykosylierung (▲), Proteinkinase A (□), Proteinkinase C (■), C-Palmitoylierung (*).

3.1.3 Phylogenetische Analyse des AmTyr2-Rezeptors

Anhand der Aminosäuresequenzen von bislang charakterisierten Tyraminrezeptoren verschiedener Organismen konnte die phylogenetische Verwandtschaft des putativen AmTyr2-Rezeptors untersucht werden. AmTyr2 bildet mit den Tyramin-2-Rezeptoren anderer Insekten eine gemeinsame Gruppe (Abb. 5). Der höchste Homologiegrad wurde zwischen den Tyramin-2-Rezeptoren von *Bombyx mori* und *D. melanogaster* gefunden. Die Tyramin-1-Rezeptoren um den AmTyr1-Rezeptor bilden eine eigenständige Gruppe.

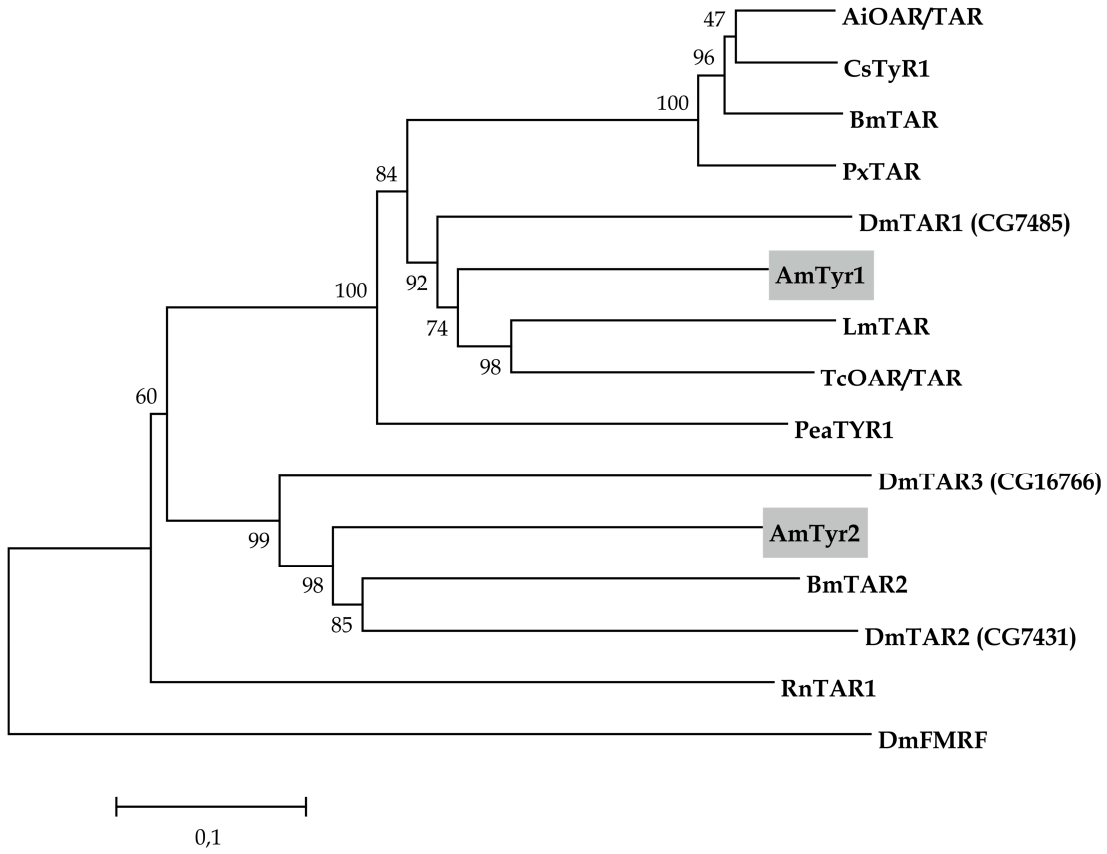


Abb. 5 Phylogramm charakterisierter Tyraminrezeptoren verschiedener Organismen. Die Alinierung der kompletten Aminosäuresequenzen erfolgte mit dem ClustalW-Algorithmus. Das Phylogramm wurde durch die distanzbasierte *Neighbor-Joining*-Methode erstellt (*p*-Distanz-Modell, *Bootstrap* = 10 000). Der FMRF-Rezeptor von *Drosophila melanogaster* wurde als Außengruppe gewählt. Die Zahlen an den Knoten der Äste zeigen die Bootstrapwerte in Prozent. Die Astlänge zeigt die genetische Distanz (0,1 = 10 % genetische Distanz). Ai = *Agrotis ipsilon*, Am = *Apis mellifera*, Bm = *Bombyx mori*, Cs = *Chilo suppressalis*, Dm = *Drosophila melanogaster*, Lm = *Locusta migratoria*, Pea = *Periplaneta americana*, Px = *Papilio xuthus*, Rn = *Rattus norvegicus*, Tc = *Tribolium castaneum*. Die Angabe der GenBank-Nummer der verwendeten Aminosäuresequenzen erfolgt in alphabetischer Reihenfolge: AiOAR/TAR: ACN12797.1, AmTyr1: NP_001011594.1, BmTAR: BAD11157.1, BmTAR2: BAI52937.1, CsTyR1: AFG26689.1, DmFMRF: AGB94042.1, DmTAR1: ACZ94765.1, DmTAR2 (CG7431): AAF55463.1, DmTAR3 (CG16766): NP_650651.1, LmTAR: CAA49269.1, PeaTYR1: CAQ48240.1, PxTAR: BAD72869.1, RnTAR1: NP_599155.1, TcOAR/TAR: NP_001164312.1. Die Tyraminrezeptoren von *A. mellifera* sind grau hinterlegt.

Durch den paarweisen Vergleich konnte die Identität bzw. Ähnlichkeit zwischen der vollständigen Aminosäuresequenz des AmTyr2-Rezeptors und des AmTyr1-Rezeptors analysiert werden. Es ergibt sich eine Identität von 36 % und eine Ähnlichkeit von 52 %. Analog zur phylogenetischen Analyse zeigte der AmTyr2-Rezeptor eine höhere Identität und Ähnlichkeit zu den Tyramin-2-Rezeptoren von *D. melanogaster* (58 %/74 %) und *B. mori* (52 %/67 %).

3.1.4 Immunologischer Nachweis des AmTyr2-Rezeptorproteins

Funktionalität des Antikörpers anti-AmTyr2 gegen das AmTyr2-Rezeptorprotein in Western Blot Analysen

Für den Nachweis des AmTyr2-Rezeptorproteins in Zell- und Gewebeproben, sowie die Lokalisierung in Gehirnschnitten von Honigbienen wurde ein polyklonaler Antikörper gegen die CPL3 des Rezeptors generiert und affinitätschromatographisch aufgereinigt. In Abbildung 6A ist das Ergebnis einer Western Blot Analyse des Immunisierungsverlaufs unter Verwendung der entsprechenden Seren dargestellt. Mit zunehmender Immunisierungsdauer erhöhte sich ebenfalls die Anzahl markierter Proteinbanden, was auf eine erhöhte Immunantwort hindeutete. Nach der Aufreinigung des Antikörpers (anti-AmTyr2) wurde eine einzelne Bande bei ca. 75 kDa in Gehirnhomogenaten von Sammlerinnen detektiert (Abb. 6A). Dies weicht von der errechneten Größe des AmTyr2-Rezeptors (ca. 45 kDa) ab. Anschließend wurde die Spezifität des anti-AmTyr2-Antikörper getestet. Erfolgte eine Präadsorption des anti-AmTyr2-Antikörpers gegen das zur Immunisierung verwendete MBP-Fusionsprotein, verschwand die markante Bande (Abb. 6B). Der Antikörper markierte ebenfalls eine Bande bei ca. 75 kDa in flpTM Zellen, welche mit dem AmTyr2-Rezeptor transfiziert wurden (Abb. 6C). In nicht transfizierten Zellen erfolgte keine Markierung. Vergleichbare Ergebnisse zeigte auch ein Antikörper gegen das eingefügte HA-Tag (Abb. 6C). Durch PNGase-F Behandlung wurde eine Verschiebung der markanten Bande von 75 kDa auf ca. 45 kDa erzielt, was der errechneten Größe des AmTyr2-Rezeptorproteins entspricht (siehe 3.1.2). Dies deutet auf eine Glykosylierung des Rezeptors sowohl im Bienengewebe als auch in den transfizierten Zellen hin. Die zweite Bande in den transfizierten Zellen bei ca. 35 kDa konnte in den Gewebeproben von Sammlerinnen nicht nachgewiesen werden. Es handelt sich hier vermutlich um ein Abbauprodukt. Im Bienengewebe zeigte sich nach PNGase-F Behandlung keine Verschiebung der markierten Bande (nicht abgebildet).

Die dargestellten Western Blot Analysen deuten darauf hin, dass es sich bei dem anti-AmTyr2-Antikörper um einen spezifischen Antikörper handelt.

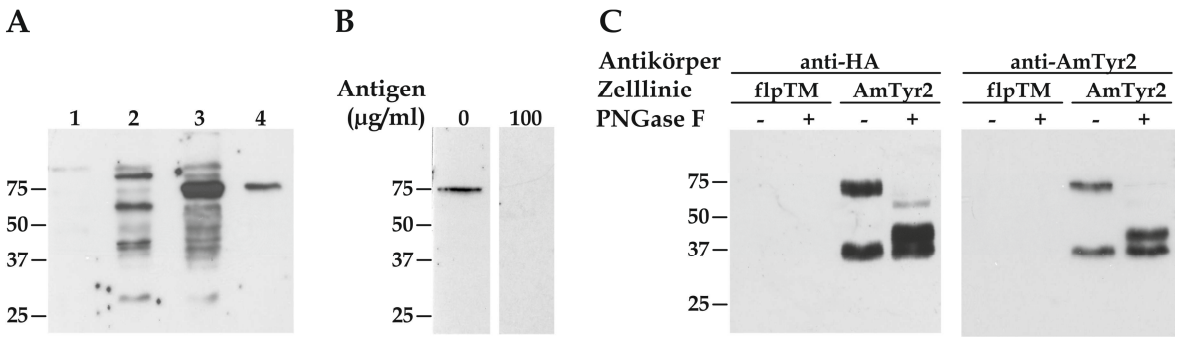


Abb. 6 Funktionalität des Antikörpers gegen das AmTyr2-Rezeptorprotein im Western Blot. **A:** Untersuchung des Immunisierungsverlaufs. Pro Bahn wurden 10 µl Gehirnhomogenat einer Sammlerin aufgetragen: Präimmunserum (1) 1:5 000, Serum 61. Immunisierungstag (2) 1:5 000, Serum 85. Immunisierungstag (3) 1:5 000, affinitätsgereinigter Antikörper (4) 1:2 000 **B:** Präadsorptionsexperiment. Pro Bahn wurden 10 µl Gehirnhomogenat einer Sammlerin aufgetragen. Verwendet wurde der anti-AmTyr2-Antikörper (1:1 000) unbehandelt und präadsorbiert gegen 100 µg/ml des AmTyr2-MBP-Fusionsproteins **C:** Analyse mit Membranproteinen der Zelllinien. Pro Bahn wurden 5 µg Membranprotein der jeweiligen Zelllinie aufgetragen: nichttransfiziert (flpTM), mit dem AmTyr2-Rezeptor transfiziert (AmTyr2). Eine Probe wurde mit PNGase behandelt (+), die andere nicht (-). Zur Immundetektion wurden der anti-HA-Antikörper (1:5 000) und der anti-AmTyr2-Antikörper (1:5 000) verwendet.
Als Sekundärantikörper wurden jeweils der anti-guineapig HRP (1:10 000) und der anti-rat HRP (1:10 000) eingesetzt. Die Größenangabe erfolgt in kDa.

Gewebs- und organspezifischer Nachweis des AmTyr2-Rezeptorproteins auf Western Blots

Der anti-AmTyr2-Antikörper wurde verwendet, um die Rezeptorexpression in verschiedenen Gehirnbereichen und Körpergeweben von Honigbienen nachzuweisen. Die 75 kDa-Bande konnte in allen untersuchten Gehirnbereichen (optische Loben, Zentralgehirn, Antennalloben und Subösophagealganglion) detektiert werden (Abb. 7).

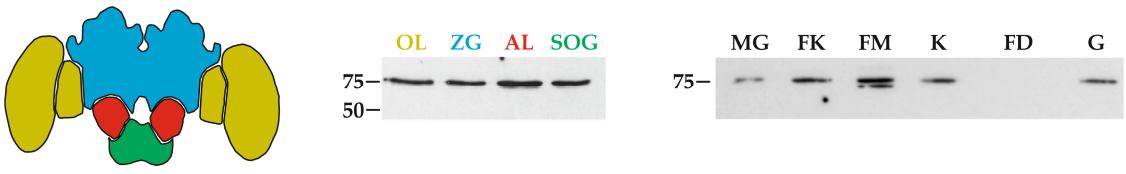


Abb. 7 Western Blot-Analyse zur Gewebeverteilung des AmTyr2-Rezeptorproteins in Honigbienen-Arbeiterinnen. Pro Bahn wurden 5 µl Gesamtprotein einer Sammlerin aufgetragen. Verwendet wurden der anti-AmTyr2-Antikörper (1:2 000) und der anti-guineapig HRP (1:10 000). **OL** optische Loben, **ZG** Zentralgehirn mit Pilzkörpern, **AL** Antennalloben, **SOG** Subösophagealganglion (die Farben entsprechen den Gehirnregionen in dem Schema). **MG** Malpighische Gefäße, **FK** Fettkörper, **FM** Flugmuskulatur, **K** Kropf, **FD** Futtersaftdrüsen, **G** Gehirn. Die Größenangabe erfolgt in kDa.

Zudem wurde sie in den Malpighischen Gefäßen, dem Fettkörper, der Flugmuskulatur und dem Kropf nachgewiesen. In den Futtersaftdrüsen zeigte sich keine Markierung (Abb. 7). Dies deutet darauf hin, dass der Rezeptor nicht nur im Nervengewebe lokalisiert ist.

Immunhistochemische Lokalisierung des AmTyr2-Rezeptorproteins im Gehirn

Für die exakte Lokalisierung des Rezeptorproteins im Bienengehirn erfolgten immunhistochemische Färbungen von Vibratomschnitten mit dem anti-AmTyr2-Antikörper. Abbildung 8 zeigt eine repräsentative Markierung von mehreren gefärbten Gehirnen. Eine AmTyr2-ähnliche Markierung war in allen untersuchten Gehirnteilen nachweisbar. Markante Färbungen zeigten sich in den Pilzkörpern, den optischen Loben, den Antennalloben und dem Zentralkomplex. Bei Analysen ohne Primärantikörper anti-AmTyr2 war keine Markierung detektierbar (nicht abgebildet).

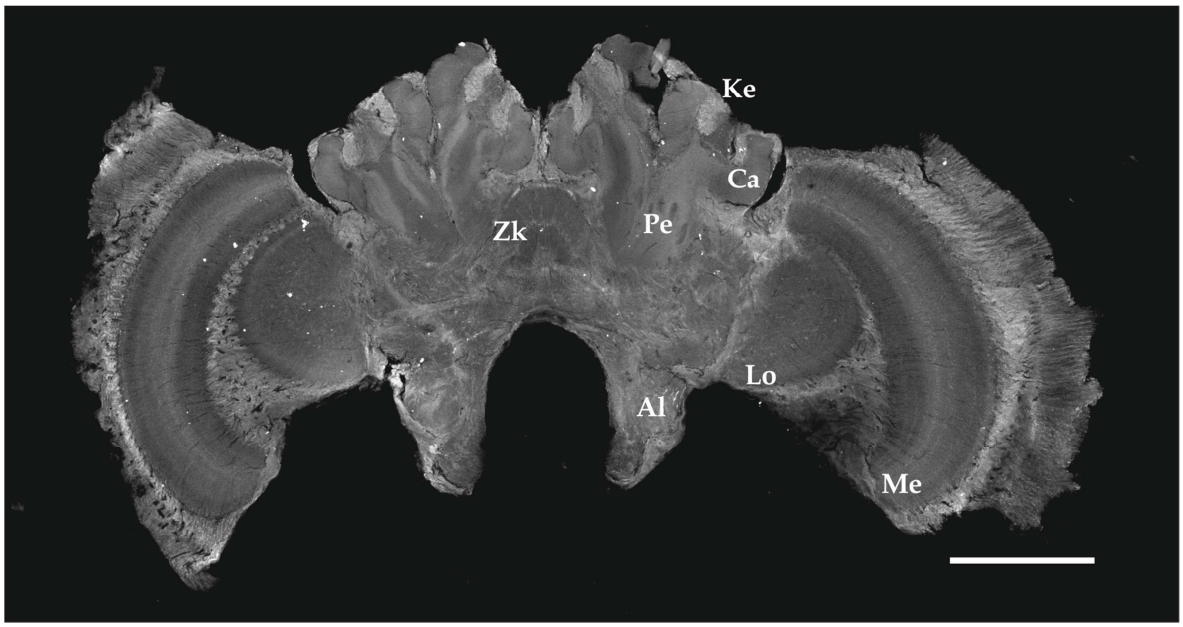


Abb. 8 AmTyr2-ähnliche Markierung im Gehirn der Honigbiene. Verwendet wurden der anti-AmTyr2-Antikörper (1:200) und der anti-guineapig Cy3 (1:200). Eine markante Färbung zeigte sich in den optischen Loben, den Pilzkörpern, den Antennalloben und dem Zentralkomplex. Al = Antennallobus, Ca = Calyx, Ke = Kenyon Zellen, Lo = Lobula, Me = Medulla, Pe = Pedunculus, Zk = Zentralkomplex. Die Aufnahme repräsentiert die Projektion von Bildstapeln (Gesamtdicke 30 µm). Der Maßstabsbalken entspricht 300 µM.

In den optischen Loben war eine AmTyr2-ähnliche Immunreaktivität in der Medulla und der Lobula erkennbar (Abb. 9A). Die stärkste Markierung zeigte sich im Bereich des ersten optischen Chiasma (zwischen Lamina und Medulla) und des zweiten optische Chiasma

(zwischen Medulla und Lobula). In der Medulla war eine deutliche Strukturierung zu sehen. Nach RIBI & SCHEEL (1981) handelt es sich um sechs distinkte Schichten. Die Schichten 3 und 5 zeigten die intensivste AmTyr2-ähnliche Färbung. Eine Detailaufnahme der Pilzkörper ist in Abbildung 9B dargestellt. Die Benennung der Strukturen erfolgte nach STRAUSFELD (2002). AmTyr2-ähnliche Markierungen waren in den Klasse I Kenyon Zellen innerhalb der Calyces und den Klasse II Kenyon Zellen außerhalb der Calyces sichtbar. Die Zellkörper der Klasse I Kenyon Zellen des Basalrings im Zentrum der Calyces zeigten dabei eine weniger markante Färbung als die Zellkörper der Lippe und des Kragens. In den jeweiligen Zellkernen wurde keine Markierung beobachtet. Lippe und Kragen der Pilzkörpercalyces wiesen eine gleichmäßige aber deutlich schwächere Färbung als die Perikaryen der Kenyon Zellen auf. In den nicht zentralen Bereichen der Pedunculi war ebenfalls eine AmTyr2 Immunreaktivität zu sehen. Bei einem Vergleich zwischen dem medialen und dem lateralen Calyx eines Pilzkörpers zeigten sich keine sichtbaren Unterschiede in der Färbung (Abb. 11A).

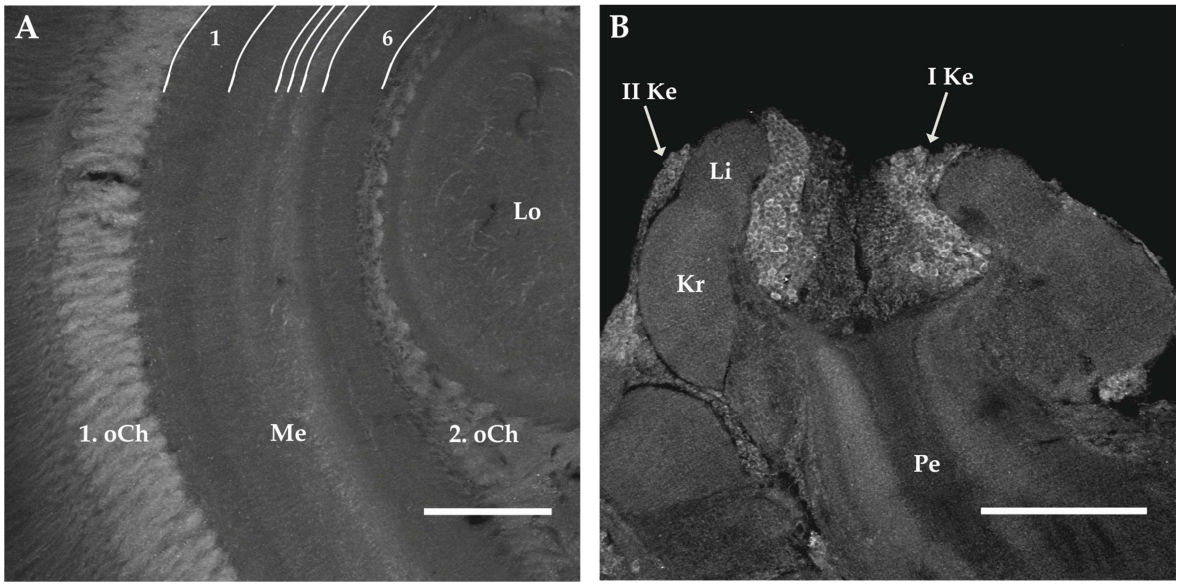


Abb. 9 AmTyr2-ähnliche Immunreaktivität im optischen Lobus und dem Pilzkörper von *A. mellifera*. **A:** Vibratomschnitt des optischen Lobus gefärbt mit anti-AmTyr2 (1:200) und anti-guineapig-Cy3 (1:200). Eine deutliche Markierung zeigte sich im ersten und zweiten optischen Chiasma, in verschiedenen Schichten der Medulla und in der Lobula. Zur Orientierung sind die Schichten 1 und 6 in der Medulla beschriftet. **B:** Vibratomschnitt des Pilzkörpers gefärbt mit anti-AmTyr2 (1:200) und anti-guineapig-Cy3 (1:200). Eine Markierung wurde in den Klasse I und II Kenyon Zellen sowie dem Pedunculus beobachtet. Die Aufnahmen repräsentieren die Projektion von Bildstapeln (Gesamtdicke 30 µm). Der Maßstabsbalken entspricht 100 µm. Abkürzungen: I Ke = Klasse I Kenyon Zellen, II Ke = Klasse II Kenyon Zellen, Kr = Kragen, Li = Lippe, Lo = Lobula, Me = Medulla, oCh = optisches Chiasma, Pe = Pedunculus.

Deutliche AmTyr2-ähnliche Färbungen konnten ebenfalls im Zentralkomplex beobachtet werden. Dieser gliedert sich in die Protocerebralbrücke und den Zentralkörper. Hier war die stärkste AmTyr2 Immunreaktivität in der Protocerebralbrücke zu sehen. Der obere Teil des Zentralkörpers zeigte keine Markierung, während sich im unteren Teil deutlich gefärbte Fasern präsentierten (Abb. 10A). Dabei handelt es sich vermutlich um Verzweigungen von einem oder mehreren Neuronen. Auffällig war die starke Färbung von zwei punktförmigen Strukturen über dem oberen Teils des Zentralkörpers. Eine eindeutige Identifizierung dieser Struktur erwies sich als schwierig. Möglicherweise handelt es sich um Teile der anterioren Kommissur (MERCER ET AL. 1983) oder um die paarig angelegten anterioren Faserbündel (HOMBERG 1985).

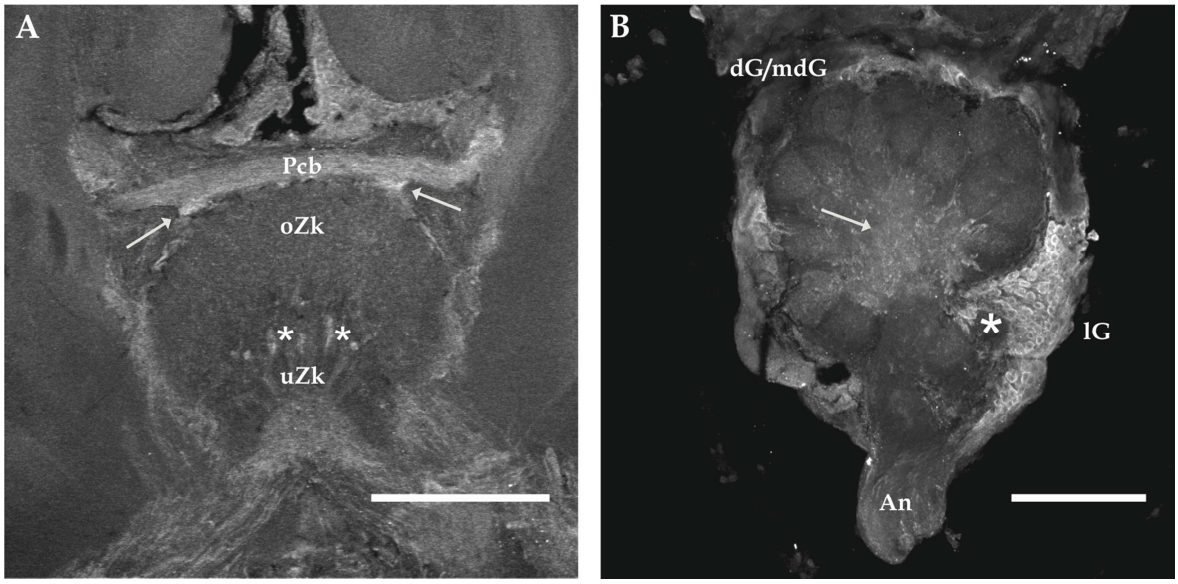


Abb. 10 AmTyr2-ähnliche Immunreaktivität im Zentralkomplex und dem Antennallobus von *A. mellifera*. **A:** Vibratomschnitt des Zentralkomplexes gefärbt mit anti-AmTyr2 (1:200) und anti-guineapig-Cy3 (1:200). Eine deutliche Markierung zeigte sich in der Protocerebralbrücke, dem unteren Zentralkörper (*) und zwei punktförmigen Strukturen zwischen Zentralkörpers und Protocerebralbrücke (Pfeile). **B:** Vibratomschnitt des Antennallobus gefärbt mit anti-AmTyr2 (1:200) und anti-guineapig-Cy3 (1:200). Eine Markierung wurde in den Faserknäulen (Pfeil) innerhalb der Antennalloben und in den umgebenden Neuronen der lateralen, dorsalen bzw. mediodorsalen Gruppe beobachtet. Die laterale Passage ist mit einem Sternchen markiert. Die Aufnahmen repräsentieren die Projektion von Bildstapeln (Gesamtdicke 30 µm). Der Maßstabsbalken entspricht 100 µm. Abkürzungen: An = Antennalnerv, dG/mdG = dorsale bzw. mediodorsale Gruppe von Neuronen, lG = laterale Gruppe von Neuronen, oZk = oberer Zentralkörper, Pcb = Protocerebralbrücke, uZk = unterer Zentralkörper

In den Antennalloben wiesen die peripheren Neuronen der lateralen Gruppe eine starke AmTyr2-ähnliche Immunreaktivität auf, ähnlich der Kenyon Zell-Markierung in den Pilzkörpern. Auch hier sind die jeweiligen Zellkerne ungefärbt (Abb. 10B). Die Neurone der dorsalen bzw. mediodorsalen Gruppe zeigten keine eindeutige Markierung. Innerhalb

der Antennalloben konnte eine AmTyr2-ähnliche Markierung im zentralen Faserknäuel detektiert werden. Dabei handelt es sich um die Axone der lateralen Neurone, die das Zentrum über die laterale Passage erreichen (Abb. 10B). Im Subösophagealganglion war keine distinkte AmTyr2-ähnliche Markierung zu beobachten (nicht abgebildet).
Kontrollexperimente dienten dem Nachweis der Spezifität des anti-AmTyr2-Antikörpers im Gewebe. Ohne Verwendung des primären Antikörpers konnte keine Färbung detektiert werden (Abb. 11A, B). Erfolgte eine Präadsorption des anti-AmTyr2-Antikörpers gegen das zur Immunisierung verwendete MBP-Fusionsprotein ist die Markierung deutlich schwächer (Abb. 11C, D).

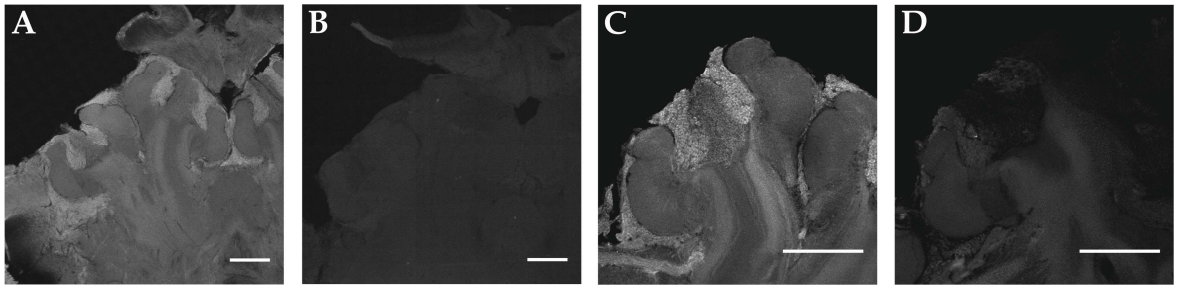


Abb.11 Kontrollexperimente zur Feststellung der Spezifität des anti-AmTyr2-Antikörpers (beispielhaft dargestellt in den Pilzkörpern). A: Vibratomschnitt gefärbt mit anti-AmTyr2 (1:200) und anti-guineapig-Cy3 (1:200) **B:** Kontrollexperiment zu A, ohne Primärantikörper **C:** Vibratomschnitt gefärbt mit anti-AmTyr2 (1:200) und anti-guineapig-Cy3 (1:100) **D:** Kontrollexperiment zu C, Primärantikörper präadsorbiert gegen 1 mg/ml AmTyr2-MBP-Fusionsproteins. Die Aufnahmen repräsentieren die Projektion von Bildstapeln (Gesamtdicke 30 µm). Der Maßstabsbalken entspricht 100 µm.

Expression des AmTyr2-Rezeptorproteins in flpTM Zellen

Die Expression und Verteilung des Rezeptorproteins wurde mit immunzytochemischen Färbungen an konstitutiv transfizierten flpTM Zellen (flpTM-AmTyr2 Zelllinie) untersucht. Dies sollte die Spezifität des Antikörpers unterstreichen und die Grundlage für die pharmakologische Charakterisierung schaffen. Die flpTM-AmTyr2 Zellen wurden mit dem anti-AmTyr2-Antikörper und dem anti-HA-Antikörper inkubiert. Die Mehrzahl der fixierten Zellen zeigten eine Markierung in der Zellperipherie (Abb. 12A und D). Die Kontrollexperimente ohne primären Antikörper und in nicht transfizierten flpTM Zellen (flpTM Zelllinie) zeigten keine messbare Markierung bei gleichen Aufnahmebedingungen (Abb. 12B und C).

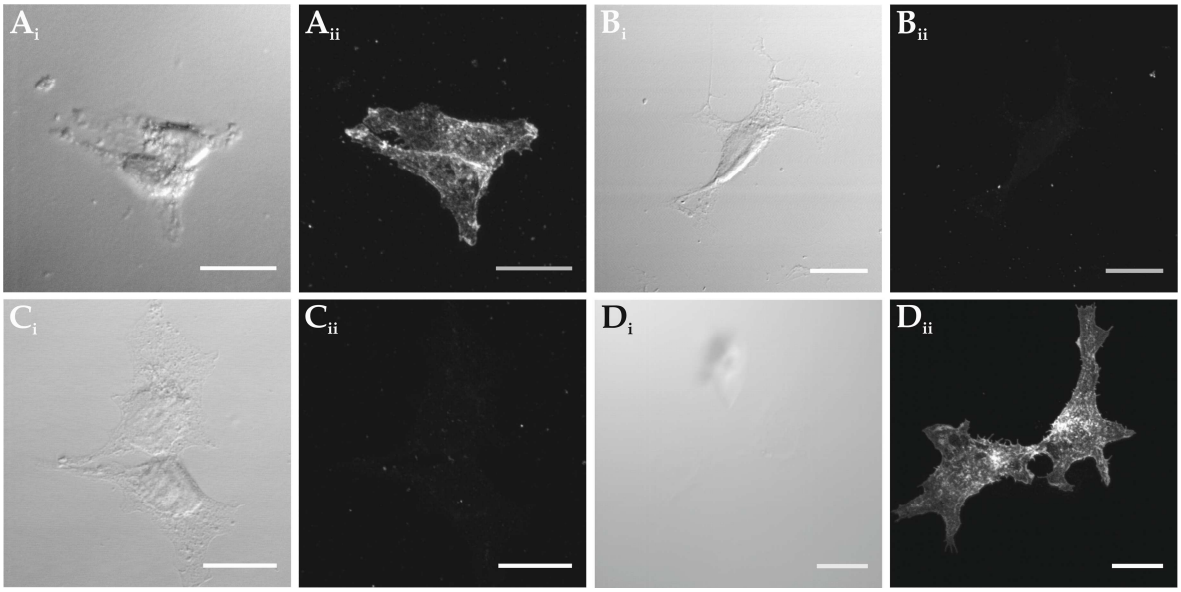


Abb. 12 Nachweis des AmTyr2-Rezeptorproteins in konstitutiv transfizierten Zellen. A: flpTM-AmTyr2 Zellen mit anti-AmTyr2 (1:200) und anti-guineapig Cy3 (1:200) inkubiert und mit differentiellem Interferenzkontrast (A_i) und unter Fluoreszenz (A_{ii}) aufgenommen. **B:** Kontrollexperiment zu A, ohne primären Antikörper. **C:** nicht transfizierte flpTM-Zellen mit anti-AmTyr2 (1:200) und anti-guineapig Cy3 (1:200) inkubiert und mit differentiellem Interferenzkontrast (C_i) und unter Fluoreszenz (C_{ii}) aufgenommen. **D:** flpTM-AmTyr2 Zellen mit anti-HA (1:100) und anti-rat Cy3 (1:200) inkubiert und mit differentiellem Interferenzkontrast (D_i) und unter Fluoreszenz (D_{ii}) aufgenommen. Der dargestellte Maßstabsbalken entspricht 15 µm.

3.1.5 Funktionelle und pharmakologische Charakterisierung des AmTyr2-Rezeptors

Zur Untersuchung der pharmakologischen Eigenschaften des AmTyr2-Rezeptors sowie der beteiligten Signalkaskaden wurde eine Zelllinie hergestellt, die den Rezeptor und einen CNG-Kanal, welcher durch cAMP geöffnet wird (siehe 2.6), konstitutiv exprimiert. Die Expression des Rezeptors konnte mit einem spezifischen Antikörper in Western Blot Analysen, sowie immunzytochemisch nachgewiesen werden (siehe 3.1.4). Voruntersuchungen hatten gezeigt, dass die Inkubation der Zelllinie mit Tyramin zu einem Anstieg der Fluoreszenzsignale führte. Dieser Effekt beruht auf dem Anstieg des $[cAMP]_i$ und der daraus resultierenden Öffnung der CNG-Kanäle, durch die Ca^{2+} in die Zelle fließen kann (siehe 2.6). Wurden die Zellen in calciumfreiem ES mit Tyramin inkubiert, wurde keine Änderung der Fluoreszenzsignale beobachtet (nicht abgebildet).

Ligandenspezifität

Die Ligandenspezifität des AmTyr2-Rezeptors wurde durch die Inkubation der flpTM- und flpTM-AmTyr2 Zelllinien mit verschiedenen biogenen Aminen untersucht. Nach der Zugabe von je 1 µM Histamin, Dopamin oder Serotonin wurde im Vergleich zu

Kontrollzellen keine Änderung der Fluoreszenzsignale in der flpTM-AmTyr2 Zelllinie beobachtet (Abb. 13A). Die Zugabe von Tyramin und Octopamin führte zu einem deutlichen Anstieg des Fluoreszenzsignals, wobei der Effekt für Tyramin größer war als für Octopamin (Abb. 13A). Die Erhöhung der Ligandenkonzentration auf 10 µM führte zu einer Zunahme des Fluoreszenzsignals bei Octopamin und Dopamin, während das Signal nach Zugabe von 10 µM Tyramin in etwa den Wert erreichte wie nach der Zugabe von 1 µM Tyramin (Abb. 13B). In diesen Experimenten wurde auch eine Zunahme des Fluoreszenzsignals bei der Inkubation der flpTM-Zellen beobachtet. Diese Effekte können auf der Expression endogener GPCRs in den flpTM-Zellen zurückzuführen sein (siehe ATWOOD ET AL. 2011).

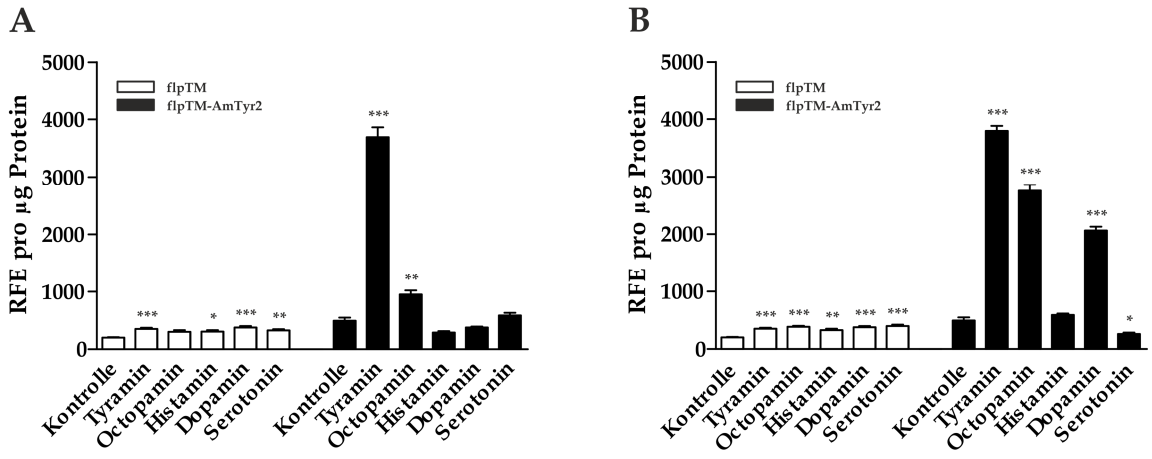


Abb. 13 Einfluss verschiedener biogener Amine auf die intrazelluläre cAMP-Konzentration. Dargestellt ist die Änderung der Fluoreszenzsignale (RFE, relative Fluoreszenzeinheiten) nach Zugabe unterschiedlicher Konzentrationen biogener Amine auf flpTM Kontrollzellen (weiße Balken) und flpTM-AmTyr2 Zellen (schwarze Balken). Die Werte wurden auf die Proteinmenge normiert. Mittelwerte wurden aus einer Achtfachbestimmung gebildet. Die Fehlerbalken zeigen den Standardfehler an. **A:** Effekt bei einer Ligandenkonzentration von 1 µM. **B:** Effekt bei einer Ligandenkonzentration von 10 µM. Signifikante Unterschiede zur jeweiligen Kontrolle (keine Ligandenzugabe) sind durch Sterne gekennzeichnet (*: $P \leq 0.05$, **: $P \leq 0.01$, ***: $P \leq 0.001$; einfaktorielle ANOVA, Tamhane bzw. Scheffé Post-Hoc Test). Signifikante Änderungen in den flpTM-Zellen können auf endogene GPCRs zurückzuführen sein.

Wirkung von Agonisten

Zur weiteren Charakterisierung des AmTyr2-Rezeptors wurden Dosis-Wirkungs-Kurven für Tyramin und Octopamin an der flpTM-Amtyr2 Zelllinie erstellt. Dazu wurden die Liganden in Konzentrationen von 10^{-9} M bis 10^{-4} M zugegeben und die Änderung der Ca^{2+}-induzierten Fluo-4 Fluoreszenz gemessen (Abb. 14A). Für die Auswertung der Dosis-Wirkungs-Kurven wurde der Fluoreszenzwert, welcher mit 10^{-4} µM Tyramin erreicht wurde, gleich 100 % gesetzt und alle anderen Messwerte darauf berechnet. Die

Dosis-Wirkungs-Kurve für Tyramin ist sigmoidal und sättigt bei Ligandenkonzentrationen ≥ 10^{-6} M. Die Ligandenkonzentration, welche zur halbmaximalen Aktivierung des AmTyr2-Rezeptors führt (EC_{50}), betrug für Tyramin $1{,}552 \times 10^{-8}$ M und für Octopamin 2×10^{-5} M (Tab. 2). Es ist bemerkenswert, dass die Fluoreszenzsignale selbst bei der Zugabe der höchsten Octopamin Konzentration noch nicht sättigen (Abb. 14A). Bei der Inkubation der flpTM Kontrollzellen mit Tyramin wurde keine Änderung der Fluoreszenzsignale beobachtet (Abb. 14A). Die beschriebenen Ergebnisse zeigen, dass es sich bei dem AmTyr2-Rezeptor um einen funktionellen Tyraminrezeptor handelt. Octopamin aktiviert den AmTyr2-Rezeptor ebenfalls, jedoch mit einer ca. 1 000fach schwächeren Wirksamkeit als Tyramin.

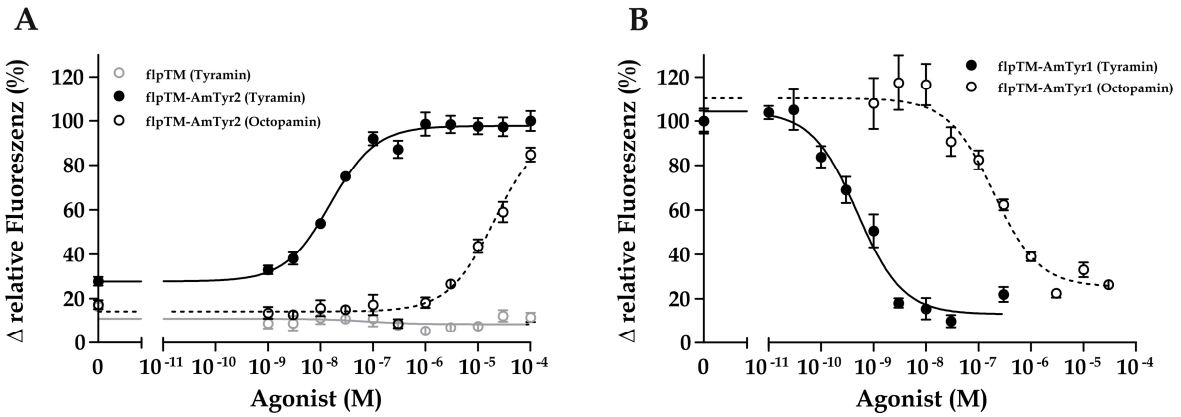


Abb. 14 Dosis-Wirkungs-Kurven für Tyramin an flpTM, flpTM-AmTyr2 und flpTM-AmTyr1, sowie für Octopamin an flpTM-AmTyr2 und flpTM-AmTyr1. A: Fluoreszenzsignale an flpTM-AmTyr2 Zellen nach Zugabe von Tyramin (●) und Octopamin (○). Zur Kontrolle erfolgte eine Inkubation der flpTM Zellen mit Tyramin (○). Die Werte sind auf den Fluoreszenzwert normiert, welcher mit 10^{-4} M Tyramin erhalten wurde (= 100 %). Dargestellt sind die Mittelwerte aus Achtfachbestimmungen. Die Fehlerbalken zeigen den Standardfehler. **B:** Fluoreszenzsignale in flpTM-AmTyr1 Zellen nach Zugabe von Tyramin (●) und Octopamin (○). Die Messungen erfolgten auf einem Hintergrund von 10 µM NKH477 und wurden auf das Fluoreszenzsignal ohne Zugabe von Liganden (= 100 %) normiert. Dargestellt sind die Mittelwerte aus Vierfachbestimmungen. Die Fehlerbalken zeigen den Standardfehler an. Die Daten der flpTM-AmTyr1 Zelllinie wurden von der AG Baumann (siehe 2.7) zur Verfügung gestellt.
Alle Messungen erfolgten in Gegenwart von 100 µM IBMX.

Um die pharmakologischen Eigenschaften des AmTyr2-Rezeptors mit denen des bereits früher klonierten AmTyr1-Rezeptors (BLENAU ET AL. 2000) vergleichen zu können, wurde eine neue Zelllinie hergestellt. Dazu wurden flpTM Zellen mit dem AmTyr1-Rezeptor transfiziert (AG Baumann). Es war bekannt, dass der aktivierte Rezeptor zu einer Inhibierung von Adenylylcyclasen führt (BLENAU ET AL. 2000). Deshalb wurden die Messungen an der flpTM-AmTyr1 Zelllinie auf einem Hintergrund von 10 µM NKH477 (= Agonist membranständiger Adenylylcyclasen) durchgeführt. Wie bei der flpTM-AmTyr2 Zelllinie

wurden Änderungen des $[cAMP]_i$ indirekt über den Ca^{2+}-Einstrom durch CNG Kanäle fluorometrisch mit Fluo-4 gemessen. Die Zugabe von Tyramin und Octopamin führte zu einer konzentrationsabhängigen Abnahme der Fluoreszenzsignale. Die Dosis-Wirkungs-Kurven verlaufen sigmoidal und sättigen (Abb. 14B). Im Vergleich zum AmTyr2-Rezeptor ist der AmTyr1-Rezeptor deutlich empfindlicher für Tyramin (EC_{50} 4,909 × 10^{-10} M) und Octopamin (EC_{50} 1,932 × 10^{-7} M) (Tab. 2).

Tab. 2 Werte der halbmaximalen Stimulierung (EC_{50} [M] und log EC_{50}) der Rezeptoraktivität für AmTyr2 und AmTyr1. Die Werte wurden mit dem Programm GraphPad Prism durch nichtlineare Datenanpassung berechnet.

	AmTyr2		**AmTyr1**	
	Tyramin	Octopamin	Tyramin	Octopamin
EC_{50} [M]	**1,552 × 10^{-8}**	**2 × 10^{-5}**	**4,909 × 10^{-10}**	**1,932 × 10^{-7}**
log EC_{50}	-7,809 ± 0,079	-4,699 ± 0,098	-9,309 ± 0,100	-6,714 ± 0,142

Wirkung von Antagonisten

Es wurden sieben potentielle Rezeptor Antagonisten auf ihre Wirksamkeit überprüft, die AmTyr2-Rezeptor vermittelte cAMP Produktion in flpTM-AmTyr2 Zellen zu inhibieren. Die Messungen erfolgten auf einem Tyramin- bzw. Octopaminhintergrund und mit steigenden Antagonistenkonzentrationen. Die Zugabe der Antagonisten führte zu einer Abnahme der Tyramin- bzw. Octopamin-induzierten Fluoreszenzsignale. Für die Dosis-Wirkungs-Kurven wurde auf den Fluoreszenzwert ohne Zugabe von Antagonisten normiert (Abb. 15A). Aus den Dosis-Wirkungs-Kurven wurde die Ligandenkonzentration ermittelt, die zur halbmaximalen Inhibierung der Rezeptorantwort führt (IC_{50}-Wert). Die IC_{50}-Werte für den AmTyr2-Rezeptor sind in Tabelle 3 zusammengefasst.

Der effektivste Antagonist sowohl auf dem Tyramin- als auch auf dem Octopamin-stimulierten AmTyr2-Rezeptor war Mianserin mit IC_{50}-Werten von 2,275 × 10^{-8} M bzw. 7,482 × 10^{-9} M. Die Aktivität des Rezeptors konnte ebenfalls durch Yohimbin, Epinastin, Phentolamin, Chlorpromazin und Cyproheptadin inhibiert werden. Anhand der IC_{50}-Werte ergibt sich folgende Reihenfolge der Antagonistenwirksamkeit am Tyramin stimulierten AmTyr2-Rezeptor: Mianserin > Yohimbin > Chlorpromazin > Phentolamin > Cyproheptadin ≅ Epinastin (Tab. 3).

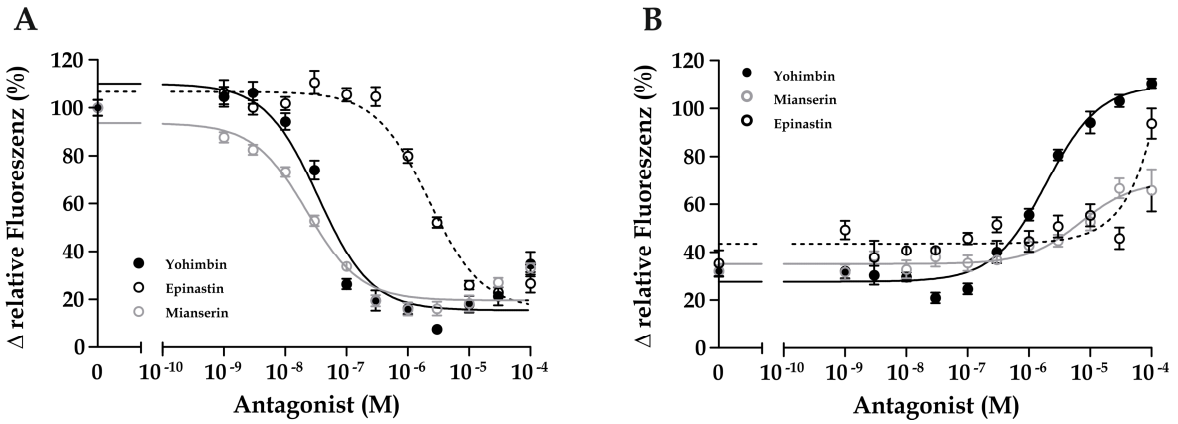


Abb. 15 Dosis-Wirkungs-Kurven der Antagonisten. A: Fluoreszenzsignale in flpTM-AmTyr2 Zellen nach Zugabe der Antagonisten Yohimbin (●), Epinastin (○) und Mianserin (○). Die Werte sind auf das maximale Fluoreszenzsignal normiert, welches mit Tyramin in Abwesenheit der Antagonisten gemessen wurde (= 100 %). Dargestellt sind die Mittelwerte aus Achtfachbestimmungen. Die Fehlerbalken zeigen den Standardfehler an. Alle Messungen wurden auf einem Tyramin Hintergrund von 50 nM durchgeführt. **B:** Fluoreszenzsignale in flpTM-AmTyr1 Zellen nach Zugabe der Antagonisten Yohimbin (●), Epinastin (○) und Mianserin (○). Die Werte sind auf das maximale Fluoreszenzsignal normiert, welches mit NKH477 in Abwesenheit von Tyramin und der Antagonisten erhalten wurde (= 100 %). Dargestellt sind die Mittelwerte aus Vierfachbestimmungen. Die Fehlerbalken zeigen den Standardfehler. Alle Messungen wurden auf einem Tyramin-Hintergrund von 3 nM durchgeführt.
Alle Messungen erfolgten in Gegenwart von 100 µM IBMX.

Tab. 3 Werte der halbmaximalen Inhibierung (IC50 [M] und log IC50) für Antagonisten an Tyramin- bzw. Octopamin aktiviertem AmTyr2-Rezeptor und an Tyramin aktiviertem AmTyr1-Rezeptor. Die Werte wurden mit dem Programm GraphPad Prism durch nichtlineare Datenanpassung berechnet.

		AmTyr2		AmTyr1
		Tyramin-aktiviert	Octopamin-aktiviert	Tyramin-aktiviert
Yohimbin	**IC_{50} [M]**	**$3{,}459 \times 10^{-8}$**	**$3{,}532 \times 10^{-8}$**	**$1{,}923 \times 10^{-6}$**
	log IC_{50}	-7,461 ± 0,074	-7,452 ± 0,034	-5,716 ± 0,066
Mianserin	**IC_{50} [M]**	**$2{,}275 \times 10^{-8}$**	**$7{,}482 \times 10^{-9}$**	**$6{,}839 \times 10^{-6}$**
	log IC_{50}	-7,643 ± 0,061	-8,126 ± 0,058	-5,165 ± 0,203
Epinastin	**IC_{50} [M]**	**$2{,}218 \times 10^{-6}$**	**$6{,}855 \times 10^{-7}$**	nicht bestimmbar
	log IC_{50}	-5,654 ± 0,069	-6,164 ± 0,1	
Phentolamin	**IC_{50} [M]**	**$8{,}68 \times 10^{-7}$**	**$1{,}109 \times 10^{-6}$**	nicht bestimmbar
	log IC_{50}	-6,061 ± 0,093	-5,955 ± 0,039	
Metoclopramid	**IC_{50} [M]**	nicht bestimmbar	nicht bestimmbar	nicht bestimmbar
	log IC_{50}			
Chlorpromazin	**IC_{50} [M]**	**$2{,}35 \times 10^{-7}$**	**$2{,}018 \times 10^{-7}$**	**$1{,}892 \times 10^{-6}$**
	log IC_{50}	-6,628 ± 0,048	-6,695 ± 0,047	-5,723 ± 0,176
Cyproheptadin	**IC_{50} [M]**	**$1{,}986 \times 10^{-6}$**	**$3{,}459 \times 10^{-6}$**	**$2{,}075 \times 10^{-5}$**
	log IC_{50}	-5,702 ± 0,096	-5,461 ± 0,063	-4,683 ± 0,112

Die IC_{50}-Werte von Metoclopramid konnten nicht bestimmt werden, da eine Sättigung der Signale bei einer Konzentration von 10^{-4} M nicht erreicht wurde und höhere Ligandenkonzentrationen aufgrund der geringen Löslichkeit der Substanz nicht untersucht werden konnten.

In Tyramin stimulierten flpTM-AmTyr1 Zellen führte die Applikation von Antagonisten zu einem Anstieg der Fluoreszenzsignale (Abb. 15B). Die Signale wurden auf den Wert normiert, welcher mit 10 µM NKH477 in Abwesenheit von Tyramin und den Antagonisten gemessen wurde (= 100 %). Die IC_{50}-Werte für den AmTyr1-Rezeptor sind ebenfalls in Tabelle 3 zusammengefasst. Der effektivste Antagonist war Chlorpromazin mit einem IC_{50}-Wert von $1{,}892 \times 10^{-6}$ M, gefolgt von Yohimbin > Mianserin > Cyproheptadin. Die IC_{50}-Werte von Epinastin, Phentolamin und Metoclopramid konnten nicht bestimmt werden, da eine Sättigung der Antwort bei einer Konzentration von 10^{-4} M nicht erreicht wurde.

3.2 Arbeitsteilung, biogene Amine und deren Rezeptoren

3.2.1 Alters- und rollenabhängige Expression der Referenzgene

In Expressionsanalysen müssen die Daten auf ein Referenzgen normiert werden, um die Vergleichbarkeit der Proben untereinander zu gewährleisten und mögliche Unterschiede in der eingesetzten Menge biologischen Materials auszugleichen. Folglich wurde vor Beginn der Expressionsanalysen der biogenen Aminrezeptoren zunächst die Eignung von drei häufig verwendeten Referenzgenen bei Insekten geprüft. Die Expression der potentiellen Referenzgene *ef1a, rpl32* und *gapdh* wurde in ganzen Gehirnen von Arbeiterinnen unterschiedlichen Alters (frischgeschlüpft, sechs Tage und zwölf Tage) und unterschiedlicher sozialer Rolle (Pollensammlerinnen, Nektarsammlerinnen) untersucht.

Jedes einzelne Gen zeigte altersabhängige Veränderungen in der Expression (einfaktorielle ANOVA: *ef1a*: $F_{(4,45)} = 3{,}025$, $P = 0{,}027$; *rpl32*: $F_{(4,45)} = 8{,}163$, $P \leq 0{,}001$; *gapdh*: $F_{(4,45)} = 6{,}046$, $P \leq 0{,}001$). In den Gehirnen frischgeschlüpfter Bienen war *ef1a* stärker exprimiert als bei sechs Tage alten Bienen (Tamhane: $P = 0{,}03$), zeigte aber keine Expressionsunterschiede zu zwölf Tage alten Bienen, Pollensammlerinnen oder Nektarsammlerinnen (Abb. 16A). Die Expression von *rpl32* war in zwölf Tage alten Bienen deutlich erhöht im Vergleich zu frischgeschlüpften und sechs Tage alten Bienen, sowie Pollensammlerinnen (Abb. 16B, Scheffé: zwölf Tage vs. frischgeschlüpft: $P \leq 0{,}001$, zwölf vs. sechs Tage: $P = 0{,}019$, zwölf Tage vs. Pollensammlerinnen: $P = 0{,}035$). Nektarsammlerinnen unterschieden sich in

der Expression nur von frischgeschlüpften Bienen (Scheffé: $P = 0{,}01$). Die anderen Gruppen lagen dazwischen. Die Expression von *gapdh* war in den frischgeschlüpften Bienen im Vergleich zu allen Gruppen bis auf die Nektarsammlerinnen deutlich erhöht (Abb. 16C, Scheffé: $P \leq 0{,}05$).

Ef1a kann ab einem Alter von 6 Tagen als Gen mit stabiler Expression betrachtet werden und wurde in den folgenden Expressionsanalysen der biogenen Aminrezeptoren als Referenzgen verwendet.

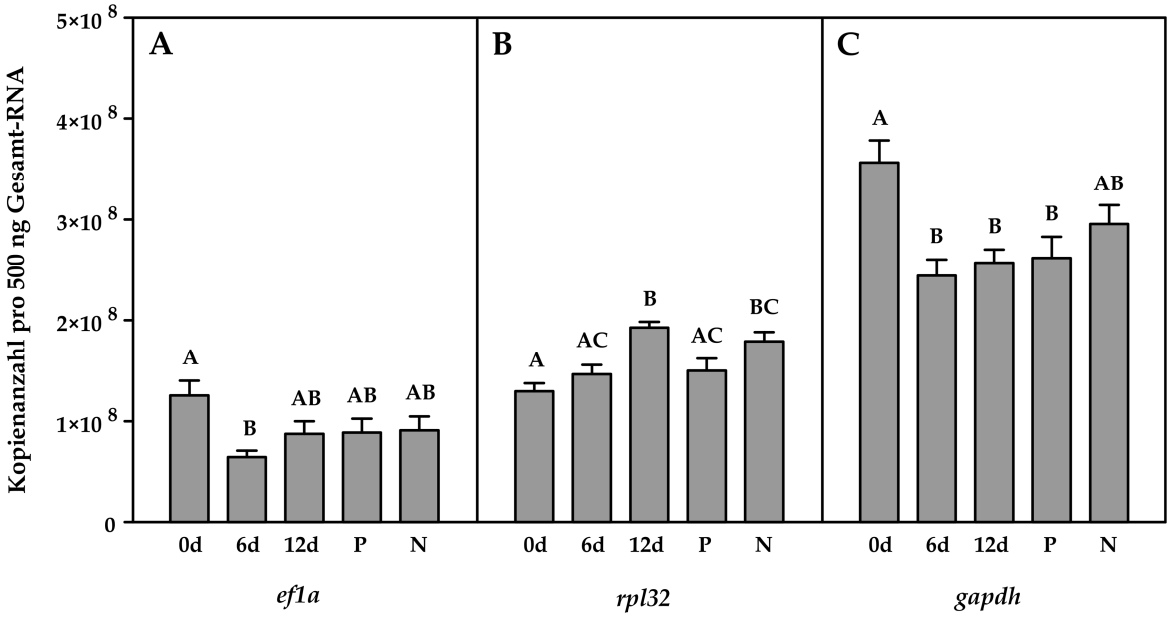


Abb. 16 Expression der Referenzgen-mRNA im Gesamtgehirn von Arbeiterinnen. A: *ef1a*. **B:** *rpl32*. **C:** *gapdh*. Die Expression aller drei Gene war altersabhängig ($P \leq 0.001$, einfaktorielle ANOVA). Die Balken stellen die Mittelwerte dar, die Fehlerbalken zeigen die Standardfehler. Verschiedene Buchstaben zeigen signifikant unterschiedliche Gruppen innerhalb eines Gens ($P \leq 0{,}05$, Post-hoc-Test nach Tamhane oder Scheffé, siehe Text). Untersuchte Gruppen: frischgeschlüpft (0 d), 6-Tage alt (6 d), 12-Tage alt (12 d), Pollensammlerinnen (P), Nektarsammlerinnen (N). Anzahl der Tiere pro Gruppe: zehn.

3.2.2 Alters- und rollenabhängige Expression von Octopamin- und Tyraminrezeptoren in Ammenbienen und Sammlerinnen

Aufgrund der modulatorischen Wirkung von Octopamin und Tyramin auf das Verhalten und die Arbeitsteilung von Honigbienen wurde im Folgenden die Genexpression der Octopamin- und Tyraminrezeptoren zwischen Ammenbienen und Sammlerinnen verglichen. Unterschiede in der Genexpression deuten auf einen erhöhten bzw. erniedrigten Bedarf des Rezeptorproteins hin. Das lässt einen Rückschluss auf die potentielle Beteiligung des Rezeptors für aufgabenspezifische Aktivitäten zu. Analysiert wurden der

Ca^{2+}-gekoppelte AmOctαR1, beide Spleißvarianten des AmOctβR3/4 (siehe 2.4.5) als Vertreter der cAMP-gekoppelten Octopamin-β-Rezeptoren und die beiden cAMP-gekoppelten Tyraminrezeptoren AmTyr1 und AmTyr2.

AmOctaR1

Die mRNA des Am*octaR1* konnte in allen analysierten Gehirnteilen nachgewiesen werden. Sammlerinnen aus der Kolonie mit typischer Altersstruktur wiesen dabei eine höhere Expression dieses Rezeptors im Subösophagealganglion (T-Test: $t(8) = -5{,}515$; $P \leq 0{,}001$; Abb. 17A), den Antennalloben (T-Test: $t(7{,}205) = -3{,}461$; $P = 0{,}010$; Abb. 17D) und den Pilzkörpern (T-Test: $t(13) = -2{,}435$; $P = 0{,}030$; Abb. 17G) auf als Ammenbienen. In den optischen Loben zeigte sich keine veränderte Expression zwischen Ammenbienen und Sammlerinnen (T-Test: $t(10) = -0{,}486$; $P = 0{,}638$; Abb. 17K).

Um das chronologische Alter von der sozialen Rolle zu trennen, wurde die Genexpression des Am*octaR1* in vorzeitigen Sammlerinnen und gleichalten Ammenbienen aus einer *single cohort* Kolonie verglichen. Hierbei erfolgte nur eine Analyse von Gehirnregionen, welche auch Expressionsunterschiede in Kolonien mit typischer Altersstruktur aufwiesen. Am*octaR1* zeigte eine stärkere Expressionsrate im Subösophagealganglion (T-Test: $t(16) = 4{,}930$; $P \leq 0{,}001$; Abb. 17B) und den Antennalloben (T-Test: $t(12) = -2{,}916$; $P = 0{,}013$; Abb. 17E) vorzeitiger Sammlerinnen verglichen zu gleichalten Ammenbienen. In den Pilzkörpern unterschieden sich die beiden Gruppen nicht voneinander (T-Test: $t(16) = -0{,}241$; $P = 0{,}812$; Abb. 17H). Die Reversion von Sammlerinnen zu Ammenbienen führte zu einer verringerten Genexpression des Am*octaR1* im Subösophagealganglion (T-Test: $t(14) = -4{,}514$; $P \leq 0{,}001$; Abb. 17C), den Antennalloben (T-Test: $t(11{,}964) = -4{,}704$; $P = 0{,}001$; Abb. 17F) und den Pilzkörpern (T-Test: $t(12) = -7{,}865$; $P \leq 0{,}001$; Abb. 17I) im Vergleich zu den nicht revertierten Sammlerinnen der Kolonie.

Die Unterschiede in der Genexpression des Am*octaR1* im Subösophagealganglion und den Antennalloben zwischen Ammenbienen und Sammlerinnen waren abhängig von der sozialen Rolle, während Unterschiede in den Pilzkörpern, welche nur in revertierten Ammenbienen aber nicht in vorzeitigen Sammlerinnen nachgewiesen werden konnten, an das Alter gekoppelt waren.

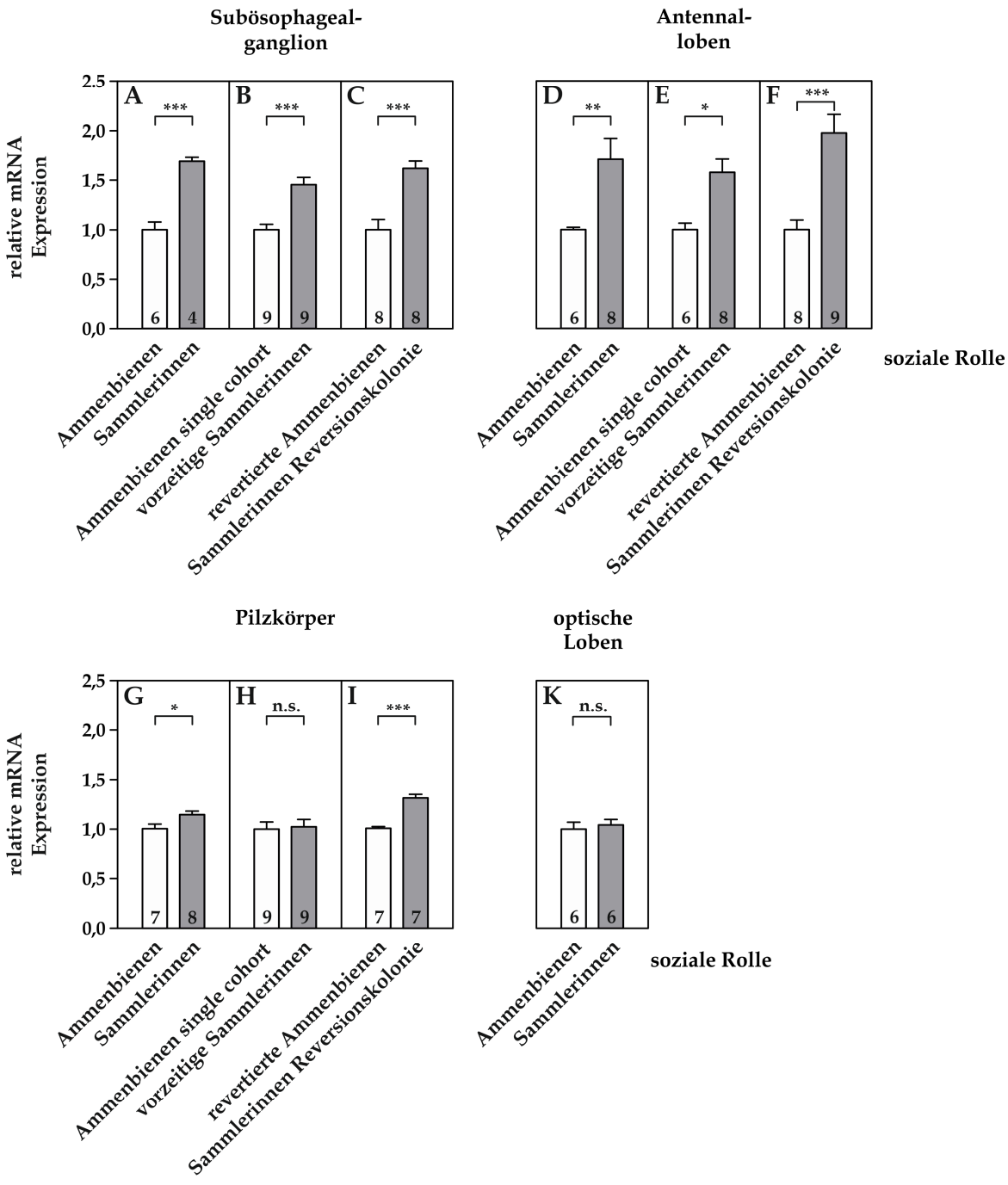


Abb. 17 Relative mRNA Expression des Am*octaR1* Gens in einzelnen Gehirnteilen. Untersucht wurden Ammenbienen und Sammlerinnen aus Kolonien mit typischer Altersstruktur, vorzeitigen Sammlerinnen und Ammenbienen aus einer *single cohort* Kolonie, sowie revertierte Ammenbienen und Sammlerinnen aus einer Reversionskolonie. **A-C:** Subösophagealganglion. **D-F:** Antennalloben. **G-I:** Pilzkörper. **K:** optischen Loben. Die Balken stellen die Mittelwerte der Expression relativ zu dem Referenzgen *ef1a* dar, die Fehlerbalken zeigen die Standardfehler. Die Ammenbienen wurden gleich eins gesetzt und die Sammlerinnen wurden auf die jeweiligen Ammenbienen normalisiert. Die Anzahl der Tiere pro Gruppe ist in den Balken dargestellt. Sterne zeigen signifikante Unterschiede zwischen Ammenbienen und Sammlerinnen (*: $P \leq 0{,}05$; **: $P \leq 0{,}01$; ***: $P \leq 0{,}001$, T-Test), n.s. = nicht signifikant. Untersuchungen in *single cohort*- und Reversionskolonien wurden nur durchgeführt, wenn Unterschiede in Kolonien mit typischer Altersstruktur gefunden wurden.

AmOctβR3/4

Auch die mRNA des Am*octβR3/4* konnte in allen analysierten Gehirnteilen nachgewiesen werden. Im Gegensatz zum Am*octaR1* zeigten sich keine Unterschiede in der Genexpression des Am*octβR3/4* zwischen Ammenbienen und Sammlerinnen im Subösophagealganglion (T-Test: $t(10) = 0{,}300$; $P = 0{,}770$; Abb. 18A), den Antennalloben (T-Test: $t(16) = 0{,}506$; $P = 0{,}620$; Abb. 18B) und den optischen Loben (T-Test: $t(9) = 0{,}033$; $P = 0{,}974$; Abb. 18C). Allerdings konnte in den Pilzkörpern von Sammlerinnen eine geringere Expression des Am*octβR4* im Vergleich zu Ammenbienen nachgewiesen werden (T-Test: $t(15) = 5{,}187$; $P \leq 0{,}001$) (Abb. 18D).

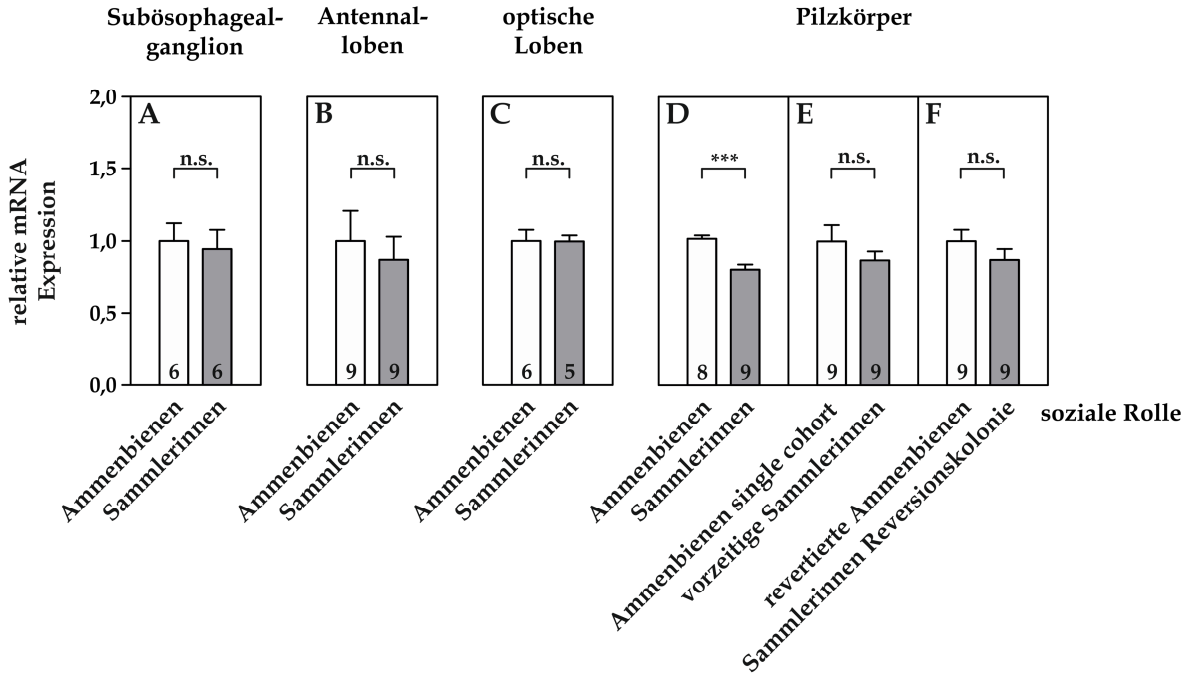


Abb. 18 Relative mRNA Expression des Am*octβR3/4* Gens in einzelnen Gehirnteilen. Untersucht wurden Ammenbienen und Sammlerinnen aus Kolonien mit typischer Altersstruktur, vorzeitigen Sammlerinnen und Ammenbienen aus einer *single cohort* Kolonie, sowie revertierte Ammenbienen und Sammlerinnen aus einer Reversionskolonie. **A:** Subösophagealganglion. **B:** Antennalloben. **C:** optischen Loben. **D-F:** Pilzkörper. Die Balken stellen die Mittelwerte der Expression relativ zu dem Referenzgen *ef1a* dar, die Fehlerbalken zeigen die Standardfehler. Die Ammenbienen wurden gleich eins gesetzt und die Sammlerinnen wurden auf die jeweiligen Ammenbienen normalisiert. Die Anzahl der Tiere pro Gruppe ist in den Balken dargestellt. Sterne zeigen signifikante Unterschiede zwischen Ammenbienen und Sammlerinnen (***: $P \leq 0{,}001$, T-Test), n.s. = nicht signifikant. Untersuchungen in *single cohort*- und Reversionskolonien wurden nur durchgeführt, wenn Unterschiede in Kolonien mit typischer Altersstruktur gefunden wurden.

Dieser Unterschied in der Genexpression zwischen Ammenbienen und Sammlerinnen aus Kolonien mit typischer Altersstruktur verschwand, als frühzeitige Sammlerinnen und Ammenbienen aus der *single cohort* Kolonie (T-Test: $t(13{,}277) = 1{,}061$; $P = 0{,}304$; Abb. 18E),

als auch revertierte Ammenbienen und Sammlerinnen aus der Reversionskolonie (T-Test: $t(16) = 1{,}181$; $P = 0{,}255$; Abb. 18F) verglichen wurden.

Die Genexpression des Am*octβR3/4* korrelierte in den Pilzkörpern mit dem Alter, war aber unabhängig von der sozialen Rolle.

AmTyr1-Rezeptor

Die mRNA des AmTyr1-Rezeptors konnte in allen analysierten Gehirnteilen nachgewiesen werden. Es wurden keine Unterschiede in der Genexpression zwischen Ammenbienen und Sammlerinnen in den Antennalloben (T-Test: $t(10{,}097) = -0{,}055$; $P = 0{,}957$; Abb. 19A), den Pilzkörpern (T-Test: $t(16) = 1{,}126$; $P = 0{,}277$; Abb. 19C) und den optischen Loben (T-Test: $t(10) = 0{,}367$; $P = 0{,}721$; Abb. 19D) detektiert. Im Subösophagealganglion zeigten Sammlerinnen im Vergleich zu Ammenbienen eine höhere Expression des Am*tyr1*-Rezeptorgens (T-Test: $t(16) = -2{,}178$; $P = 0{,}045$; Abb. 19D).

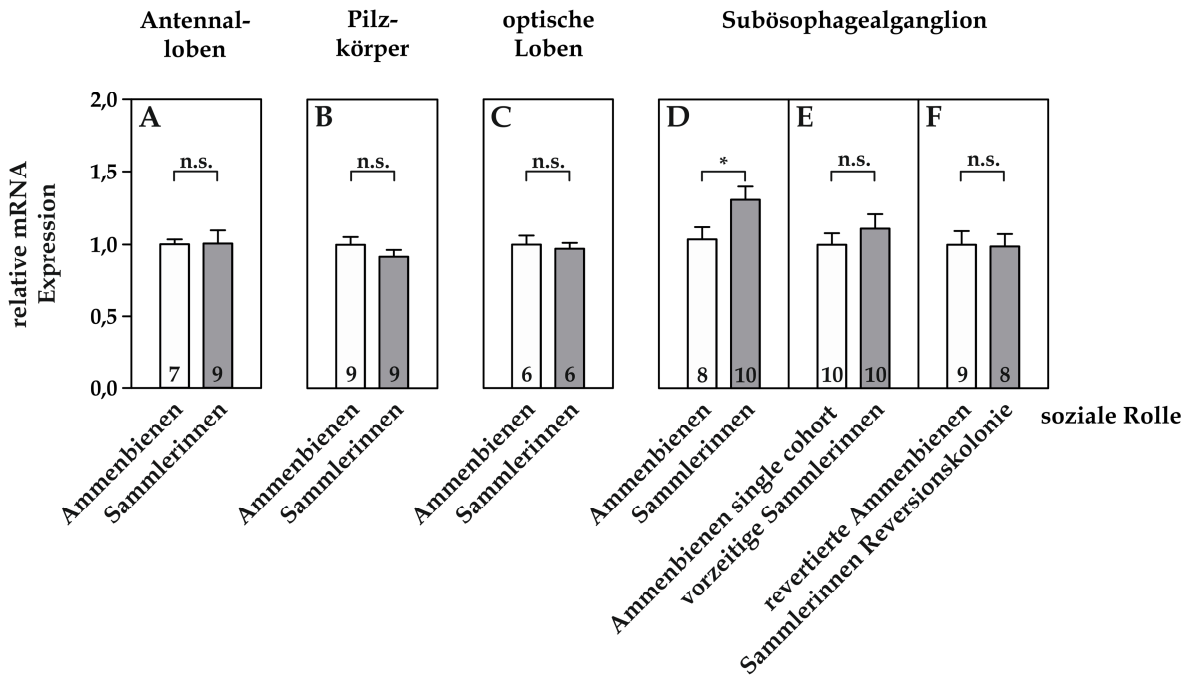


Abb. 19 Relative mRNA Expression des Am*tyr1*-Gens in einzelnen Gehirnteilen. Untersucht wurden Ammenbienen und Sammlerinnen aus Kolonien mit typischer Altersstruktur, vorzeitigen Sammlerinnen und Ammenbienen aus einer *single cohort* Kolonie, sowie revertierte Ammenbienen und Sammlerinnen aus einer Reversionskolonie. **A:** Antennalloben. **B:** Pilzkörper. **C:** optischen Loben. **D-F:** Subösophagealganglion. Die Balken stellen die Mittelwerte der Expression relativ zu dem Referenzgen *ef1a* dar, die Fehlerbalken zeigen die Standardfehler. Die Ammenbienen wurden gleich eins gesetzt und die Sammlerinnen wurden auf die jeweiligen Ammenbienen normalisiert. Die Anzahl der Tiere pro Gruppe ist in den Balken dargestellt. Sterne zeigen signifikante Unterschiede zwischen Ammenbienen und Sammlerinnen (*: $P \leq 0{,}05$, T-Test), n.s. = nicht signifikant. Untersuchungen in *single cohort*- und Reversionskolonien wurden nur durchgeführt, wenn Unterschiede in Kolonien mit typischer Altersstruktur gefunden wurden.

Der Vergleich der Genexpression im Subösophagealganglion zwischen vorzeitigen Sammlerinnen und gleichalten Ammenbienen (T-Test: $t(18) = -0{,}880$; $P = 0{,}390$; Abb. 19E), sowie zwischen revertierten Ammenbienen und gleichalten Sammlerinnen (T-Test: $t(15) = 0{,}085$; $P = 0{,}934$; Abb. 19F) zeigte dagegen keine Unterschiede. Dies deutete auf eine Altersabhängigkeit der Am*tyr1*-Rezeptorexpression hin.

AmTyr2-Rezeptor

Die Genexpression des in dieser Arbeit charakterisierten AmTyr2-Rezeptors zeigte keine alters- und rollenabhängigen Unterschiede zwischen Ammenbienen und Sammlerinnen im Subösophagealganglion (T-Test: $t(10) = 0{,}590$; $P = 0{,}568$; Abb. 20A), den Antennalloben (T-Test: $t(10{,}362) = 1{,}731$; $P = 0{,}113$; Abb. 20B), den Pilzkörpern (T-Test: $t(11{,}044) = -0{,}163$; $P = 0{,}873$; Abb. 20C) und den optischen Loben (T-Test: $t(10) = -0{,}486$; $P = 0{,}781$; Abb. 20D). Aufgrund der fehlenden Korrelation der Rezeptorexpression mit Alter bzw. sozialer Rolle scheint es keinen Zusammenhang mit der altersabhängigen Arbeitsteilung zu geben.

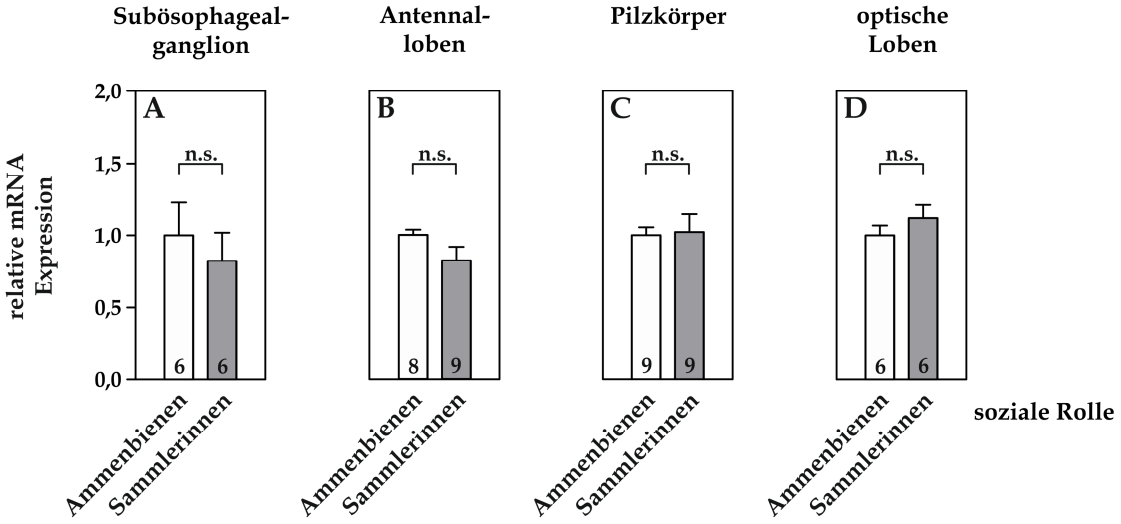


Abb. 20 Relative mRNA Expression des Am*tyr2*-Gens in einzelnen Gehirnteilen. Untersucht wurden Ammenbienen und Sammlerinnen aus Kolonien mit typischer Altersstruktur. **A:** Subösophagealganglion. **B:** Antennalloben. **C:** Pilzkörper. **D:** optischen Loben. Die Balken stellen die Mittelwerte der Expression relativ zu dem Referenzgen *ef1a* dar, die Fehlerbalken zeigen die Standardfehler. Die Ammenbienen wurden gleich eins gesetzt und die Sammlerinnen wurden auf die Ammenbienen normalisiert. Die Anzahl der Tiere pro Gruppe ist in den Balken dargestellt. n.s. = nicht signifikant.

3.2.3 Octopamin- und Tyramingehalt in den Gehirnen von Ammenbienen und Sammlerinnen

Im Anschluss an die Experimente zur Genexpression der Octopamin- und Tyraminrezeptoren wurde untersucht, ob Ammenbienen und Sammlerinnen Unterschiede in der Menge der beteiligten biogenen Amine im Gesamtgehirn zeigen. Sammlerinnen wiesen einen deutlich höheren Gehalt an Octopamin im Gehirn auf als Ammenbienen (T-Test: $t(68) = -8{,}588$; $P \leq 0{,}001$; Abb. 21A). Bei der Analyse von Tyramin hatten Sammlerinnen tendenziell einen höheren Tyramingehalt als Ammenbienen. Allerdings ist dieser Unterschied nicht signifikant (T-Test: $t(42) = -1{,}961$; $P = 0{,}057$; Abb. 21B). Bei einem Vergleich der biogenen Amine untereinander fällt auf, dass der Gesamtgehalt an Octopamin um das ca. 10fache höher war, als der Gesamtgehalt an Tyramin.

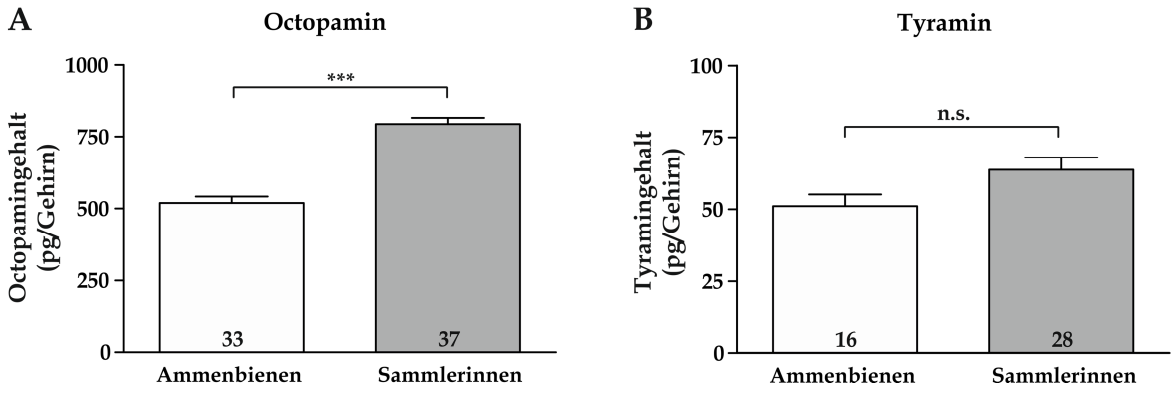


Abb. 21 Octopamin- und Tyramingehalt in den Gehirnen von Ammenbienen und Sammlerinnen. Untersucht wurden Ammenbienen und Sammlerinnen aus Kolonien mit typischer Altersstruktur. **A:** Octopamin. **B:** Tyramin. Die Balken stellen die Mittelwerte des Amingehalts in pg pro Gehirn dar, die Fehlerbalken zeigen die Standardfehler. Sterne zeigen signifikante Unterschiede zwischen Ammenbienen und Sammlerinnen (***: $P \leq 0{,}001$), n.s. = nicht signifikant. Die Anzahl der Tiere pro Gruppe ist in den Balken dargestellt.

4 Diskussion

Die Honigbiene *A. mellifera* zählt zu den wichtigsten Modellorganismen in verhaltensbiologischen Studien zur Eusozialität und dem Lernen (MENZEL & MÜLLER 1996, PENNISI 2006, ZAYED & ROBINSON 2012). Trotz einer langen Geschichte als Modellorganismus fehlen essentielle Informationen für ein detailliertes Verständnis einer der wichtigsten Eigenschaften einer Honigbienenkolonie, der Arbeitsteilung. Während junge Bienen als Ammenbienen im Stock die Brut versorgen, verlassen ältere Bienen den Stock, um Pollen und Nektar zu sammeln (SEELEY 1995, WINSTON 1987). Die regulatorische Funktion biogener Amine ist hierbei seit langem bekannt. So werden das Sammelverhalten und die sensorische Empfindlichkeit gegenüber aufgabenspezifischen Reizen durch Octopamin und Tyramin beeinflusst (BARRON & ROBINSON 2005, BARRON ET AL. 2002, SCHEINER ET AL. 2002, SCHULZ & ROBINSON 2001). Über die Beteiligung der entsprechenden Octopamin- und Tyraminrezeptoren an der Regulation der Arbeitsteilung wusste man bisher wenig. Während bei Invertebraten eine große Anzahl an Octopaminrezeptoren bekannt war, stand Tyramin lange Zeit im Schatten des Octopamins. Inzwischen wurde eine steigende Anzahl an Tyraminrezeptoren bei Insekten identifiziert und zum Teil auch charakterisiert. Hier sind *B. mori* (HUANG ET AL. 2009, OHTA ET AL. 2003), *D. melanogaster* (BAYLISS ET AL. 2013, CAZZAMALI ET AL. 2005, SAUDOU ET AL. 1990), *Locusta migratoria* (VANDEN BROECK ET AL. 1995), *Nicrophorus vespilloides* (CUNNINGHAM ET AL. 2014) und *Periplaneta americana* (ROTTE ET AL. 2009) zu nennen. Bei *A. mellifera* wurde bisher ein Tyraminrezeptor (AmTyr1) kloniert und detailliert untersucht (BLENAU ET AL. 2000). Durch die Arbeiten von CAZZAMALI ET AL. (2005) und HAUSER ET AL. (2006) wurde die Existenz eines zweiten putativen Tyraminrezeptors bei der Honigbiene bekannt. In der vorliegenden Arbeit ist es gelungen, diesen Rezeptor zu klonieren und zu analysieren.

Der erste Teil der folgenden Diskussion beschäftigt sich mit der Charakterisierung des zweiten Tyraminrezeptors der Honigbiene, AmTyr2. Hierbei wird auf die strukturellen und funktionellen Eigenschaften, das pharmakologische Profil, die phylogenetische Einordnung in das bestehende System der Tyraminrezeptoren sowie die Lokalisierung des Rezeptors eingegangen. Daraus folgend werden potentielle Funktionen des AmTyr2-Rezeptors in der Physiologie und dem Verhalten von *A. mellifera* abgeleitet. Im zweiten Teil der Diskussion werden die Genexpression der verschiedenen Octopamin- und Tyraminrezeptoren sowie der Gehalt der biogenen Amine in den Gehirnen von Ammenbienen und Sammlerinnen besprochen. Dieser Teil der Ausführungen setzt sich

mit der regulatorischen Rolle der Rezeptoren und der beteiligten Signalkaskaden bei der Steuerung der altersabhängigen Arbeitsteilung auseinander. Der abschließende Ausblick liefert Anregungen für weiterführende Experimente.

4.1 Charakterisierung des Tyramin-2-Rezeptors bei *A. mellifera*

Die Grundlage für die Experimente zur Isolierung und Charakterisierung des putativen AmTyr2-Rezeptors bot unter anderem das sequenzierte Genom der Honigbiene (THE HONEY BEE GENOME SEQUENCING CONSORTIUM 2006). Die cDNA des Rezeptors konnte durch die Verwendung sequenzspezifischer Primer vollständig amplifiziert und kloniert werden.

4.1.1 Molekulare und funktionelle Eigenschaften des AmTyr2-Rezeptors

Beide Tyraminrezeptoren der Honigbiene liegen auf dem gleichen Chromosom, LG1. AmTyr1 und AmTyr2 unterscheiden sich in ihrer Intron-Exon Struktur deutlich voneinander. Während sich AmTyr2 aus sieben Exons zusammensetzt, besteht der AmTyr1-Rezeptor nur aus drei bekannten Exons (SCHEINER ET AL. 2014B). Der AmTyr2-Rezeptor weist sieben Transmembrandomänen auf und besitzt einen extrazellulären *N*-Terminus sowie einen intrazellulären *C*-Terminus. Er zählt, wie die bereits bekannten Tyraminrezeptoren anderer Spezies, zu den Rhodopsin-ähnlichen GPCRs. Unterstützt wird diese Aussage durch die Identifizierung bestimmter Aminosäuremotive und konservierter Reste von Rhodopsin-ähnlichen GPCRs. Hierzu zählen das DRY-Motiv und das NPXXY-Motiv (EILERS ET AL. 2005). Beide Motive sind an der Rezeptoraktivierung, speziell der Konformationsänderung des Rezeptors während der Ligandenbindung beteiligt (FRITZE ET AL. 2003, ROVATI ET AL. 2007). Ein Vergleich der Aminosäuresequenz des AmTyr2-Rezeptors mit den Tyraminrezeptorsequenzen anderer Insekten zeigt einen hohen Konservierungsgrad der hydrophoben Transmembrandomänen und Aminosäuremotive, während sich die hydrophilen extra- und intrazellulären Schleifen von Art zu Art deutlich unterscheiden, ein weiteres Charakteristikum von GPCRs (STRADER ET AL. 1995). Für die Ligandenbindung sind Aminosäurereste in den Transmembrandomänen verantwortlich (STRADER ET AL. 1995). Bei dem AmTyr2-Rezeptor ist in dieser Hinsicht wahrscheinlich der Asparaginsäurerest an Position 118 in der Transmembrandomäne 3 wichtig. Dieser ist in der Lage die Aminogruppe des Tyramins zu binden (STRADER ET AL. 1988). Wichtig für die Rezeptoraktivierung kann zudem die Bin-

dung des Benzolrings von Tyramin an zwei Serinreste in der Transmembrandomäne 5 und einen Phenylalaninrest in der Transmembrandomäne 6 sein (STRADER ET AL. 1989). OHTA ET AL. (2004) zeigten anhand von Mutagenesestudien, dass zwei Serinreste in der Transmembrandomäne 5 des Tyraminrezeptors von *B. mori* essentiell für die Bindung von Tyramin sind. Der AmTyr2-Rezeptor besitzt mit den analogen Aminosäureresten eine Bindungstasche, die entscheidend für die Ligandenbindung und die Rezeptoraktivierung ist und ihn zu einem funktionsfähigen biogenen Aminrezeptor macht.

Der AmTyr2-Rezeptor kann nicht nur durch Tyramin, sondern auch durch Octopamin aktiviert werden, wenn auch in höheren Konzentrationen. Dies ist keine Ausnahme, sondern wurde auch bei anderen charakterisierten Tyraminrezeptoren nachgewiesen (BAYLISS ET AL. 2013, BLENAU ET AL. 2000, OHTA ET AL. 2003, SAUDOU ET AL. 1990). Eine Erklärung hierfür ist die hohe strukturelle Ähnlichkeit beider Substanzen. Octopamin besitzt lediglich eine zusätzliche Hydroxygruppe in der Seitenkette, die dem Tyramin fehlt. Ob ein biogener Aminrezeptor bevorzugt durch Tyramin oder Octopamin aktiviert wird, hängt wahrscheinlich von bestimmten Aminosäureresten in den Transmembrandomänen ab, welche in der Lage sind mit der zusätzlichen Hydroxygruppe eine Bindung einzugehen oder nicht. Jedoch konnte bisher keine einzelne Aminosäure identifiziert werden, welche die Bindungspräferenz für Octopamin oder Tyramin erklärt (CHATWIN ET AL. 2003, OHTA ET AL. 2004). Für eine klare Aussage müssten gezielte Mutagenesestudien mit dem AmTyr2-Rezeptor durchgeführt werden. Durch den stückweisen Austausch einzelner Aminosäuren bzw. von Aminosäurebereichen und der anschließenden Analyse der Bindungspräferenz für Octopamin oder Tyramin sowie der Aktivierbarkeit des Rezeptors könnte der Unterschied zwischen Tyramin- und Octopaminrezeptoren erklärt werden.

Interessanterweise führt auch die Applikation von Dopamin in unphysiologisch hohen Konzentrationen (10 µM) zu einer Aktivierung des AmTyr2-Rezeptors. Dopamin wird ebenso wie Tyramin und Octopamin aus Tyrosin synthetisiert. Es ist strukturell ähnlich zu Tyramin, besitzt aber zusätzlich eine Hydroxygruppe am Benzolring. Vergleichbar mit Octopamin scheint es angesichts der Grundstruktur die Fähigkeit zu besitzen, den AmTyr2-Rezeptor zu aktivieren. Dies geschieht wahrscheinlich nicht *in vivo*, sondern nur *in vitro*, wenn Tyramin als eigentlicher Ligand nicht vorliegt und Dopamin im Überschuss vorhanden ist.

4.1.2 Posttranslationale Modifikationen des AmTyr2-Rezeptors

Der AmTyr2-Rezeptor besitzt eine Reihe posttranslationaler Modifikationsstellen in den extra- und intrazellulären Schleifen. Die Cysteinreste in den ersten beiden extrazellulären Schleifen können für die Ausbildung von Disulfidbrücken verantwortlich sein. Disulfidbrücken dienen dem korrekten dreidimensionalen Aufbau und der Stabilisierung der funktionellen Proteinstruktur sowie der strukturellen Aufrechterhaltung der Ligandenbindungsstelle in GPCRs (DOHLMAN ET AL. 1990, JAAKOLA ET AL. 2008, KARNIK & KHORANA 1990, NODA ET AL. 1994, PROBST ET AL. 1992).

Weiterhin wurden in der Aminosäuresequenz des Rezeptors drei potentielle *N*-Glykosylierungstellen identifiziert. In Western Blot Analysen konnte gezeigt werden, dass der Rezeptor in der AmTyr2-flpTM Zelllinie stark glykosyliert ist. Durch die Behandlung mit dem Enzym PNGase-F konnte die Glykosylierung in der transfizierten Zelllinie entfernt werden, was zu einer deutlichen Verschiebung der markierten Bande führte. Das trifft jedoch nicht für das Gehirngewebe adulter Sammlerinnen zu. Dies kann zum einen damit begründet werden, dass das Enzym PNGase-F nicht in der Lage ist, alle *N*-glykosidischen Bindungen zu trennen. Eine enzymatische Spaltung erfolgt nur zwischen *N*-Acetylglucosamin und Asparagin sofern kein zusätzlicher Fucoserest gebunden ist (MALEY ET AL. 1989, PLUMMER ET AL. 1984). Zum anderen existieren möglicherweise *O*-Glykoside im Bienengewebe. Die Entdeckung und Untersuchung von *O*-Glykosylierungen bei GPCRs umfassen erst wenige Arbeiten (NAKAGAWA ET AL. 2001, PETÄJÄ-REPO ET AL. 2000, SADEGHI & BIRNBAUMER 1999). In keiner dieser Studien konnten übereinstimmende Konsensussequenzen nachgewiesen werden, obgleich Serine und Threonine offensichtlich eine Rolle spielen. Eine potentielle Funktion der Glykosylierung des AmTyr2-Rezeptors lässt sich nur schwer abschätzen. Bei einigen Rezeptoren sind die zusätzlichen Zuckerreste an der stabilen Expression des Rezeptors beteiligt (LILES & NATHANSON 1986, SODERQUIST & CARPENTER 1984, ZHENG ET AL. 1994). Bei anderen Rezeptoren ändern die Glykosylierungen weder die Expression noch die Funktion des Rezeptors (VAN KOPPEN & NATHANSON 1990).

Weitere posttranslationale Modifikationen, wie die Palmitoylierung und die Phosphorylierung des *C*-Terminus sowie der intrazellulären Schleifen können die Signaltransduktion von GPCRs erheblich beeinflussen (PROBST ET AL. 1992). Beim AmTyr2-Rezeptor ist die potentielle Ausbildung einer vierten cytoplasmatischen Schleife durch die Palmitoylierung eines Cysteins im *C*-Terminus und dessen Verankerung in der Plasmamembran möglich. Diese Form der posttranslationalen Modifikation kann die Mobilität von GPCRs (Endozy-

tose, Transport zur Plasmamembran), die Regenerierung und die Kopplung an G-Proteine beeinflussen (BIJLMAKERS & MARSH 2003, GODDARD & WATTS 2010, PROBST ET AL. 1992). Beim β_2-adrenergen Rezeptor des Menschen wurde z.B. die Bedeutung von Palmitoylierungen für die Stimulierung der Adenylylcyclase nachgewiesen (O´DOWD ET AL. 1989). Die Sequenz des AmTyr2-Rezeptors weist mehrere Phosphorylierungsstellen für die Proteinkinasen A und C auf. Die entsprechenden Konsensussequenzen befinden sich in den intrazellulären Schleifen sowie dem *C*-Terminus. Eine potentielle Phosphorylierung dieser Bereiche kann zu Konformationsänderungen dieser Strukturen führen. In Folge dessen können G-Proteine nicht mehr binden und es kommt zur Desensibilisierung des Rezeptors; ein Mechanismus, wie er für β-adrenerge Rezeptoren schon früh nachgewiesen wurde (BOUVIER ET AL. 1988). Dies hat zur Folge, dass die Empfindlichkeit gegenüber dem spezifischen Reiz abnimmt. Es handelt es sich bei diesen Phosphorylierungen um einen negativen Rückkopplungsmechanismus, der eine Dauerstimulierung verhindert (SIBLEY ET AL. 1987), da die phosphorylierenden Proteinkinasen (z.B. Proteinkinase A) in der Regel durch das vom Agonisten angeregte *second messenger* System (z.B. cAMP) aktiviert werden.

4.1.3 Pharmakologie der Tyraminrezeptoren von *A. mellifera*

Pharmakologische Studien deuten auf eine funktionelle Rolle von Tyramin bei der Steuerung bzw. Modulierung des Verhaltens von Honigbienen hin (FUSSNECKER ET AL. 2006, SCHEINER ET AL. 2002, SCHULZ & ROBINSON 2001). Durch die Charakterisierung des intrazellulären Signalwegs und die Erstellung des pharmakologischen Profils des fehlenden AmTyr2-Rezeptors können beobachtete Tyramineffekte präziser diskutiert werden. Weiterhin erfolgt ein Vergleich der Ergebnisse des AmTyr2-Rezeptors mit denen des AmTyr1-Rezeptors. Da ältere Daten zum AmTyr1-Rezeptor aus HEK293 Zellen stammen und mit einer anderen Messmethode generiert wurden (BLENAU ET AL. 2000), war es notwendig, den AmTyr1-Rezeptor ebenfalls heterolog in flpTM Zellen zu exprimieren. Somit konnte ein vergleichbares Messsystem, wie für den AmTyr2-Rezeptor beschrieben, verwendet werden.

Agonisten

Die Aktivierung des AmTyr2-Rezeptors führte zu einem cAMP Anstieg im Zellinneren der transfizierten Zelllinie. Dies deutet auf die Aktivierung von G_s-Proteinen hin, die wiede-

rum Adenylylcyclasen stimulieren. Eine Freisetzung von Ca^{2+} aus intrazellulären Speichern konnte nicht beobachtet werden. Der Rezeptor konnte mit 15,5 nM Tyramin halbmaximal aktiviert werden. Dagegen erfolgte die Aktivierung durch Octopamin mit einem EC_{50} Wert von 20 µM, einer 1 000 fach höheren Konzentration. Durch die Tyramin-Aktivierung bei viel geringeren Konzentrationen kann davon ausgegangen werden, dass es sich bei dem Rezeptor um einen funktionellen Tyraminrezeptor und nicht um einen Octopaminrezeptor handelt. Der aktivierte AmTyr1-Rezeptor steuert G_i-Proteine an (BLENAU ET AL. 2000), was zur Inhibierung der cAMP Produktion führt. Bei einem Vergleich der Konzentrationen, die zur halbmaximalen Aktivierung des jeweiligen Rezeptors führten, fällt auf, dass der AmTyr1-Rezeptor mit 0,5 nM viel empfindlicher auf Tyramin reagierte als der AmTyr2-Rezeptor. Ebenso wie AmTyr2 konnte auch AmTyr1 durch Octopamin stimuliert werden. Hier reagierte der AmTyr1-Rezeptor (193 nM Octopamin) ebenfalls empfindlicher als der AmTyr2-Rezeptor.

Die gegenteiligen Effekte von AmTyr1 und AmTyr2 in den Zellen (Stimulierung oder Hemmung der cAMP Synthese) sind keine Ausnahme bei biogenen Aminrezeptoren. Die Stimulierung durch Serotonin führt über die Aktivierung verschiedener Serotoninrezeptoren sowohl zu einem Anstieg (Am5-HT_7) als auch einem Absinken (Am5-HT_{1A}) des $[cAMP]_i$ Spiegels (SCHLENSTEDT ET AL. 2006, THAMM ET AL. 2010). Auch Dopamin kann über zwei unterschiedliche Dopaminrezeptoren aktivierend (AmDOP1) oder hemmend (AmDOP3) auf Adenylylcyclasen wirken (BEGGS ET AL. 2005, BLENAU ET AL. 1998). Die parallele Aktivierung und Inhibierung eines *second messenger* Signalwegs ist möglich, wenn die entsprechenden Rezeptoren in der gleichen Zelle exprimiert werden. Physiologische Prozesse könnten auf diese Weise durch nur ein biogenes Amin detailliert gesteuert werden. Ein potentieller Regulationsmechanismus durch die beiden Tyraminrezeptoren ist denkbar. So setzt die cAMP-Synthese über den AmTyr2-Rezeptor erst ein, wenn ein bestimmter Schwellenwert der Tyraminkonzentration überschritten wird. Bis zu diesem Zeitpunkt inhibieren niedrige Tyraminkonzentrationen eher die cAMP Synthese über den AmTyr1-Rezeptor. Solch ein Szenario würde auch die Ergebnisse aus Versuchen mit Membranpräparationen aus Homogenaten von Bienengehirnen erklären. Hierbei führte die Applikation geringer Konzentrationen von Tyramin zu einer verminderten cAMP-Synthese, während die Applikation von hohen Konzentrationen diesen Effekt verringerte oder sogar zu einer Aktivierung von Adenylylcyclasen führte (BLENAU ET AL. 1996, 2000). Diese Ergebnisse wurden der gleichzeitigen Aktivierung von cAMP-stimulierenden Octopaminrezeptoren zugeschrieben. Durch die Charakterisierung

des AmTyr2-Rezeptors und den Nachweis der Existenz eines cAMP-stimulierenden Tyraminrezeptors können diese Effekte aber besser erklärt werden und sind sehr wahrscheinlich auf den AmTyr2-Rezeptor zurückzuführen.

Antagonisten

Die Substanzen Mianserin und Yohimbin sind die effektivsten Antagonisten für den AmTyr2-Rezeptor, wohingegen der AmTyr1-Rezeptor am besten mit Chlorpromazin gefolgt von Yohimbin inhibiert werden kann. Diese Substanzen wurden auch bei *B. mori*, *D. melanogaster*, *L. migratoria* und *P. americana* als Tyraminrezeptor-Antagonisten identifiziert (HUANG ET AL. 2009, OHTA ET AL. 2003, ROTTE ET AL. 2009, SAUDOU ET AL. 1990, VANDEN BROECK ET AL. 1995). Bei der Verwendung von Mianserin und Chlorpromazin in verhaltenspharmakologischen Studien bei *A. mellifera* ist allerdings zu beachten, dass ebenfalls die Octopamin- und die Dopaminrezeptoren blockiert werden (BALFANZ ET AL. 2014, BEGGS ET AL. 2011, BLENAU ET AL. 1998, MUSTARD ET AL. 2003). Somit sollte Yohimbin in Studien zum Octopamin/Tyramin-System bei *A. mellifera* der Antagonist der Wahl sein, um die Tyraminrezeptoren zu inhibieren, weil dieser nicht die Octopaminrezeptoren blockiert (BALFANZ ET AL. 2014). Yohimbin ist ein Antagonist der α_2-adrenergen Rezeptoren und seit Jahren auch als Tyraminrezeptor-Antagonist bekannt (ROEDER 2005). Es fand bereits Verwendung in zahlreichen Studien zur Charakterisierung von Tyraminrezeptoren und deren physiologischer Bedeutung (BLUMENTHAL 2003, POELS ET AL. 2001, SAUDOU ET AL. 1990, VANDEN BROECK ET AL. 1995). Seine starke Wirkung auf den AmTyr2-Rezeptor untermauert das Ergebnis, dass es sich bei diesem um einen Tyraminrezeptor handelt.

Trotz der Analyse zahlreicher potentieller Antagonisten konnte keiner ermittelt werden, der einen der beiden Tyraminrezeptoren selektiv inhibiert. In pharmakologischen Studien ist eine Möglichkeit für die selektive Hemmung eines einzelnen Rezeptors die kombinierte Anwendung mehrerer Antagonisten. Aufgrund der bereits erwähnten Kreuzreaktionen der anderen identifizierten Antagonisten mit verschiedenen biogenen Aminrezeptoren (BALFANZ ET AL. 2014, BEGGS ET AL. 2011, BLENAU ET AL. 1998) ist dieses Vorgehen bei den beiden Tyraminrezeptoren der Honigbiene nicht möglich. Effekte, die in solchen Experimenten beobachtet werden, könnten nicht nur auf die Inhibierung von Tyraminrezeptoren, sondern auch auf blockierte Serotonin- oder Dopaminrezeptoren zurückgeführt werden. Yohimbin inhibiert den AmTyr2-Rezeptor aber bei einer deutlich geringeren Konzentration als für die Blockierung des AmTyr1-Rezeptors erforderlich. So-

mit ist die selektive Inhibierung des AmTyr2-Rezeptors durch die konzentrationsabhängige Verwendung von Yohimbin denkbar. Da es bei der Verfütterung oder Injektion von Tyramin im Vergleich zu *in vitro* Studien nicht möglich ist, die genaue Konzentration des Antagonisten am Wirkungsort zu kontrollieren, kann eine in diesem Fall unerwünschte Blockierung des AmTyr1-Rezeptors nicht komplett ausgeschlossen werden. Eine spezifischere Methode für die Rezeptorinhibierung stellt die RNA-Interferenz dar. Hierbei kommt es zu einer Hemmung der Genexpression, indem sequenzspezifische doppelsträngige RNA zugegeben wird und dies zu einem Abbau der mRNA führt (FIRE ET AL. 1998). Mit einer etablierten RNA-Interferenz für AmTyr1 und AmTyr2 ist das Ausschalten eines einzelnen Tyraminrezeptors sowie beider Rezeptoren gleichzeitig denkbar.

4.1.4 Einordnung des AmTyr2-Rezeptors in das bestehende System der Tyraminrezeptoren

Analysiert man die phylogenetische Beziehung von Tyraminrezeptoren bei Insekten, ist eine strikte Gruppierung in Tyramin-1-Rezeptoren und Tyramin-2-Rezeptoren erkennbar. Der AmTyr2-Rezeptor weist eine größere Ähnlichkeit zu den Tyramin-2-Rezeptoren von *D. melanogaster* und *B. mori* auf. AmTyr1 hingegen ordnet sich bei den Tyraminrezeptoren von *L. migratoria* und *Tribolium castaneum* ein. Vergleicht man die Charakteristika der Tyramin-1-Rezeptoren untereinander zeigen sich Gemeinsamkeiten. Alle pharmakologisch charakterisierten Vertreter wirken hemmend auf Adenylylcyclasen und sorgen für einen reduzierten cAMP-Level im Zellinneren (BLENAU ET AL. 2000, OHTA ET AL. 2003, ROTTE ET L. 2009, SAUDOU ET AL. 1990, VANDEN BROECK ET AL. 1995, WU ET AL. 2013).
Die Gruppe der Tyramin-2-Rezeptoren hingegen ist heterogen. Obwohl die phylogenetische Analyse der Aminosäuresequenzen auf eine nahe Verwandtschaft hindeutet, unterscheiden sich die Tyramin-2-Rezeptoren in ihrem Charakter deutlich voneinander. Während der AmTyr2-Rezeptor Adenylylcyclasen stimuliert, führt die Aktivierung der orthologen Rezeptoren von *B. mori* und *D. melanogaster* (CG7431) zur Mobilisierung von intrazellulärem Calcium (CAZZAMALI ET AL. 2005, HUANG ET AL. 2009). Ein weiterer, als DmTAR3 bezeichneter Tyraminrezeptor von *D. melanogaster* (CG16766) mobilisiert intrazelluläres Calcium und reduziert gleichzeitig den intrazellulären cAMP Level (BAYLISS ET AL. 2013). Trotz der positiven Kopplung an Adenylylcyclasen zeigt der AmTyr2-Rezeptor aber auch keine besondere Nähe zu den Octopamin-β-Rezeptoren der

Honigbiene, deren Aktivierung ebenfalls zu einem Anstieg des $[cAMP]_i$ führt (BALFANZ ET AL. 2014). Alle bisher analysierten Tyraminrezeptoren bei Insekten zeigen eine unterschiedliche Empfindlichkeit gegenüber Tyramin. Ein adäquater Vergleich ist hier aber nicht möglich, da die Rezeptoren in verschiedenen Zelllinien exprimiert und die Daten mit verschiedenen Messsystemen ermittelt wurden.

Trotz der phylogenetischen Nähe des AmTyr2-Rezeptors zu anderen Tyramin-2-Rezeptoren erfolgt die Einordnung von biogenen Aminrezeptoren hauptsächlich anhand ihrer pharmakologischen Eigenschaften (EVANS & MAQUEIRA 2005). Nach bisherigen Kenntnissen ist AmTyr2 der einzige Tyraminrezeptor bei Insekten, dessen Aktivierung zu einer cAMP-Synthese führt. Aus diesem Grund erscheint es sinnvoll, AmTyr2 als Begründer einer neuen Gruppe von Tyraminrezeptoren zu sehen, welche durch die Fähigkeit hervorstechen, die Synthese von cAMP zu stimulieren. Es wird interessant sein zu sehen, ob in naher Zukunft auch in anderen Arten Tyraminrezeptoren mit ähnlichen Eigenschaften identifiziert werden können.

4.1.5 Lokalisierung und potentielle Funktionen des AmTyr2-Rezeptors

Nach der funktionellen Charakterisierung des AmTyr2-Rezeptors stellt sich neben der Lokalisierung des Rezeptorproteins im Bienengewebe auch die Frage nach der Funktion des Rezeptors in der Physiologie sowie der Steuerung des Verhaltens von *A. mellifera*.

In Western Blot Experimenten konnte das Rezeptorprotein im Gehirn sowie der Muskulatur, dem Fettkörper, dem Kropf und den Malpighischen Gefäßen nachgewiesen werden. Vergleicht man dies mit der Expression der Tyraminrezeptoren anderer Insekten, zeigt sich, dass der Tyraminrezeptor von *P. americana* ebenfalls im Gehirn, der Muskulatur und den Malpighischen Gefäßen exprimiert wird (ROTTE ET AL. 2009). In *B. mori* und *L. migratoria* hingegen wurden die Tyraminrezeptoren nur im Nervengewebe detektiert (HUANG ET AL. 2009, VANDEN BROECK ET AL. 1995). Das scheinbar ubiquitäre Vorkommen von Tyraminrezeptoren im Nervengewebe macht auch eine Beteiligung des AmTyr2-Rezeptors an der Perzeption und Verarbeitung multimodaler Reize wahrscheinlich. Für eine detaillierte Lokalisierung des AmTyr2-Rezeptorproteins im Gehirn der Honigbiene wurden immunhistochemische Färbungen an Vibratomschnitten durchgeführt. Prominente Markierungen wurden in den optischen Loben, in den Antennalloben, in den Pilzkörpern und im Zentralkomplex detektiert.

Optische Loben

In den optischen Loben konnte das AmTyr2-Rezeptorprotein in der Medulla und der Lobula nachgewiesen werden. Bei den optischen Loben handelt es sich um die primären Verarbeitungszentren von visuellen Informationen aus der Retina. Während in der Medulla die erste Verarbeitung der Informationen von den Photorezeptoren der Retina stattfindet, erfolgt in der Lobula eine komplexere Verarbeitung der Informationen, was zur Wahrnehmung von Farbe, Form und Bewegung von Objekten führt (SRINIVASAN 2010). Die optischen Chiasmata, welche ebenfalls eine starke AmTyr2-ähnliche Immunreaktivität aufwiesen, stellen die Überkreuzungen von Neuronenfasern, welche von der Lamina zur Medulla bzw. von der Medulla zur Lobula führen, dar. Bisher gibt es nur wenige Informationen über den Einfluss von Tyramin auf das visuelle System und die Beteiligung der entsprechenden Rezeptoren bei Insekten. SCHEINER ET AL. (2014A) konnten zeigen, dass Honigbienen nach oraler Applikation hoher Tyraminkonzentrationen schneller zu einer Lichtquelle liefen. Dieser positive Effekt auf das phototaktische Verhalten kann jedoch eher durch eine gesteigerte lokomotorische Aktivität, als eine höhere Lichtempfindlichkeit erklärt werden (SCHEINER ET AL. 2014A). Weitere Untersuchungen zum Effekt von Tyramin und dessen Rezeptoren in Bezug auf das visuelle System bei *A. mellifera* müssen folgen.

Antennalloben

Eine starke Markierung des AmTyr2-Rezeptorproteins zeigte sich weiterhin in den Antennalloben. Diese setzen sich aus einer Vielzahl Glomeruli zusammen, welche ein zentrales Faserknäuel umgeben. Daneben gehören dorsale, mediodorsale und laterale Neuronen in der Peripherie zum Antennallobus (FLANAGAN & MERCER 1989, MERCER ET AL. 1983). Sie erhalten ihre Informationen über olfaktorische Rezeptorneurone aus den Antennen, die den jeweiligen Antennallobus über den Antennalnerv erreichen (HANSSON & ANTON 2000, HOMBERG ET AL. 1989). Bei den AmTyr2-immunreaktiven peripheren Neuronen der lateralen Gruppe handelt es sich wahrscheinlich um Projektionsneurone, die vom Antennallobus in die Pilzkörper projizieren und um lokale Interneurone, die mit den Glomeruli in Kontakt stehen (FLANAGAN & MERCER 1989, HANSSON & ANTON 2000, HOMBERG ET AL. 1989). Die Antennalloben sind zum einen das primäre Verarbeitungszentrum olfaktorischer und mechanischer Reize. Zum anderen scheinen sie neben den Pilzkörpern auch der Sitz von einer Art olfaktorischen Gedächtnisses zu sein (HAMMER & MENZEL 1995, 1998, HOMBERG ET AL. 1989). Somit erscheint es sinnvoll, dem AmTyr2-Rezeptor eine Beteiligung

an der Verarbeitung dieser Reize zuzuordnen. Handelt es sich bei den markierten Zellen um Projektionsneurone, könnte der AmTyr2-Rezeptor nicht nur in die lokale Verarbeitung olfaktorischer Informationen involviert sein, sondern auch an deren Weiterleitung und Verarbeitung in höheren Gehirnzentren beteiligt sein. Einige Projektionsneurone verarbeiten hierbei die Zusammensetzung eines Duftes, andere dessen Konzentration und die Dauer des Stimulus (GALIZIA & RÖSSLER 2010). Eine funktionelle Rolle von Tyramin in der Olfaktorik wurde bereits bei verschiedenen Insekten nachgewiesen. Bei *Manduca sexta* resultiert die Tyraminapplikation in einer erhöhten Empfindlichkeit gegenüber dem Sexualpheromon, indem es zu einer erhöhten Frequenz des Aktionspotentials und einer erhöhten Amplitude von Sensillenpotentialen führt (FLECKE & STENGL 2009). Die *honoka* Mutante von *D. melanogaster*, welche eine verringerte Expression des Tyraminrezeptors aufweist, zeigt nicht mehr das gewohnte Vermeidungsverhalten gegenüber Repellentien (KUTSUKAKE ET AL. 2000). Dies wird auf die Beteiligung des Tyraminrezeptors an der Verarbeitung olfaktorischer Informationen in den Antennalloben zurückgeführt.

Pilzkörper

Eine starke AmTyr2-ähnliche Färbung wurde in den Kenyon Zellen der Pilzkörper beobachtet. Die Pilzkörper der Honigbiene sind multimodale Zentren und verarbeiten Informationen aus den optischen Loben, den Antennalloben sowie dem Subösophagealganglion (FAHRBACH 2006). Sie gelten im Allgemeinen als Sitz des Kurz- und Langzeitgedächtnisses, als übergeordnetes Zentrum für zahlreiche Verarbeitungs- und Lernprozesse, sowie als Ort der Entscheidungsfindung (DAVIS 1996, ERBER ET AL. 1980, HAMMER & MENZEL 1998, HEISENBERG 1998, 2003). Die Expression des AmTyr2-Rezeptors in den Pilzkörpern, speziell den Kenyon Zellen, legt eine Beteiligung des Rezeptors an Lernprozessen nahe. Diese Hypothese wird unterstützt durch die Tatsache, dass der Rezeptor an Adenylylcyclasen-stimulierende G_s-Proteine gekoppelt ist. Die Beteiligung von cAMP beim Lernen ist durch zahlreiche Studien belegt worden. Versuche mit *Drosophila* Mutanten zeigen, dass cAMP und die durch cAMP aktivierte Proteinkinase A eine wichtige Rolle beim olfaktorischen Lernen spielen (DAVIS 1993). In *A. mellifera* führt das Herunterregulieren der Proteinkinase A-Aktivität während des Lernens zu einer Beeinträchtigung des Langzeitgedächtnisses (FIALA ET AL. 1999). Es wird angenommen, dass cAMP und die Proteinkinase A auf Ionenkanäle und Transkriptionsfaktoren wirken, was wiederum zu Veränderungen in der Physiologie der Zellen führt und Lernprozesse ermöglicht (DAVIS 1996). Ein Transkriptionsfaktor, welcher durch cAMP und die Protein-

kinase A aktiviert wird, ist CREB (*cAMP response element-binding protein*). Dieser ist nachweislich an der Ausbildung des Langzeitgedächtnisses beteiligt (YIN & TULLY 1996). Die in den cAMP-Signalweg involvierten Komponenten (Adenylylcyclase, Phosphodiesterase und Proteinkinase A) werden alle in den Pilzkörpern exprimiert und eine Störung dieser Komponenten führt bei *Drosophila* zu einem verminderten Gedächtnis (DAVIS 1993).

In Honigbienen beeinflusst Tyramin die Habituation, die einfachste Form des Lernens. Bei der Habituation führt die mehrfach wiederholte Applikation eines ansonsten stimulierenden Reizes irgendwann zu einer Abnahme der spezifischen Reaktion (THOMPSON & SPENCER 1966). Bei der Honigbiene kann dies bei der Habituation des Rüsselreflexes beobachtet werden. Wird die Antenne einer Biene mit einem Tropfen Zuckerwasserlösung in ausreichender Konzentration berührt, streckt das Tier reflexartig den Rüssel aus. Durch die wiederholte Stimulierung einer Antenne mit geringen Zuckerwasserkonzentrationen verliert sich dieser Reflex allmählich (BRAUN & BICKER 1992, SCHEINER 2004). Die Applikation von Tyramin führt hierbei zu einer beschleunigten Habituation gegenüber dem Reiz Zuckerwasser (BRAUN & BICKER 1992).

Außer dem AmTyr2-Rezeptor gibt es auch Octopamin-, Serotonin- und Dopaminrezeptoren, welche Adenylylcyclasen aktivieren und für einen cAMP Anstieg sorgen (BALFANZ ET AL. 2014, BLENAU ET AL. 1998, SCHLENSTEDT ET AL. 2006). Mit den Tyraminrezeptoren AmTyr1 und AmTyr2 gibt es nun ein zusätzliches Rezeptorenpaar zur exakten Regulierung des cAMP-Levels in Kenyon Zellen. Denn offensichtlich ist für die Neuroplastizität eine exakte Modulierung des $[cAMP]_i$ Spiegels wichtiger als die absolute Menge des Botenstoffs (MELLER & DAVIS 1996). Der bisher diskutierte Zusammenhang zwischen Tyramin und Lernprozessen bei Honigbienen muss durch weitere Experimente belegt werden.

Zentralkomplex

Im Zentralkomplex konnten ebenfalls AmTyr2-ähnliche Markierungen nachgewiesen werden. Im Gegensatz zu den Pilzkörpern war die Rolle, die der Zentralkomplex im Insektengehirn spielt, lange Zeit nicht bekannt. Inzwischen gilt er als multisensorisches Gehirnteil, in welchem eine Vielzahl visueller, mechanosensorischer und olfaktorischer Signale verarbeitet wird (PFEIFFER & HOMBERG 2014).

Ein Bereich des Zentralkomplexes, der eine deutliche Färbung durch den anti-AmTyr2 Antikörper zeigte, war die Protocerebralbrücke. Die Zellen der Protocerebralbrücke sind

wichtig für die laterale Unterscheidung visueller Reize (HOMBERG 1985, MILDE 1988). Eine Beteiligung des AmTyr2-Rezeptors an visuellen Prozessen in diesem Bereich ist damit durchaus denkbar. In Heuschrecken und wahrscheinlich auch in Fliegen erfolgt hier z.B. die Verarbeitung von polarisiertem Licht (LIN ET AL. 2013).

Auch der Zentralkörper zeigte bei den analysierten Bienengehirnen eine AmTyr2-ähnliche Immunreaktivität. Der Zentralkörper ist das Zentrum für die motorische Kontrolle und hat eine wichtige Funktion in der Lokomotorik, speziell dem Laufen und Fliegen, sowie der rechts-links Koordinierung und der Orientierung (PFEIFFER & HOMBERG 2014, STRAUSS 2002). Hinsichtlich der Lokomotorik scheint der Zentralkomplex das Laufen anzuregen (MARTIN ET AL. 1998). Durch den Nachweis der Expression des AmTyr2-Rezeptors im Zentralkörper und dessen aktivierende Wirkung auf die Lokomotorik, wäre eine gesteigerte lokomotorische Aktivität durch Tyramin zu erwarten. Und tatsächlich konnte bei Honigbienen eine erhöhte Lokomotorik durch Tyraminapplikation beobachtet werden. Die Verfütterung von Tyramin führt zu einer höheren Laufgeschwindigkeit von Sammlerinnen in einer dunklen Arena (SCHEINER ET AL. 2014A). Eine Studie von FUSSNECKER ET AL. (2006) zeigte allerdings eine reduzierte Lokomotorik nach Injektion von Tyramin in das Abdomen. Weitere Daten zum Einfluss von Tyramin auf die Lokomotorik bei *D. melanogaster* zeigen ebenfalls unterschiedliche Effekte. Die Mutante *TβH*, welche sich durch das Fehlen des Enzyms Tyramin-β-Hydroxylase auszeichnet, ist nicht in der Lage Octopamin zu synthetisieren, aber zeigt einen erhöhten Gehalt an Tyramin (MONASTIRIOTI ET AL. 1996). Diese Mutanten zeigen als Larven aber nicht als adulte Tiere Störungen in der Lokomotorik; sie bewegen sich weniger, sind langsamer und die Strecken, die sie zurücklegen, sind kürzer (HARDIE ET AL. 2007, SARASWATI ET AL. 2004). Adulte Fliegen der *D. melanogaster* Mutante *honoka*, welche eine verringerte Expression des Tyraminrezeptors aufweist, zeigten keine veränderte Lokomotorik (KUTSUKAKE ET AL. 2000). Der Zusammenhang zwischen Tyramin und der Lokomotorik im Zentralkörper erscheint sehr komplex. Ein möglicher Ansatzpunkt zur Erklärung der entgegengesetzten Effekte bei *A. mellifera* könnte die Aktivierung von verschiedenen Tyraminrezeptoren sein. So könnten die Ergebnisse von SCHEINER ET AL. (2014A) auf den AmTyr2-Rezeptor zurückzuführen sein, die Ergebnisse von FUSSNECKER ET AL. (2006) hingegen auf den AmTyr1-Rezeptor. Eine andere Erklärung könnte die Applikationsmethode liefern. Es ist bekannt, dass die Verfütterung von biogenen Aminen den Amingehalt im Gehirn erhöht (SCHULZ & ROBINSON 2001), was bei einer lokalen Injektion in das Abdomen bislang nicht untersucht wurde. Die unterschiedlichen Effekte bei *D. melanogaster*

können möglicherweise auch durch die verschiedenen Entwicklungsstadien erklärt werden. Bei holometabolen Tieren ist ein Vergleich zwischen Larven und adulten Tieren aufgrund der unterschiedlichen Anatomie und Lebensweise schwer möglich.

Ein Vergleich der Expressionsmuster zwischen dem AmTyr2-Rezeptor und dem AmTyr1-Rezeptor im Nervengewebe von Honigbienen offenbart viele Übereinstimmungen. Da bis dato kein funktioneller Antikörper gegen das AmTyr1-Rezeptorprotein vorliegt, müssen die Daten der mRNA Expression des Rezeptors durch in-situ-Hybridisierungen genügen. Demnach wird AmTyr1 ebenso wie AmTyr2 in den Kenyon Zellen der Pilzkörper, den Neuronen der lateralen Gruppe der Antennalloben sowie im ersten und zweiten optischen Chiasma exprimiert (BLENAU ET AL. 2000, MUSTARD ET AL. 2005). Vergleicht man die Expressionsmuster beider Rezeptoren in den Pilzkörpern im Detail, zeigt sich aber ein wesentlicher Unterschied. Während der AmTyr2-Rezeptor verstärkt in den Perikaryen der Klasse I Kenyon Zellen der Lippe und des Kragens sowie den Klasse II Kenyon Zellen exprimiert wird, zeigt sich der AmTyr1-Rezeptor an diesen Stellen weniger deutlich (MUSTARD ET AL. 2005). AmTyr1 tritt allerdings stärker in den Klasse I Kenyon Zellen des Basalrings auf (MUSTARD ET AL. 2005), welche wiederum eine schwächere AmTyr2-ähnliche Färbung aufweisen. Erst Kolokalisationsstudien mit beiden Rezeptoren können abschließend klären, ob eine unterschiedliche oder identische Expression der Rezeptoren vorliegt.
Es liegen bisher keine veröffentlichten Daten zur Verteilung von Tyramin selbst im Gehirn von Honigbienen vor. Bei *L. migratoria* wurden zahlreiche tyraminerge Neurone im Gehirn gefunden. Eine starke Tyramin-ähnliche Immunreaktivität zeigten die Protocerebralbrücke, der untere Teil des Zentralkörpers, die Antennalloben sowie distinkte Bereiche der Lobula und der Medulla (KONONENKO ET AL. 2009). Einige der detektierten Fasern und Neurone waren ausschließlich tyraminerg. Eine ähnliche Untersuchung bei der Honigbiene durch die Verwendung eines spezifischen anti-Tyramin Antikörpers würde eine Aussage zu den Abgabe- und Wirkorten von Tyramin ermöglichen. Mit solchen Daten könnten die Hypothesen zur Funktion der Tyraminrezeptoren bei *A. mellifera* weiterentwickelt werden.
Die Charakterisierung des AmTyr2-Rezeptors erbrachte, dass dessen Aktivierung zu einem Anstieg des $[cAMP]_i$ durch die Aktivierung von Adenylylcyclasen führt. Zwar sind noch nicht alle vorhergesagten Adenylylcyclasen der Honigbiene charakterisiert, aber es liegen Daten zur Lokalisierung zweier membrangebundener Adenylylcyclasen (AmAC3 und AmAC8) vor. Beide zeigen eine räumliche Nähe zum AmTyr2-Rezeptor. So wird AmAC3

vorwiegend in den optischen Loben, den Antennalloben und dem Zentralkörper exprimiert, während AmAC8 überwiegend in den Pilzkörpern lokalisiert ist (BALFANZ ET AL. 2012, FUSS ET AL. 2010).

Zusammenfassend könnte der in der vorliegenden Arbeit charakterisierte AmTyr2-Rezeptor im Gehirn an der Verarbeitung und Bewertung olfaktorischer Stimuli sowie deren Verankerung im Gedächtnis beteiligt sein. Weiterhin ist eine aktive Rolle des Rezeptors beim Lernen und bei der Lokomotorik denkbar. Für einen experimentellen Nachweis der Funktionen des AmTyr2-Rezeptors ist dessen Ausschaltung bzw. die Überexpression mit Hilfe molekularbiologischer Methoden (z.B. der RNA-Interferenz) oder die pharmakologische Aktivierung bzw. Blockierung notwendig. Anschließend können physiologische und verhaltensbiologische Versuche durchgeführt werden.

4.2 Biogene Amine und deren Rezeptoren bei der Arbeitsteilung von *A. mellifera*

Welche Aufgabe eine Arbeiterin in einer Honigbienenkolonie ausführt, wird durch verschiedene Faktoren beeinflusst. Hier unterscheidet man zwischen internen Faktoren, wie genetischen, neuronalen und hormonellen Einflüssen und externen Faktoren, zu denen Interaktionen der Arbeiterinnen untereinander sowie Informationen aus der Umwelt zählen (BESHERS & FEWELL 2001). Zu den Umweltreizen, welche die Aufgabenerfüllung in einer Honigbienenkolonie beeinflussen, gehören die Koloniegröße, die Brutmenge, die eingetragene Pollenmenge und die Verfügbarkeit von Futterquellen (DRELLER ET AL. 1999, ECKERT ET AL. 1994, FEWELL & WINSTON 1992, FREE 1967, PANKIW ET AL. 1998, SEELEY 1986). Externe und interne Faktoren interagieren miteinander. So können Reize aus der Umwelt zu neuronalen Veränderungen im Organismus führen. Dies geschieht z.B. über Neurotransmitter und –modulatoren, wie Octopamin und Tyramin. Wie einleitend erwähnt, beeinflussen Octopamin und Tyramin die Arbeitsteilung von *A. mellifera*. Arbeiterinnen einer Honigbienenkolonie unterscheiden sich in ihrer Empfindlichkeit gegenüber gustatorischen und olfaktorischen Reizen (SCHEINER ET AL. 2004, THAMM & SCHEINER 2014). Diese Empfindlichkeit wiederum kann durch die Applikation von Octopamin und Tyramin beeinflusst werden (BARRON ET AL. 2002, SCHEINER ET AL. 2002).

Nach der erfolgten Charakterisierung des Tyramin-2-Rezeptors, liegen nun die vollständigen Daten aller Octopamin- und Tyraminrezeptoren der Honigbiene vor. Während die

Tyraminrezeptoren und die Octopamin-β-Rezeptoren auf Adenylylcyclasen wirken und zu einem Anstieg (AmTyr2, AmOctβR1-4) bzw. einer Reduktion (AmTyr1) der cAMP Konzentration führen (vorliegende Arbeit, BALFANZ ET AL. 2014, BLENAU ET AL. 2000), führt die Aktivierung des AmOctαR1 hauptsächlich zu Ca^{2+}-Oszillationen (GROHMANN ET AL. 2003). Diese Rezeptoren sind aussichtsreiche Kandidaten, über die eine Regulation der altersabhängigen Aufgabenteilung in einer Kolonie erfolgen könnte. Im Folgenden werden der Gehalt von Octopamin und Tyramin im Gehirn sowie die Expression der korrespondierenden biogenen Aminrezeptoren bei Ammenbienen und Sammlerinnen erklärt sowie potentielle Folgen für die altersabhängige Arbeitsteilung diskutiert.

4.2.1 Octopaminrezeptoren

Octopaminrezeptoren wurden bisher bei einer Reihe Insekten unterschiedlicher Familien identifiziert und charakterisiert (CHEN ET AL. 2010, CUNNINGHAM ET AL. 2014, LAM ET AL. 2013, MAQUEIRA ET AL. 2005, WU ET AL. 2012, Übersicht: FAROOQUI 2012). Trotz der großen Anzahl an Funktionen, welche Octopamin nachweislich bei Insekten und anderen Wirbellosen besitzt, konnten bisher nur wenige Aussagen über die Beteiligung der Genexpression der entsprechenden Rezeptoren am Verhalten, im Besonderen dem sozialen Verhalten, getroffen werden. Unterschiede in der Genexpression von Octopaminrezeptoren im sozialen Kontext wurden bisher nur bei der Wüstenheuschrecke *Schistocerca gregaria* und dem Totengräber *N. vespilloides* gefunden. Bei *S. gregaria* geht die Schwarmphase einher mit einer höheren Genexpression der Octopaminrezeptoren SgOctαR und SgOctβR, was wiederum mit der höheren Flugaktivität der Heuschrecken in dieser Phase korreliert (VERLINDEN ET AL. 2010). Bei *N. vespilloides* konnte eine Korrelation zwischen der Octopaminrezeptor-Genexpression und dem Verhalten, speziell der Duldung von Artgenossen, sowie dem Paarungsstatus und dem indirekten Fürsorgeverhalten der Weibchen nachgewiesen werden (CUNNINGHAM ET AL. 2014).

Bei *A. mellifera* spielt das biogene Amin Octopamin eine wichtige Rolle beim sozialen Verhalten und der Arbeitsteilung (ROEDER 2005, SCHULZ & ROBINSON 1999, 2001). Dieses biogene Amin konnte in den Antennalloben, dem Subösophagealganglion, der Lamina, Medulla und Lobula der optischen Loben sowie in den Calyces der Pilzkörper nachgewiesen werden (KREISSL ET AL. 1994, SINAKEVITCH ET AL. 2005). In der vorliegenden Arbeit konnte in den Gehirnen von Sammlerinnen ein höherer Gehalt an Octopamin detektiert werden, als in den Gehirnen von Ammenbienen. Offensichtlich gibt es also eine Korrela-

tion zwischen dem Octopamingehalt und dem Alter bzw. der sozialen Rolle. Unterstützt wird diese Aussage durch WAGENER-HULME ET AL. (1999), die ebenfalls einen Zusammenhang zwischen dem Octopamingehalt und dem Verhalten von Honigbienen entdeckten. Da Octopamin über die Bindung an spezifische Rezeptoren in der Zellmembran wirkt, liegt eine Korrelation der Genexpression von Octopaminrezeptoren mit der Arbeitsteilung nahe.

AmOctαR1

Es konnte gezeigt werden, dass die Genexpression des Ca^{2+}-gekoppelten AmOctαR1 mit der sozialen Rolle von *A. mellifera* korreliert. Sammlerinnen haben unabhängig von ihrem Alter durchgehend einen höheren mRNA Gehalt im Subösophagealganglion und den Antennalloben als Ammenbienen. Diese Unterschiede in der Genexpression zwischen Ammenbienen und Sammlerinnen werden in erster Linie durch ihre soziale Rolle und nicht durch ihr biologisches Alter bestimmt. Die höhere Genexpression von AmOctαR1 in den Antennalloben von Sammlerinnen im Vergleich zu Ammenbienen geht einher mit einem höheren Gehalt von Octopamin in diesem Gehirnteil (SCHULZ & ROBINSON 1999). Dies unterstützt die Annahme, dass dem octopaminergen System bei der Steuerung der Arbeitsteilung eine Schlüsselrolle durch AmOctαR1 zukommt. MCQUILLAN ET AL. (2012A) konnten ebenfalls eine höhere Expression des Am*octaR1* Gens im Gesamtgehirn von Sammlerinnen nachweisen. Allerdings wurde dabei keine Unterscheidung zwischen einzelnen Gehirnbereichen getroffen und die Analyse erfolgte in einer Kolonie mit normaler Altersstruktur, was keinen Schluss auf einen Zusammenhang der Expression mit der sozialen Rolle oder eher dem biologischen Alter zulässt.

In der vorliegenden Arbeit waren die Unterschiede in der Genexpression von AmOctαR1 am deutlichsten im Subösophagealganglion und den Antennalloben; Bereiche im Gehirn, die an der Verarbeitung und Auswertung gustatorischer und olfaktorischer Reize beteiligt sind. Die Antennalloben sind die primären Verarbeitungszentren olfaktorischer Stimuli im Insektengehirn (GALIZIA & MENZEL 2001, HOMBERG ET AL. 1989). Das Subösophagealganglion fungiert als sensorisches und motorisches Zentrum der Futteraufnahme und kontrolliert die Rüsselextension nach entsprechender Stimulation der Antenne mit Zuckerwasser (REHDER 1989). Die ungleiche Genexpression in diesen Gehirnteilen lässt den Schluss zu, dass Sammlerinnen und Ammenbienen gustatorische und olfaktorische Reize, die durch Octopamin vermittelt werden, verschieden bewerten. Tatsächlich konnten THAMM & SCHEINER (2014) zeigen, dass Sammlerinnen empfindlicher gegenüber Zuckerwasser sind als Ammenbienen. Zudem sind Bienen mit einer höheren gustatori-

schen Empfindlichkeit ebenfalls empfindlicher gegenüber Düften (SCHEINER ET AL. 2004). Die hohe Empfindlichkeit gegenüber gustatorischen Reizen ist ebenso, wie die Expression des Am*octaR1* Gens, abhängig von der sozialen Rolle und nicht vom biologischen Alter (BEHRENDS ET AL. 2007). Ferner verstärkt die pharmakologische Aktivierung des Octopamin-Signalwegs offensichtlich die Bewertung olfaktorischer (BARRON ET AL. 2002, MERCER & MENZEL 1982, SPIVAK ET AL. 2003) und gustatorischer Reize (BEHRENDS & SCHEINER 2012, SCHEINER ET AL. 2002). Die Verwendung eines Antikörpers gegen den AmOctαR1 zeigte dessen Lokalisierung in den genannten Bereichen des Bienengehirns. Der Rezeptor wird im Antennallobus in Interneuronen und Projektionsneuronen sowie in einzelnen Zellpopulationen des Subösophagealganglions exprimiert (SINAKEVITCH ET AL. 2011).

Die bisherigen Ergebnisse zeigen, dass die beobachteten Unterschiede im Verhalten zwischen Ammenbienen und Sammlerinnen bei den genannten Studien durchaus das Resultat einer unterschiedlichen Expression des Ca^{2+}-gekoppelten Octopaminrezeptors AmOctαR1 sein könnten. Unterstützend hierzu sind die Studien von FAROOQUI ET AL. (2003) und REIN ET AL. (2013) zu nennen, die zeigen konnten, dass Octopamin die olfaktorischen Reaktionen über genau diesen Octopaminrezeptor moduliert und die Zerstörung des AmOctαR1 zu einem gestörten olfaktorischen Lernen und olfaktorischen Gedächtnis führt. Aus diesem Grund können Unterschiede in der Auswertung gustatorischer und olfaktorischer Reize bei Ammenbienen und Sammlerinnen wenigstens zu einem gewissen Teil auf eine schwächere bzw. stärkere Signalfortleitung durch den AmOctαR1 zurückgeführt werden.

Die gezeigten Ergebnisse stehen im Gegensatz zu den Ergebnissen von MCQUILLAN ET AL (2012B). Dort wiesen die Autoren eine höhere AmOctαR1 Genexpression direkt in den Antennen von Ammenbienen nach. Diese unerwartete Beziehung zwischen der Rezeptorexpression in der Peripherie und im Gehirn bedarf zusätzlicher Experimente, um zu klären, ob hinsichtlich des octopaminergen Systems eine Trennung zwischen der peripheren Sinneswahrnehmung und der zentralen Auswertung olfaktorischer Reize existiert.

Die unterschiedliche Expression des AmOctαR1 Gens in den Pilzkörpern von Ammenbienen und Sammlerinnen scheint eher abhängig vom Alter als von der sozialen Rolle zu sein. Zwar besaßen Sammlerinnen hier ein höheres Expressionslevel als zu Ammenbienen revertierte Sammlerinnen, jedoch wiesen gleichalte Ammenbienen und Sammlerinnen aus *single cohort* Kolonien keine Expressionsunterschiede des Rezeptorgens auf. Die Ergebnisse

passen zu den Resultaten der Studie von SCHULZ & ROBINSON (1999), in welcher sich der Octopamingehalt im Pilzkörper der untersuchten Bienen mit dem Alter aber nicht mit der sozialen Rolle ändert. Die Pilzkörper sind die Hauptverarbeitungsregionen im Insektengehirn und spielen eine zentrale Rolle beim Lernen und der Gedächtnisbildung (HEISENBERG 1998). Die erhöhte Genexpression des AmOctαR1 im Pilzkörper von Sammlerinnen liefert einen Hinweis auf deren bessere Lernleistung im Vergleich zu Ammenbienen. Wenn dies stimmt, könnte man erwarten, dass sich gleichalte Sammlerinnen und Ammenbienen in ihrem Lernverhalten nicht unterscheiden, weil sie sich in ihrer Rezeptorexpression nicht unterscheiden. Dies konnte in der Tat bereits nachgewiesen werden (BEHRENDS ET AL. 2007, SCHEINER & AMDAM 2009). Ob Sammlerinnen einer Kolonie mit normaler Altersstruktur tatsächlich eine bessere Lernleistung zeigen als Ammenbienen, muss in weiteren Experimenten untersucht werden.

Betrachtet man den intrazellulären Signalweg des AmOctαR1, so führt dessen Aktivierung hauptsächlich zu Ca^{2+}-Oszillationen (GROHMANN ET AL. 2003). Es ist bekannt, dass sich Ca^{2+}-Oszillationen verstärkend auf die Expression von Genen auswirken können, indem sie Transkriptionsfaktoren aktivieren und die Signaldetektion und die Signalwirksamkeit bei einem niedrigen Stimulationsniveau steigern (DOLMETSCH ET AL. 1998, LI ET AL. 1998). Eine gesteigerte Expression des AmOctαR1 könnte somit zu einer erhöhten Empfindlichkeit führen und zu einer Steigerung der Expression von Genen, die für die Ausführung rollenspezifischer Aufgaben notwendig sind. Dies könnte eine Erklärung für die höhere sensorische Empfindlichkeit von Sammlerinnen im Vergleich zu Ammenbienen sein (THAMM & SCHEINER 2014).

AmOctβR3/4

Im Gegensatz zu dem Ca^{2+}-Signalweg des AmOctαR1 aktivieren die AmOctβR1-4 über Adenylylcyclasen den cAMP-Signalweg (BALFANZ ET AL. 2014). Eine wichtige Aufgabe von cAMP als sekundärem Botenstoff ist die Aktivierung der Proteinkinase A. Durch diese erfolgt die Phosphorylierung verschiedener Substrate, darunter Transkriptionsfaktoren und Ionenkanäle (DAVIS 1996). Die Proteinkinase A spielt nachweislich eine wichtige Rolle beim Lernen und der Gedächtnisbildung von Insekten (DUBNAU & TULLY 1998, FIALA ET AL. 1999, MÜLLER 2000).

Octopamin-β-Rezeptoren spielen bei *A. mellifera* eine Rolle beim Auskundschaften neuer Futterquellen. Kundschafterbienen weisen eine stärkere Genexpression eines Octopamin-β-Rezeptors auf als normale Sammlerinnen (LIANG ET AL. 2012). Auch bei

D. melanogaster und *N. vespilloides* sind Octopamin-β-Rezeptoren bei Individuen auf Futtersuche stärker exprimiert (CUNNINGHAM ET AL. 2014, ZHANG ET AL. 2013). Da bei diesem Verhalten das Lernen neuer Futterquellen und die Erinnerung an diese eine große Rolle spielt, zeigen diese Ergebnisse die Bedeutung der Octopamin-β-Rezeptoren bei Lernprozessen.

In der vorliegenden Arbeit unterscheidet sich die Expression des Am*octβR3/4* Gens zwischen Ammenbienen und Sammlerinnen nur in den Pilzkörpern. Diese Expressionsunterschiede waren im Wesentlichen abhängig vom Alter und verschwanden in gleichalten Ammenbienen und Sammlerinnen. So kann geschlussfolgert werden, dass AmOctβR3/4 wahrscheinlich nicht an der Steuerung des unterschiedlichen Verhaltens zwischen Ammenbienen und Sammlerinnen beteiligt ist. Möglicherweise hat dieser Rezeptor eine Funktion bei Alterungs- und Lernprozessen. Sammlerinnen, die bereits lange Zeit sammeln, weisen im Vergleich zu Sammlerinnen, die erst seit Kurzem sammeln Defizite beim Lernen auf (BEHRENDS ET AL. 2007, SCHEINER & AMDAM 2009). Da Sammlerinnen mit langer Sammeldauer normalerweise älter sind, können diese altersabhängigen Unterschiede im Lernverhalten durchaus auf die unterschiedliche Genexpression des AmOctβR3/4 zurückgeführt werden. Bei *D. melanogaster* konnte eine Beteiligung der Octopamin-β-Rezeptoren an Alterungsprozessen nachgewiesen werden. Hier führt eine Hemmung der Octopamin-β-Rezeptoren zu einer verlängerten Lebensdauer (SPINDLER ET AL. 2012). Eine endgültige Aussage zu der Funktion von AmOctβR3/4 in diesem Kontext könnte nach der Etablierung einer RNA-Interferenz, wie für den AmOctαR1 vorhanden (FAROOQUI ET AL. 2003, 2004, REIN ET AL. 2013), getroffen werden.

Interessant bei dem Am*octβR3/4* Gen ist das Vorhandensein von zwei funktionsfähigen Spleißvarianten, die sich in ihrer Empfindlichkeit gegenüber Octopamin nur geringfügig unterscheiden (BALFANZ ET AL. 2014). In Vertebraten und Insekten sind Gene biogener Aminrezeptoren, die zwei Protein-Isoformen kodieren, nicht ungewöhnlich (USIELLO ET AL. 2000, WU ET AL. 2014). Diese Isoformen entstehen vermutlich durch alternatives Spleißen. Die verschiedenen Isoformen können dabei unterschiedliche Funktionen erfüllen. So wirkt bei Mäusen der Dopaminrezeptor D2L postsynaptisch und der Dopaminrezeptor D2S präsynaptisch als Autorezeptor (USIELLO ET AL. 2000). Inwieweit die beiden Spleißvarianten AmOctβR3 und AmOctβR4 unterschiedlich wirken bzw. verschieden lokalisiert sind, kann erst durch spezifische Antikörper und eine etablierte RNA-Interferenz untersucht werden.

Die vorliegenden Ergebnisse der untersuchten Octopaminrezeptoren führen zu dem Schluss, dass sie unterschiedliche Funktionen im Verhalten der Honigbiene erfüllen. Der Ca^{2+}-abhängige Signalweg des AmOctαR1 ist, wahrscheinlich über die Steuerung der sensorischen Empfindlichkeit, an der altersabhängigen Arbeitsteilung beteiligt. Dagegen könnte der cAMP-Signalweg des AmOctβR3/4 an altersabhängigen Unterschieden beim Lernen beteiligt sein.

4.2.2 Tyraminrezeptoren

Während die Verfütterung von Octopamin zu einem früheren Einsetzen des Sammelverhaltens von Arbeiterinnen in Honigbienenkolonien führt, verringert die Gabe von Tyramin meist die Anzahl von jungen Bienen, die sammeln (SCHULZ & ROBINSON 2001). Auf die Zuckerwasserempfindlichkeit von Honigbienen haben beide Substanzen allerdings die gleiche Wirkung; sie machen die Bienen empfindlicher (SCHEINER ET AL. 2002). Somit kann die Applikation von Tyramin und Octopamin sowohl gegenteilige als auch gleiche Effekte zeigen, je nach dem Verhalten das untersucht wird.
In der Vergangenheit wurden mehrere Tyraminrezeptoren bei Insekten identifiziert und teilweise charakterisiert (siehe 4.1). Im Gegensatz zu den Octopaminrezeptoren gibt es allerdings nur für wenige dieser Rezeptoren Studien zu deren möglicher Funktion. Bei *D. melanogaster* ist ein Tyraminrezeptor an der olfaktorischen Wahrnehmung repellenter Duftstoffe beteiligt (KUTSUKAKE ET AL. 2000). Bei Fliegen und Käfern steuern Tyraminrezeptoren wahrscheinlich das Fressverhalten (CUNNINGHAM ET AL. 2014, ISHIDA & OZAKI 2011). Es liegen bisher keine Daten vor, die eine Beteiligung von Tyraminrezeptoren an der Steuerung der altersabhängigen Arbeitsteilung zeigen.

AmTyr1

Die Genexpression des AmTyr1-Rezeptors unterscheidet sich zwischen Ammenbienen und Sammlerinnen nur im Subösophagealganglion und ist abhängig vom Alter aber nicht von der sozialen Rolle. Auch in der Peripherie, z.B. in den Antennen, zeigen Sammlerinnen im Vergleich zu jungen Bienen eine höhere Genexpression des AmTyr1-Rezeptors (MCQUILLAN ET AL. 2012A). Dieser Unterschied ist größtenteils ebenfalls abhängig vom biologischen Alter und nicht von der sozialen Rolle. Nach MUSTARD ET AL. (2005) ist die Menge des Am*tyr1* Transkripts im Gesamtgehirn von Sammlerinnen allgemein größer als in frischgeschlüpften Honigbienen. Ein direkter Vergleich zwischen Ammenbienen und

Sammlerinnen fand jedoch nicht statt. Die genannten Ergebnisse deuten auf eine altersabhängige Steigerung der Rezeptorexpression hin, während die Analyse der Tyraminmenge in den Gehirnen von Ammenbienen und Sammlerinnen in der vorliegenden Arbeit keinen Unterschied zwischen den beiden Gruppen zeigte.

Das Subösophagealganglion ist in die Perzeption gustatorischer Reize involviert. Hier spielt Tyramin eine Rolle bei der gustatorischen Empfindlichkeit. Die Verfütterung und die Injektion von Tyramin machen die Schmeißfliege *Phormia regina* und die Honigbiene empfindlicher gegenüber Zuckerwasser (NISIMURA ET AL. 2005, SCHEINER ET AL. 2002). Möglicherweise wird dieser Effekt durch den AmTyr1-Rezeptor hervorgerufen.

Da die Aktivierung des AmTyr1-Rezeptors die Adenylylcyclase inhibiert und den cAMP Gehalt in der Zelle verringert (BLENAU ET AL. 2000), hat dessen Stimulierung einen inhibierenden Effekt auf die Aktivität der Proteinkinase A. Das könnte erklären, warum die Verfütterung von Tyramin zu einer Verzögerung des Sammelbeginns bei *A. mellifera* führt (SCHULZ & ROBINSON 2001). Es konnte gezeigt werden, dass ein höherer Gehalt von Proteinkinase A im Gehirn von Honigbienen mit einem früheren Sammelbeginn einhergeht (HUMPHRIES ET AL. 2003).

Auch wenn der AmTyr1-Rezeptor möglicherweise nicht direkt an der Steuerung der altersabhängigen Aufgabenteilung in einer Honigbienenkolonie beteiligt ist, so scheint er bei der vom Alter unabhängigen Arbeitsteilung eine Rolle zu spielen. Beobachtet man Sanmmlerinnen gleichen Alters, zeigen diese Unterschiede in ihrem Sammelverhalten. So versorgen einige Bienen die Kolonie mit Nektar, während andere Bienen Pollen eintragen. (PANKIW & PAGE 2000). Vergleicht man nun gleichalte Pollen- und Nektarsammlerinnen, zeigen erstere im Subösophagealganglion eine höhere Expression der Rezeptor-mRNA als Nektarsammlerinnen (SCHEINER ET AL. 2014B).

AmTyr2

Der Vergleich der Genexpression des AmTyr2-Rezeptors zwischen Ammenbienen und Sammlerinnen zeigte in allen analysierten Gehirnteilen keinen Unterschied. Auch wenn viele potentielle Funktionen dieses neu charakterisierten biogenen Aminrezeptors denkbar sind (siehe 4.1.6), so scheint er nicht direkt an der Steuerung der altersabhängigen Arbeitsteilung bei *A. mellifera* beteiligt zu sein. Möglicherweise wird die Rezeptorfunktion aber auch auf einer anderen als der mRNA-Ebene reguliert. So wäre eine veränderte Rezeptoraktivität durch Phosphorylierungen oder die zeitweise Internalisierung eines Rezeptors in intrazelluläre Vesikel denkbar. Hierzu müssten entsprechende Experimente durchge-

führt werden, bevor eine Beteiligung an der Regulierung der altersabhängigen Arbeitsteilung ausgeschlossen wird.

Die beiden Octopaminrezeptorgene werden ebenso, wie die beiden Tyraminrezeptorgene, in allen untersuchten Gehirnteilen exprimiert. Betrachtet man die Ergebnisse von Studien zur Wirkung von Octopamin und Tyramin auf das Verhalten der Honigbiene, sollte bedacht werden, dass nur in den wenigsten Fällen bekannt ist (FAROOQUI ET AL. 2003), welcher Rezeptor genau dabei aktiviert wurde und somit die beobachtete Verhaltensänderung verursacht. Ob die Wirkung von Octopamin bzw. Tyramin über den Octopamin-α-Rezeptor oder den Octopamin-β-Rezeptor bzw. den AmTyr1- oder den AmTyr2-Rezeptor ausgelöst wurde, kann aber möglicherweise über den angeregten sekundären Signalweg gemutmaßt werden. Zeigen sich als Resultat pharmakologischer Studien Defizite bzw. Verbesserungen bei Lernprozessen, ist die Beteiligung des cAMP-Signalwegs wahrscheinlich (DAVIS 1993, YIN & TULLY 1996). Dabei würde die Stimulierung der Adenylylcyclase zu einer verbesserten Lernleistung und die Hemmung der Adenylylcyclase zu einer verminderten Lernleistung führen. Für entscheidende Aussagen müssten jedoch die Rezeptoren gezielt manipuliert und Veränderungen des Verhaltens dokumentiert werden. Ein wichtiger Schritt in diese Richtung war der direkte pharmakologische Vergleich des AmTyr1-Rezeptors mit dem AmTyr2-Rezeptor (siehe 4.1.3), der Hinweise auf Substanzen liefert, mit denen die Rezeptoren gezielt pharmakologisch inhibiert werden könnten.

4.3 Tyramin und Octopamin: antagonistische Neuromodulatoren?

Anhand der Ergebnisse in der vorliegenden Arbeit muss die Existenz und Wirkung von Tyramin mit seinen entsprechenden Rezeptoren in einem neuen Licht betrachtet werden. Bisher bestand die Annahme, dass es sich bei Tyramin um den „Gegenspieler“ von Octopamin handelt, da beide oft antagonistische Wirkungen zeigen (ROEDER 2005, ROEDER ET AL. 2003). Dies passte gut zu der cAMP stimulierenden Wirkung der Octopamin-β-Rezeptoren (BALFANZ ET AL. 2014) und der cAMP inhibierenden Wirkung der meisten bislang bekannten Tyraminrezeptoren (BLENAU ET AL. 2000, OHTA ET AL. 2003, ROTTE ET L. 2009, SAUDOU ET AL. 1990, VANDEN BROECK ET AL. 1995, WU ET AL. 2013). Mit dem AmTyr2-Rezeptor wurde nun erstmals ein Tyraminrezeptor beschrieben, der die cAMP Synthese ähnlich den Octopamin-β-Rezeptoren stimuliert. Somit kann die Applikation zweier strukturell ähnlicher biogener Amine zur Aktivierung der gleichen

Signalkaskaden führen. Tatsächlich gibt es Bereiche der Physiologie und des Verhaltens, in welchen Octopamin und Tyramin ähnliche Funktionen haben können. So erhöhen beide Substanzen die gustatorische Empfindlichkeit von Honigbienen und wirken stimulierend auf die Muskulatur der Spermathek von Heuschrecken (CLARK & LANGE 2003, SCHEINER ET AL. 2002).

Tyramin und Octopamin zeigen in Abhängigkeit vom Verhalten, welches untersucht wird, sowohl antagonistische, als auch agonistische Effekte (SCHEINER ET AL. 2006). Möglicherweise hat auch das Gleichgewicht zwischen Octopamin und Tyramin einen größeren Einfluss auf die Physiologie und das Verhalten eines Organismus, als die bloße An- oder Abwesenheit eines dieser biogenen Amine in einem Gewebe. In diesem Fall könnte Tyramin eher als Ko-Modulator, denn als antagonistischer Neuromodulator zum Octopamin bezeichnet werden.

4.4 Ausblick

In der vorliegenden Arbeit konnte der zweite Tyraminrezeptor von *A. mellifera* charakterisiert werden und erweitert damit den Kenntnisstand über Tyraminrezeptoren von Insekten. Die gewonnenen Ergebnisse bilden die Grundlage für weiterführende Experimente zur Wirkung von Tyramin auf die Physiologie und das Verhalten von Honigbienen.

So wäre eine gezielte Manipulation der Rezeptorexpression und –funktion durch RNA-Interferenz und pharmakologische Inhibierung denkbar. Anschließende verhaltensbiologische Tests z.B. zur Lokomotorik, zur Olfaktorik und dem Lernverhalten könnten die Funktionen der Tyraminrezeptoren in Honigbienen aufklären.

Weiterhin wurde in dieser Arbeit ein Antikörper gegen das AmTyr2-Rezeptorprotein generiert und dessen Expression im Nervengewebe untersucht. Für ein umfassendes Verständnis des tyraminergen Systems der Honigbiene ist die Herstellung eines spezifischen anti-AmTyr1-Antikörpers für Kolokalisationsstudien beider Tyraminrezeptoren notwendig. Mit solch einem Antikörper könnten potentielle Unterschiede im Expressionsmuster aber auch die Möglichkeit eines Zusammenspiels beider Tyraminrezeptoren detailliert analysiert werden. Für die ergänzende Lokalisierung der Abgabeorte des Tyramins selbst, müssen Färbungen mit einem anti-Tyramin-Antikörper durchgeführt werden. Mit den genannten Antikörpern wäre es überdies möglich, die Expression der Tyraminrezeptoren in einzelnen Geweben zu verschiedenen Entwicklungszeitpunkten zu untersuchen. Entsprechende Analysen würden Informationen über die Plastizität der

Rezeptorexpression liefern. Die vorgeschlagenen Experimente könnten die bisherigen Hypothesen zur Funktion der Tyraminrezeptoren unterstützen oder widerlegen bzw. die Entwicklung neuer Theorien erlauben.

Weiterhin kann eine gezielte Mutagenese und damit die Veränderung der Aminosäuresequenz des AmTyr2-Rezeptorproteins Einblicke in das Prinzip der Ligandenbindung geben und möglicherweise die Frage klären, wodurch die Präferenz der Tyramin- und Octopaminrezeptoren für Tyramin bzw. Octopamin entsteht. Außerdem ist es mit dieser Technik möglich, die Existenz potentieller posttranslationaler Modifikationen nachzuweisen und deren Auswirkungen auf die Rezeptorfunktion zu untersuchen.

Im zweiten Teil der vorliegenden Arbeit wurde mit der Analyse der Genexpression der Octopamin- und Tyraminrezeptoren in Ammenbienen und Sammlerinnen ein wichtiger Schritt hin zum Verständnis der Steuerung der Arbeitsteilung durch biogene Amine gemacht. Weiterführende Experimente müssen die bedeutende Rolle des AmOctαR1 in der altersabhängigen Arbeitsteilung bestätigen.

So stellt sich die Frage, ob die erhöhte Genexpression des Rezeptors Ursache oder Folge der Sammelaktivität ist. Diese Frage könnte geklärt werden, indem untersucht wird, ob die Expression des Am*octaR1*-Gens schon kurz vor Beginn des Sammelns erhöht ist oder erst kurz nach dem Sammelbeginn.

Weiterhin wäre eine detailliertere Analyse der Funktionen der Octopamin- und Tyraminrezeptoren bei der Honigbiene interessant. Die Expression der Rezeptoren im Zentralnervensystem spricht für eine funktionelle Rolle bei der Verarbeitung aufgenommener Reize. Zusätzliche Genexpressionsanalysen der Octopamin- und Tyraminrezeptoren in peripheren Bereichen des Nervensystems könnten Hinweise über eine direkte Beteiligung dieser Rezeptoren an der Bewertung spezifischer Reize außerhalb des Zentralnervensystems liefern.

Weiterhin wäre es interessant zu wissen, ob es ein Zusammenspiel der Rezeptorsubtypen sowie der durch sie aktivierten Signalkaskaden in der neuronalen Steuerung z.B. sensorischer Prozesse gibt. Ein Hinweis auf solch eine Interaktion könnte z.B. die Kolokalisation des AmOctαR1 mit den Octopamin-β-Rezeptoren im Gehirn von *A. mellifera* sein. Für diesen Zweck müssten spezifische Antikörper gegen die einzelnen Rezeptoren für immunhistochemische Färbungen an Gewebeschnitten generiert werden.

Während der AmOctαR1 offensichtlich in die Regulation der altersabhängigen Arbeitsteilung involviert ist, konnte an dieser Stelle kein Zusammenhang mit den Octopamin-β-Rezeptoren und den Tyraminrezeptoren entdeckt werden. Möglicherweise

spielen diese Rezeptoren aber in einem anderen Bereich, wie der vom Alter unabhängigen Arbeitsteilung zwischen Pollen- und Nektarsammlerinnen eine wichtige Rolle. Hierfür könnnte ein Vergleich der Rezeptorexpression zwischen gleichalten Sammlerinnen durchgeführt werden.

Die Arbeitsteilung in einem Honigbienenstaat könnte außerdem auch durch ein Zusammenspiel mehrerer biogener Amine beeinflusst werden. Da eine Beteiligung von Dopamin und Serotonin nicht ausgeschlossen werden kann, sollte auch die Expression ihrer entsprechenden Rezeptoren in Ammenbienen und Sammlerinnen untersucht werden. Ergänzend könnten die entsprechenden Rezeptoren auch pharmakologisch oder mittels RNA-Interferenz manipuliert werden. Hierfür wäre ein umfassender pharmakologischer Vergleich aller Rezeptoren sinnvoll, um potentielle Aktivatoren und Inhibitoren für die einzelnen Rezeptoren direkt miteinander zu vergleichen. Dies sollte, wie in der vorliegenden Arbeit für den AmTyr1- und den AmTyr2-Rezeptor geschehen, vorzugsweise im gleichen Expressions- und Messsystem erfolgen.

5 Literaturverzeichnis

ATWOOD, B. K., LOPEZ, J., WAGER-MILLER, J., MACKIE, K. & STRAIKER, A. (2011) Expression of G protein-coupled receptors and related proteins in HEK293, AtT20, BV2, and N18 cell lines as revealed by microarray analysis. BMC Genomics 12:14

BALFANZ, S., EHLING, P., WACHTEN, S., JORDAN, N., ERBER, J., MUJAGIC, S. & BAUMANN, A. (2012) Functional characterization of transmembrane adenylyl cyclases from the honeybee brain. Insect Biochemistry and Molecular Biology 42, 435-445

BALFANZ, S., JORDAN, N., LANGENSTÜCK, T., BREUER, J., BERGMEIER, V. & BAUMANN, A. (2014) Molecular, pharmacological, and signaling properties of octopamine receptors from honeybee (*Apis mellifera*) brain. Journal of Neurochemistry 129, 284-296

BARRON, A. B. & ROBINSON, G. E. (2005) Selective modulation of task performance by octopamine in honey bee (*Apis mellifera*) division of labour. Journal of Comparative Physiology A 191, 659-668

BARRON, A. B., SCHULZ, D. J. & ROBINSON, G. E. (2002) Octopamine modulates responsiveness to foraging-related stimuli in honey bees (*Apis mellifera*). Journal of Comparative Physiology A 188, 603-610

BAYLISS, A., ROSELLI, G. & EVANS, P. D. (2013) A comparison of the signalling properties of two tyramine receptors from Drosophila. Journal of Neurochemistry 125, 37-48

BEGGS, K. T., HAMILTON, I. S., KURSHAN, P., T., MUSTARD, J., A. & MERCER, A. R. (2005) Characterization of a D2-like dopamine receptor (*Am*DOP3) in honey bee, *Apis mellifera*. Insect Biochemistry and Molecular Biology 35, 873–882

BEGGS, K. T., TYNDALL, J. D. A. & MERCER, A. R. (2011) Honey Bee dopamine and octopamine receptors linked to intracellular calcium signaling have a close phylogenetic and pharmacological relationship. PLoS ONE 6(11): e26809. doi:10.1371/journal.pone.0026809

BEHRENDS, A. & SCHEINER, R. (2012) Octopamine improves learning in newly emerged bees but not in old foragers. Journal of Experimental Biology 215, 1076-1083

BEHRENDS, A., SCHEINER, R., BAKER, N. & AMDAM, G. V. (2007) Cognitive aging is linked to social role in honey bees (*Apis mellifera*). Experimental Gerontology 42, 1146-1153

BESHERS, S. N. & FEWELL, J. H. (2001) Models of division of labor in social insects. Annual Review of Entomology 46, 413-440

BIJLMAKERS, M.-J. & MARSH, M. (2003) The on–off story of protein palmitoylation. TRENDS in Cell Biology 13, 32-42

BLENAU, W. & BAUMANN, A. (2001) Molecular and pharmacological properties of insect biogenic amine receptors: lessond from *Drosophila melanogaster* and *Apis mellifera*. Archives of Insect Biochemistry and Physiology 48, 13-38

BLENAU, W. & BAUMANN, A. (2003) Aminergic signal transduction in invertebrates: focus on tyramine and octopamine receptors. Recent research developments in neurochemistry 6, 225-240

BLENAU, W., MAY, T. & ERBER, J. (1996) The *in vitro* effects of biogenic amines on adenylate cyclase activity in the brain of the honeybee (*Apis mellifera* L.). In: Elsner, N. & Schnitzler, H.-U. (Editoren), Göttingen Neurobiology Report 1996, Georg Thieme Verlag, Stuttgart, Seite 548

BLENAU W., ERBER, J. & BAUMANN, A. (1998) Characterization of a dopamine D1receptor from *Apis mellifera*: cloning, functional expression, pharmacology, and mRNA localization in the brain. Journal of Neurochemistry 70, 15-23

BLENAU, W., BALFANZ, S. & BAUMANN, A. (2000) Characterization of a Gene from Honeybee (Apis mellifera) Brain Encoding a Functional Tyramine Receptor. Journal of Neurochemistry 74, 900-908

BLOCH, G. & ROBINSON, G. E. (2001) Chronobiology: reversal of honeybee behavioural rhythms. Nature 410, 1048

BLUMENTHAL, E. M. (2003) Regulation of chloride permeability by endogenously produced tyramine in the *Drosophila* Malpighian tubule. The American Journal of Physiology - Cell Physiology 284, 718-728

BOUVIER, M., HAUSDORFF, W. P., DE BLASI, A., O´DOWD, B. F., KOBILKA, B. K., CARON, M. G. & LEFKOWITZ, R. J. (1988) Removal of phosphorylation sites from the β_2-adrenergic receptor delays onset of agonist-promoted desensitization. Nature 333, 370-373

BRADFORD, M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Analytical Biochemistry 72, 248-254

BRAUN, G. & BICKER, G. (1992) Habituation of an appetitive reflex in the honeybee. Journal of Neurophysiology 67, 588-598

CAZZAMALI, G., KLAERKE, D. A., GRIMMELIKHUIJZEN, C. J. P. (2005) A new family of insect tyramine receptors. Biochemical and Biophysical Research Communications 338, 1189-1196

CHATWIN, H. M., RUDLING, J. E., PATEL, D., REALE, V. AND EVANS, P. D. (2003) Site-directed mutagenesis studies on the *Drosophila* octopamine/tyramine receptor. Insect Biochemistry and Molecular Biology 33, 173–184.

CHEN, C. & OKAYAMA, H. (1987) High-efficiency transformation of mammalian cells by plasmid DNA. Molecular and Cellular Biology 7, 2745-2752

CHEN, X., OHTA, H., OZOE, F., MIYAZAWA, K., HUANG, J. & OZOE, J. (2010) Functional and pharmacological characterization a beta-adrenergic-like octopamine receptor from the silkworm *Bombyx mori*. Insect Biochemistry and Molecular Biology 40, 476-486

CLAPHAM, D. E. (1995) Calcium signaling. Cell 80, 259-268

CLARK, J. & LANGE, A. B. (2003) Octopamine modulates spermathecal muscle contractions in *Locusta migratoria*. Journal of Comparative Physiology A 189, 105-114

CRESPI, B. J. & YANEGA, D. (1995) The definition of eusociality. Behavioral Ecology 6, 109-115

CUNNINGHAM, C. B., DOUTHIT, M. K. & MOORE, A. J. (2014) Octopaminergic gene expression and flexible social behavior in the subsocial burying beetle *Nicrophorus vespilloides*. Insect Molecular Biology 23, 391-404

DAVIS, R. L. (1993) Mushroom bodies and Drosophila learning. Neuron 11, 1-14

DAVIS, R. L. (1996) Physiology and biochemistry of *Drosophila* learning mutants. Physiological Reviews 76, 299-317

DOHLMAN, H. G., CARON, M. G., DEBLASI, A., FRIELLE, T. & LEFKOWITZ, R. J. (1990) Role of extracellular disulfide-bonded cysteines in the ligand binding function of the β_2-adrenergic receptor. Biochemistry 29, 2335-2342

DOLMETSCH, R. E., XU, K. & LEWIS, R. S. (1998) Calciumoscillations increase the efficiency and specificity of gene expression. Nature 392, 933-936

DOWNER, R. G. H., HIRIPI, L. & JUHOS, S. (1993) Characterization of the tyraminergic system in the central nervous system of the locust, Locusta migratoria migratoides. Neurochemical Research 18, 1245-1248

DRELLER, C., PAGE, R. E. & FONDRK, M. K. (1999) Regulation of pollen foraging in honeybee colonies: effects of young brood, stored pollen, and empty space. Behavioral Ecology and Sociobiology 45, 227-233

DUBNAU, J. & TULLY, T. (1998) GENE DISCOVERY IN *DROSOPHILA*: New Insights for Learning and Memory. Annual Review of Neuroscience 21, 407-444

ECKERT, C. D., WINSTON, M. L. & YDENBERG, R. C. (1994) The relationship between population size, amount of brood, and individual foraging behavior in the honey bee *Apis mellifera* L. Oecologia 97, 248-255

EILERS, M., HORNAK, V., SMITH, S. O. & KONOPKA, J. B. (2005) Comparison of Class A and D G Protein-Coupled Receptors: Common Features in Structure and Activation. Biochemistry 44, 8959-8975

ERBER, J. & KLOPPENBURG, P. (1995) The modulatory effects of serotonin and octopamin in the visual system of the honey bee (*Apis mellifera* L.) – Behavioral analyses of the motion-sensitive antennal reflex. Journal of Comparative Physiology A 176, 111-118

ERBER, J., MASUHR, T. H. & MENZEL, R. (1980) Localization of short-term memory in the brain of the bee, *Apis mellifera*. Physiological Entomolgy 5, 343-358

ERBER, J., HOORMANN, J. & SCHEINER, R. (2006) Phototactic behaviour correlates with gustatory responsiveness in honey bees (*Apis mellifera* L.). Behavioural Brain Research 174, 174–180

ERSPAMER, V. (1948) Active substances in the posterior salivary glands of octopada. II tyramine and octopamine (oxyoctopamine). Acta Pharmacologica Sinica 4, 224-247

ERSPAMER, V. & BORETTI, G. (1951) Substances of a phenolic and indolic nature present in acetone extracts of the posterior salivary glands of octopoda (*Octopus vulgaris*, *Octopus macropus* and *Eledone moschata*). Experientia 7, 271-273

EVANS, P. D. & MAQUEIRA, B. (2005) Insect octopamine receptors: a new classification scheme based on studies of cloned *Drosophila* G-protein coupled receptors. Invertebrate Neuroscience 5, 111-118

FAHRBACH, S. E. (2006) Structure of the mushroom bodies of the insect brain. Annual Review of Entomology 51, 209-232

FAROOQUI, T. (2012) Review of octopamine in insect nervous systems. Journal of Open Access Insect Physiology 4, 1-17

FAROOQUI, T., ROBINSON, K., VAESSIN, H. & SMITH, B. H. (2003) Modulation of early olfactory processing by an octopaminergic reinforcement pathway in the honey bee. The Journal of Neuroscience 23, 5370-5380

FAROOQUI, T., VAESSIN, H. & SMITH, B. H. (2004) Octopamine receptors in the honey bee (*Apis mellifera*) brain and their disruption by RNA-mediated interference. Journal of Insect Physiology 50, 701-713

FEWELL, J. H. & WINSTON, M. L. (1992) Colony state and regulation of pollen foraging in the honey bee, *Apis mellifera* L. Behavioral Ecology and Sociobiology 30, 387-393

FIALA, A., MÜLLER, U. & 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*. The Journal of Neuroscience 19, 10125-10134

FIRE, A., XU, S., MONTGOMERY, M. K., KOSTAS, S. A., DRIVER, S. E. & MELLO, C. C. (1998) Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. Nature 391, 806-811

FLANAGAN, D. & MERCER, A. R. (1989) An atlas and 3-D reconstruction of the antennal lobes in the worker honey bee, *Apis mellifera* L. (Hymenoptera : Apidae). International Journal of Insect Morphology and Embryology 18, 145-159

FLECKE, C. & STENGL, M. (2009) Octopamine and tyramine modulate pheromone-sensitive olfactory sensilla of the hawkmoth *Manduca sexta* in a time-dependent manner. Journal of Comparative Physiology A 195, 529-545

FREE, J. B. (1967) Factors determining the collection of pollen by honey bee foragers. Animal Behaviour 15, 134-144

FRITZE, O., FILIPEK, S., KUKSA, V., PALCZEWSKI, K., HOFMANN, K. P. & ERNST, O. P. (2003) Role of the conserved NPxxY(x)$_{5,6}$F motif in the rhodopsin ground state and during activation. Proceedings of the National Academy of Sciences 100, 2290–2295

FUSS, N., MUJAGIC, S., ERBER, J., WACHTEN, S. & BAUMANN, A. (2010) Biochemical properties of heterologously expressed and native adenylyl cyclases from the honeybee brain (*Apis mellifera* L.). Insect Biochemistry and Molecular Biology 40, 573-580

FUSSNECKER, B. L., SMITH, B. H. & MUSTARD, J. A. (2006) Octopamine and tyramine influence the behavioral profile of locomotor activity in the honey bee (*Apis mellifera*). Journal of Insect Physiology 52, 1083-92

GALIZIA, C. G. & MENZEL, R. (2001) The role of glomeruli in the neural reprensentation of odours: results from optical recording studies. Journal of Insect Physiology 47, 115-130

GALIZIA, C. G. & RÖSSLER, W. (2010) Parallel olfactory systems in insects: anatomy and function. Annual Review of Entomology 55, 399-420

GETHER, U. (2000) Uncovering molecular mechanisms involved in activation of G protein-coupled receptors. Endocrine Reviews 21, 90-113

GETHER, U. & KOBILKA, B. K. (1998) G protein-coupled receptors: II. Mechanism of agonist activation. The Journal of Biological Chemistry 273, 17979-17982

GODDARD, A. D. & WATTS, A. (2010) Regulation of G protein-coupled receptors by palmitoylation and cholesterol. BMC Biology 10:27

GROHMANN, L., BLENAU, W., ERBER, J., EBERT, P. R., STRÜNKER, T. & BAUMANN, A. (2003) Molecular and functional characterization of an octopamine receptor from honeybee (*Apis mellifera*) bran. Journal of Neurochemistry 86, 725-735

GUDERMANN, T., SCHÖNEBERG, T. & SCHULTZ, G. (1997) Functional and structural complexity of signal transduction via G-protein-coupled receptors. Annual Review of Neuroscience 20, 399-427

HAMMER, M. & MENZEL, R. (1995) Learning and memory in the honeybee. The Journal of Neuroscience 15, 1617-1630

HAMMER, M. & MENZEL, R. (1998) Multiple sites of associative odor learning as revealed by local brain microinjections of octopamine in honeybees. Learning & Memory 5, 146-156

HANSSON, B. S. & ANTON, S. (2000) Function and morphology of the antennal lobe: new developments. Annual Review of Entomology 45, 203-231

HARDIE, S. L., ZHANG, J. X. & HIRSH, J. (2007) Trace amines differentially regulate adult locomotor activity, cocaine sensitivity, and female fertility in *Drosophila melanogaster*. Developmental Neurobiology 67, 1396-1405

HAUSER, F., CAZZAMALI, G., WILLIAMSON, A., BLENAU, W. & GRIMMELIKHUIJZEN, C. J. P. (2006) A review of neurohormone GPCRs present in the fruitfly *Drosophila melanogaster* and the honey bee *Apis mellifera*. Progress in Neurobiology 80, 1-19

HEISENBERG, M. (1998) What do the mushroom bodies do for the insect brain? An introduction. Learning & Memory 5, 1-10

HEISENBERG, M. (2003) Mushroom body memoir: from maps to models. Nature Reviews Neuroscience 4, 266-275

HOMBERG, U. (1985) Interneurons of the central complex in the bee brain (*Apis mellfera* L.). Journal of Insect Physiology 31, 251-264

HOMBERG, U., CHRISTENSEN, T. A. & HILDEBRAND, J. G. (1989) Structure and function of the deutocerebrum in insects. Annual Review of Entomology 34, 477-501

HOYER, S. C., ECKART, A., HERREL, A., ZARS, T., FISCHER, S. A., HARDIE, S. L. & HEISENBERG, M. (2008) Octopamine in Male Aggression of *Drosophila*. Current Biology 18, 159-167

HUANG, Z. Y. & ROBINSON, G. E. (1996) Regulation of honey bee division of labor by colony age demography. Behavioral Ecology and Sociobiology 39, 147-158

HUANG, J., OHTA, H., INOUE, N., TAKAO, H., KITA, T., OZOE, F. & OZOE, Y. (2009) Molecular cloning and pharmacological characterization of a Bombyx mori tyramine receptor selectively coupled to intracellular calcium mobilization. Insect Biochemistry and Molecular Biology 39, 842–849

HUMPHRIES, M. A., MÜLLER, U., FONDRK, M. K. & PAGE, R. E. (2003) PKA and PKC content in the honey bee central brain differs in genotypic strains with distinct foraging behavior. Journal of Comparative Physiology A 189, 555-562

ISHIDA, Y. & OZAKI, M. (2011) A putative octopamine/tyramine receptor mediating appetite in a hungry fly. Naturwissenschaften 98, 635-638

JAAKOLA, V.-P., GRIFFITH, M. T., HANSON, M. A., CHEREZOV, V., CHIEN, E. Y. T., LANE, J. R., IJZERMAN, A. P. & STEVENS, R. C. (2008) The 2.6 Angstrom crystal structure of a human A2A adenosine receptor bound to an antagonist. Science 322, 1211-1217

KARNIK, S. S. & KHORANA, H. G. (1990) Assembly of functional rhodopsin requires a disulfide bond between cysteine residues 110 and 187. The Journal of Biological Chemistry 265, 17520-17524

KLOPPENBURG, P. & ERBER, J. (1995) The modulatory effects of serotonin and octopamin in the visual system of the honey bee (*Apis mellifera* L.) – Electrophysiological analysis of motion-sensitiveneurons in the lobula. Journal of Comparative Physiology A 176, 119-129

KONONENKO, N. L., WOLFENBERG, H. & PFLÜGER, H.-J. (2009) Tyramine as an independent transmitter and a precursor of octopamine in the locust central nervous system: an immunocytochemical study. The Journal of Comparative Neurology 512: 433-452

KOZAK, M. (1984) Compilation and analysis of sequences upstream from the translational start site in eukaryotic mRNAs. Nucleic Acids Research 12, 857-872

KREISSL, S., EICHMÜLLER, S., BICKER, G., RAPUS, J. & ECKERT, M. (1994) Octopamine-like immunoreactivity in the brain and subesophageal ganglion of the honeybee. The Journal of Comparative Neurology 348, 583-595

KUTSUKAKE, M., KOMATSU, A., YAMAMOTO, D. & ISHIWA-CHIGUSA, S. (2000) A *tyramine receptor* gene mutation causes a defective olfactory behavior in *Drosophila melanogaster*. Gene 245, 31-42

KYTE, J. & DOOLITTLE, R. F. (1982) A simple method for displaying the hydropathic character of a protein. Journal of Molecular Biology 157, 105-132

LAM, F., MCNEIL, J. N. & DONLY, C. (2013) Octopamine receptor gene expression in three lepidopteran species of insect. Peptides 41, 6673

LANGE, A. (2009) Tyramine: from Octopamine precursor to neuroactive chemical in insects. General and Comparative Endocrinology 162, 18-26

LEFKOWITZ, R. J. (1998) G Protein-coupled Receptors: III new roles for receptor kinases and β-arrestins in receptor signaling and desensitization. The Journal of Biological Chemistry 273, 18677-18680

LI, W.-H., LLOPIS, J., WHITNEY, M., ZLOKARNIK, G. & TSIEN, R. Y. (1998) Cell-permeant caged $InsP_3$ ester shows that Ca^{2+} spike frequency can optimize gene expression. Nature 392, 936-941

LIANG, Z. S., NGUYEN, T., MATTILA, H. R., RODRIGUEZ-ZAS, S. L., SEELEY, T. D. & ROBINSON, G. E. (2012) Molecular Determinants of Scouting Behavior in Honey Bees. Science 335, 1225-1228

LILES, W. C. & NATHANSON, N. M. (1986) Regulation of neuronal muscarinic acetylcholine receptor number by protein glycosylation. Journal of Neurochemistry 46, 89-95

LIN, C.-Y., CHUANG, C.-C., HUA, T.-E., CHEN, C.-C., DICKSON, B. J., GREENSPAN, R. J. & CHIANG, A.-S. (2013) A comprehensive wiring diagram of the protocerebral bridge for visual information processing in the *Drosophila* brain. Cell Reports 3, 1739-1753

LINN, C. E. & ROELOFS, W. L. (1986) Modulatory effects of octopamine and serotonin on male sensitivity and periodicity of response to sex pheromone in the cabbage looper moth, *Trichoplusia ni*. Archives of Insect Biochemistry and Physiology 3, 161-171

LUDWIG, J., MARGALIT, T., EISMANN, E., LANCET, D. & KAUPP, U. B. (1990) Primary structure of cAMP-gated channel from bovine olfactory epithelium. FEBS Letters 270, 24-29

MALAMUD, J. G., MIZISIN, A. P. & JOSEPHSON, R. K. (1988) The effects of octopamine on contraction kinetics and power output of a locust flight muscle. Journal of Comparative Physiology A 162, 827-835

MALEY, F., TRIMBLE, R. B., TARENTINO, A. L., PLUMMER, T. H. (1989) Characterization of glycoproteins and their associated oligosaccharides through the use of endoglycosidases. Analytical Biochemistry 180, 195-204

MAQUEIRA, B., CHATWIN, H. & EVANS, P. D. (2005) Identification and characterization of a novel family of Drosophila β-adrenergic-like octopamine G-protein coupled receptors. Journal of Neurochemistry 94, 547-560

MARTIN, J.-R., ERNST, R. & HEISENBERG, M. (1998) Mushroom bodies suppress locomotor activity in *Drosophila melanogaster*. Learning & Memory 5: 179-191

MCQUILLAN, H. J., BARRON, A. B. & MERCER, A. R. (2012a) Age- and behaviour-related changes in the expression of biogenic amine receptor genes in the antennae of honey bees (*Apis mellifera*). Journal of Comparative Physiology A 198, 753-761

MCQUILLAN, H. J., NAKAGAWA, S. & MERCER, A. R. (2012b) Mushroom bodies of the honey bee brain show cell population-specific plasticity in expression of amine-receptor genes. Learning & Memory 19, 151-158

MELLER, V. H. & DAVIS, R. L. (1996) Biochemistry of insect learning: lessons from bees and flies. Insect Biochemistry and Molecular Biology 26, 327-335

MENZEL, R. & MÜLLER, U. (1996) Learning and memory in honeybees: from behavior to neural substrates. Annual Review of Neuroscience 19, 379-404

MERCER, A. R. & MENZEL, R. (1982) The effects of biogenic amines on conditioned and unconditioned responses to olfactory stimuli in the honey bee *Apis mellifera*. Journal of Comparative Physiology A 145, 363-368

MERCER, A. R., MOBBS, P. G., DAVENPORT, A. P. & EVANS, P. D. (1983) Biogenic amines in the brain of the honeybee, *Apis mellifera*. Cell and Tissue Research 234, 655-677

MILDE, J. J. (1988) Visual responses of interneurons n the posterior median protocerebrum and the central complex of the honeybee *Apis mellifera*. Journal of Insect Physiology 34, 427-436

MONASTIRIOTI, M., LINN, C. E. & WHITE, K. (1996) Characterization of *Drosophila tyramine β-hydroxylase* gene and isolation of mutant flies lacking octopamine. The Journal of Neuroscience 16, 3900-3911

MÜLLER, U. (2000) Prolonged activation of cAMP-dependent protein kinase during conditioning induces long-term memory in honeybees. Neuron 27, 159-168

MUSTARD, J. A., BLENAU, W., HAMILTON, I. S., WARD, V. K., EBERT, P. R. & MERCER, A. R. (2003) Analysis of two D1-like dopamine receptors from the honey bee *Apis mellifera* reveals agonist-independent activity. Molecular Brain Research 113, 67-77

MUSTARD, J. A., KURSHAN, P. T., HAMILTON, I. S., BLENAU, W., MERCER, A. R. (2005) Developmental expression of a tyramine receptor gene in the brain of the honey bee, *Apis mellifera*. The Journal of Comparative Neurology 483, 66-75

NAGAYA, Y., KUTSUKAKE, M., CHIGUSA, S. I. & KOMATSU, A. (2002) A trace amine, tyramine, functions as a neuromodulator in *Drosophila melanogaster*. Neuroscience Letters 329, 324-328

NAKAGAWA, M., MIYAMOTO, T., KUSAKABE, R., TAKASAKI, S., TAKAO, T., SHICHIDA, Y. & TSUDA, M. (2001) *O*-Glycosylation of G-protein-coupled receptor, octopus rhodopsin. FEBS Letters 496, 19-24

NEVES, S. R., RAM, P. T. & IYENGAR, R. (2002) G protein pathways. Science 296, 1636-1639

NISIMURA, T, SETO, A., NAKAMURA, K., MIYAMA, M., NAGAO, T., TAMOTSU, S., YAMAOKA, R. & OZAKI, M. (2005) Experiential effects of appetitive and nonappetitive odors on feeding behavior in the blowfly, *Phormia regina*: a putative role for tyramine in appetite regulation. The Journal of Neuroscience 25, 7507–7516

NODA, K., SAAD, Y., GRAHAM, R. M. & KARNIK, S. S. (1994) The high affinity state of the β_2-adrenergic receptor requires unique interaction between conserved and non-conserved extracellular loop cysteines. The Journal of Biological Chemistry 269, 6743-6752

O´DOWD, B. F., HNATOWICH, M., CARON, M. G., LEFKOWITZ, R. J. & BOUVIER, M. (1989) Palmitoylation of the human β_2-adrenergic receptor. The Journal of Biological Chemistry 264, 7564-7569

OHTA, H., UTSUMI, T. & OZOE, Y. (2003) B96Bom encodes a *Bombyx mori* tyramine receptor negatively coupled to adenylate cyclase. Insect Molecular Biology 12, 217-223

OHTA, H., UTSUMI, T. & OZOE, Y. (2004) Amino acid residues involved in interaction with tyramine in the *Bombyx mori* tyramine receptor. Insect Molecular Biology 13, 531-538

ORCHARD, I. (1982) Octopamine in insects: neurotransmitter, neurohormone, and neuromodulator. Canadian Journal of Zoology 60, 659-669

ORCHARD, I., CARLISLE, J. A., LOUGHTON, B. G., GOLE, J. W. D. & DOWNER, R. G. H. (1982) *In vitro* studies on the effects of octopamine on locust fat body. General and Comparative Endocrinology 48, 7-13

PANKIW, T & PAGE, R. E. (2000) Response thresholds to sucrose predict foraging division of labor in honeybees. Behavioral Ecology and Sociobiology 47, 265-267

PANKIW, T. & PAGE, R. E. (2003) Effect of pheromones, hormones, and handling on sucrose response thresholds of honey bees (*Apis mellifera* L.). Journal of Comparative Physiology A 189, 675-684

PANKIW, T., PAGE, R. E. & FONDRK, M. K. (1998) Brood pheromone stimulates pollen foraging in honey bees (*Apis mellifera*). Behavioral Ecology and Sociobiology 44, 193-198

PAPAEFTHIMIOU, C. & THEOPHILIDIS, G. (2011) Octopamine—A single modulator with double action on the heart of two insect species (*Apis mellifera macedonica* and *Bactrocera oleae*): Acceleration vs. inhibition. Journal of Insect Physiology 57, 316-325

PENNISI, E. (2006) Honey bee genome illuminates insect evolution and social behavior. Science 314, 578-579

PETÄJÄ-REPO, U. E., HOGUE, M., LAPERRIERE, A., WALKER, P. & BOUVIER, M. (2000) Export from the Endoplasmic Reticulum Represents the Limiting Step in the Maturation and Cell Surface Expression of the Human δ Opioid Receptor. The Journal of Biological Chemistry 275, 13727-13736

PFEIFFER, K. & HOMBERG, U. (2014) Organization and functional roles of the central complex in the insect brain. Annual Review of Entomology 59, 165-184

PLUMMER, T. H., ELDER, J. H., ALEXANDER, S., PHELAN, A. W. & TARENTINA, A. L. (1984) Demonstration of peptide:*N*-glycosidase F activity in endo-*β*-*N*-acetylglucosaminidase F preparations. The Journal of Biological Chemistry 259, 10700-10704

POELS, J., SUNER, M.-M., NEEDHAM, M., TORFS, H., DE RIJCK, J., DE LOOF, A., DUNBAR, S. J. & VANDEN BROECK, J. (2001) Functional expression of a locust tyramine receptor in murine erythroleukaemia cells. Insect Molecular Biology 10, 541-548

PROBST, W. C., SNYDER, L. A., SCHUSTER, D. I., BROSIUS, J. & SEALFON, S. C. (1992) Sequence alignment of the G-protein coupled receptor superfamily. DNA and Cell Biology 11, 1-20

REHDER, V. (1989) Sensory pathways and motoneurons of the proboscis reflex in the suboesophageal ganglion of the honey bee. Journal of Comparative Neurology 279, 499-513

REIN, J., MUSTARD, J. A., STRAUCH, M., SMITH, B. H. & GALIZIA, C. G. (2013) Octopamine modulates activity of neural networks in the honey bee antennal lobe. Journal of Comparative Physiology A 199, 947-962

RIBI, W. A. & SCHEEL, M. (1981) The second and third optic ganglia of the worker bee. Cell and Tissue Research 221, 17-43

RILLICH, J., SCHILDBERGER, K. & STEVENSON, P. A. (2010) Octopamine and occupancy: an aminergic mechanism for intruder–resident aggression in crickets. Proceedings of the Royal Society B, doi:10.1098/rspb.2010.2099

ROBINSON, G. E. (1987) Regulation of honey bee age polyethism by juvenile hormone. Behavioral Ecology and Sociobiology 20, 329-338

ROBINSON, G. E. (1992) Regulation of division of labor in insect societies. Annual Review of Entomology 37, 637-665

ROBINSON, G. E., PAGE, R. E., STRAMBI, C. & STRAMBI, A. (1989) Hormonal and genetic control of behavioral integration in honey bee colonies. Science 246, 109-112

ROEDER, T. (2005) Tyramine and octopamine: ruling behavior and metabolism. Annual Review of Entomology 50, 447-477

ROEDER, T., SEIFERT, M., KÄHLER, C. & GEWECKE, M. (2003) Tyramine and octopamine: antagonistic modulators of behavior and metabolism. Archives of Insect Biochemistry and Physiology 54, 1-13

ROGERS, S. M., MATHESON, T., SASAKI, K., KENDRICK, K., SIMPSON, S. J. & BURROWS, M. (2004) Substantial changes in central nervous system neurotransmitters and neuromodulators accompany phase change in the locust. The Journal of Experimental Biology 207, 3603-3617

ROTTE, C., KRACH, C., BALFANZ, S., BAUMANN, A., WALZ, B. & BLENAU, W. (2009) Molecular characterizationand localization of the first tyramine receptor of the American cockroach (*Periplaneta americana*). Neuroscience 162, 1120-1133

ROVATI, G. E., CAPRA, V. & NEUBIG, R. R. (2007) The highly conserved DRY motif of class A G protein-coupled receptors: beyond the ground state. Molecular Pharmacology 71, 959-964

SADEGHI, H. & BIRNBAUMER, M. (1999) O-Glycosylation of the V2 vasopressin receptor. Glycobiology 9, 731-737

SARASWATI, S., FOX, L. E., SOLL, D. R. & WU, C.-F. (2004) Tyramine and octopamine have opposite effects on the locomotion of *Drosophila* larvae. Journal of Neurobiology 50, 425-441

SAUDOU, F., AMLAIKY, M., PLASSAT, J.-L., BORELLI, E. & HEN, R. (1990) Cloning and characterization of a *Drosophila* tyramine receptor. The EMBO Journal 9, 3611-3617

SCHEINER, R. (2004) Responsiveness to sucrose and habituation of the proboscis extension response in honey bees. Journal of Comparative Physiology A 190, 727-723

SCHEINER, R. & AMDAM, G. V. (2009) Impaired tactile learning is related to social role in honey bees. Journal of Experimental Biology 212, 994-1002

SCHEINER, R., PLÜCKHAHN, S., ÖNEY, B., BLENAU, W. & ERBER, J. (2002) Behavioural pharmacology of octopamine, tyramine and dopamine in honey bees. Behavioural Brain Research 136, 545-553

SCHEINER, R., PAGE, R. E. & ERBER, J. (2004) Sucrose responsiveness and behavioral plasticity in honey bees (Apis mellifera). Apidologie 35, 133-142

SCHEINER, R., BAUMANN, A. & BLENAU, W. (2006) Aminergic control and modulation of honeybee behaviour. Current Neuropharmacology 4, 259-276

SCHEINER, R., TOTEVA, A., REIM, T., SØVIK, E. & BARRON, A. B. (2014a) Differences in the phototaxis of pollen and nectar foraging honey bees are related to their octopamine brain titers. Frontiers in Physiology 5:116

SCHEINER, R., KULIKOVSKAJA, L. & THAMM, M. (2014b) The honey bee tyramine receptor AmTYR1 and division of foraging labour. The Journal of Experimental Biology 217, 1215-1217

SCHLENSTEDT, J., BALFANZ, S., BAUMANN, A. & BLENAU, W. (2006) Am5-HT_7: molecular and pharmacological characterization of the first serotonin receptor of the honeybee (*Apis mellifera*). Journal of Neurochemistry 98, 1985–1998

SCHULZ, D. J. & 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. Journal of Comparative Physiology A 184, 481-488

SCHULZ, D. J. & ROBINSON, G. E. (2001) Octopamine influences division of labor in honey bee colonies. Journal of Comparative Physiology A 187, 53-61

SEELEY, T. D. (1982) Adaptive significance of the age polyethism schedule in honeybee colonies. Behavioral Ecology and Sociobiology 11, 287-293

SEELEY, T. D. (1986) Social foraging by honeybees: how colonies allocate foragers among patches of flowers. Behavioral Ecology and Sociobiology 19, 343-354

SEELEY, T. D. (1995) The Wisdom of the Hive. Harvard University Presd, Cambridge Mass, London

SIBLEY, D. R., BENOVIC, J. L., CARON, M. G. & LEFKOWITZ, R. J. (1987) Regulation of transmembrane signaling by receptor phosphorylation. Cell 48, 913-922

SINAKEVITCH, I., NIWA, M. & STRAUSFELD, N. J. (2005) Octopamine-like immunoreactivity in the honey bee and cockroach: comparable organization in the brain and subesophageal ganglion. The Journal of Comparable Neurobiology 488, 233-254

SINAKEVITCH, I., MUSTARD, J. A. & SMITH, B. H. (2011) Distribution of the octopamine receptor AmOA1 in the honey bee brain. PLoS ONE 6(1): e14536.doi:10.1371/journal.pone.0014536

SODERQUIST, A. M. & CARPENTER, G. (1984) Glycosylation of the epidermal growth factor receptor in A-431 cells. The Journal of Biological Chemistry 259, 12586-12594

SPINDLER, S. R., MOTE, P. L., LI, R., DHAHBI, J. M., YAMAKAWA, A., FLEGAL, J. M., JESKE, D. R., LI, R. & LUBLIN, A. L. (2012) β1-Adrenergic receptor blockade extends the life span of *Drosophila* and long-lived mice. AGE 35, 2099-2109

SPIVAK, M., MASTERMAN, R., ROSS, R. & MESCE, K. A. (2003) Hygienic behavior in the honey bee (*Apis mellifera* L.) and the modulatory role of octopamine. Journal of Neurobiology 55, 341-354

SRINIVASAN, M. V. (2010) Honey bees as a model for vision, perception, and cognition. Annual Review of Entomology 55, 267–84

STEVENSON, P. A., DYAKONOVA, V., RILLICH, J. & SCHILDBERGER, K. (2005) Octopamine and experience-dependent modulation of aggression in crickets. The Journal of Neuroscience 25, 1431-1441

STRADER, C. D., SIGAL, I. S., CANDELORE, M.R., RANDS, E., HILL, W. S. & DIXON, R. A. F. (1988) Conserved aspartic acid residues 79 and 113 of the β-adrenergic receptor have different roles in receptor function. The Journal of Biological Chemistry 263, 10267-10271

STRADER, C. D., CANDELORE, M.R., HILL, W. S., SIGAL, I. S. & DIXON, R. A. F. (1989) Identification of two serine residues involved in agonist activation of the β-adrenergic receptor. The Journal of Biological Chemistry 264, 13572-13578

STRADER, C., MING FONG, T., GRAZIANO, M. P. & TOTA, M. R. (1995) The family of G-protein-coupled receptors. The FASEB Journal 9, 745-754

STRAUSFELD, N. J. (2002) Organization of the honey bee mushroom body: representation of the calyx within the vertical and gamma lobes. The Journal of Comparative Neurology 450, 4-33

STRAUSS, R. (2002) The central complex and the genetic dissection of locomotor behavior. Current Opinion in Neurobiology 12, 633-638

STRYER, L. & BOURNE, H. R. (1986) G proteins: a family of signal transducers. Annual Review of Cell and Developmental Biology 2, 391-419

THAMM, M. (2009) Charakterisierung der Serotonin-Rezeptoren der Honigbiene *Apis mellifera*. Dissertation, Universität Potsdam

THAMM, M. & SCHEINER, R. (2014) PKG in honey bees: spatial expression, *Amfor* gene expression, sucrose responsiveness and division of labor. Journal of Comparative Neurology 522, 1786-1799

THAMM, M., BALFANZ, S., SCHEINER, R., BAUMANN, A. & BLENAU, W. (2010) Characterization of the 5-HT_{1A} receptor of the honeybee (*Apis mellifera*) and involvement of serotonin in phototactic behavior. Cellular and Molecular Life Sciences 67, 2467-2479

THAMM, M., ROLKE, D., JORDAN, N., BALFANZ, S., SCHIFFER, C., BAUMANN, A. & BLENAU, W. (2013) Function and distribution of 5-HT_2 receptors in the honeybee (*Apis mellifera*). PLoS ONE 8(12): e82407. doi:10.1371/journal.pone.0082407

THE HONEY GENOME SEQUENCING CONSORTIUM (2006) Insights into social insects from the genome of the honey bee *Apis mellifera*. Nature 443, 931-949

THOMPSON, R. F. & SPENCER, W. A. (1966) Habituation: a model phenomenon for the study of neuronal substrates of behavior. Psychological Review 73, 16-43

USIELLO, A., BAIK, J.-H., ROUGE-PONT, F., PICETTI, R., DIERICH, A., LEMEUR, M., PIAZZA, P. V. & BORELLI, E. (2000) Distinct functions of the two isoforms of dopamine D2 receptors. Nature 408, 199-203

VAN KOPPEN, C. J. & NATHANSON, N. M. (1990) Site-directed mutagenesis of the m2 muscarinic acetylcholine receptor. The Journal of Biological Chemistry 265, 20887-20892

VANDEN BROECK, J. (2001) Insect G Protein-coupled receptors and signal transduction. Archives of Insect Biochemistry and Physiology 48, 1-12

VANDEN BROECK, J., VULSTEKE, V. & DE LOOF, A. (1995) Characterization of a cloned locust tyramine receptor cDNA by functional expression in permanently transformed *Drosophila* S2 cells. Journal of Neurochemistry 64, 2387-2395

VERLINDEN, H., VLEUGELS, R., MARCHAL, E., BADISCO, L., TOBBACK, J., PFFLÜGER, H.-J., BLENAU, W. & VANDEN BROECK, J. (2010) The cloning, phylogenetic relationship and distribution pattern of two new putative GPCR-type octopamine receptors in the desert locust (*Schistocerca gregaria*). Journal of Insect Physiology 56, 868-875

WACHTEN, S., SCHLENSTEDT, J., GAUSS, R. & BAUMANN, A. (2006) Molecular identification and functional characterization of an adenylyl cyclase from the honeybee. Journal of Neurochemistry 96, 1580-1590

WAGENER-HULME, C., KUEHN, J. C., SCHULZ, D. J. & ROBINSON, G. E. (1999) Biogenic amines and division of labor in honey bee colonies. Journal of Comparative Physiology A 184, 471-479

WINSTON, M. L. (1987) The Biology of the Honey Bee. Harvard University Press, Cambridge Mass, London

WU, S.-F., YAO, Y., HUANG, J. & YE, G.-Y. (2012) Characerization of a β-adrenergic-like octopamine receptor from the rice stem borer (*Chilo suppressalis*). Journal of Experimental Biology 215, 2646-2652

WU, S.-F., HUANG, J. & YE, G. Y. (2013) Molecular cloning and pharmacological characterisation of a tyramine receptor from the rice stem borer, *Chilo suppressalis* (Walker). Pest Management Science 69, 126-134

WU, S.-F., XU, G., QI, Y.-X., XIA, R.-Y., HUANG, J. & YE, G.-Y. (2014) Two splicing variants of a novel family of octopamine receptors with different signaling properties. Journal of Neurochemistry 129, 37-47

YIN, J. C. P. & TULLY, T. (1996) CREB and the formation of long-term memory. Current Opinion in Neurobiology 6, 264-268

ZAYED, A. & ROBINSON, G. E. (2012) Understanding the relationship between brain gene expression and social behavior: lessons from the honey bee. Annual Review of Genetics 46, 591-615

ZHANG, T., BRANCH, A. & SHEN, P. (2013) Octopamine-mediated circuit mechanism underlying controlled appetite for palatable food in *Drosophila*. Proceedings of the National Academy of Sciences 110, 15431–15436

ZHENG, M., FANG, H. & HAKOMORI, S.-I. (1994) Functional role of N-glycosylation in α5β1 integrin receptor. The Journal of Biological Chemistry 269, 12325-12331

ZHOU, C., RAO, Y. & RAO, Y. (2008) A subset of octopaminergic neurons are important for *Drosophila* aggression. Nature Neuroscience 11, 1059 – 1067

Abkürzungsverzeichnis

ANOVA	*analysis of variance*, Varianzanalyse
bp	Basenpaare
BSA	bovines Serumalbumin
cAMP	cyclisches Adenosinmonophosphat
$[cAMP]_i$	intrazelluläre cAMP Konzentration
$[Ca^{2+}]_i$	intrazelluläre Ca^{2+} Konzentration
cDNA	*complementary DNA*, komplementäre DNA
CPL	*cytoplasmatic loop*, cytoplasmatische Schleife
C_q	*quantification cycle*, Quantifizierungszyklus
C-Terminus	Carboxy-Terminus
ddH_2O	steriles, doppelt destilliertes Wasser
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DNA	*desoxyribonucleic acid*, Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
EC_{50}	mittlere effektive Konzentration
ECL	*extracellular loop*, extrazelluläre Schleife
G-Protein	Guaninnukleotid-bindendes Protein
GPCR	*G-protein coupled receptor*, G-Protein gekoppelter Rezeptor
HA	Haemagglutinin A
HPLC	*high performance liquid chromatography*, Hochleistungsflüssigkeitschromatographie
HRP	*horseradish peroxidase*, Meerrettichperoxidase
IC_{50}	mittlere inhibitorische Konzentration
IPTG	Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid
kb	Kilobasenpaare
kDa	Kilodalton
mRNA	*messenger RNA,* Boten-RNA
N-Terminus	Amino-Terminus
PBS	*phosphate buffered saline*, Phophat gepufferte Salzlösung
PCR	*polymerase chain reaction*, Polymerase-Kettenreaktion
PVDF	Polyvinylidenfluorid
qPCR	quantitative Echtzeit-PCR
RFE	relative Fluoreszenzeinheiten
RNA	*ribonucleic acid*, Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
RT	*Reverse transcriptase*, Reverse Transkriptase
SDS	*sodium dodecyl sulphate,* Natriumdodecylsulfat
SDS-PAGE	*sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis*, Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese
UpM	Umdrehungen pro Minute

Anhang

Nukleotidsequenz des AmTyr2-Rezeptors

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

```
ATGGCGAATCAAACGGCCAATTACTATGGGGACGTTTATCAATGGAATCACACGGTGTCG          60
TCGGGCGAGCGAGATACGCGGACGGAATATTATCTACCGAATTGGACGGATCTCGTTTTG         120
GCGGGGCTGTTCACCATGTTGATCATCGTCACTATAGTGGGCAACACTTTGGTAATTGCC         180
GCTGTGATAACAACTAGGCGTCTACGGTCCGTTACTAATTGTTTCGTGTCCAGCTTGGCC         240
GCTGCGGATTTGCTGGTTGGTTTGGCCGTGATGCCACCAGCAGTGCTGTTACAGCTCACA         300
GGTGGTACCTGGGAGTTGGGCCCGATGCTCTGCGACTCGTGGGTCTCCCTCGACATTCTT         360
CTCTGTACTGCCAGCATACTATCGTTATGCGCCATATCCATAGACAGGTATCTAGCTGTA         420
ACTCAACCGTTGATATACAGCCGAAGACGACGTAGCAAGAGGTTGGCCGGTCTAATGATC         480
GTCGCAGTATGGGTGTTAGCCGGCGCCATCACCAGTCCACCTTTGCTAGGATGCTTTCCA         540
CGTGCGACGAATCGCGACATTAAAAAATGCTCGTATAATATGGACTCCTCGTACGTGATA         600
TTTTCCGCGATGGGTTCGTTTTTCCTACCGATGCTGGTGATGCTTTACGTTTACGGGAGG         660
ATATCTTGCGTGATCGCCAGCCGCCATAGAAATCTCGAAGCAACCGAGAGTGAAAATGTT         720
CGACCACGGCGCAATGTCTTGATCGAACGCGCGAAAAGTATCAGAGCGCGAAGAACGGAA         780
TGCGTGACCAACAGTGTGACGTGCGACAGACCATCCGACGAGGCAGAACCTTCTAGCACG         840
AGCAAAAAGTCCGGAATCGTTCGCAGCCATCAGCAGAGTTGTATCAACAGAGTCGCTCGA         900
GAGACAAAAACAGCTGGCACTTTGGCGGTGGTCGTAGGTGGATTCGTGGCCTGTTGGTTA         960
CCATTTTTCATCCTTTATTTGGCCACTCCTTTTGTGCCTGTCGAACCACCCGATATCTTG        1020
ATGCCTGCGTTAACTTGGCTAGGGTGGATTAATTCGGCTATAAATCCATTTATCTACGCC        1080
TTCTATTCGGCCGACTTTAGGCTTGCGTTCTGGCGATTGACTTGTCGAAAATGTTTCAAA        1140
AGTAGAACCAATTTGGATCCCAGTAACCGGAAATTACCAGCACCGGCTAATTGGAAGAAA        1200
GACACAACGAGAACGTGA                                                   1218
```

Sequenzen der verwendeten Primer und Hydrolysesonden

Amplifizierung des AmTyr2-Rezeptors:

Name	Sequenz (5´→ 3´)	Verwendungszweck
AmTyr_2 For 1 AmTyr_2 Rev 1	GCGGAAGTCATCGTCAATGG GGTCGTATCAACGTTCATTCCC	Amplifizieren der vollständigen AmTyr2-cDNA
Amtyr2_exp_f Amtyr2_exp_r	TTTAAGCTTCCACCATGGCGAATCAAACGG TTTGAATTCCGTTCTCGTTGTGTCTTTCTT	Herstellung des AmTyr2-Expressions-Konstruktes für die heterologe Expression

für die Klonierung der CPL3 des AmTyr2-Rezeptors (5´→3´):

CPL3_*forward*: TTTGAATTCGCCAGCCGCCATAGAAATC

CPL3_*reverse*: TTTAAGCTTTTACTCTCGAGCGACTCTGTTGATAC

qPCR:

Rezeptorgen	Sequenz (5´→ 3´)	Amplifikat-länge (bp)
ef1a		
forward	GAACATTTCTGTGAAAGAGTTGAGGC	394
reverse	TTTAAAGGTGACACTCTTAATGACGC	
Sonde	FAM-ACCGAGGAGAATCCGAAGAGCATCAA-BBQ	
gapdh		
forward	ACCTTCTGCAAAATTATGGCGA	188
reverse	CACCTTTGCCAAGTCTAACTGTTAAG	
Sonde	6FAM-AGAGCTGGAATAACTTTGCCAACAGCTT-BBQ	
rpl32		
forward	AGTAAATTAAAGAGAAACTGGCGTAA	180
reverse	TAAAACTTCCAGTTCCTTGACATTAT	
Sonde	FAM-TGGCAACATATGACGAGTTTTTTTGTT-BBQ	
Am*tyr1*		
forward	AGCCGACCGAGGTCACGATAG	169
reverse	CCCATTATCACGCCCAATGTCC	
Sonde	HEX-AACGAGATCCTCTGCCTCTCCTCGATGAA-BBQ	
Am*tyr2*		
forward	GTTACTAATTGTTTCGTGTCCAGCTT	161
reverse	GCAGTACAGAGAAGAATGTCGAGG	
Sonde	Cy5-AGGTACCACCTGTGAGCTGTAACAGCA-BBQ	
Am*octaR1*		
forward	GCAGGAGGAACAGCTGCGAG	154
reverse	GCCGCCTTCGTCTCCATTCG	
Sonde	HEX-TCCCCATCTTCATCACCCTTGGCTTCTCC-BBQ	
Am*octβR3/4*		
forward	CACTTCGATACGACAACAAACG	209
reverse	GGTTCAGGGCGCTGTTGA	
Sonde	HEX-ACCACGTCCTTGTGCGGCGA-BBQ	

BBQ = BlackBerry® Quencher
FAM = Fluorescein
HEX = Hexachlorfluorescein

Bezugsquellen kommerziell erhältlicher Antikörper

anti-HA	Roche Applied Science (Mannheim)
anti-guineapig HRP	Jackson ImmunoResearch Europe Ltd. (Suffolk)
anti-guineapig Cy3	Jackson ImmunoResearch Europe Ltd. (Suffolk)
anti-rat HRP	American Qualex Antibodies (La Mirada)
anti-rat Cy3	Jackson ImmunoResearch Europe Ltd. (Suffolk)

Die Seite 103 enthält persönliche Daten. Sie ist deshalb nicht Bestandteil der Online-Veröffentlichung.

Publikationen

REIM T. & SCHEINER R. **(2014)** Division of labour in honey bees: age- and task-related changes in the expression of octopamine receptor genes. Insect Molecular Biology 23, 833-841

SCHEINER R., TOTEVA A., **REIM T.**, SØVIK E. & BARRON A. B. **(2014)** Differences in the phototaxis of pollen and nectar foraging honey bees are related to their octopamine brain titers. Frontiers in Invertebrate Physiology 5: 116

REIM T, THAMM M, ROLKE D, BLENAU W, SCHEINER R **(2013)** Suitability of three common reference genes for quantitative real-time PCR in honey bees. Apidologie 44: 342-350

Tagungsbeiträge

12.05. - 13.05.2012	Development and plasticity of the insect nervous system, Rauischholzhausen Vortrag: *Sensory responsiveness and division of labor in honey bees*
06.07. - 08.07.2012	Symposium „Biogenic amines in insects“, Berlin Poster: *Biogenic amines receptors and division of labor in the honey bee*
21.09. - 24.09.2012	105. Jahrestagung Deutsche Zoologische Gesellschaft, Konstanz Poster: *Biogenic amines receptors and division of labor in the honey bee*
11.05. - 12.05.2013	Development and plasticity of the insect nervous system, Rauischholzhausen Vortrag: *Regulatory mechanisms of the division of labor in honey bees*

Ich danke…

Prof. Dr. Ricarda Scheiner für die Vergabe dieses Themas und das in mich gesetzte Vertrauen sowie für die zahlreichen Gespräche, Ideen und die stete Diskussionsbereitschaft.

Prof. Dr. Paul A. Stevenson und Prof. Christian Wegener für die Bereitschaft meine Dissertation zu begutachten.

Prof. Dr. Arnd Baumann und Sabine Balfanz für die Kooperation und die Hilfe auf dem Gebiet der Zellkultur und der Calciumfluorometrie.

Apl. Prof. Dr. Otto Baumann für die Einarbeitung an den Fluoreszenzmikroskopen sowie für die Hilfe bei kleineren und größeren Problemen an deren Hardware und Software.

Dr. Andrew B. Barron, Dr. Eirik Søvik und Dr. Naila Even für die Kooperation auf dem Gebiet der HPLC, für die Einarbeitung in verschiedene Präparationstechniken und für die herzliche Atmosphäre innerhalb und außerhalb des Labors in Sydney.

Dr. Markus Thamm für die Hilfe und Diskussionsbereitschaft bei molekularbiologischen und biochemischen Fragestellungen sowie für die Einarbeitung in die verschiedenen Methoden.

Der gesamten AG Zoophysiologie, insbesondere Dr. Stefanie Blankenburg, Dr. Kristoffer Heindorff, Dr. Anne-Katrin Rohlfing, Daniel Rolke, Dr. Claudia Röser und Dr. Markus Thamm für das freundschaftliche Willkommen in der Arbeitsgruppe, die Arbeitsatmosphäre und überhaupt die letzten vier Jahre innerhalb und außerhalb des Labors.

Daniel Rolke und Christiane Hönicke für die tolle Zeit in Potsdam und einfach für ihre positive Grundeinstellung.

Marcel Bugenhagen, Robert Engel, Fabian Katterwe, Anna Toteva und Bärbel Wuntke für die Unterstützung im Labor und in der Bienenhaltung.

Benedikt Polaczek für die Pflege der Bienenvölker und die Einführung in das Imkern.

Der AG Zellbiologie und der AG Allgemeine Zoologie für einige freundlicherweise zur Verfügung gestellte Geräte.

Meiner Familie und allen guten Freunden für ihre Unterstützung, Motivation und manchmal auch Nachsicht.

Mathilda für ihre Kooperationsbereitschaft in den letzten Monaten des Dissertationsprozesses.

Und nicht zuletzt danke ich Andreas für die grenzenlose Unterstützung, die aufbauenden Worte und den Optimismus zu jeder Zeit.

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich an Eides statt, dass ich die vorliegende Dissertation selbstständig ohne Hilfe Dritter und nur unter Verwendung der angegebenen Hilfsmittel und Quellen angefertigt habe. Diese Arbeit hat in gleicher oder ähnlicher Form noch keiner anderen Hochschule vorgelegen.

Potsdam, 01.04.2015 Tina Reim