

Institut für Biochemie und Biologie

Abteilung Zoophysiologie

Räumliche und zeitliche Expressionsmuster sowie Funktionen
der Serotonin-Rezeptor-Subtypen der Honigbiene,
Apis mellifera L., 1758

-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

DANIEL ROLKE

Potsdam, den 21. März 2016

Gutachter: 1. PD. Dr. Wolfgang BLENAU
2. Prof. Dr. Dorothea EISENHARDT
3. Prof. Dr. Gerd BICKER

Online veröffentlicht auf dem
Publikationsserver der Universität Potsdam:
URN urn:nbn:de:kobv:517-opus4-96667
<http://nbn-resolving.de/urn:nbn:de:kobv:517-opus4-96667>

Zusammenfassung

Das biogene Amin Serotonin (5-Hydroxytryptamin, 5-HT) agiert als wichtiger chemischer Botenstoff bei einer Vielzahl von Organismen. Das durch 5-HT vermittelte Signal wird dabei durch spezifische Rezeptoren wahrgenommen und in eine zelluläre Reaktion umgesetzt. Diese 5-HT-Rezeptoren gehören überwiegend zur Familie der G-Protein gekoppelten Rezeptoren (GPCRs). Die Honigbiene *Apis mellifera* bietet unter anderem aufgrund ihrer eusozialen Lebensweise vielfältige Ansatzpunkte zur Erforschung der Funktionen des serotonergen Systems in Insekten. Bei *A. mellifera* wurden bereits vier 5-HT-Rezeptor-Subtypen beschrieben und molekular sowie pharmakologisch charakterisiert: Am5-HT_{1A}, Am5-HT_{2α}, Am5-HT_{2β} und Am5-HT₇. Ziel dieser Arbeit war es, gewebespezifische sowie alters- und tageszeitabhängige Expressionsmuster der 5-HT-Rezeptor-Subtypen zu untersuchen, um zu einem umfassenden Verständnis des serotonergen Systems der Honigbiene beizutragen und eine Basis zur Hypothesenentwicklung für mögliche physiologische Funktionen zu schaffen.

Es wurde die Expression der 5-HT-Rezeptorgene sowohl im zentralen Nervensystem, als auch in Teilen des Verdauungs-, Exkretions- und Speicheldrüsensystems gemessen. Dabei konnte gezeigt werden, dass die untersuchten 5-HT-Rezeptor-Subtypen generell weit im Organismus der Honigbiene verbreitet sind. Interessanterweise unterschieden sich die untersuchten Gewebe hinsichtlich der mRNA-Expressionsmuster der untersuchten Rezeptoren. Während beispielsweise im Gehirn *Am5-ht1A* und *Am5-ht7* stärker als *Am5-ht2a* und *Am5-ht2β* exprimiert wurden, zeigte sich in Darmgewebe ein umgekehrtes Muster.

Es war bereits bekannt, dass es bei der Expression der *Am5-ht2*-Gene zu alternativem Spleißen kommt. Dies führt zur Entstehung der verkürzten mRNA-Varianten *Am5-ht2aΔIII* und *Am5-ht2βΔII*. Die daraus resultierenden Proteine können nicht als funktionelle GPCRs agieren. Es konnte gezeigt werden, dass diese verkürzten Spleißvarianten dennoch ubiquitär in der Honigbiene exprimiert werden. Bemerkenswerterweise wurden gewebeübergreifende Ähnlichkeiten der Expressionsmuster der Spleißvarianten gegenüber deren zugehörigen Vollängenvarianten festgestellt, welche auf Funktionen der verkürzten Varianten *in vivo* hindeuten.

Im Hinblick auf die bei *A. mellifera* hauptsächlich altersbedingte Arbeitsteilung wurde die Expression der 5-HT-Rezeptor-Subtypen in Gehirnen von unterschiedlich alten Arbeiterinnen

mit unterschiedlichen sozialen Rollen verglichen. Während auf mRNA-Ebene keines der vier 5-HT-Rezeptor-Subtypen eine altersabhängig unterschiedliche Expression zeigte, konnte für das Am5-HT_{1A}-Protein eine höhere Konzentration in den Gehirnen älterer Tiere gefunden werden. Dies deutet auf eine posttranskriptionale Regulation der 5-HT_{1A}-Rezeptorexpression hin, welche im Zusammenhang mit der Arbeitsteilung stehen könnte.

Es erfolgte die Untersuchung tageszeitlicher Änderungen sowohl der Expression der 5-HT-Rezeptor-Subtypen, als auch des biogenen Amins 5-HT selbst. Während es in den Gehirnen von Arbeiterinnen, welche unter natürlichen Bedingungen gehalten wurden, zu keiner tageszeitabhängigen Veränderung des 5-HT-Titers kam, zeigte die mRNA-Expression von *Am5-ht2a* und *Am5-ht2β* eine periodische Oszillation mit Zunahme während des Tages und Abnahme während der Nacht. Diese Regulation wird durch externe Faktoren hervorgerufen und ist nicht auf einen endogenen circadianen Rhythmus zurückzuführen. Dies ging aus der Wiederholung der Expressionsmessungen an Gehirnen von Bienen, welche unter konstanten Laborbedingungen gehalten wurden, hervor.

Weiterhin wurde die Beteiligung des serotonergen Systems an der Steuerung von Aspekten des circadianen lokomotorischen Aktivitätsrhythmus anhand von Verhaltensexperimenten untersucht. Mit 5-HT gefütterte Arbeiterinnen zeigten dabei unter konstanten Bedingungen eine längere Periode des Aktivitätsrhythmus als Kontrolltiere. Dies deutet auf einen Einfluss von 5-HT auf die Modulation der Synchronisation der inneren Uhr hin.

Die vorliegenden Ergebnisse tragen wesentlich zum tieferen Verständnis des serotonergen Systems der Honigbiene bei und bieten Ansatzpunkte für weitergehende Studien zur Funktion von 5-HT im Zusammenhang mit der Modulation von physiologischen Prozessen, Arbeitsteilung und circadianen Rhythmen.

Abstract

The biogenic amine serotonin (5-hydroxytryptamine, 5-HT) acts as an important chemical messenger in a variety of organisms. The 5-HT-mediated signal is perceived by specific receptors and converted to a cellular response. This 5-HT receptors mainly belong to the family of G protein-coupled receptors (GPCRs). The honeybee offers various starting points to explore the functions of the serotonergic system in insects, among other things because of their eusocial lifestyle. In *A. mellifera* four 5-HT receptor subtypes have been described and molecularly and pharmacologically characterized: Am5-HT_{1A}, Am5-HT_{2α}, Am5-HT_{2β} and Am5-HT₇. The aim of this study was to investigate the tissue-specific and age- and daytime-dependent expression patterns of the 5-HT receptor subtypes in order to contribute to a comprehensive understanding of the serotonergic system in *A. mellifera*.

The expression of the 5-HT receptor genes was measured in the central nervous system, as well as in parts of the digestive, excretory and salivary system. It was shown that the investigated 5-HT receptor subtypes are widely distributed in the honeybee. Interestingly, the tissues examined differed with regard to the mRNA expression pattern of the studied receptors. While in the brain the expression of *Am5-ht1A* and *Am5-ht7* was higher than that of *Am5-ht2a* and *Am5-ht2β*, the opposite held true for intestinal tissue.

It was already known that alternative splicing occurs in the expression of both *Am5-ht2* genes. This leads to the formation of the truncated mRNA variants *Am5-ht2aΔIII* and *Am5-ht2βΔII*. The resulting proteins cannot act as functional GPCRs. However, it was demonstrated that these truncated splice variants are still ubiquitously expressed in the honeybee. Remarkably, similarities in the expression patterns of the shortened splice variants towards their corresponding full length variants were found throughout different tissues that indicate *in vivo* functions of the shortened variants.

In view of the mainly age related division of labor in *A. mellifera*, the expression of the 5-HT receptor subtypes was compared in brains of different aged workers with different social roles. While none of the four 5-HT receptor subtypes showed an age-dependent differential expression at the mRNA level, a higher concentration in the brains of older animals could be found for the Am5-HT_{1A} protein. This points to a post-transcriptional regulation of 5-HT_{1A} receptor expression, which could be associated with the division of labor.

It was carried out the investigation of diurnal changes in both the expression of the 5-HT receptor subtypes, and of the biogenic amine 5-HT itself. While in the brains of workers, which were kept under natural conditions, no daytime-dependent changes of the 5-HT titer could be found, the mRNA expression of *Am5-ht2a* and *Am5-ht2β* showed a periodic oscillation with an increase during the day and a decrease at night. This regulation is caused by external factors and not due to an endogenous circadian rhythm. That was shown by the repetition of the expression measurements on brains of bees, which were kept under constant laboratory conditions.

Furthermore, the involvement of the serotonergic system in controlling aspects of circadian locomotor activity rhythm was investigated in behavioral experiments. Under constant conditions, worker bees which were fed with 5-HT showed a longer period of locomotor rhythm than control animals. This suggests an influence of 5-HT in the modulation of the synchronization of the internal clock.

In conclusion, the present results contribute to a more detailed understanding of the serotonergic system of the honeybee and provide a basis for further studies on the function of 5-HT in connection with the modulation of physiological processes, division of labor and circadian rhythms.

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	vii
Abbildungs- und Tabellenverzeichnis.....	x
Hinweis zur Nomenklatur von Serotonin-Rezeptor-Subtypen.....	xii
1 Einleitung.....	1
1.1 Arbeitsteilung bei der eusozialen Honigbiene <i>Apis mellifera</i>	2
1.2 Das biogene Amin Serotonin und seine Rezeptor-Subtypen	4
1.3 Circadiane Rhythmik bei Insekten.....	10
1.4 Zielstellung der Arbeit.....	13
2 Material und Methoden.....	15
2.1 Chemikalien	15
2.2 Versuchstiere.....	15
2.2.1 Haltung von Honigbienen unter kontrollierten Bedingungen	16
2.3 Gewebepräparation.....	17
2.4 Molekularbiologische Methoden.....	18
2.4.1 RNA-Extraktion.....	18
2.4.2 RNA-/DNA-Konzentrationsbestimmung	18
2.4.3 Synthese komplementärer DNA (cDNA)	18
2.4.4 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	19
2.4.5 Quantitative Echtzeit-PCR (qPCR).....	20
2.4.6 Agarose-Gelelektrophorese.....	22
2.4.7 DNA-Fragment Reinigung.....	22
2.4.8 DNA-Konzentrierung	23
2.4.9 DNA-Restriktionsverdau	23
2.4.10 Ligation	23
2.4.11 Transformation von <i>Escherichia coli</i>	24
2.4.12 Präparation von Plasmid-DNA	24
2.5 Biochemische Methoden.....	25
2.5.1 Bestimmung von Proteinkonzentrationen	25
2.5.2 Isolierung von Membran- und cytosolischen Proteinen	25
2.5.3 Deglykosylierung von Membranproteinen	25
2.5.4 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese	26
2.5.5 Coomassie Blau-Färbung.....	28
2.5.6 Western Blot	29
2.5.7 Immundetektion.....	31

2.5.8	Expression und Reinigung von Maltose-Bindeprotein-Fusionsproteinen	31
2.5.9	Expression und Reinigung von His-Tag-Fusionsproteinen	32
2.5.10	Generierung und Aufreinigung polyklonaler Antikörper	34
2.6	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie	35
2.7	Verhaltensexperimente zur Ontogenese der circadianen Rhythmik lokomotorischer Aktivität	36
2.7.1	Verabreichung pharmakologischer Substanzen	36
2.7.2	Messung der lokomotorischen Aktivität von Honigbienen	36
2.8	Datenauswertung und Statistik	37
3	Ergebnisse	39
3.1	Gewebespezifische Expressionsmuster der 5-HT-Rezeptor-Subtypen.....	39
3.1.1	Expression der 5-HT-Rezeptorgene <i>Am5-ht1A</i> , <i>Am5-ht2a</i> , <i>Am5-ht2β</i> und <i>Am5-ht7</i>	39
3.1.2	Expression von <i>Am5-ht2a</i> und <i>Am5-ht2β</i> , sowie deren alternativen Spleißvarianten <i>Am5-ht2aΔIII</i> und <i>Am5-ht2$\beta$$\Delta$II</i>	41
3.2	Zeitliche Expressionsmuster der 5-HT-Rezeptor-Subtypen.....	47
3.2.1	Altersabhängige Expression der 5-HT-Rezeptorgene <i>Am5-ht1A</i> , <i>Am5-ht2a</i> , <i>Am5-ht2β</i> und <i>Am5-ht7</i> im Gehirn	47
3.2.2	Altersabhängige Expression des Am5-HT _{1A} -Rezeptorproteins im Gehirn	48
3.2.3	Tageszeitliche Expression der 5-HT-Rezeptorgene <i>Am5-ht1A</i> , <i>Am5-ht2a</i> , <i>Am5-ht2β</i> und <i>Am5-ht7</i> im Gehirn	49
3.2.4	Tageszeitliche Expression des Am5-HT _{1A} -Rezeptorproteins im Gehirn	56
3.3	Generierung und Testung polyklonaler Antikörper gegen das Am5-HT _{2β} - Rezeptorprotein	57
3.4	Serotoningehalt im Gehirn von Arbeiterinnen.....	62
3.4.1	Altersabhängigkeit des Serotoningehalts im Gehirn.....	62
3.4.2	Tagesverlauf des Serotoningehalts im Gehirn.....	63
3.5	Einfluss von Serotonin auf die Ontogenese der circadianen Rhythmik lokomotorischer Aktivität	64
4	Diskussion.....	68
4.1	Expressionsmuster der Serotonin-Rezeptor-Subtypen im zentralen Nervensystem.....	68
4.2	Expressionsmuster der Serotonin-Rezeptor-Subtypen im Vorder- und Mitteldarm.....	72
4.3	Expressionsmuster der alternativen Spleißvarianten der Am5-HT ₂ -Rezeptor-Subtypen.....	76
4.4	Expressionsmuster der Serotonin-Rezeptor-Subtypen im Kontext der altersabhängigen Arbeitsteilung.....	81
4.5	Expressionsmuster der Serotonin-Rezeptor-Subtypen im Kontext der Plastizität circadianer Rhythmik.....	84

4.6	Einfluss von Serotonin auf Parameter der circadianen Aktivitätsrhythmik.....	90
4.7	Ausblick.....	92
5	Literatur	95
6	Appendix	113
	Abkürzungen.....	113
	Lebenslauf.....	121
	Publikationen.....	122
	Konferenzbeiträge.....	123
	Danksagung.....	124
	Eidesstattliche Erklärung.....	125

Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

Abb. 1.1	Biosynthese von Serotonin	4
Abb. 1.2	Signalwege G-Protein gekoppelter 5-HT-Rezeptoren	7
Abb. 1.3	Schematische Darstellung der genomischen Organisation der <i>Am5-ht2a</i> und <i>Am5-ht2β</i> Rezeptorgene	9
Abb. 2.1	Verdünnungsreihe von Bienenhirn-Gewebe zur Bestimmung des geeigneten Probenvolumens für quantitative Western Blot-Analysen	30
Abb. 2.2	Versuchsaufbau zur Messung lokomotorischer Aktivität von Einzelbienen	37
Abb. 3.1	Expressionsmuster der <i>Am5-ht</i> -Rezeptorgene in Gehirn- und Darmgewebe, gemessen mittels qPCR	40
Abb. 3.2	Expressionsmuster der <i>Am5-ht2</i> -Rezeptorgene inklusive alternativer Spleißvarianten im zentralen Nervensystem, gemessen mittels qPCR	42
Abb. 3.3	Expressionsmuster der <i>Am5-ht2</i> -Rezeptorgene inklusive alternativer Spleißvarianten in verschiedenen Drüsengeweben von Pollensammlerinnen, gemessen mittels qPCR	44
Abb. 3.4	Expressionsmuster der <i>Am5-ht2</i> -Rezeptorgene inklusive alternativer Spleißvarianten in Geweben des Verdauungs- und Exkretionssystems von Pollensammlerinnen, gemessen mittels qPCR	46
Abb. 3.5	Relative mRNA-Expression der <i>Am5-ht</i> -Rezeptorgene im Gehirn von 5 und 20 Tage alten Arbeiterinnen, gemessen mittels qPCR	48
Abb. 3.6	Relative Expression des <i>Am5-HT_{1A}</i> -Rezeptorproteins im Gehirn von 6 und 21 Tage alten Arbeiterinnen, gemessen mittels quantitativem Western Blot	49
Abb. 3.7	Tageszeitlicher Verlauf der relativen Expression der <i>Am5-ht</i> -Rezeptorgene im Gehirn von 5 und 20 Tage alten Arbeiterinnen unter Freilandbedingungen (24. April – 9. Mai 2012), gemessen mittels qPCR	50
Abb. 3.8	Tageszeitlicher Verlauf der relativen Expression der <i>Am5-ht</i> -Rezeptorgene in Zentralhirn und optischen Loben von 20 Tage alten Arbeiterinnen unter Freilandbedingungen (10. - 25. September 2013), gemessen mittels qPCR	52
Abb. 3.9	Exemplarische Darstellung der lokomotorischen Aktivität dreier Versuchstiere im Dauerdunkel, welche für die qPCR-Messungen der <i>Am5-ht</i> -Rezeptorgene im Tagesverlauf unter konstanten Bedingungen verwendet wurden	54
Abb. 3.10	Tageszeitlicher Verlauf der relativen Expression der <i>Am5-ht</i> -Rezeptorgene in Zentralhirn und optischen Loben von 20 Tage alten Arbeiterinnen unter konstanten Bedingungen (Dauerdunkel, relative Luftfeuchtigkeit), gemessen mittels qPCR	55
Abb. 3.11	Tageszeitlicher Verlauf der relativen Expression des <i>Am5-HT_{1A}</i> -Rezeptorproteins im Gehirn von 6 bzw. 21 Tage alten Arbeiterinnen unter Freilandbedingungen (25. April – 10. Mai 2012), gemessen mittels quantitativem Western Blot	56

Abb. 3.12	Western Blot Analysen zur Beurteilung der Spezifität der generierten und aufgereinigten Antikörper gegen das Am5-HT _{2β} -Rezeptorprotein	58
Abb. 3.13	Western Blot Analysen zur Beurteilung der Spezifität der aufgereinigten Antikörper gegen das Am5-HT _{2β} -Rezeptorprotein	59
Abb. 3.14	2D-Western Blot-Analysen zur Beurteilung der Spezifität der aufgereinigten Antikörper gegen das Am5-HT _{2β} -Rezeptorprotein	60
Abb. 3.15	Serotoningehalt in Gehirnen von 5 und 20 Tage alten Arbeiterinnen unter Freilandbedingungen (07. Januar – 22. Januar 2013, Sydney {Australien}), gemessen mittels HPLC	62
Abb. 3.16	Tageszeitlicher Verlauf des Serotoningehalts in Gehirnen von 5 und 20 Tage alten Arbeiterinnen unter Freilandbedingungen (07. Januar – 22. Januar 2013, Sydney {Australien}), gemessen mittels HPLC	63
Abb. 3.17	Überlebenskurve der im Verhaltensexperiment eingesetzten Bienen	65
Abb. 3.18	Prozentualer Anteil von Bienen mit circadianem Rhythmus der lokomotorischen Aktivität im Dauerdunkel bei zunehmendem Alter	65
Abb. 3.19	Exemplarische Darstellung der lokomotorischen Aktivität zweier Versuchstiere im Dauerdunkel	66
Abb. 3.20	Periode des circadianen Rhythmus der lokomotorischen Aktivität im Dauerdunkel bei unterschiedlicher Fütterung	67
Abb. A.1	Schematische Darstellung der <i>Am5-ht2a</i> und <i>Am5-ht2β</i> cDNAs mit Angabe der Positionen der Primer und TaqMan-Sonden für qPCR	117
Abb. A.2	Vergleich der C _q -Werte der Fluoreszenzsignalkurven für <i>Amef-1a-fl</i> in verschiedenen Geweben, gemessen mittels qPCR	120
Tab. 1.1	Serotoninrezeptoren bei <i>A. mellifera</i>	8
Tab. 2.1	PCR-Reaktionsgemische	19
Tab. 2.2	PCR-Temperaturprogramme	20
Tab. 2.3	Zusammensetzung von Trenn- und Sammelgel bei SDS-PAGE nach LAEMMLI (1970)	26
Tab. 2.4	Spannungsprogramm zur isoelektrischen Fokussierung	28
Tab. A.1	Temperatur- und Luftfeuchteregime zur Haltung von Honigbienen für 2 Tage nach Transfer aus dem Volk ins Labor zum Zweck der Habituation	116
Tab. A.2	Sequenzen der Primer für die Klonierung von 5-HT-Rezeptorgenen und <i>Amef-1a-fl</i>	117
Tab. A.3	Sequenzen der Primer für die Antikörperherstellung gegen Am5-HT _{2β}	117
Tab. A.4	Sequenzen der Primer und TaqMan-Sonden (inklusive 5'- und 3'-Modifikationen) für den Einsatz in der qPCR, sowie die erwarteten Ampliconlängen	118
Tab. A.5	Nukleotid- und Aminosäuresequenzen der Antigenbereiche zur Antikörperherstellung gegen Am5-HT _{2β}	119

Hinweis zur Nomenklatur von Serotonin-Rezeptor-Subtypen

In der vorliegenden Arbeit erfolgte die Nomenklatur aller aufgeführten Serotonin-Rezeptor-Subtypen durchgängig nach HOYER et al. (1994) und COLAS et al. (1997), verändert nach BLENAU & THAMM (2011), durch einen vorangestellten Zwei-Buchstaben-Code zur Kennzeichnung der zugehörigen Spezies („Am“ für *Apis mellifera*, „Dm“ für *Drosophila melanogaster*, etc.), gefolgt von der entsprechenden Abkürzung „5-HT“ für Serotonin (5-Hydroxytryptamin) mit tiefgestellter klassifikatorischer Zuordnung (_{1A}, _{2a}, etc.). Es sei darauf hingewiesen, dass nicht alle erwähnten Rezeptor-Subtypen in den jeweilig zitierten Originalarbeiten nach dieser nomenklatorischen Konvention benannt wurden, jedoch erleichtert die in der vorliegenden Arbeit angewendete Vereinheitlichung der zum Teil unterschiedlichen Schreibweisen die Lesbarkeit des Textes. Während Gene und deren mRNA-Transkripte klein und kursiv geschrieben wurden, erfolgte die Schreibweise von Proteinen groß und nicht kursiv.

1 Einleitung

Die Kommunikation zwischen Organen, Geweben und letztlich einzelnen Zellen innerhalb eines mehrzelligen Organismus ist sowohl für die Aufrechterhaltung seiner Homöostase, als auch für die Anpassung an sich verändernde Umweltbedingungen von außerordentlicher Wichtigkeit (MIAN & ROSE 2011). Kommunizierende Zellen können sich sowohl eng benachbart, als auch weit voneinander entfernt befinden. In der Regel spielen freigesetzte chemische Substanzen als Signalmoleküle durch Interaktion mit entsprechenden Rezeptorproteinen eine entscheidende Rolle bei der Signalübertragung und ermöglichen Zellen eine adäquate Reaktion auf die übermittelten Reize. Häufig nehmen Vertreter der Substanzklasse der biogenen Amine die Rolle der Signalmoleküle ein, welche in der Regel durch Bindung an G-Protein gekoppelte Rezeptoren (GPCRs) wirken (HAUSER et al. 2006). Neben Dopamin, Tyramin, Octopamin und Histamin ist Serotonin eines der wichtigsten biogenen Amine und als Neuromodulator sowie Hormon an der Steuerung einer Vielzahl von physiologischen Prozessen und Verhaltensweisen beteiligt (BICKER & MENZEL 1989, BAUMANN et al. 2009, BLENAU et al. 2012). Serotonin fungiert als wichtiges Signalmolekül sowohl zwischen Einzellern (MCGOWAN et al. 1983), als auch innerhalb mehrzelliger Organismen (WEIGER 1997).

Soziale Insekten sind in ihrer dynamischen sozialen Umgebung sich permanent ändernden Bedingungen ausgesetzt. Dies erfordert eine zuverlässige und leistungsfähige Anpassung ihrer Physiologie und ihres Verhaltens an verschiedene Situationen. Arbeiterinnen innerhalb eines Insektenstaates sind hierdurch in der Lage, präzise aufeinander abgestimmt unterschiedliche Aufgaben zu erledigen, um das homöostatische Gleichgewicht des sozialen Gefüges zu erhalten (WILSON 1971, HÖLLDOBLER & WILSON 2009). Die Arbeiterinnen der eusozialen Honigbiene *Apis mellifera* LINNAEUS 1758 (Hymenoptera: Apidae) übernehmen vor allem in Abhängigkeit ihres Alters unterschiedliche Aufgaben (SEELEY, 1982). Gleichzeitig sind sie täglich wechselnden Tag- und Nachtbedingungen ausgesetzt. Auch bei der Koordination dieser Abläufe sind biogene Amine wie Serotonin beteiligt (SCHEINER et al. 2006).

Die Grundvoraussetzung für die Wirkung von Serotonin als Signalmolekül ist das Vorhandensein von spezifischen Serotoninrezeptoren in Zellen verschiedener Gewebe (SAUDOU & HEN 1994, TIERNEY 2001, NICHOLS & NICHOLS 2008). Die Arbeit betrachtet die räumliche und zeitliche Expression der bekannten Serotoninrezeptoren von *A. mellifera* sowie

Aspekte der Beteiligung von Serotonin und Serotoninrezeptoren an der Arbeitsteilung und circadianen Rhythmik.

1.1 Arbeitsteilung bei der eusozialen Honigbiene *Apis mellifera*

Im Tierreich evolvierten viele verschiedene Systeme des sozialen Zusammenlebens. Besonders divers sind dabei die Formen des Sozialverhaltens bei Insekten (WILSON 1971). Hymenopteren besitzen hinsichtlich der Komplexität ihrer sozialen Organisation eine große Variabilität (MICHENER, 1969, LIN & MICHENER 1972, O'TOOLE & RAW 1991). Als komplexeste Form des Sozialverhaltens innerhalb einer Art wird hierbei die Eusozialität betrachtet (WILSON 1971, WILSON & HÖLLDOBLER 2005, HÖLLDOBLER & WILSON 2009). Bei Bienen (Hymenoptera: Apoidea) entwickelte sich eusoziales Verhalten mehrfach unabhängig voneinander (CAMERON 1993, WOODARD et al. 2011). Charakteristisch für Eusozialität sind reproduktive Arbeitsteilung und kooperative Brutpflege durch Individuen derselben Art, sowie das Überlappen der Lebensspannen mindestens zweier Generationen innerhalb eines Nests (WILSON 1971, WILSON 1975, CRESPI & YANEGA 1995).

Die Aufrechterhaltung des sozialen Gefüges innerhalb eines Verbundes eusozialer Insekten („Insektenstaat“) erfordert die Verrichtung einer Vielzahl verschiedener Aufgaben. Die Westliche Honigbiene *Apis mellifera* zeigt hierbei eine Arbeitsteilung, welche auf verschiedenen Ebenen reguliert wird (PAGE & AMDAM 2007). Weibliche Tiere entwickeln sich entweder zu Individuen, welche sich verpaaren, jedoch nicht allein für die Aufrechterhaltung des Volkes sorgen können (Königinnen), oder fakultativ sterile Individuen, welche sich nicht verpaaren können und dementsprechend keine weiblichen Nachkommen hervorbringen können (Arbeiterinnen) (WINSTON 1987, PAGE & PENG 2001). Dieser Polyphänismus geht einher mit erheblichen Unterschieden in der Genexpression (EVANS & WHEELER 1991, EVANS & WHEELER 2001, BARCHUK et al. 2007, SMITH et al. 2010, CHEN et al. 2012, CAMERON et al. 2013) und wird durch unterschiedliche Futterzusammensetzungen der Larven herbeigeführt (HAYDAK 1943).

Arbeiterinnen zeigen eine hauptsächlich altersbedingte Arbeitsteilung (SEELEY 1982, ROBINSON 1992, PAGE & PENG 2001). Generell verrichten jüngere Arbeiterinnen (Stockbienen) Aufgaben innerhalb des Nests, zunächst im Zentrum und mit zunehmendem Alter verstärkt in der Nestperipherie (SEELEY 1982). Besondere Bedeutung kommt hierbei den sogenannten

Ammenbienen zu. Arbeiterinnen verrichten Ammentätigkeiten im Alter von etwa 4 bis 12 Tagen. Hierzu gehört das Füttern der Brut und Imagines mit proteinhaltiger Nahrung (CRAILSHEIM 1991, CRAILSHEIM 1992). Darüber hinaus formieren sie sich in direkter Umgebung der Königin (WINSTON 1987) und sind somit sowohl an der Regulation ihres Verhaltens, als auch an der Verbreitung der von ihr emittierten Pheromone im Volk von entscheidender Bedeutung (VELTHUIS 1972, SEELEY 1979). Für Ammenbienen charakteristisch ist die besonders ausgeprägte Entwicklung der Hypopharynx- oder Futtersaftdrüsen (KUBO et al. 1996, CRUZ-LANDIM & COSTA 1998, DESEYN & BILLEN 2005). Diese paarig angelegten, exokrinen Drüsen produzieren Komponenten des Gelée Royals, eines von Ammenbienen an Larven und Königinnen verfütterten, komplex zusammengesetzten Sekrets (PATEL et al. 1960, KNECHT & KAATZ 1990, KUBO et al. 1996).

Mit zunehmendem Alter, verstärkt ab etwa 18 bis 21 Tagen (SEELEY 1982), beginnen Arbeiterinnen damit, außerhalb des Nests nach Nektar, Pollen, Wasser und Propolis zu suchen und diese Stoffe einzutragen (ROBINSON 1992). Ein Großteil der Sammlerinnen fouragiert sowohl Nektar als auch Pollen bei ein und demselben Sammelflug, jedoch zeigen sich auch Tiere mit Präferenzen für eine der beiden Substanzen (PAGE et al. 2000, PAGE et al. 2006). Einhergehend mit dem Übergang der Arbeiterin von der Stockbiene zur Sammlerin verändert sich die Expression verschiedener Gene im zentralen Nervensystem (SMITH et al. 2010, ZAYED & ROBINSON 2012). WHITFIELD et al. (2003) fanden Unterschiede in der mRNA-Expression von 39% der ca. 5.500 untersuchten Gene im Gehirn zwischen Ammenbienen und Sammlerinnen. Diese Veränderungen stehen in engen Wechselbeziehungen zur Physiologie der Tiere (AMDAM & OMHOLT 2003, JOHNSON 2010, BLOCH & GROZINGER 2011). Beispielsweise konnte ein Anstieg des Titers an Juvenilhormon III in der Hämolymphe von Sammlerinnen festgestellt werden (FLURI et al. 1982). Die Applikation von Juvenilhormon-Agonisten führt zur vorzeitigen Aufnahme des Sammelverhaltens (ROBINSON 1987).

Darüber hinaus wurde ein Anstieg der als Neurotransmitter, Neuromodulatoren und Neurohormone wirkenden biogenen Amine im Gehirn von Arbeiterinnen in Abhängigkeit des Alters und der sozialen Aufgabe beobachtet (SCHULZ & ROBINSON 1999, WAGENER-HULME et al. 1999). REIM & SCHEINER (2014) zeigten Unterschiede in der mRNA-Expression zweier Octopamin-Rezeptorgene (*AmOctaR1* und *AmOctβR3/4*) in verschiedenen Gehirn-Neuropilen zwischen Ammen und Sammlerinnen. Nach einer allgemeinen Hypothese basiert die altersabhängige Arbeitsteilung auf unterschiedlichen intrinsischen Reaktionsschwellen der Arbeiterinnen für aufgabenspezifische Stimuli (BESHERS & FEWEL 2001). Indem sie diese

Reaktionsschwellen beeinflussen, sind biogene Amine an der Regulation der Arbeitsteilung bei *A. mellifera* beteiligt (SCHEINER et al. 2006).

1.2 Das biogene Amin Serotonin und seine Rezeptor-Subtypen

Das Indolamin Serotonin (5-Hydroxytryptamin, 5-HT) ist ein phylogenetisch altes Signalmolekül und dementsprechend ubiquitär im Tierreich verbreitet (PEROUTKA & HOWELL 1994, WEIGER 1997). Die Biosynthese von 5-HT erfolgt ausgehend von der aromatischen Aminosäure L-Tryptophan in einem zweistufigen Prozess (Abb. 1.1). Im ersten Schritt addiert das Enzym Tryptophan-Hydroxylase (TRH) eine Hydroxylgruppe an den Indolring des L-Tryptophan (LIVINGSTONE & TEMPEL 1983, ROBERTS & FITZPATRICK 2013). Das entstandene 5-Hydroxytryptophan dient als Substrat der DOPA-Decarboxylase (DDC, auch Aromatische-L-Aminosäure-Decarboxylase {AADC}), welche es zu 5-HT decarboxyliert (LOVENBERG et al. 1962, HIRSH & DAVIDSON 1981, LIVINGSTONE & TEMPEL 1983).

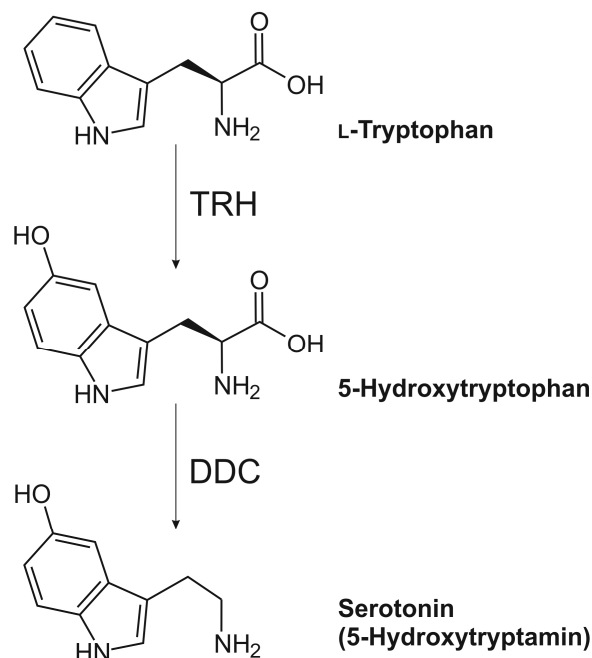


Abb. 1.1: Biosynthese von Serotonin. L-Tryptophan wird durch die Tryptophan-Hydroxylase (TRH) zu 5-Hydroxytryptophan hydroxyliert, welches durch die DOPA-Decarboxylase (DDC) zu Serotonin decarboxyliert wird.

Bei Insekten agiert 5-HT als Neurotransmitter und -hormon sowohl im zentralen Nervensystem, als auch in peripheren Organen (ELOFSSON & KLEMM 1972, MERCER 1987, HOMBERG 1994, ROEDER 1994, BLENAU & THAMM 2011, BLENAU et al. 2013). Im Gehirn von *A. mellifera* wurden 5-HT-Konzentrationen von 6-21 pmol/Gehirn gemessen (TAYLOR et al. 1992, SCHULZ & ROBINSON 1999, WAGENER-HULME et al. 1999). Durch histochemische und immunhistochemische Analysen wurden serotonerge Neuronen im Nervensystem der Honigbiene identifiziert (MERCER et al. 1983, SCHÜRMAN & KLEMM 1984, SCHÄFER & BICKER 1986, BICKER 1999). Das Gehirn von *A. mellifera* weist etwa 75 serotonin-immunreaktive Nervenzellkörper auf, deren Axone sich weit in alle Gehirnbereiche verzweigen (SCHÜRMAN & KLEMM 1984). Die paarigen optischen Loben, welche wichtige Strukturen für die erste Verarbeitung visueller Informationen darstellen, besitzen je 20-30 serotonin-immunreaktive Neuronen (SCHÜRMAN & KLEMM 1984). Deren Fortsätze sind zum Teil in Schichten zwischen einzelnen optischen Neuropilen angeordnet (SCHÄFER & BICKER 1986, THAMM et al. 2010). FRENCH et al. (2013) zeigten das Vorkommen serotonin-immunreaktiver Neuronen sowohl im Bauchmark, als auch im Vorder- und Mitteldarm (genauer: dem enterischen Nervensystem) der Honigbiene.

Das biogene Amin 5-HT erzielt seine Wirkung fast immer durch die Bindung an G-Protein gekoppelte Rezeptoren (GPCRs) (SAUDOU & HEN 1994, BLENAU & BAUMANN 2001, NICHOLS & NICHOLS 2008). Gene, die für GPCRs codieren, bilden eine große Genfamilie, welche 1-5% des Genoms von tierischen Organismen ausmacht (BOCKAERT & PIN 1999). Bei *A. mellifera* wurden etwa 240 GPCR-Gene identifiziert, welche einen Anteil von ca. 1,5% der Gesamtzahl der Gene im Genom darstellen (THE HONEYBEE SEQUENCING CONSORTIUM 2006). GPCRs weisen sieben hydrophobe, α -helikale Domänen auf. Diese erlauben dem Protein das Durchspannen der Plasmamembran (BLENAU & BAUMANN 2001). Die extrazelluläre Bindung eines Signalmoleküls (Ligand) bewirkt eine Konformationsänderung des Rezeptorproteins, welche intrazellulär zur Aktivierung eines Guaninnukleotid-bindenden Proteins (G-Protein) führt. In der Regel aktiviert die GTP-gebundene α -Untereinheit des G-Proteins ihrerseits weitere Proteine und wird letztlich durch eine intrinsische GTPase-Aktivität inaktiviert (BLENAU & BAUMANN 2001). Zu den häufigsten zellulären Antworten auf biogene Amine gehört eine Veränderung der intrazellulären Konzentration an zyklischem Adenosinmonophosphat (cAMP) und/oder Ca^{2+} . Die Art der Änderung wird durch die Spezifität des G-Proteins bedingt und erlaubt neben der Primärstruktur der Rezeptoren eine funktionelle Klassifizierung der GPCRs in distinkte Subtypen (GUDERMANN 1996, 1997).

Aufgrund des phylogenetisch frühen Auftretens von 5-HT als Signalmolekül evolvierte eine große Anzahl verschiedener 5-HT-Rezeptor-Subtypen (PEROUTKA 1994). Im Allgemeinen werden alle 5-HT-Rezeptoren anhand von Sequenzhomologien, Genorganisation, Art der intrazellulären Signalantwort und pharmakologischen Eigenschaften in sieben Klassen gruppiert, welche mit 5-HT₁₋₇ bezeichnet werden (TIERNEY 2001, HANNON & HOYER 2008, NICHOLS & NICHOLS 2008). Mit Ausnahme von 5-HT₃-Rezeptoren, die ligandengesteuerte Ionenkanäle darstellen, gehören alle zu den Rhodopsin-ähnlichen GPCRs der *a*-Gruppe. Bei Insekten wurden bislang Rezeptoren der Klassen 5-HT₁, 5-HT₂ und 5-HT₇ beschrieben (HAUSER et al. 2006, BLENAU & THAMM 2011, VLEUGELS et al. 2015). Der Kohlweißling *Pieris rapae* (Lepidoptera: Pieridae) weist zusätzlich einen 5-HT-Rezeptor auf, welcher möglicherweise als invertebratenspezifisch angesehen werden muss und kürzlich als 5-HT₈-Rezeptor beschrieben wurde (QI et al. 2014).

Die Bindung von 5-HT an ein 5-HT₇-Rezeptorprotein bewirkt die Aktivierung eines heterotrimeren G-Proteins aus der G_s-Familie (Abb. 1.2 A). Die aktivierte G_{αs}-Untereinheit stimuliert die membrangebundene Adenylzyklase (AC) zur Umsetzung von Adenosintriphosphat (ATP) zu cAMP. Die Steigerung der intrazellulären cAMP-Konzentration aktiviert die cAMP-abhängige Proteinkinase (Proteinkinase A, PKA). Diese modifiziert die Eigenschaften vieler verschiedener Substratmoleküle durch Phosphorylierung von Serin- und/oder Threoninresten (BLENAU & BAUMANN 2001).

Bindet 5-HT an einen 5-HT₁-Rezeptor, wird ein inhibitorisches G-Protein (G_i-Protein) aktiviert, welches die Cyclaseaktivität der membranständigen AC inhibiert und somit zu einer Reduzierung der cAMP-Synthese führt (Abb. 1.2 B). Die Wirkungen von 5-HT₁-Rezeptoren sind somit auf zellulärer Ebene denen der 5-HT₇-Rezeptoren entgegengerichtet (BLENAU & BAUMANN 2001).

Die Interaktion von 5-HT mit einem 5-HT₂-Rezeptor führt zur Aktivierung eines G_{q/o}-Proteins (Abb. 1.2 C). Die aktivierte G_{αq/o}-Untereinheit bindet an die Phospholipase C (PLC), welche Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat (PIP₂) zu Diacylglycerin (DAG) und Inositol-1,4,5-trisphosphat (IP₃) hydrolysiert. IP₃ führt zur Öffnung spezifischer Kanäle in der Membran des endoplasmatischen Retikulums, welche Ca²⁺ in das Cytosol entlassen. Der Anstieg der intrazellulären Ca²⁺-Konzentration bewirkt die Regulation einer Vielzahl Ca²⁺-bindender Proteine. Gemeinsam mit DAG führt Ca²⁺ zudem zur vollständigen enzymatischen Aktivität der Proteinkinase C (PKC), welche vergleichbar mit der PKA die Funktion vieler Effektorproteine moduliert (BLENAU & BAUMANN 2001).

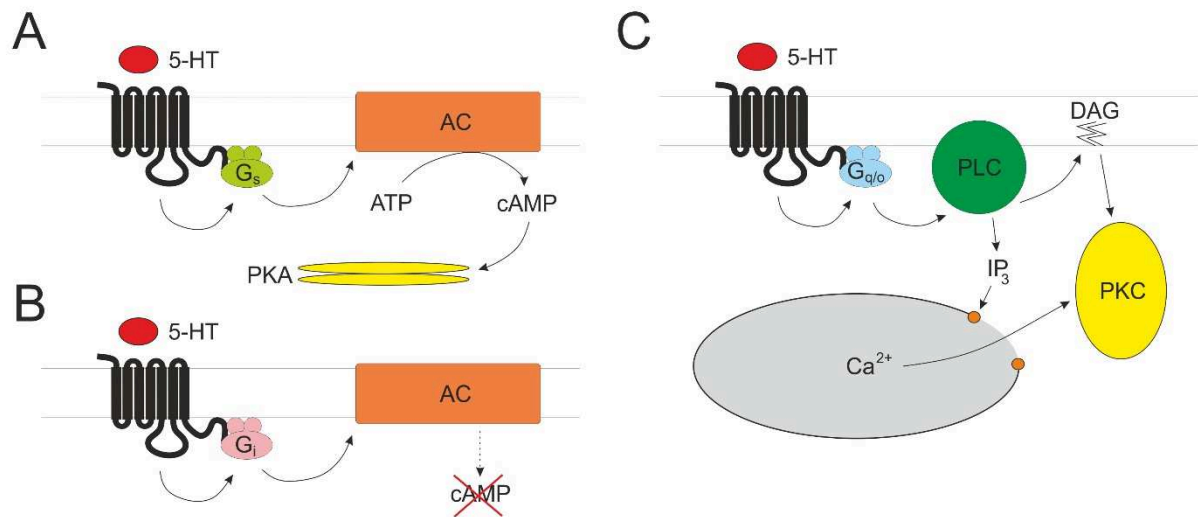


Abb. 1.2: Signalwege G-Protein gekoppelter 5-HT-Rezeptoren (verändert nach BLENAU & BAUMANN 2001). **A:** Die Bindung von 5-HT bewirkt die Aktivierung eines heterotrimeren G-Proteins (G_s). Dies stimuliert die membrangebundene Adenylylzyklase (AC) zur Umsetzung von ATP zu cAMP. Der Anstieg der intrazellulären cAMP-Konzentration führt zur Aktivierung der cAMP-abhängigen Proteinkinase A (PKA). **B:** Die Bindung von 5-HT führt zur Aktivierung des G_i-Proteins, welches die AC inhibiert. **C:** Die rezeptorvermittelte Aktivierung eines G_{q/o}-Proteins führt zur Aktivierung der Phospholipase C (PLC), welche PIP₂ zu DAG und IP₃ hydrolysiert. IP₃ bindet an intrazelluläre Rezeptoren, welche die Freisetzung von Ca²⁺ ermöglichen. Dies resultiert in der Stimulierung der Proteinkinase C (PKC).

Bei der Honigbiene *A. mellifera* wurden vier 5-HT-Rezeptor-Subtypen identifiziert und charakterisiert: Am5-HT_{1A} (THAMM et al. 2010), Am5-HT_{2α} und Am5-HT_{2β} (THAMM et al. 2013), sowie Am5-HT₇ (SCHLENSTEDT et al. 2006) (Tab. 1.1). Die Expression des Am5-HT_{1A}-Rezeptors wurde sowohl anhand von Reverse-Transkriptase (RT)-PCR-Experimenten auf Ebene der mRNA (SCHLENSTEDT 2005), als auch mittels eines spezifischen Antikörpers auf Proteinebene (THAMM et al. 2010) untersucht. Die *Am5-ht1A*-mRNA wurde im Zentralgehirn, den optischen Loben, der Flugmuskulatur und den Malpighischen Gefäßen nachgewiesen (SCHLENSTEDT 2005). Das Am5-HT_{1A}-Rezeptorprotein fand sich vor allem im zentralen Nervensystem (Gehirn und Bauchmark), wo es insbesondere in Strukturen zur Transduktion visueller Informationen (Ocellartrakt, Lamina) auftrat (THAMM et al. 2010). Die Expression der *Am5-ht7*-mRNA wurde mittels RT-PCR- und *in-situ*-Hybridisierungs-Experimenten sowohl im Gehirn (optische Loben, Kenyon-Zellen der Pilzkörper, Deuterocerebrum), als auch peripheren Geweben (Flugmuskulatur, Malpighische Gefäße) festgestellt (SCHLENSTEDT et al. 2006). Die Expression der *Am5-ht2a*-mRNA wurde ebenfalls mittels RT-PCR- und

in-situ-Hybridisierungs-Experimenten im zentralen Nervensystem, sowie Flugmuskulatur und Malpighischen Gefäßen festgestellt (SCHLENSTEDT 2005).

Tab. 1.1: Serotoninrezeptoren bei *A. mellifera*

Rezeptor	Signalantwort auf Ebene der sekundären Botenstoffe (<i>second messenger</i>)	Referenz
Am5-HT _{1A}	Reduzierung der cAMP-Synthese	THAMM et al. 2010
Am5-HT _{2α}	Steigerung der intrazellulären Ca ²⁺ -Konzentration	THAMM et al. 2013
Am5-HT _{2β}	Steigerung der intrazellulären Ca ²⁺ -Konzentration	THAMM et al. 2013
Am5-HT ₇	Steigerung der cAMP-Synthese	SCHLENSTEDT et al. 2006

Für die Rezeptorgene *Am5-ht2a* und *Am5-ht2β* konnte alternatives Spleißen nachgewiesen werden (THAMM 2009, THAMM et al. 2013). Hierbei entstehen jeweils verkürzte mRNAs, welche als *Am5-ht2aΔIII* und *Am5-ht2βΔII* bezeichnet werden und durch das Weglassen jeweils eines Exons entstehen (Abb. 1.3). Spleißen stellt eine Form der posttranskriptionalen Modifikation dar, bei welcher einer prä-mRNA nichtcodierende Intronabschnitte entfernt und codierende Exonabschnitte zusammengefügt werden. Werden bei diesem Prozess Exons verschieden kombiniert oder weggelassen, bzw. Introns beibehalten, wird dies als alternatives Spleißen bezeichnet (SMITH et al. 1989). Dieser Mechanismus trägt entscheidend zur Proteindiversität innerhalb eines Organismus bei. Alternatives Spleißen ist ein häufiger und ubiquitärer Prozess. So werden etwa 40% der Gene der Taufliege *Drosophila melanogaster* (Diptera: Drosophilidae) (STOLC et al. 2004) und 92 – 94% der Gene des Menschen (WANG et al. 2008) alternativ gespleißt. Bei Genen, welche für GPCRs codieren, tritt alternatives Spleißen ebenfalls häufig auf (MARKOVIC & CHALLISS 2009) und wurde bereits für einige 5-HT-Rezeptorgene aus verschiedenen Organismen beschrieben (GUEST et al. 2000, HANNON & HOYER 2008). Obwohl die verkürzten, durch alternatives Spleißen entstandenen *Am5-ht2aΔIII* und *Am5-ht2βΔII* mRNAs nicht für funktionelle Rezeptorproteine codieren (THAMM 2009), kann dennoch eine physiologische Relevanz nicht ausgeschlossen werden. So wurde für einen Dopaminrezeptor (DOP-3) des Nematoden *Caenorhabditis elegans* (Rhabditida: Rhabditidae) eine Interaktion mit dessen verkürzter Spleißvariante festgestellt, welche zu einer Modulierung der Bindungseigenschaften des Rezeptors führt (SUGIURA et al. 2005).

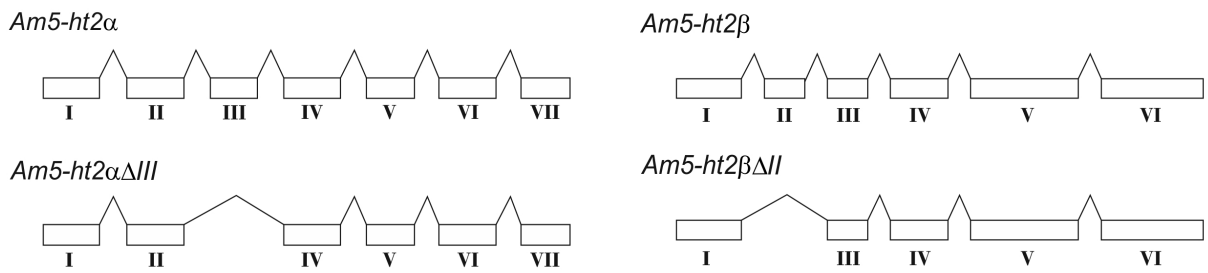


Abb. 1.3: Schematische Darstellung der genomischen Organisation der *Am5-ht2a* und *Am5-ht2β* Rezeptorgene (verändert nach THAMM et al. 2013). Dargestellt sind sowohl die für die vollständigen Rezeptoren codierenden mRNAs (oben), als auch die durch alternatives Spleißen entstehenden verkürzten Varianten (unten). Darstellung der Exons als Boxen und Introns als gewinkelte Linien. Römische Ziffern nummerieren die jeweiligen Exons.

Der Einfluss von 5-HT auf die Physiologie und das Verhalten von Insekten ist außerordentlich vielfältig. Zu den beschriebenen Effekten gehören ontogenetische Prozesse (COLAS et al. 1999), sekretorische Prozesse (WALZ et al. 2006), Herzrate (ZORNIK et al. 1999), Aggression (DIERICK & GREENSPAN 2007), Gregarisierung bei Wanderheuschrecken (ANSTEY et al. 2006), circadiane Rhythmik (YUAN et al. 2005) sowie Lernen und Gedächtnis (SITAMARAN et al. 2008). So führt die Injektion von 5-HT in das Gehirn von *A. mellifera* beispielsweise zur Beeinträchtigung des Erwerbs und Abrufens erlernter Verhaltensweisen (BICKER & MENZEL 1989; MENZEL et al. 1999). Außerdem moduliert 5-HT die Verarbeitung visueller Informationen und reduziert phototaktisches Verhalten (THAMM et al. 2010).

Der 5-HT-Gehalt im Gehirn von *A. mellifera* steigt beim Übergang vom Larven- zum Puppenstadium (TAYLOR et al. 1992). In den Gehirnen von *A. mellifera*-Imagines steigt der 5-HT-Gehalt mit zunehmendem Alter und ist abhängig von der verrichteten Tätigkeit im Volk (TAYLOR et al. 1992, WAGENER-HULME et al. 1999). Er ist altersunabhängig in Antennalloben von Sammlerinnen höher als in Antennalloben von Ammenbienen. Pilzkörpergewebe weist aufgabenunabhängig mit zunehmendem Alter einen steigenden 5-HT-Gehalt auf (SCHULZ & ROBINSON 1999). Stress, etwa das mechanische Fixieren der Beine von Honigbienen, führt zu einer raschen Erhöhung des 5-HT-Gehaltes im Gehirn binnen weniger Minuten (HARRIS & WOODRING 1992). Im Jahresverlauf sind die höchsten 5-HT-Konzentrationen im Gehirn zwischen Juni und September (Nordhalbkugel) zu verzeichnen (HARRIS & WOODRING 1992).

1.3 Circadiane Rhythmik bei Insekten

Die Rotation der Erde um die eigene Achse erzeugt täglich wiederkehrende und damit vorhersagbare Periodizitäten der geophysikalischen Umwelt. Die Adaptation von Organismen an diese zeitlichen Strukturen führte zur Evolution endogener biologischer Rhythmen. Im Zusammenhang mit täglich wiederkehrenden Umweltveränderungen sind speziell circadiane Rhythmen mit einer Periodenlänge von ca. 24 Stunden von besonderer Bedeutung. Circadiane Rhythmen sind endogene zelluläre Mechanismen, welche einem Organismus die Antizipation täglicher Umweltveränderungen erlauben und ihm so eine Anpassung seiner Physiologie und seines Verhaltens an die spezielle tageszeitliche Situation ermöglichen (PANDA et al. 2002, SHARMA 2003). Diese „inneren Uhren“ werden täglich anhand von externen Stimuli, sogenannten Zeitgebern, mit den real vorherrschenden Umgebungsbedingungen synchronisiert (ASCHOFF 1954). Dieser Prozess wird als *entrainment* bezeichnet. Als Hauptzeitgeber treten Licht und Temperatur auf, jedoch auch Nahrungsverfügbarkeit und interindividuelle Interaktionen vermögen die Synchronisation circadianer Uhren (FRISCH & ASCHOFF 1987, MOORE & RANKIN 1993, KNADLER & PAGE 2009). Diese Signale werden durch bestimmte Eingangssignalwege an die zentralen Schrittmacher des circadianen Systems übermittelt. Als zentrale Schrittmacher werden distinkte, im zentralen Nervensystem lokalisierte Netzwerke von Neuronen angesehen (*clock neurons*). Insekten besitzen bilateral organisierte Schrittmacher in den optischen Loben, welche in kleinräumigen Bereichen zwischen der Medulla und der Lobula lokalisiert sind (HELFRICH-FÖRSTER et al. 1998, HELFRICH-FÖRSTER 2004). Innerhalb dieser Schrittmacherzellen laufen prinzipiell zwei miteinander verzahnte molekulare Rückkopplungsschleifen ab. In der Hauptschleife inhibieren bestimmte Proteine (*clock proteins*) die Transkription ihrer eigenen Gene (*clock genes*) nach einer gewissen Zeitspanne, indem sie deren Transkriptionsaktivatoren blockieren. Eine zweite Rückkopplungsschleife führt zur erneuten Auslösung der Hauptschleife durch die Wiederaktivierung dieser Transkriptionsaktivatoren (ALLADA 2003). Dies führt zu rhythmischer Genexpression und Proteinakkumulation, welches sich letztlich in physiologischen und Verhaltensrhythmen niederschlagen kann. Neben zentralisierten Schrittmachern existieren multiple Oszillatoren auch in peripheren Geweben, welche durch komplexe Signalkaskaden auf molekularer Ebene miteinander interagieren (BELL-PEDERSEN et al. 2005).

Die Honigbiene *A. mellifera* nutzt die innere circadiane Uhr unter Anderem zur Erlangung eines Zeitgedächtnisses zur Koordination von Sammelflügen (MOORE 2001, BLOCH 2009) und

zur Korrektur des Schwänzeltanzes zur Übermittlung von Informationen über Nahrungsquellen, etwa nach längerem Aufenthalt im Stock (VON FRISCH 1967).

Im Gegensatz zu den meisten anderen Insekten zeigen Honigbienen eine außerordentliche Plastizität ihrer circadianen Rhythmik (EBAN-ROTHSCHILD & BLOCH 2012). Stockbienen, wie beispielsweise Ammenbienen, zeigen sich hinsichtlich lokomotorischer Aktivität und Metabolismus arrhythmisch und schlafen in kurzen, unregelmäßigen Intervallen. Dies gewährleistet die ununterbrochene Versorgung der Brut rund um die Uhr. Demgegenüber entwickeln Sammlerinnen starke circadiane Rhythmen mit diurnaler Aktivität (SPANGLER 1972, MOORE 2001, MOORE et al. 1998, EBAN-ROTHSCHILD & BLOCH 2008, KLEIN et al. 2008, BLOCH et al. 2013a). Diese ontogenetischen Prozesse sind nicht starr im Sinne einer Unumkehrbarkeit. Sammlerinnen sind in der Lage, bei besonderem Bedarf des Volkes zu Ammenbienen zu revertieren (ROBINSON 1989, ROBINSON 1992), was zugleich zu einer erneuten Arrhythmik von Verhalten und Metabolismus führt (BLOCH & ROBINSON 2001). Die Arrhythmik junger Stockbienen wie beispielsweise Ammenbienen basiert jedoch nicht auf einem unterentwickelten circadianen System, denn bereits wenige Tage alte Bienen vermögen unter experimentellen Bedingungen vorzeitig circadiane Rhythmen auszubilden (SHEMESH et al. 2007, SHEMESH et al. 2010). Entscheidend für die Unterdrückung der Rhythmik bei Ammenbienen unter natürlichen Bedingungen scheint das Vorhandensein volatiler Pheromone und anderer, noch nicht hinreichend identifizierter Faktoren der Mikroumwelt innerhalb des Stocks zu sein (EBAN-ROTHSCHILD et al. 2012).

Die Synchronisation (*entrainment*) der Rhythmik geschieht durch verschiedenartige Faktoren. Wie bei den meisten Organismen sind auch bei *A. mellifera* Licht und Temperatur wichtige Zeitgeber (MOORE & RANKIN 1993). Darüber hinaus spielt bei Honigbienen als eusozialen Insekten die Umgebung innerhalb des Volkes eine große Rolle für das *entrainment*. Hierbei nehmen vor allem Sammlerinnen eine Schlüsselrolle ein. Auf ihren Flügen außerhalb des Stocks sind sie externen Faktoren wie Licht ausgesetzt und bedingen nach ihrer Rückkehr die indirekte Synchronisation bestimmter circadianer Rhythmen der Stockbienen nach diesen externen Zeitgebern (BLOCH et al. 2013c).

Die Plastizität circadianer Rhythmik ist verbunden mit Unterschieden in der Genexpression (RODRIGUEZ-ZAS et al. 2012, BLOCH 2010). Die tageszeitliche Expression sogenannter *clock*-Gene wie *Period* (*per*), *Cryptochrome* (*cry-m*), *Timeout* (*tim2*) oder *Cycle* (*cyc*) bleibt im Gehirn von Ammenbienen konstant, während es bei Sammlerinnen zu deutlichen Oszillationen der jeweiligen mRNA im Tagesverlauf kommt (TOMA et al. 2000, BLOCH et al. 2001,

BLOCH et al. 2004, BLOCH & MESHI 2007, SHEMSH et al. 2007). RODRIGUEZ-ZAS et al. (2012) identifizierten im Gehirn von Sammlerinnen anhand von Microarray-Studien 541 Gene, deren mRNA-Expression circadian reguliert wird. Jedoch zeigten auch Ammenbienen circadiane Regulation der Expression von 160 Genen, obwohl diese Tiere keinen circadianen Aktivitätsrhythmus ausbilden (RODRIGUEZ-ZAS et al. 2012).

Sowohl bei Vertebraten (CIARLEGLIO et al. 2011, MISTLBERGER et al. 2000) als auch Invertebraten (BLOCH et al. 2013b) finden Interaktionen zwischen dem circadianen und dem serotonergen System statt. Spezifische Schrittmacherneurone im Gehirn der Taufliege *D. melanogaster* sind serotonerg innerviert (HAMASAKA & NÄSSEL 2006) und weisen die Expression des Dm5-HT_{1B}-Rezeptors auf (YUAN et al. 2005). Der Titer des biogenen Amins 5-HT selbst zeigt einen circadianen Rhythmus bei einer Vielzahl von Insekten. Der 5-HT-Titer oszilliert im Gehirn des Eulenfalters *Trichoplusia ni* (Lepidoptera: Noctuidae) (LINN et al. 1994, LINN et al. 1995), in den Antennalloben des Tabakswärmers *Manduca sexta* (Lepidoptera: Sphingidae) (KLOPPENBUERG et al. 1999) und in Gehirn und Hämolymphe der Grille *Acheta domesticus* (Insecta: Gryllidae) (MUSZYNSKA-PYTEL & CYMBOROWSKI 1978). FOWLER et al. (1972) berichten von tageszeitlichen Änderung des 5-HT-Levels in Larven, Puppen und Imagines von *D. melanogaster*, wohingegen YUAN et al. (2005) keine circadiane Änderung im Gehirn von adulten Fliegen beobachteten. Bei *D. melanogaster* zeigt darüber hinaus die mRNA-Expression der *Dm5-ht1A*- und *Dm5-ht2*-Rezeptorgene circadiane Veränderungen (CLARIDGE-CHANG et al. 2001), während der Dm5-HT_{1B}-Rezeptor sowohl auf mRNA- als auch Proteinebene keine solche Oszillation zeigt (YUAN et al. 2005). In den zu den optischen Loben bei Insekten homologen Strukturen im Gehirn des Flusskrebse *Procambarus clarkii* (Astacoidea: Cambaridae) konnten tageszeitliche Änderungen des Pc5-HT_{1A}-Rezeptortiters gemessen werden (CALDERÓN-ROSETE et al. 2006).

Die Funktionen von 5-HT im circadianen System bei Insekten sind nur ansatzweise untersucht (BLOCH et al. 2013b). Die Applikation von 5-HT bewirkt eine Reduzierung der intrazellulären Ca²⁺-Konzentration in Schrittmacherneuronen im Gehirn von *D. melanogaster* (HAMASAKA & NÄSSEL 2006). Schlaf kann durch 5-HT reguliert werden (YUAN et al. 2006, NALL & SEHGAL 2014). Im Allgemeinen wird die Beteiligung von 5-HT bei Signalwegen angenommen, welche dem *entrainment* der circadianen Uhr durch externe Zeitgeber zugrunde liegen. So führt 5-HT-Gabe zu einer Phasenverschiebung des lokomotorischen Aktivitätsrhythmus bei der Schabe *Leucophaea maderae* (Blattaria: Blaberidae) (PAGE 1987) und der Schmeißfliege *Calliphora vicina* (Diptera: Calliphoridae) (CYMBOROWSKI 2003). Bei Larven

von *D. melanogaster* führt die Applikation eines 5-HT₂-Rezeptor-Agonisten zum Verlust von antizipatorischem Verhalten, welches normalerweise vor Licht-Dunkel-Wechseln gezeigt wird und ein typisches Zeichen von *entrainment* der circadianen Uhr darstellt (NICHOLS 2007). Es wurde die Beteiligung von 5-HT₇-Rezeptoren bei der Kopplung der beiden Schrittmacherzentren in den optischen Loben bei *Gryllus bimaculatus* (Ensifera: Gryllidae) nachgewiesen (SAIFULLAH & TOMIOKA 2002, SAIFULLAH & TOMIOKA 2003). YUAN et al. (2005) konnten zeigen, dass die Bindung von 5-HT an den Dm5-HT_{1B}-Rezeptor zu einer Aktivierung der Kinase *Shaggy* (Sgg) führt, welche bestimmte *clock*-Proteine in Schrittmacherzellen posttranslational modifiziert und somit *entrainment*-Prozesse reguliert.

1.4 Zielstellung der Arbeit

Serotonin agiert als wichtiger chemischer Botenstoff bei der Honigbiene *Apis mellifera*. In der Vergangenheit wurden vier Serotonin-Rezeptor-Subtypen der Honigbiene molekular und pharmakologisch charakterisiert: Am5-HT₇ (SCHLENSTEDT et al. 2006), Am5-HT_{1A} (THAMM et al. 2010), sowie Am5-HT_{2α} und Am5-HT_{2β} (THAMM et al. 2013). Für ein umfassendes Verständnis des serotonergen Systems von *A. mellifera* erscheint eine detaillierte Kenntnis über die räumlichen und zeitlichen Expressionsmuster dieser Rezeptoren unerlässlich.

Zunächst erfolgte die Untersuchung der gewebespezifischen mRNA-Expression der Gene der Rezeptor-Subtypen. Neben dem zentralen Nervensystem wurden ebenso periphere Gewebe betrachtet. Dabei lag ein Augenmerk vor allem auf exokrinen Drüsen und Teilen des Gastrointestinal- und Exkretionssystems, da hier von möglichen Funktionen des Serotonins ausgegangen werden konnte. In besonderem Maße wurde das Verhältnis der Expression beider alternativer Spleißvarianten der jeweiligen *Am5-ht2*-Gene untersucht. Dies diente der Beantwortung der Frage, ob die verkürzten Spleißvarianten überhaupt im gesamten Organismus exprimiert werden. Der Einsatz eines spezifischen Antikörpers gegen Am5-HT₁ ermöglichte zusätzlich einen Vergleich der Expression dieses Rezeptor-Subtyps auf Proteinebene mit den gewonnenen mRNA-Daten. Entsprechend wurde der Versuch unternommen, einen polyklonalen Antikörper gegen das Am5-HT_{2β}-Rezeptorprotein und dessen verkürzte Spleißvariante Am5-HT_{2β}ΔII herzustellen.

Arbeiterinnen der Honigbiene zeigen eine im Wesentlichen altersabhängige Arbeitsteilung, welche einhergeht mit einem signifikanten Anstieg des Serotonin-Titers im Gehirn (TAYLOR et al. 1992, WAGENER-HULME et al. 1999). Es wurde die Hypothese untersucht, dass sich die

Expression von Serotoninrezeptoren in gleichem Maße altersabhängig und somit aufgabenspezifisch verändert. Hierzu wurden altersabhängige Expressionsmuster im Gehirn von jungen (Ammen-)Bienen und älteren (Sammler-)Bienen untersucht.

Nicht nur die räumliche Nähe von serotonergen Neuronen und Schrittmacherstrukturen der circadianen Uhr lässt die Frage nach einer funktionellen Verbindung beider Systeme aufkommen. Vor allem verschiedene Arbeiten an der Fliege *D. melanogaster* legen eine circadiane Steuerung der Expression einiger, aber nicht aller Serotonin-Rezeptor-Subtypen nahe (CLARIDGE-CHANG et al. 2001, YUAN et al. 2005). Aus diesem Grunde fand die Untersuchung der tageszeitlichen Expression der Serotonin-Rezeptor-Subtypen und des Serotonin-Titers im Gehirn der Honigbiene statt. Um die Frage zu beantworten, ob eine regulative Rezeptorgen-Expression durch exogene Stimuli oder endogen als echter circadianer Rhythmus stattfindet, wurden Versuchstiere sowohl unter Freilandbedingungen, als auch unter konstanten Laborbedingungen untersucht. Von besonderem Interesse waren die Expressionsmuster in den optischen Loben, da dort die zentralen Schrittmacher der circadianen Uhr lokalisiert sind. Die Beantwortung dieser Fragen war auch aus einem funktionellen Aspekt von Interesse, da *A. mellifera*-Arbeiterinnen einer Ontogenese des circadianen Systems unterliegen und als Stockbienen arrhythmisch sind (BLOCH et al. 2013a). Der Einfluss von Serotonin auf die altersabhängige Ausbildung des circadianen, lokomotorischen Aktivitätsrhythmus wurde pharmakologisch anhand von Verhaltensexperimenten untersucht.

2 Material und Methoden

2.1 Chemikalien

Alle verwendeten Chemikalien wurden, sofern im Text nicht anders vermerkt, von den Firmen Merck KGaA (Darmstadt), Carl Roth GmbH & Co. KG (Karlsruhe), Serva Electrophoresis GmbH (Heidelberg) und Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Taufkirchen) 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 (HP Medizintechnik GmbH, Oberschleißheim) sterilisiert. Sofern nicht anders vermerkt, wurden die Lösungen mit sterilem, zweifach destilliertem Wasser (ddH₂O) angesetzt. Zur Verdünnung bzw. zum Auffüllen von Proben wurde DEPC-Wasser verwendet. Zur Herstellung von DEPC-Wasser wurde ddH₂O 0,1% Diethylpyrocarbonat (DEPC) zugesetzt, über Nacht auf einem Magnetrührer vermischt und anschließend autoklaviert.

2.2 Versuchstiere

Als Versuchstier wurde die Westliche Honigbiene *Apis mellifera* LINNAEUS, 1758 (Hymenoptera: Apidae) verwendet. Es kam die Unterart *A. m. carnica* POLLMANN, 1879 zum Einsatz. Die Untersuchung des Gehalts an Serotonin im Gehirn wurde an *A. m. ligustica* SPINOLA, 1806 durchgeführt. Die Haltung erfolgte in Völkern mit typischer Altersstruktur in handelsüblichen Magazinbeuten. Die Völker befanden sich an vier verschiedenen Standorten, von denen Bienen für unterschiedliche Experimente entnommen wurden: auf dem Gelände der Universität Potsdam (Campus Golm), dem Institut für Bienenkunde Oberursel (Goethe-Universität Frankfurt am Main), der Julius-Maximilians-Universität Würzburg (Campus Hubland) und der Macquarie University Sydney (Australien).

Einige Experimente erforderten eine genaue Feststellung des Alters der Versuchstiere. Hierfür wurde vorab einem Volk eine Brutwabe mit verdeckelter Arbeiterinnen-Brut kurz vor dem Schlupf entnommen und in einem Inkubator bei 32-34°C und 60% Luftfeuchtigkeit

platziert. Die frischgeschlüpften Bienen wurden mit einem farbigen Punkt auf dem Mesosoma markiert. Hierfür wurden Permanentmarker (edding 750, edding AG) verwendet. Anschließend erfolgte das Zurücksetzen der Tiere in die Ursprungsvölker. Stockbienen wurden nach Öffnen der Beute direkt von den Waben in Gläschen geeigneter Größe abgesammelt. Arbeiterinnen, welche den Kopf in offene Brutzellen steckten und bei späterer Präparation ausgeprägte Futtersaftdrüsen (Hypopharynxdrüsen) aufwiesen, wurden als Ammenbienen identifiziert (DESEYN & BILLEN 2005). Sammlerinnen wurden am Stockeingang abgefangen. Um eine Verwechslung mit ausfliegenden Jungbienen (Orientierungsflüge, Defäkationsflüge, etc.) zu vermeiden, wurden ausschließlich zurückkehrende Pollensammlerinnen abgefangen, welche durch pollenbeladene Corbiculae gekennzeichnet waren. Für einige Experimente war die Entnahme von Bienen aus dem Volk zwischen Sonnenunter- und Sonnenaufgang erforderlich. Dies erfolgte stets unter Zuhilfenahme einer Rotlichtlampe.

Alle abgesammelten Versuchstiere wurden, sofern für Präparationszwecke vorgesehen, schnellstmöglich auf Eis (bzw. flüssigem Stickstoff, siehe 2.6) abgekühlt.

2.2.1 Haltung von Honigbienen unter kontrollierten Bedingungen

Die Untersuchung endogener Rhythmik bei Honigbienen erforderte die Haltung der Versuchstiere unter konstanten Bedingungen. Hierfür wurden Tiere definierten Alters bzw. direkt nach Schlupf aus der Wabe einzeln in Glasröhrchen (Länge: 100 mm, Durchmesser: 16 mm, Pyrex-Glas) transferiert und in Klimaschränken (Sanyo MIR-553, Sanyo Denki K.K., Moriguchi, Japan und Percival I-66L4V, Percival Scientific, Perry, USA) gehalten. Die Haltung in Glasröhrchen war Teil eines Messsystems für lokomotorische Aktivität (TriKinetics Inc., Waltham, USA), welches an anderer Stelle detailliert beschrieben wird (siehe 2.7.2). Die separierten Versuchstiere hatten olfaktorisch Kontakt zu einer bienenbesetzten Wabe, jedoch ohne taktil mit anderen Bienen interagieren zu können (Abb. 2.2).

Sofern Bienen zum Zweck der Gehirnpräparation unter kontrollierten Bedingungen gehalten wurden, wurden dem Volk 12 d (Tage) alte Tiere entnommen und zunächst für 2 d im Klimaschrank bei einem mittels 72 LED-Dioden (Dioder, IKEA Deutschland GmbH & Co. KG, München, Lichtintensität: 400 Lux, Lichttemperatur: 2.700 Kelvin) erzeugten Lichtregime (L:D) von 12:12 mit Licht an um 07:00 Uhr und einem spezifischen Temperatur- und Luftfeuchteregime gehalten (Tab. A.1). Dies diente der Habituation der Tiere und erwies sich

in Vorexperimenten als sinnvoll (Katharina BEER, unveröffentlicht, Universität Würzburg). Anschließend erfolgte die Haltung der Bienen in Dauerdunkel (DD) bei 32°C und 60% relativer Luftfeuchtigkeit für 6 d bis zur Gehirnpräparation. Die Fütterung erfolgte *ad libitum* mit einer wässrigen Pollen-Zucker-Lösung (1 Massenteil getrockneter und zerstoßener Pollen {Gemisch verschiedener Pflanzen} in 3,5 Massenteilen ApiInvert {Südzucker AG, Mannheim}).

Versuchstiere für verhaltenspharmakologische Experimente wurden direkt nach dem Schlupf aus der Wabe in DD bei 32°C und 60% relativer Luftfeuchtigkeit gehalten und speziell gefüttert (siehe 2.7.1).

2.3 Gewebepräparation

Vor der Gewebepräparation erfolgte grundsätzlich ein Herunterkühlen der Versuchstiere auf Eis. Während der Präparation wurde eiskalte Ringerlösung verwendet. Zur Präparation von in der Kopfkapsel befindlichen Geweben (Gehirn, Futtersaftdrüsen, Kopfspeicheldrüsen) wurde diese separiert und mithilfe eines Skalpells nach dem Entfernen der Antennen geöffnet. Der Schnitt erfolgte oberhalb der Antennenbasis und entlang der Komplexaugen. Die Präparation von thorakal bzw. abdominal gelegenen Geweben (Bauchmark, Darm, Malpighische Gefäße, Flugmuskulatur, Thoraxspeicheldrüsen) erfolgte nach Fixierung des Körpers in Bauchlage nach Ablösen und Abheben der Tergite mittels Skalpell und Pinzetten. Alle präparierten Gewebe wurden in Blockschälchen mit eiskaltem Ringer überführt. Hier erfolgte gegebenenfalls die Säuberung (Entfernen von Tracheenresten, Beseitigung von Darminhalt) und, sofern für einzelne Experimente notwendig, das Separieren von einzelnen Organteilen (z.B. Trennung von optischen Loben und Restgehirn). Anschließend wurden die Gewebe in Reaktionsgefäße transferiert und unverzüglich in flüssigen Stickstoff überführt. Die Lagerung erfolgte bei -80°C bis zur weiteren Verwendung.

Ringer: 270 mM NaCl; 3,2 mM KCl; 10 mM MgCl₂; 1,2 mM CaCl₂;
10 mM 3-(N-Morpholino)Propansulfonsäure; pH 7,3

2.4 Molekularbiologische Methoden

2.4.1 RNA-Extraktion

Tiefgefrorenes Gewebe wurde in dem Reaktionsgefäß manuell mithilfe eines Pistills homogenisiert. Die RNA-Extraktion erfolgte unter Verwendung des RNeasy-Kits (Qiagen, Hilden) gemäß den Angaben des Herstellers. Anschließend wurde die RNA zur Aufkonzentrierung unter Zugabe von 3 M LiCl und Ethanol (ca. 95%) 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 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. Durch die Verhältnisbildung von OD_{260 nm} zu OD_{280 nm} konnte der Grad der Kontamination mit Proteinen bewertet und ausgeschlossen werden.

2.4.3 Synthese komplementärer DNA (cDNA)

Die Synthese der komplementären DNA (*complementary DNA*, cDNA) erfolgte mithilfe des SuperScript™III First-Strand Synthesis SuperMix für qRT-PCR Kits (Life Technologies GmbH, Darmstadt). Die cDNA-Synthese 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 übrige 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 (PCR)

Mittels Polymerase-Kettenreaktion (*polymerase chain reaction*, PCR) wurden definierte DNA-Abschnitte vervielfältigt. Die Amplifikation eines definierten DNA-Abschnitts erfolgte über die Bindung zweier sequenzspezifischer Primer, gelöst in TE-Puffer, und der Verlängerung dieser durch eine DNA-Polymerase. Diese Methode wurde für die Herstellung der Standards in der quantitativen Echtzeit-PCR (qPCR), sowie für die Herstellung von Fusionsproteinen als Antigene für die Synthese von Antikörpern gegen den Am5-HT_{2β}-Rezeptor verwendet. Hierfür wurden entweder die Taq DNA-Polymerase (Roboklon GmbH, Berlin) oder die Phusion® *High Fidelity* DNA Polymerase (New England Biolabs, Frankfurt am Main) in dem spezifischen Reaktionsgemisch verwendet (Tab. 2.1).

Tab. 2.1: PCR-Reaktionsgemische

	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
<i>forward</i> Primer (20 µM)	0,5-1 µl	2,5 µl
<i>reverse</i> Primer (20 µM)	0,5-1 µl	2,5 µl
DNA-Polymerase	0,5-1 µl	0,5 µl
DEPC-Wasser	<i>ad</i> 50 µl	<i>ad</i> 50 µl

Die Sequenzen der verwendeten Primer sind im Anhang aufgelistet (Tab. A.2 und Tab. A.3). Als Matrize diente entweder cDNA oder ein die Rezeptor-cDNA tragendes Plasmid. Alle PCR-Reaktionen wurden in einem T3 Thermocycler (Biometra GmbH, Göttingen) unter den in Tab. 2.2 dargestellten Bedingungen durchgeführt.

Tab. 2.2: PCR-Temperaturprogramme

	Taq	Phusion®
Denaturierung	94°C, 150 s	98°C, 30 s
Denaturierung	94°C, 40 s	98°C, 10 s
Hybridisierung	65-66,5°C, 40 s	63-67°C, 40 s
Elongation	72°C, 60-90 s	72°C, 25 s
Finale Elongation	72°C, 600 s	72°C, 600 s

TE-Puffer: 10 mM Tris; 1 mM EDTA; pH 7,5

2.4.5 Quantitative Echtzeit-PCR (qPCR)

Die Analyse der Expression verschiedener Gene wurde mithilfe der quantitativen Echtzeit-PCR (qPCR) durchgeführt. Hierbei diente aus Gewebe gewonnene RNA, welche in cDNA transkribiert wurde, als Templat. Neben den für eine PCR obligatorischen sequenzspezifischen Primern wurden ebenfalls sequenzspezifische Hydrolyse-Sonden (TaqMan-Sonden) eingesetzt, welche am 3'-Ende einen BlackBerry Quencher (BBQ) und am 5'-Ende einen Reporter-Fluoreszenzfarbstoff (Cy5, Cy5.5, YAK oder 6-FAM) aufwiesen (TaqMan-Technologie, basierend auf der 5'-3'-Exonukleaseaktivität der DNA-Polymerase {HOLLAND et al. 1991}). Bei intakten Sonden verhindert die Nähe des Quenchers zum Fluoreszenzfarbstoff die Emission von Fluoreszenzlicht bei Anregung mit Licht einer bestimmten Wellenlänge. Während der Extension des Amplifikats in der PCR-Reaktion werden die Sonden hydrolysiert und setzen den Fluoreszenzfarbstoff frei. Nach jedem PCR-Zyklus wird ein Fluoreszenzsignal detektiert. Dieses ist direkt proportional zur amplifizierten Menge des PCR-Produkts und erlaubt die Berechnung der Menge des ursprünglich im Reaktionsgefäß befindlichen Templats. Je größer die Menge an eingesetzter cDNA, desto früher erhält man einen signifikanten Anstieg des Fluoreszenzsignals. Dies erlaubt die Quantifizierung der mRNA-Ausgangsmenge des analysierten Gens. Der Einsatz der TaqMan-Technologie ermöglichte zudem die Messung mehrerer Gene in ein und demselben Reaktionsansatz (hier: Rezeptorgen und Referenzgen, siehe unten).

Die Sequenzen der verwendeten Primer und Hydrolyse-Sonden, sowie die Ampliconlängen der verschiedenen Gene sind im Anhang gelistet (Tab. A.4). Für die Differenzierung der

alternativen Spleißvarianten der *Am5-ht2a*- und *Am5-ht2β*-mRNA kamen Primer zum Einsatz, welche Exon-Exon-Grenzen umspannten (Abb. A.1).

Die Messung jeder Probe erfolgte als Triplikat (technisches Replikat). Hierfür wurden 0,2 μM je Primer, 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 Temperaturprogrammes: 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 Primer und Hydrolyse-Sonden.

Für die weitere Berechnung wurde in jedem Lauf ein Schwellenwert 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 zu analysierenden Proben wurde in jedem qPCR-Lauf eine Reihe von Standardkonzentrationen des jeweils zu analysierenden 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 zu analysierenden 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 der PCR-Produkte der Zielgene (hier: Serotoninrezeptor-Gene und deren Spleißvarianten) erfolgte relativ in Bezug auf ein Referenzgen. Auf diese Weise können Variationen in der Ausgangsmenge der ursprünglich eingesetzten RNA bzw. cDNA ausgeglichen werden, welche nicht auf Expressionsunterschieden beruhen. Hierzu wurden in Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Ricarda SCHEINER (Potsdam, jetzt Würzburg) drei Gene auf ihre Eignung als Referenzgene für altersabhängige Untersuchungen in Gehirngewebe getestet: *elongation factor 1 alpha-f1* (*Ame1a-f1*), *glyceraldehyde-3-phosphate-dehydrogenase* (*Amgapdh*) und *ribosomal protein L32* (*Amrpl32*) (REIM et al. 2013). Daraus resultierend wurde die Expression der Zielgene in den anschließenden Experimenten auf das Referenzgen *Ame1a-f1* normiert. Hierfür wurde die Kopienzahl des Zielgens durch die

Kopienzahl des Referenzgens dividiert. *Ame1a-f1* eignete sich insbesondere als Referenzgen für die Untersuchung tagesperiodischer, sowie altersabhängiger Unterschiede in Gehirngewebe (TOMA et al. 2000; BLOCH et al. 2001, REIM et al. 2013). Lediglich für vergleichende Untersuchungen zwischen verschiedenen Geweben war *Ame1a-f1* nur bedingt als Referenzgen geeignet, wie Voruntersuchungen an zeigten (einfaktorielle ANOVA: $F = 1429$; $FG = 6$; $p < 0,0001$; Abb. A2). Aus diesem Grund sei darauf hingewiesen, dass die vorliegenden gewebespezifischen Expressionsdaten verschiedener Rezeptor-Subtypen nur innerhalb des jeweiligen Gewebes miteinander vergleichbar sind (mit Ausnahme von Kropf- und Mitteldarmgewebe, die aufgrund gleicher *Ame1a-f1*-mRNA-Konzentrationen durchaus miteinander verglichen werden konnten {t-Test für unabhängige Stichproben: $t = 0,217$; $FG = 34$; $p = 0,830$ }).

2.4.6 Agarose-Gelelektrophorese

Zur Identifizierung von DNA-Fragmenten wurden diese anhand ihrer Größe in einem Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt. Es wurden 1%ige (w/v) Agarosegele verwendet, bei welchen die entsprechende Menge Agarose in 1 x TAE-Puffer unter Wärmezufuhr gelöst und mit 0,1 µg/ml Ethidiumbromid-Lösung versetzt wurde. Teilproben der zu analysierenden PCR-Produkte wurden mit einem Fünftel Volumen DNA-Ladepuffer gemischt, auf das Agarosegel aufgetragen und bei 80 V aufgetrennt. Die Größenbestimmung erfolgte über DNA-Größenstandards (1 Kilo-Basenpaare (kb) oder 100 Basenpaare (bp), jeweils New England Biolabs, Frankfurt am Main). 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
50× TAE-Puffer: 2 M Tris; 0,05 M EDTA; 5,75% (v/v) Essigsäure

2.4.7 DNA-Fragment Reinigung

Die Aufreinigung von DNA-Fragmenten im Anschluss an eine PCR erfolgte entweder direkt aus der Lösung oder über ein präparatives Agarosegel mit dem High Pure PCR Product Purification Kit (Roche Applied Science, Mannheim) entsprechend den Angaben des Herstellers. Die PCR-Produkte wurden dabei über eine Säule aufgereinigt und nach mehreren Waschschritten in ein Reaktionsgefäß eluiert. Im Falle der 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

Die Aufkonzentrierung von DNA erfolgte durch Ethanolpräzipitation. Hierfür wurde die jeweilige DNA-Probe mit dem 0,1-fachen Volumen einer 3 M Natriumacetatlösung (pH 5,2) und dem 2,5-fachen Volumen an 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

Die zu verdauenden DNA-Fragmente (100-630 ng) wurden mit einer entsprechenden Restriktionsendonuklease und dem jeweiligen Puffer laut Herstellerangaben zusammengegeben und vermischt. Verwendete Restriktionsendonukleasen waren FastDigest BamHI oder FastDigest HindIII, Thermo Scientific, Bonn) mit dem Puffer 10×FastDigest Puffer. Der Ansatz wurde bei 37 °C für 1 h 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 bzw. die Isolierung der geschnittenen DNA-Fragmente erfolgte mittels Agarose-Gelelektrophorese.

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:

$$\text{Menge Insert für Verhältnis 1:1 (ng)} = \frac{\text{Länge Insert (kB)}}{\text{Länge Vektor (kB)}} \times \text{Menge Vektor (ng)}$$

Gereinigte PCR-Produkte wurden direkt mithilfe des pGEM® T-Vektor Systems in den pGEM-T® Vektor (Promega, Mannheim) ligiert. PCR-Produkt und Vektor wurden in den

genannten Verhältnissen zusammengegeben und mit 5 μ l 2 \times *Rapid Ligation* Puffer und 1 μ l T4 DNA Ligase (3 Weiss Units) versetzt. Die Ligation erfolgte über Nacht bei 4°C in Eiswasser.

Bei durch Restriktion erhaltenen Vektoren und Fragmente mit entsprechend passenden kohäsiven Enden bestand ein Reaktionsansatz neben der berechneten Menge an Insert und Vektor aus der T4 DNA Ligase (1-3 Weiss Units) sowie dem 10 \times *Rapid Ligation* Puffer (Promega, Mannheim). Verwendete Vektoren waren in diesen Fällen der pMAL-c2X-Vektor (New England Biolabs, Frankfurt am Main), sowie der pET-30a(+)-Vektor (Novagen, Darmstadt). Die Ligation erfolgte ebenfalls über Nacht bei 4°C in Eiswasser.

2.4.11 Transformation von *Escherichia coli*

Je Ligationsansatz wurden 100 μ l kompetente *E. coli* Bakterienzellen (Stamm JM109, BL21 oder ArcticExpress {Agilent Technologies Sales & Services GmbH & Co.KG, Waldbronn}) zugegeben und 30 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurde ein Hitzeschock für 20-45 s bei 42°C, sowie 2 min auf Eis durchgeführt. Die so behandelten Bakterien wurden mit 900 μ l LB-Medium versetzt und 45 min bei 37°C auf einem Thermoschüttler (Thermomixer Comfort, Eppendorf, Hamburg) inkubiert. Danach erfolgten die Sedimentation des Ansatzes für 2 min bei 7.000 UpM, die Resuspension 100 μ l LB-Medium und der Ausstrich auf LB-Agar-Platten mit dem vektorspezifischen Antibiotikum. Für eine Blau-Weiß-Selektion bei Verwendung des pGEM-T® Vektor-Systems wurde auf den LB-Agar-Platten zuvor 37,5 μ l X-Gal (75 μ g/ml) und 2,5 μ l 1 M IPTG (Isopropyl-Thio-D-Galaktopyranosid) ausgestrichen. Die Inkubation der Platten erfolgte über Nacht bei 37°C.

Antibiotikumzusatz (LB-Agar-Platten): 30 μ g/ml Kanamycin oder 30 μ g/ml Carbenicillin

2.4.12 Präparation von Plasmid-DNA

Mit entsprechendem Antibiotikumzusatz behandeltes LB-Medium (5 ml) wurde mit einer Bakterienkolonie beimpft und über Nacht bei 37°C und 260 UpM inkubiert. Plasmid-DNA wurde aus der Bakterienkultur mithilfe des PeqGOLD Plasmid Miniprep Kits I (PEQLAB Biotechnologie GmbH, Erlangen) nach Angaben des Herstellers gewonnen.

Antibiotikumzusatz (LB-Medium): 50 μ g/ml Carbenicillin, 10 μ g/ml Kanamycin

2.5 Biochemische Methoden

2.5.1 Bestimmung von Proteinkonzentrationen

Die Konzentrationsbestimmung von in Lösung befindlichen Proteinen erfolgte nach BRADFORD (1976). Hierfür wurden 1-5 μl Probe mit DEPC-Wasser auf 800 μl aufgefüllt mit 200 μl 5 \times Roti[®]-Nanoquant versetzt. Nach 5 min erfolgte die spektrophotometrische Messung der Lösung bei 595 nm (GeneQuant 1300, GE Healthcare, München). Anhand einer zeitgleich erstellten Eichreihe mit Referenzlösungen (Rinderserumalbumin {BSA, 0-10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ } in definierten Konzentrationen) wurde die Proteinkonzentration in der zu analysierenden Probe berechnet.

2.5.2 Isolierung von Membran- und cytosolischen Proteinen

Tiefgefrorenes Bienengewebe wurde mit 150 μl Puffer A versetzt und auf Eis für 10 min inkubiert. Anschließend erfolgte eine Zentrifugation der Proben bei 4°C und 60.000 UpM für 30 min (Optima[™]TL Ultracentrifuge, Beckman Coulter GmbH, Krefeld). Der so gewonnene Überstand enthielt die cytosolische Proteinfraction. Das Pellet wurde in 45 μl Puffer B resuspendiert. Nach Zugabe von 45 μl 2%iger (3-[(3-Cholamidopropyl)-dimethylammonio]-propan-sulfonat-Lösung (CHAPS-Lösung) erfolgte eine Inkubation auf Eis für 10-15 min. Anschließend wurden die Proben bei 4°C und 10.100 UpM für 10 min zentrifugiert (Heraeus Biofuge Primo R, Thermo Scientific, Bonn). Der Überstand enthielt nun die membrangebundene Proteinfraction.

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

Posttranslationale Modifikationen, beispielsweise durch Glykosylierung, verändern unter anderem die Laufeigenschaften von Proteinen in Gelen. Dies kann die falsche Einschätzung der Proteingröße zur Folge haben. Die in der Membranfraction enthaltenen Proteine wurden

deshalb mittels Peptid:*N*-Glycosidase F (PNGase F, New England Biolabs, Frankfurt am Main) behandelt, um potentielle *N*-Glykosylierungen abzuspalten. Hierfür wurden 20-40 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 6 µl G7-Puffer und NP-40 (10%), sowie 2 µl PNGase F. Die Negativkontrolle enthielt DEPC-Wasser anstelle des Enzyms. Die Proben wurden für 2 h bei 37°C inkubiert.

2.5.4 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese

Die Auftrennung von Proteinen erfolgte entweder eindimensional (Trennung nach molekularen Massen) oder zweidimensional (Trennung sowohl nach isoelektrischen Punkten, als auch molekularen Massen).

Eindimensionale Polyacrylamidgelelektrophorese

Die diskontinuierliche Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) nach LAEMMLI (1970) erlaubte die Auftrennung von Proteinen unter denaturierenden Bedingungen in Gegenwart von SDS anhand ihres Molekulargewichts in einem elektrischen Feld. Zunächst wurde ein Trenngel hergestellt, welches durch eine Beschichtung mit *n*-Butanol eine ebene Oberkante (Grenze zum Sammelgel) erhielt. Nach vollständigem Auspolymerisieren wurde das *n*-Butanol entfernt und das Trenngel mit dem Sammelgel überschichtet. Das Einstecken eines Plastikammes führte zur Taschenbildung im Sammelgel, die anschließend den Probenauftrag ermöglichte. Die Zusammensetzung des Trenn- und Sammelgels ist in Tab. 2.3 dargestellt.

Tab. 2.3: Zusammensetzung von Trenn- und Sammelgel bei SDS-PAGE nach LAEMMLI (1970)

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

Gewebeproben wurden homogenisiert, mit 1 Volumen LöA-Puffer versetzt, bei 50°C für 5 min denaturiert und aufgetragen. Die Elektrophorese erfolgte in Kammerpuffer bei 80 V, 60 mA und 40 W. Nach Übertritt der Proben vom Trenn- in das Sammelgel erfolgte die weitere Auftrennung bei 120 V, 60 mA und 40 W. Als Molekulargewichtvergleich diente eine Standardproteinmischung (Precision Plus Protein™ Dual Color Standard, Bio-Rad Laboratories GmbH, München).

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

Zweidimensionale Polyacrylamidgelelektrophorese

Durch Kombination von zwei verschiedenen elektrophoretischen Trenntechniken wurden Proteingemische sowohl nach isoelektrischen Punkten (1. Dimension), als auch nach molekularen Massen (2. Dimension) aufgetrennt. Hierfür wurden Gewebeproben in 100 μ l Lysis-Puffer homogenisiert. Die isoelektrische Fokussierung wurde auf 7 cm langen Immobiline DryStrip Gelfolien (immobilisierter pH-Gradient, nichtlinearer pH-Bereich: pH 3-10, GE Healthcare, München) durchgeführt. Die Gele wurden zuvor in Rehydrierungslösung für 12 Stunden bei Raumtemperatur rehydriert. Nach Probenauftrag erfolgte die isoelektrische Fokussierung in einer Protean IEF Cell-Apparatur (Bio-Rad, Laboratories GmbH, München) bei 50 mA und 15°C unter Verwendung eines Fokussierungsprogrammes (Tab. 2.4).

Nach erfolgter isoelektrischer Fokussierung wurden die Immobiline DryStrip Gelfolien je 15 min in je 10 ml primärer und sekundärer Äquibrierungslösung auf einem Schüttler inkubiert. Anschließend erfolgte die Auftrennung nach molekularen Massen mithilfe einer SDS-PAGE in einem 12%igen Sammelgel nach LAEMMLI (1970) ohne Trenngel an (siehe 2.5.4.1) für 20 min bei 100 V (3 mA) und 200 min bei 200 V (6 mA). Als Molekulargewichtvergleich diente eine Standardproteinmischung (PageRuler Plus Prestained Protein Ladder 10-250 kDa, Thermo Fisher Scientific GmbH, Bonn).

Tab. 2.4: Spannungsprogramm zur isoelektrischen Fokussierung

Phase	Spannung [V]	Dauer [h:min]
1	150	0:15
2	300	0:15
3	500	0:10
4	1.000	0:10
5	1.500	0:10
6	2.000	0:10
7	2.500	0:10
8	3.000	0:10
9	3.500	1:30

Lysis-Puffer	7 M Harnstoff; 2 M Thioharnstoff; 10% (w/v) Glycerol, 4% (w/v) CHAPS; 40 mM Tris; 2 % (v/v) IPG Puffer pH 3-10 NL (GE Healthcare, München); 19 mM DTT; 4 mM AEBSF
Rehydrierungslösung:	10% Glycerol; 8 M Harnstoff; 2% (w/v) CHAPS; 2 % (v/v) IPG Puffer pH 3-10 NL (GE Healthcare, München)
primäre Äquibrierungslösung	30% (v/v) Glycerol; 50 mM Tris HCl pH 8,8; 6 M Harnstoff; 2% (w/v) SDS; Bromphenolblau; 1% (w/v) DTT
sekundäre Äquibrierungslösung	30% (v/v) Glycerol; 50 mM Tris HCl pH 8,8; 6 M Harnstoff; 2% (w/v) SDS; Bromphenolblau; 2,5% (w/v) Iodacetamid

2.5.5 Coomassie Blau-Färbung

Durch Färbung mit Coomassie Brilliant Blau R-250-Lösung wurden mit SDS-PAGE aufgetrennte Proteine im Gel sichtbar gemacht. Das Gel wurde 30 min in der Coomassielösung bei Raumtemperatur auf einem Schüttler inkubiert. Anschließend erfolgte das Entfärben bei Raumtemperatur auf einem Schüttler für 1 Stunde. Die Entfärbelösung wurde währenddessen einmal gewechselt. Die Größenbestimmung der aufgetrennten Proteine erfolgte im Vergleich zu einer Proteinmischung mit definierten Molekulargewichten (Precision Plus Protein™ Standards, Bio-Rad Laboratories GmbH, München).

Coomassielösung:	0,1% (w/v) Coomassie Blau R-250; 50% (v/v) Methanol; 10% (v/v) Essigsäure
Entfärbelösung:	10% (v/v) Methanol; 7% (v/v) Essigsäure

2.5.6 Western Blot

Der Transfer der mittels Gelelektrophorese getrennten Proteine auf eine proteinbindende Membran (Polyvinylidenfluorid-Membran {PVDF}, Immobilon P, Roth, Karlsruhe) erfolgte durch Western Blot im Semi-Dry-Verfahren. Hierfür kam eine Halbtrockenzelle (Trans-Blot® SD Semi Dry transfer cell, Bio-Rad Laboratories GmbH, München) zum Einsatz. Der elektrophoretische Transfer fand bei 20 V, 54 mA pro Blot (Fläche in $\text{cm}^2 \times 0,8$) und 4 W für 90 min statt. Folgende Schichtung wurde luftblasenfrei 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. Die Effizienz des Blot-Vorgangs wurde durch reversible Färbung der Proteine mit 0,2% Ponceau S in Trichlor-Essigsäure (5 minütige Inkubation bei Raumtemperatur auf einem Schüttler) überprüft. Die Entfärbung der Blotmembran erfolgte mit vollentsalztem Wasser (VE-Wasser). Die Lagerung erfolgte nach Trocknung (maximal 37°C) bei 4°C.

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

Quantitativer Western Blot

Durch quantitativen Western Blot wurde die Expression eines Zielproteins (hier: Am5-HT_{1A}) relativ zu einem Referenzprotein (hier: AmAktin) erfasst. Grundlegend kam das oben unter 2.5.6 beschriebene Verfahren zum Einsatz. Zunächst fand eine Justierung des Systems statt: Es wurde gezeigt, dass sich das zu erwartende Signal durch die Parameter des quantitativen Western Blots und anschließender Immundetektion (Proben- und Antikörperkonzentrationen, sowie Belichtungszeit) nicht in der Sättigung befindet. Dies geschah über Verdünnungsreihen von Gewebeproben (Abb. 2.1). Gewebe wurde in 100 μl LöA-Puffer homogenisiert, wovon 3 μl , 6 μl , 9 μl , 12 μl , 15 μl , 18 μl (jeweils *ad* 21 μl LöA-Puffer) auf einem SDS-Polyacrylamidgel elektrophoretisch aufgetrennt (siehe 2.5.4) und mittels Western Blot auf eine PVDF-Membran transferiert wurden. Die Immundetektion erfolgte wie unter 2.5.7 beschrieben. Die entwickelten Kodak-Fotofilme wurden mit einer Auflösung von 800 dpi in

260 Grautönen gescannt und als JPG-Datei in ImageJ (Version 1.46, U. S. National Institutes of Health, Bethesda, USA) importiert. Es wurde von jeder auszuwertenden Proteinbande (bzw. deren visualisiertem Signal) densitometrisch die Bandenintensität ermittelt.

Verwendete Primärantikörper waren α Am5-HT_{1A} (zur Verfügung gestellt von Herrn Dr. Markus THAMM, Universität Würzburg; THAMM et al. 2010) und α GdAktin (Haushuhn-Aktin, pan Ab-5, Neo-Markers, Fremont, USA). Als Sekundärantikörper kamen *goat-anti-rabbit*-HRP und *goat-anti-mouse*-HRP (Jackson ImmunoResearch Europe Ltd., Suffolk) zum Einsatz.

Anhand der durch die Verdünnungsreihen (Abb. 2.1) erhaltenen Erkenntnisse wurden die Proben in den eigentlichen quantitativen Western Blot-Experimenten in 100 μ l LöA-Puffer homogenisiert und 9 μ l des Homogenats (*ad* 21 μ l LöA-Puffer) in der SDS-Gelelektrophorese eingesetzt. Für die Auswertung wurde die Bandenintensität des Am5-HT_{1A}-Rezeptorproteins durch die Bandenintensität des Aktin-Proteins in derselben Probe dividiert.

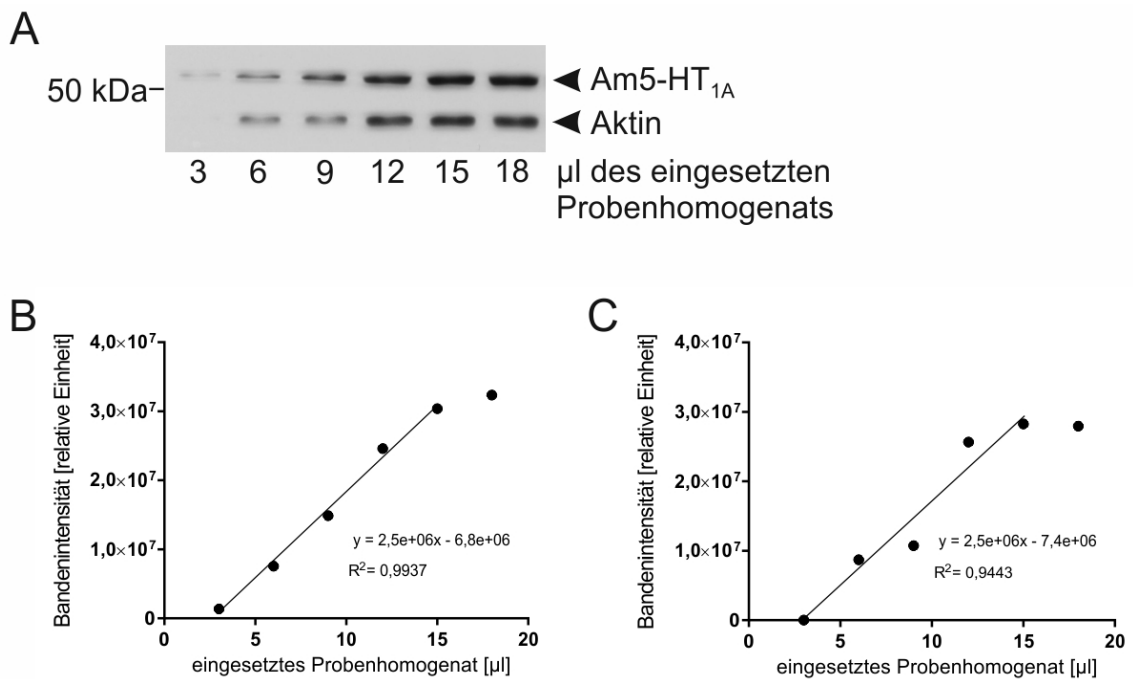


Abb. 2.1: Verdünnungsreihe von Bienenhirn-Gewebe zur Bestimmung des geeigneten Probenvolumens für quantitative Western Blot-Analysen. **A:** Western Blot mit Verdünnungsreihe. Primärantikörper: α Am5-HT_{1A}, 1:3.000 und α GdAktin, 1:10.000, Sekundärantikörper: *goat-anti-rabbit*-HRP, 1:20.000 und *goat-anti-mouse*-HRP, 1:20.000, 2 min Belichtungszeit. **B und C:** Intensität der Am5-HT_{1A}- (B) und Aktinbanden (C) bei zunehmendem Volumen des eingesetzten Probenhomogenats (lineare Regression nur für den linearen Bereich der Steigung {3-15 μ l Probenhomogenat}).

2.5.7 Immundetektion

Die Nachweisreaktion von auf Blotmembranen befindlicher Antigene erfolgte durch die Bindung von Primär- und Sekundärantikörpern. Zunächst wurden jedoch überschüssige Proteinbindestellen der Membran durch Inkubation in 5%iger (w/v) Trockenmilchlösung in Tween-Puffer für 30 min bei Raumtemperatur saturiert. Anschließend erfolgte die Inkubation der abgesättigten Blotmembran in Tween-Puffer, in welchem der Primärantikörper in einer spezifischen Verdünnung vorlag. Die Inkubation in Primärantikörperlösung erfolgte, sofern nicht anders angegeben, über Nacht bei 4°C auf einem Schüttler. Es folgten drei Waschschrte in Tween-Puffer für jeweils 5 min bei Raumtemperatur. Anschließend erfolgte die Inkubation in Harnstoffpuffer für 3 min und in Tween-Puffer für 5 min. Der Sekundärantikörper, welcher gegen Epitope des Spenderorganismus des Primärantikörpers gerichtet war, wurde in Tween-Puffer in entsprechender Verdünnung gelöst und die Blotmembran darin 1 h bei Raumtemperatur auf einem Schüttler inkubiert. Danach wurde der Blot mit Tween-Puffer dreimal für jeweils 5 min bei Raumtemperatur gewaschen. Nach kurzem Abspülen mit ddH₂O erfolgte die Inkubation mit dem ECL-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 führte zu Lichtemission. Lichtempfindliche Kodak-Fotofilme (CL-Xposure, Thermo Scientific, Bonn) wurden durch die behandelte Blotmembran belichtet und anschließend entwickelt.

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

Für die spätere Herstellung polyklonaler Antikörper gegen das Am5-HT_{2β}-Rezeptorprotein wurden die für die gewählten Antigenregionen (Antigen 1 und Antigen 2, siehe 2.5.10) kodierenden Genbereiche über die *multiple cloning site* in den pMAL c2X Vektor (New England Biolabs, Frankfurt am Main) ligiert. Anschließend erfolgte die Transformation von *E. coli* (ArcticExpress) mit dem Am5-HT_{2β}-pMAL c2X-Konstrukt. Jeweils eine Kolonie wurde in 5 ml LB Medium mit 10 µl Carbenicillin aufgenommen und bei 37 °C und 260 UpM über Nacht inkubiert. Von dieser Übernachtskultur wurden 4 ml in 1 l LB Medium mit 2 ml Carbenicillin aufgenommen und bei 37°C und 260 UpM so lange inkubiert, bis die Lösung eine OD_{600 nm}

zwischen 0,6 und 0,9 aufwies (GeneQuant 1300, GE Healthcare, München). Durch die Zugabe von 1 mM Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid (IPTG), welches als Induktor des Lactose-Operons bei *E. coli* fungiert, wurde die Expression induziert und die Kultur bei Raumtemperatur über Nacht geschüttelt. Anschließend erfolgte die Sedimentation der Kulturen bei 8500 UpM und 4 °C für 5 min und die Resuspension in 5 ml TE Puffer. Der Zellaufschluss erfolgte mit einem Stabsonifizierer UP50H (Hielscher Ultrasonics GmbH, Teltow) für 5 \times 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 Maltosebindeprotein (MBP)-Fusionsprotein-haltige Überstand wurde mit 50 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.

Antibiotikumzusatz (LB-Medium):	100 μ g/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

Für die spätere Aufreinigung polyklonaler Antikörper gegen das Am5-HT_{2 β} -Rezeptorprotein mittels einer Nickel-Chelat-Säule, wurden die für die Antigenregionen (Antigen 1 und Antigen 2, siehe 2.5.10) kodierenden Genbereiche in den pET-30a(+)-Vektor (Novagen, Darmstadt) kloniert. *E. coli* (BL21) wurde mit dem Vektor-Konstrukt transformiert. Jeweils eine Kolonie wurde in 3 ml LB Medium mit 15 μ l Kanamycin aufgenommen und bei 37 °C und 260 UpM über Nacht inkubiert. Von dieser Übernachtskultur wurden 2 ml in 500 ml LB Medium mit 1,25 ml Kanamycin aufgenommen und bei 37 °C und 260 UpM so lange inkubiert, bis die Lösung eine OD_{600 nm} zwischen 0,6 und 0,9 aufwies (GeneQuant 1300, GE Healthcare,

München). Die Proteinexpression wurde durch die Zugabe von 1 mM IPTG induziert. Die Kultur wurde über Nacht bei Raumtemperatur auf einem Schüttler inkubiert. Die Sedimentation der Kulturen erfolgte bei 5.500 UpM und 4°C für 10 min. Anschließend wurde das Pellet 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 für ca. 5 × 30 s auf Eis mit dem Stabsonifizierer UP50H (Hielscher Ultrasonics GmbH, Teltow). Die Lösung wurde anschließend mit DNase (*DNase I from bovine pancreas*, Sigma-Aldrich) und 2 mM MgCl₂ versetzt und 30 min bei 4°C inkubiert und bei 15.000 UpM und 4°C für 30 min zentrifugiert. Der His-Tag-Fusionsprotein-haltige Überstand wurde bis zur weiteren Verwendung auf Eis gelagert.

Das zur Reinigung der Fusionsproteine benötigte Säulenmaterial (*HIS-Select® HF Nickel Affinity Gel*, Sigma-Aldrich) wurde zunächst äquilibriert. Hierfür wurden 2 ml Säulenmaterial bei 5.300 UpM und 4°C für 3 min zentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Säulenmaterial wurde nacheinander mit 2 ml ddH₂O und 5 ml Waschpuffer resuspendiert und jeweils bei 5.300 UpM und 4°C für 3 min zentrifugiert. Nach dem erneuten Verwerfen des Überstandes konnte das Fusionsprotein mit dem Säulenmaterial vermischt und 1 h bei 4°C auf einem Kippschüttler inkubiert werden. Die Lösung wurde bei 5.300 UpM und 4°C für 3 min sedimentiert und der Überstand verworfen. Das nun an die Nickelmatrix gebundene Fusionsprotein wurde je 3 × mit 10 ml Waschpuffer versetzt und bei 5.300 UpM und 4°C für 3 min zentrifugiert. 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. Es schloss sich eine Dialyse über Nacht bei 4°C gegen 1 l Kopplungspuffer an.

Antibiotikumzusatz (LB-Medium):	50 µg/ml Kanamycin; 100 µg/ml Chloaramphenicol
Lysispuffer:	10 mM Imidazol; 50 mM NaH ₂ PO ₄ ; 300 mM NaCl; 1 mg/ml Lysozym <i>from Chicken Egg White</i> (Sigma-Aldrich); pH 8
Waschpuffer:	20 mM Imidazol; 50 mM NaH ₂ PO ₄ ; 300 mM NaCl; pH 8
Elutionspuffer:	250 mM Imidazol; 50 mM NaH ₂ PO 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

Es wurden zwei Antigenregionen (Epitope) des Am5-HT_{2β}-Rezeptorproteins ausgewählt (Antigen 1 und Antigen 2), gegen welche polyklonale Antikörper hergestellt wurden. Diese Antigenregionen befanden sich in der dritten cytoplasmatischen Schleife des Rezeptorproteins. Bei Antigen 1 handelte es sich um einen 138 Aminosäuren, bei Antigen 2 um einen 113 Aminosäuren langen Sequenzabschnitt (Tab. A.5). Es wurden jeweils Fusionsproteine aus Antigen und MBP hergestellt, welche zur Immunisierung von Kaninchen (*Oryctolagus cuniculus*) verwendet wurden. Die Immunisierung und Versorgung der Tiere, sowie die Serumgewinnung wurde von der Firma Pineda Antikörper-Service (Berlin) durchgeführt. Im Vorfeld der Immunisierung wurden Präimmunsereen von acht Kaninchen getestet und davon vier Tiere ausgewählt, welche im Western Blot die geringste Hintergrundaktivität aufwiesen. Beide Antigen-MBP-Fusionsproteine wurden in je zwei Kaninchen immunisiert. Die Blutentnahme und Serumgewinnung erfolgte 61 Tage nach der Immunisierung.

Die Aufreinigung antigenspezifischer Antikörper aus den gewonnenen Seren erfolgte durch Affinitätschromatographie gegen das Antigen-His-Tag-Fusionsprotein über eine HiTrap NHS-activated HP-Säule (GE Healthcare, München). Das Isopropanol der gelagerten Säule wurde mit 6 ml eiskaltem 1 mM HCl ausgewaschen. Anschließend erfolgte die Injektion von 1,5 ml His-Tag-Fusionsprotein (für Antigen 1: 1,4 mg/ml; für Antigen 2: 0,9 mg/ml). Für die Bindung des Fusionsproteins an das Säulenmaterial wurde die Säule 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Das Deaktivieren aktiver Gruppen erfolgte anschließend durch alternierende Waschschritte mit Puffer A und Puffer 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. Anschließend wurde durch 2 ml Bindungspuffer der pH-Wert eingestellt. Vor der Applikation des Serums wurde die Säule mit 3 ml Bindungspuffer und 3 ml Elutionspuffer gewaschen und danach mit 10 ml Bindungspuffer äquilibriert. 5 ml des Serums wurden mit 45 ml Bindungspuffer verdünnt, filtriert (Porengröße des Filters: 0,22 µm) und mithilfe einer Peristaltikpumpe (P-1, Pharmacia Biotech, Dübendorf) über Nacht mit einer Flussrate von 0,2-1 ml/min in einem geschlossenen Kreislauf über die Säule geschickt. Anschließend 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 die Lösung einen pH-Wert von sieben aufwies.

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

2.6 Hochleistungsflüssigkeitschromatographie

Biogene Amine in Gewebeproben wurden durch Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (*high performance liquid chromatography*, HPLC) aufgetrennt, identifiziert und quantifiziert. Das Verfahren wurde in Kooperation mit Dr. Andrew B. BARRON (Macquarie University, Sydney, Australien) durchgeführt. Für die Untersuchung wurden Bienen zunächst komplett in flüssigem Stickstoff eingefroren. Die Köpfe der Tiere wurden separiert und vor der weiteren Präparation bei -65°C und 320 mTorr für 45 min lyophilisiert (Virtis Gefriertrockner 2KBTXL-75, VirTis, Gardiner, USA). Anschließend erfolgte die Gehirnpräparation auf Trockeneis. Das Gewebe wurde bis zur weiteren Verwendung bei -80°C gelagert. Zur Extraktion der biogenen Amine wurden die Gehirne für 5 min bei 4°C und $15 \times g$ und anschließend durch Ultraschall in $20 \mu\text{l}$ 0,2 M Perchlorsäure unter Zugabe von $10 \text{ pg}/\mu\text{l}$ des HPLC-Standards Dihydroxybenzylamin homogenisiert. Anschließend erfolgte eine Inkubation der Proben für 20 min bei 0°C unter Lichtausschluss und eine Zentrifugation für 15 min bei 4°C und $15 \times g$. Von dem Überstand jeder Probe wurden $13 \mu\text{l}$ für die HPLC-Analyse verwendet. Die HPLC wurde an einem Agilent 1200 HPLC-System (Agilent Technologies, Santa Clare, USA) mit elektrochemischem Detektor (ESA Coulochem III), verbunden mit einer ESA 5011A hochsensitiven Zwei-Elektrodenzelle (beides ESA, Chelmsford, USA) durchgeführt. Die Auftrennung erfolgte über eine Hypersil BDS C18-Säule (Länge: 100 mm) einer Partikelgröße von $5 \mu\text{m}$ (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA). Die Quantifizierung biogener Amine erfolgte relativ zu einer Standardmenge des Amins, sowie relativ zu Dihydroxybenzylamin als internem Standard.

2.7 Verhaltensexperimente zur Ontogenese der circadianen Rhythmik lokomotorischer Aktivität

Die Untersuchung des Einflusses verschiedener Serotoninrezeptor-Liganden auf die Ausbildung der circadianen Rhythmik lokomotorischer Aktivität bei einzelnen Honigbienen erfolgte in Verhaltensexperimenten. Hierfür wurden die Versuchstiere, wie in Kapitel 2.2.1 dargestellt, unter konstanten Licht-(DD), Temperatur- und Luftfeuchtigkeitsbedingungen gehalten.

2.7.1 Verabreichung pharmakologischer Substanzen

Die Fütterung der Kontrollgruppe erfolgte *ad libitum* mit einer wässrigen Pollen-Zucker-Lösung (1 Massenteil getrockneter und zerstoßener Pollen {Gemisch verschiedener Pflanzen} in 3,5 Massenteilen ApiInvert {Südzucker AG, Mannheim}). Die Versuchsgruppen erhielten ebendiese Futtermischung, welche entweder mit 5-HT, 5-Carboxamidotryptamin (5-CT), 5-Methoxytryptamin (5-MeOT) oder Methiothepin (jeweils 10 mM, alle Substanzen von Sigma-Aldrich) versetzt wurde. Um eventueller Degradation der pharmakologischen Substanzen zu begegnen, erfolgte alle 3 Tage ein Futterwechsel unter Rotlicht.

2.7.2 Messung der lokomotorischen Aktivität von Honigbienen

Die lokomotorische Aktivität einzelner Honigbienen wurde mithilfe des Locomotor Activity Monitor-Systems nach GIANNONI-GUZMÁN et al. (2014) (Modell: LAM, TriKinetics Inc., Waltham, USA) registriert und aufgezeichnet. Eine Monitoring-Einheit bestand aus 32 Glasröhrchen (Länge: 100 mm, Durchmesser: 16 mm, Pyrex-Glas), in welche jeweils ein Versuchstier platziert wurde. Drei Infrarot-Strahlen querten jedes Röhrchen in der Mitte und wurden durch Sensoren detektiert, wodurch Bewegungen des Versuchstiers von einem Ende des Röhrchens zum anderen Ende registriert werden konnten. Die Glasröhrchen wurden zur einen Seite mit einem Metallgitter, zur anderen Seite mit einer Vorrichtung zur Futterapplikation (siehe 2.7.1) verschlossen. Jeweils zwei Monitoring-Einheiten hatten olfaktorisch Kontakt zu einer bienenbesetzten Wabe, jedoch ohne dass die separierten Versuchstiere taktil mit anderen Bienen interagieren konnten (Abb. 2.2).

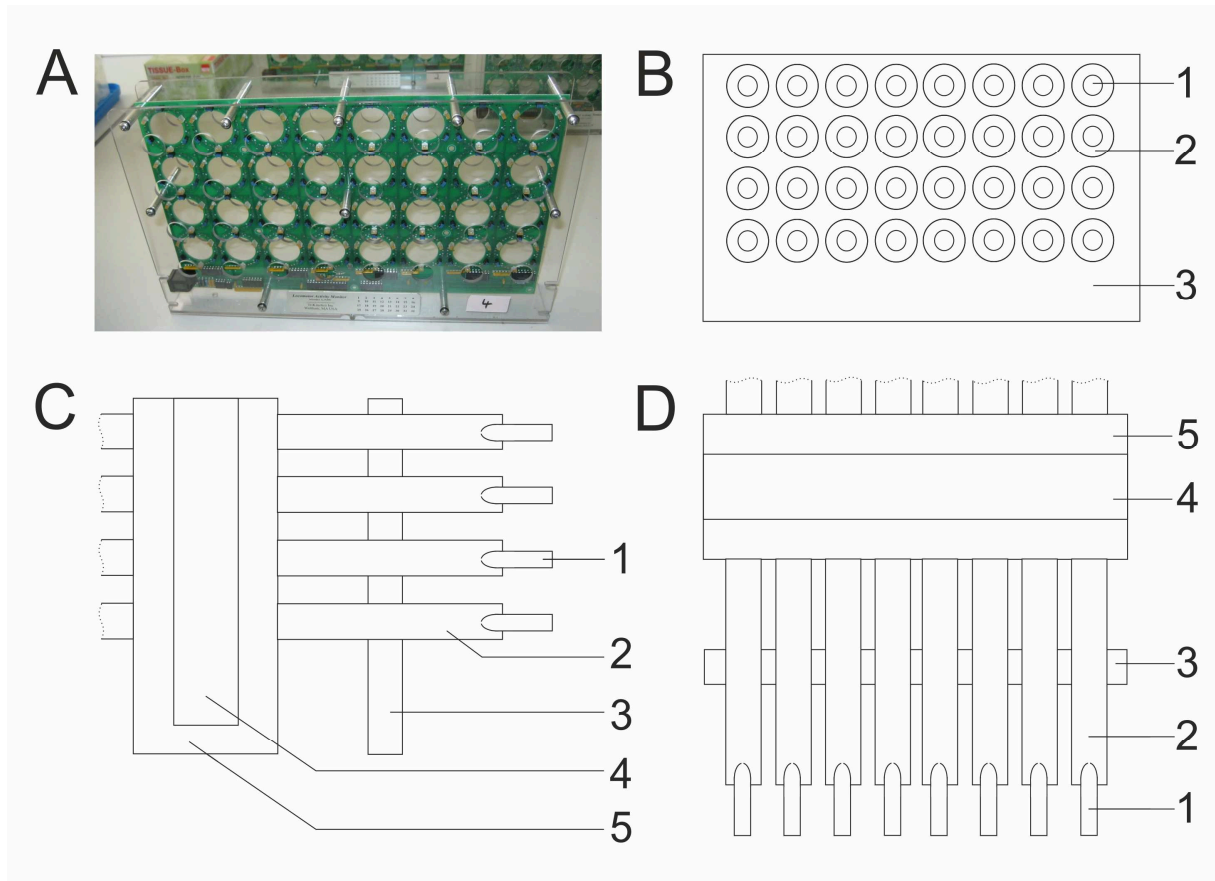


Abb. 2.2: Versuchsaufbau zur Messung lokomotorischer Aktivität von Einzelbienen. **A:** Locomotor Activity Monitor-Systemeinheit von TriKinetics ohne Bestückung mit Glasröhrchen und Versuchstieren. **B, C und D:** Schematische Darstellungen des Versuchsaufbaus in Frontal- (B), Seit- (C) und Aufsicht (D), 1: Futterapplikator, 2: Glasröhrchen (enthält je ein Versuchstier), 3: Locomotor Activity Monitor-Systemeinheit von TriKinetics, 4: bienenbesetzte Wabe, 5: Holzbox. Bei B, C und D ist jeweils nur eine der zwei gegenüberliegend angebrachten Locomotor Activity Monitor-Systemeinheiten dargestellt.

2.8 Datenauswertung und Statistik

Die statistischen Analysen erfolgten mit den Programmen SPSS Statistics (Version 19.0.0, IBM Deutschland GmbH, Ehningen) und GraphPad Prism (Versionen 4.0 und 6.04, GraphPad Software Inc., La Jolla, USA). Die verwendeten Nukleotid- und Aminosäuresequenzen wurden aus der Datenbank des National Center for Biotechnology Information (NCBI, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) gewonnen und mit der Software BioEdit (Version 7.0.9.0) verarbeitet. Die Aufnahme und Verarbeitung von qPCR-Daten erfolgte mit der Rotor-Gene Q Series Software (Version 2.0.2, Qiagen, Hilden). Die Software ImageJ (Version 1.46, U. S.

National Institutes of Health, Bethesda, USA) wurde für die densitometrischen Analysen zur quantitativen Western-Blot-Analyse verwendet. Die Auswertung der lokomotorischen Aktivitätsdaten erfolgte mit dem Plug-in „ActogramJ“ (SCHMID et al. 2011) für ImageJ anhand von χ^2 - und Lomb-Scargle-Periodogramm-Analysen. Die graphische Darstellung von Aktivitätsdaten erfolgte als Aktogramm in Form von DoppelpLOTS. Vergleiche von Überlebenskurven und prozentualer Anstiege erfolgten mittels Log-Rank-Tests (Mantel-Cox-Tests).

Die qPCR-Daten zu räumlichen Expressionsmustern der Serotonin-Rezeptor-Subtypen wurden vor der statistischen Analyse $\log(x+1)$ -transformiert. Vergleiche zwischen mehreren Gruppen erfolgten mittels einfaktorieller Varianzanalyse (ANOVA). Post-hoc-Vergleiche wurde mittels Bonferronis Mehrfachvergleichstest durchgeführt, dessen Ergebnisse als Konfidenzintervalle mit einem Konfidenzniveau von 95% in folgender Form angegeben wurden: Konfidenzintervall (KI) = untere Grenze; obere Grenze. Vergleiche zwischen zwei Gruppen erfolgten mithilfe des t-Tests für unabhängige Stichproben.

Die Irrtumswahrscheinlichkeit wurde auf $\alpha = 0,05$ festgelegt. Zum Teil konnten niedrigere Irrtumswahrscheinlichkeiten ($\alpha = 0,01$ und $\alpha = 0,001$) angenommen werden. Statistisch signifikante Unterschiede wurden in Diagrammen entsprechend mit einem, zwei oder drei Sternchen “*”, bzw. mit Buchstaben gekennzeichnet. Die Angabe der Messwerte erfolgte als arithmetisches Mittel \pm Standardfehler.

3 Ergebnisse

3.1 Gewebespezifische Expressionsmuster der 5-HT-Rezeptor-Subtypen

Die gewebespezifischen Expressionsmuster der 5-HT-Rezeptor-Varianten wurden mittels qPCR untersucht. Es erfolgten zum einen Expressionsmessungen der Volllängenvarianten der 5-HT-Rezeptorgene *Am5-ht1A*, *Am5-ht2a*, *Am5-ht2 β* und *Am5-ht7* in Gehirn- und Darmgewebe. Zum anderen erfolgte ein Vergleich der Expression von *Am5-ht2a* und *Am5-ht2 β* und den alternativen Spleißvarianten *Am5-ht2a Δ III* und *Am5-ht2 β Δ II* im Zentralnervensystem und peripheren Geweben. Sofern nicht gesondert spezifiziert, erfolgten alle Messungen an Geweben von Pollen sammelnden Arbeiterinnen.

3.1.1 Expression der 5-HT-Rezeptorgene *Am5-ht1A*, *Am5-ht2a*, *Am5-ht2 β* und *Am5-ht7*

Es konnte die mRNA-Expression aller vier 5-HT-Rezeptorgene im Gehirn von Pollensammlerinnen nachgewiesen werden (Abb. 3.1 A). Im Gehirn war die relative Expression von *Am5-ht1A* mit $0,417 \pm 0,025$ am höchsten, 1,9-fach höher als die von *Am5-ht7* (KI = 0,045; 0,080), sowie 4,9-fach höher als die von *Am5-ht2a* (KI = 0,097; 0,133) und 41,7-fach höher als die von *Am5-ht2 β* (KI = 0,129; 0,164) (einfaktorielle ANOVA: $F = 202,3$; $FG = 3$; $p < 0,0001$).

Im Kropf oder Honigmagen, Teil des Vorderdarms der Honigbiene, konnte ebenfalls die Expression aller vier 5-HT-Rezeptortranskripte nachgewiesen werden (Abb. 3.1 B). Im Gegensatz zum Muster im Gehirn wurde im Kropfgewebe eine 7,6-fach niedrigere relative Expression des *Am5-ht1A*-Transkripts im Vergleich zu *Am5-ht2a* gemessen (KI = -0,209; -0,138). *Am5-ht2a* war hier mit $0,614 \pm 0,050$ das am stärksten exprimierte 5-HT-Rezeptortranskript. Die *Am5-ht2 β* -mRNA wurde mit $0,232 \pm 0,017$ ebenfalls häufiger nachgewiesen als die mRNA des *Am5-ht1A*-Gens (2,9-facher Unterschied, KI = -0,092; -0,022). Die Expression von *Am5-ht1A* und *Am5-ht7* unterschied sich nicht signifikant voneinander (KI = -0,020; 0,050, einfaktorielle ANOVA: $F = 107,4$; $FG = 3$; $p < 0,0001$).

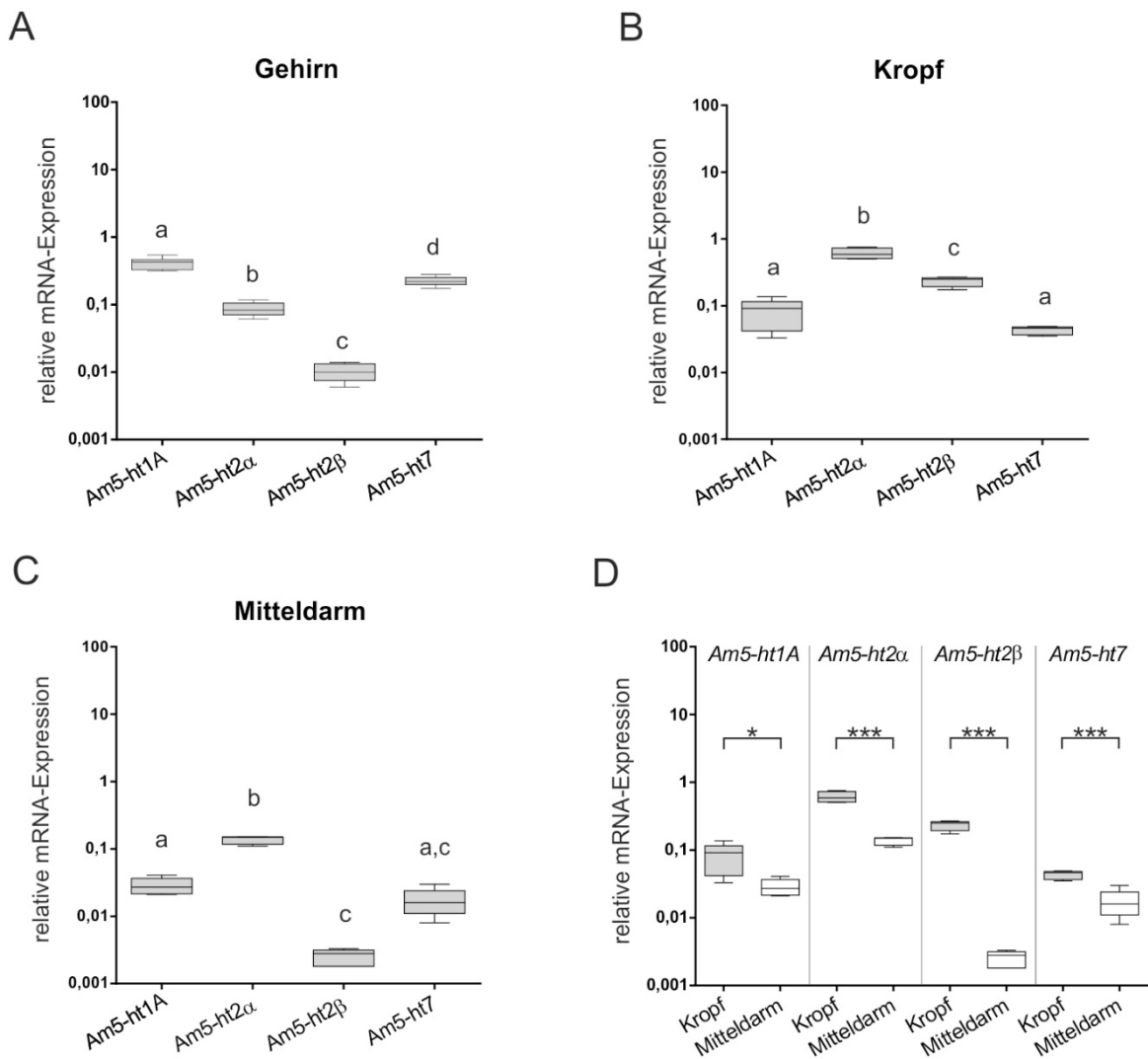


Abb. 3.1: Expressionsmuster der *Am5-HT*-Rezeptorgene in Gehirn- und Darmgewebe, gemessen mittels qPCR. Transkript-Level wurden auf die Expression von *Ameft-1a-f1* normalisiert. **A:** Relative mRNA-Expression im Gehirn von Pollensammlerinnen (n = 10). **B:** Relative mRNA-Expression im Kropf von Pollensammlerinnen (n = 5). **C:** Relative mRNA-Expression im Mitteldarm von Pollensammlerinnen (n = 5). **D:** Vergleich der relativen mRNA-Expression im Kropf und Mitteldarm von Pollensammlerinnen (n = 5). Statistik durchgeführt an $\log(x+1)$ transformierten Daten: A-C: einfaktorielle ANOVA gefolgt von Bonferronis Mehrfachvergleichstest ($p \leq 0,05$; Gruppen mit unterschiedlichen Buchstaben innerhalb eines Diagramms unterscheiden sich signifikant), D: t-Test für unabhängige Stichproben (* $p < 0,05$; *** $p < 0,001$).

Auch im Mitteldarm von Pollensammlerinnen wurden alle vier 5-HT-Rezeptorgene exprimiert (Abb. 3.1 C). Ebenso wie im Kropf war *Am5-HT2a* mit $0,137 \pm 0,008$ am stärksten exprimiert. Die Expression von *Am5-HT1A* und *Am5-HT7* unterschied sich im Mitteldarm nicht

signifikant voneinander (KI = -0,007; 0,019). Die gefundenen Expressionsmuster in Kropf und Mitteldarm unterschieden sich in der Expression des *Am5-ht2 β* -Gens: ebenso wie im Gehirn wurde die *Am5-ht2 β* -mRNA mit $0,003 \pm 0,0003$ von allen vier untersuchten Transkripten am geringsten exprimiert (einfaktorielle ANOVA: F = 116,1; FG = 3; p < 0,0001).

Alle 5-HT-Rezeptorgene wurden im Kropf stärker als im Mitteldarm exprimiert (Abb. 3.1 D): *Am5-ht1A* zeigte im Kropf eine 2,8-fach (t-Test für unabhängige Stichproben: t = 2,923; FG = 8; p = 0,019), *Am5-ht2a* eine 4,48-fach (t-Test für unabhängige Stichproben: t = 10,960; FG = 8; p < 0,0001), *Am5-ht2 β* eine 92,8-fach (t-Test für unabhängige Stichproben: t = 14,360; FG = 8; p < 0,0001) und *Am5-ht7* eine 2,5-fach (t-Test bei unabhängige Stichproben: t = 5,419; FG = 8; p = 0,0006) stärkere Expression als im Mitteldarm.

3.1.2 Expression von *Am5-ht2a* und *Am5-ht2 β* , sowie deren alternativen Spleißvarianten *Am5-ht2a Δ III* und *Am5-ht2 β Δ II*

Gewebe des Zentralen Nervensystems

Die Expression aller vier untersuchten Transkripte wurde im zentralen Nervensystem (getrennt in Gehirn und Bauchmark) von Pollensammlerinnen und männlichen Tieren (Drohnen) nachgewiesen (Abb. 3.2).

Die *Am5-ht2a*-mRNA war in Gehirngewebe von Pollensammlerinnen (Abb. 3.2 A; einfaktorielle ANOVA: F = 40,3; FG = 3; p < 0,0001) mit einer relativen Expression von $0,105 \pm 0,005$ 2,3-fach stärker exprimiert als ihre alternative Spleißvariante *Am5-ht2a Δ III* (KI = 0,011; 0,029). Das Transkript der alternativen Spleißvariante *Am5-ht2 β Δ II* war mit $0,044 \pm 0,007$ 3,4-fach stärker exprimiert, als dessen Vollängenvariante *Am5-ht2 β* (KI = -0,020; -0,002). Mit $0,013 \pm 0,001$ war die Expression der *Am5-ht2 β* -mRNA 8,1-fach niedriger, als die der *Am5-ht2a*-mRNA (KI = 0,026; 0,045).

In Gehirnen von männlichen *A. mellifera* (Drohnen; Abb. 3.2 B; einfaktorielle ANOVA: F = 57,2; FG = 3; p < 0,0001) zeigte sich, ähnlich wie bei Pollensammlerinnen, eine 8,0-fach stärkere Expression des *Am5-ht2a*-Transkripts im Vergleich zur *Am5-ht2 β* -mRNA (KI = 1,700; 2,900). Jedoch wurden keine statistisch signifikanten Unterschiede zwischen den Vollängenvarianten und den zugehörigen alternativen Spleißvarianten gefunden (*Am5-ht2a Δ III*: KI = -0,020; 1,020 und *Am5-ht2 β Δ II*: KI = -0,090; 0,504).

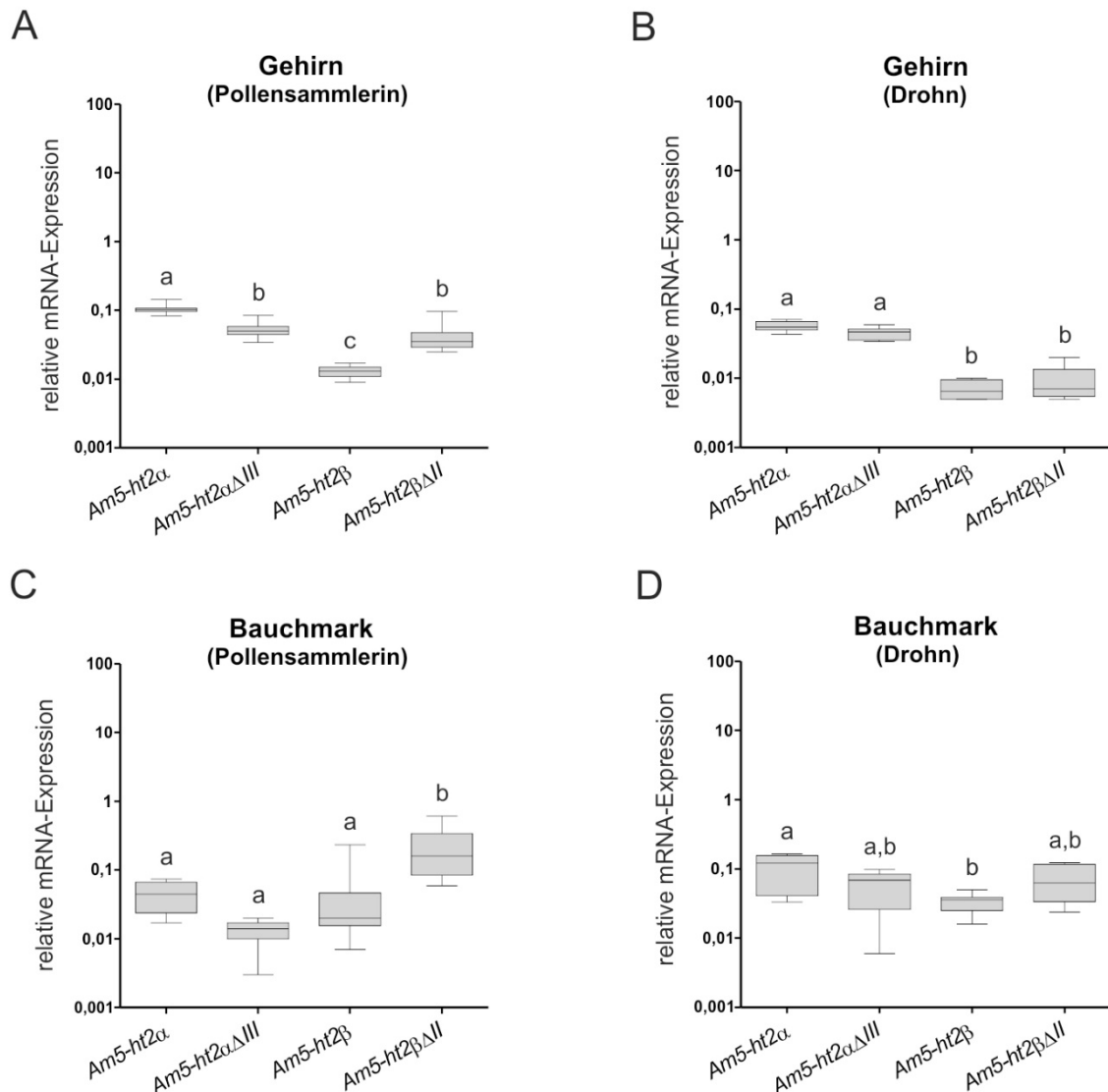


Abb. 3.2: Expressionsmuster der *Am5-ht2*-Rezeptorgene inklusive alternativer Spleißvarianten im zentralen Nervensystem, gemessen mittels qPCR. Transkript-Level wurden auf die Expression von *AmeF-1a-f1* normalisiert. **A:** Relative mRNA-Expression im Gehirn von Pollensammlerinnen (n = 11). **B:** Relative mRNA-Expression im Gehirn von Drohnen (*Am5-ht2a* und *Am5-ht2aΔIII*: n = 10; *Am5-ht2β*: n = 6; *Am5-ht2βΔII*: n = 5). **C:** Relative mRNA-Expression im Bauchmark von Pollensammlerinnen (*Am5-ht2a* und *Am5-ht2aΔIII*: n = 11; *Am5-ht2β* und *Am5-ht2βΔII*: n = 10). **D:** Relative mRNA-Expression im Bauchmark von Drohnen (*Am5-ht2a*, *Am5-ht2aΔIII* und *Am5-ht2β*: n = 7; *Am5-ht2βΔII*: n = 6). Statistik durchgeführt an log(x+1) transformierten Daten: einfaktorielles ANOVA gefolgt von Bonferronis Mehrfachvergleichstest (p < 0,05; Gruppen mit unterschiedlichen Buchstaben innerhalb eines Diagramms unterscheiden sich signifikant).

Im Bauchmark von Pollensammlerinnen (Abb. 3.2 C; einfaktorielle ANOVA: $F = 11,3$; $FG = 3$; $p < 0,0001$) lag die relative Expression der *Am5-ht2a*-mRNA bei $0,044 \pm 0,006$ und zeigte keinen signifikanten Unterschied zu den Transkripten von *Am5-ht2a Δ III* (KI = -2,590; 4,950) und *Am5-ht2 β* (KI = -3,85; 3,87). Die alternative Spleißvariante *Am5-ht2 β Δ II* wurde jedoch mit einer relativen Expression von $0,217 \pm 0,055$ 4,8-fach häufiger detektiert als die mRNA der Vollängenvariante *Am5-ht2 β* (KI = -10,200; -2,250). Dies ist vergleichbar mit dem Expressionsmuster, welches im Gehirn von Pollensammlerinnen gemessen wurde (Abb. 3.2 A).

Im Bauchmark männlicher Honigbienen (Abb. 3.2 D; einfaktorielle ANOVA: $F = 4,1$; $FG = 3$; $p = 0,019$) unterschieden sich die relativen mRNA-Expressionsstärken von *Am5-ht2a* und *Am5-ht2 β* jeweils nicht signifikant von ihren zugehörigen alternativen Spleißvarianten (*Am5-ht2a Δ III*: KI = -0,043; 4,430 und *Am5-ht2 β Δ II*: KI = -3,96; 1,100). Der Vergleich beider Vollängenvarianten miteinander zeigte eine 3,3-fach stärkere Expression der *Am5-ht2a*-mRNA gegenüber der *Am5-ht2 β* -mRNA (KI = -0,043; 5,290).

Im Zentralnervensystem von *A. mellifera* ließ sich, mit Ausnahme des Bauchmarks von Pollensammlerinnen, in allen Geweben eine stärkere Expression der Vollängen-mRNA des *Am5-ht2a*-Rezeptorgens gegenüber der Vollängen-mRNA des *Am5-ht2 β* -Rezeptorgens erkennen. Die Expression der alternativen Spleißvariante *Am5-ht2a Δ III* war im Allgemeinen gleich oder geringer als die der Vollängenvariante *Am5-ht2a*. Im Gegensatz dazu wurde die alternative Spleißvariante *Am5-ht2 β Δ II* stärker (Pollensammlerin) oder gleich stark (Drohn) exprimiert wie die Vollängenvariante *Am5-ht2 β* .

Drüsen Gewebe

Das Speicheldrüsensystem von *A. mellifera* gliedert sich morphologisch und funktionell in einen cephalen und einen thorakalen Teil (SNODGRASS 1956, CRUZ-LANDIM 1967), welche hier getrennt als Kopf- bzw. Thoraxspeicheldrüsen behandelt wurden. Zusätzlich wurden die Hypopharynx- oder Futtersaftdrüsen betrachtet.

In Kopfspeicheldrüsengewebe (Abb. 3.3 A; einfaktorielle ANOVA: $F = 14,0$; $FG = 3$; $p < 0,0001$) konnte die Rezeptor-mRNA *Am5-ht2a* sowie deren alternative Spleißvariante *Am5-ht2a Δ III* nachgewiesen werden. Die relative Expression der *Am5-ht2a*-mRNA war mit $1,319 \pm 0,375$ hierbei signifikant stärker (2,8-fach) als jene der Spleißvariante *Am5-ht2a Δ III*

(KI = 1,270; 35,100). Während die Expression der verkürzten Variante *Am5-ht2 β Δ II* mit $0,455 \pm 0,136$ gemessen wurde, konnte die Vollängen-mRNA des *Am5-ht2 β* -Gens in allen Proben von n = 7 Tieren nicht nachgewiesen werden.

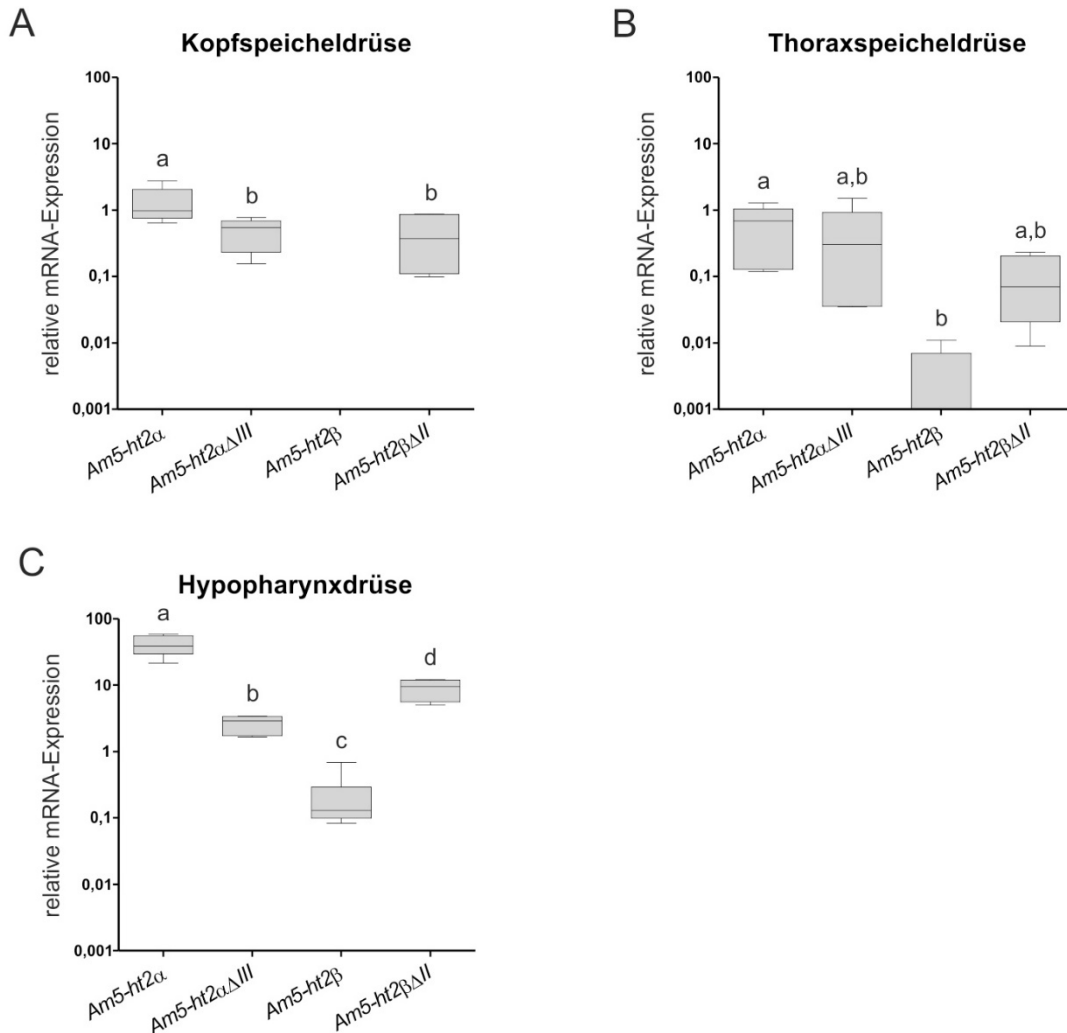


Abb. 3.3: Expressionsmuster der *Am5-ht2*-Rezeptorgene inklusive alternativer Spleißvarianten in verschiedenen Drüsengeweben von Pollensammlerinnen, gemessen mittels qPCR. Transkript-Level wurden auf die Expression von *AmeF-1a-f1* normalisiert. **A:** Relative mRNA-Expression in der Kopfspeicheldrüse (*Am5-ht2 α* und *Am5-ht2 α Δ III*: n = 5; *Am5-ht2 β* und *Am5-ht2 β Δ II*: n = 7). **B:** Relative mRNA-Expression in der Thoraxspeicheldrüse (n = 5). **C:** Relative mRNA-Expression in der Hypopharynxdrüse (*Am5-ht2 α* : n = 6; *Am5-ht2 α Δ III*: n = 5; *Am5-ht2 β* : n = 7; *Am5-ht2 β Δ II*: n = 6). Statistik durchgeführt an log(x+1) transformierten Daten: einfaktorische ANOVA gefolgt von Bonferronis Mehrfachvergleichstest ($p < 0,05$; Gruppen mit unterschiedlichen Buchstaben innerhalb eines Diagramms unterscheiden sich signifikant).

Die Expressionsstärke von *Am5-ht2a* unterschied sich in der Thoraxspeicheldrüse (Abb. 3.3 B; einfaktorielle ANOVA: $F = 4,2$; $FG = 3$; $p = 0,022$) nicht von der Spleißvariante *Am5-ht2a Δ III* (KI = -12,070; 24,930). Die mRNA der alternativen Spleißvariante *Am5-ht2 β Δ II* wurde mit $0,104 \pm 0,043$ in allen untersuchten Proben gemessen. Ähnlich der Situation im cephalen Speicheldrüsengewebe, konnte die Vollängenvariante *Am5-ht2 β* in 60% der Proben nicht nachgewiesen werden.

In Hypopharynxdrüsen wurden alle vier untersuchten Transkripte exprimiert (Abb. 3.3 C; einfaktorielle ANOVA: $F = 183,0$; $FG = 3$; $p < 0,0001$). Die *Am5-ht2a*-mRNA wurde gegenüber der Spleißvariante *Am5-ht2a Δ III* 15,8-fach stärker exprimiert (KI = 84,6; 127,0). Im Falle des *Am5-ht2 β* -Gens wurde ein umgekehrtes Expressionsmuster festgestellt: Die Vollängen-mRNA wurde 38,8-fach schwächer exprimiert als die alternative Spleißvariante *Am5-ht2 β Δ II* (-109,0; -70,1). Im Vergleich der beiden Vollängenvarianten der Rezeptorgen-mRNAs zeigte sich eine 178,7-fach stärkere Expression von *Am5-ht2a* gegenüber *Am5-ht2 β* (KI = 133,0; 172,0).

Die gefundenen mRNA-Expressionsmuster im Drüsengewebe von Pollensammlerinnen ähneln denen des Zentralnervensystems. Verglichen mit *Am5-ht2a* wurde *Am5-ht2 β* weniger stark, zum Teil überhaupt nicht, exprimiert. Während die mRNA-Expressionslevel der Spleißvariante *Am5-ht2a Δ III* niedriger als die oder gleich hoch wie die der Vollängenvariante *Am5-ht2a* waren, wurde die Spleißvariante *Am5-ht2 β Δ II* in allen untersuchten Drüsengeweben stärker als die Vollängenvariante *Am5-ht2 β* exprimiert.

Gewebe des Verdauungs- und Exkretionssystems

In Kropfgewebe wurden alle vier untersuchten Transkripte exprimiert (Abb. 3.4 A; einfaktorielle ANOVA: $F = 4,4$; $FG = 3$; $p = 0,017$). Hierbei zeigte sich kein signifikanter Unterschied zwischen den Vollängentranskripten *Am5-ht2a* und *Am5-ht2 β* (KI = -7,630; 26,600). Die Expression der alternativen Spleißvariante *Am5-ht2a Δ III* im Vergleich zur *Am5-ht2a*-mRNA war statistisch ebenso wenig unterschiedlich (KI = -26,00; 6,58), wie die der Spleißvariante *Am5-ht2 β Δ II* zur Expression der *Am5-ht2 β* -mRNA (KI = -20,60; 13,60).

In Malpighischen Gefäßen (Abb. 3.4 B; einfaktorielle ANOVA: $F = 18,5$; $FG = 3$; $p < 0,0001$) zeigten sich keine statistischen Unterschiede zwischen der Expression der *Am5-ht2a*-mRNA und *Am5-ht2a Δ III* (KI = -34,30; 6,45). Die *Am5-ht2 β* -mRNA wurde nur in 25% der untersuchten Proben detektiert. Die alternative Spleißvariante *Am5-ht2 β Δ II* wurde jedoch mit $1,046 \pm 0,356$

in allen Proben gemessen. Das Expressionsmuster der *Am5-ht2 β* - und *Am5-ht2 β Δ II*-Transkripte in Malpighischen Gefäßen zeigte Ähnlichkeiten mit dem Muster, welches in den Kopf- und Thoraxspeicheldrüsen gemessen wurde (Abb. 3.3 A und B).

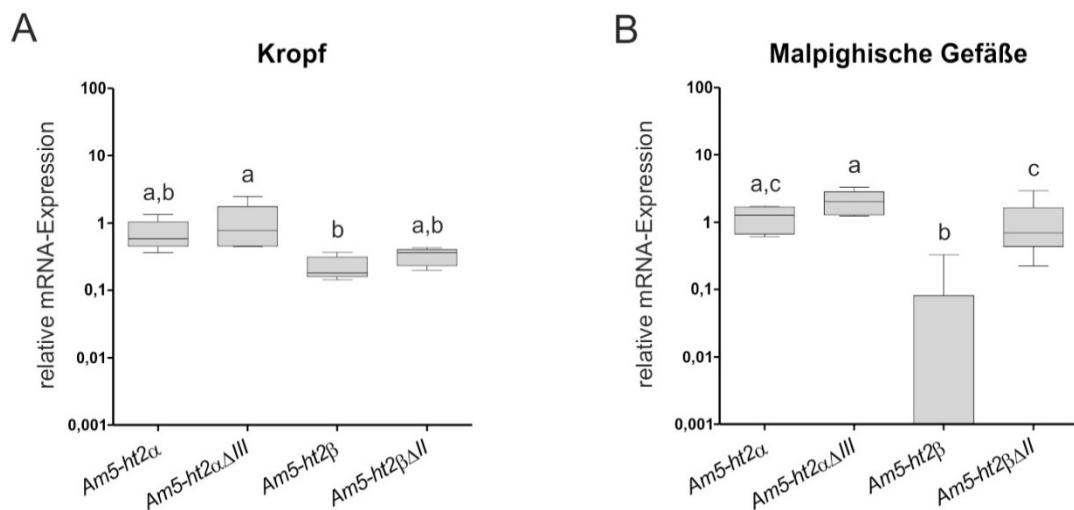


Abb. 3.4: Expressionsmuster der *Am5-ht2*-Rezeptorgene inklusive alternativer Spleißvarianten in Geweben des Verdauungs- und Exkretionssystems von Pollensammlerinnen, gemessen mittels qPCR. Transkript-Level wurden auf die Expression von *AmeF-1a-f1* normalisiert. **A:** Relative mRNA-Expression im Kropf (*Am5-ht2 α* und *Am5-ht2 α Δ III*: n = 6; *Am5-ht2 β* : n = 5; *Am5-ht2 β Δ II*: n = 6). **B:** Relative mRNA-Expression in Malpighischen Gefäßen (*Am5-ht2 α* : n = 5; *Am5-ht2 α Δ III*: n = 6; *Am5-ht2 β* : n = 8; *Am5-ht2 β Δ II*: n = 7). Statistik durchgeführt an log(x+1) transformierten Daten: einfaktorielles ANOVA gefolgt von Bonferronis Mehrfachvergleichstest ($p < 0,05$; Gruppen mit unterschiedlichen Buchstaben innerhalb eines Diagramms unterscheiden sich signifikant).

3.2 Zeitliche Expressionsmuster der 5-HT-Rezeptor-Subtypen

Entwicklungs- und tagesgangabhängige Expressionsstärken der 5-HT-Rezeptor-Subtypen wurden im Gehirn von Arbeiterinnen untersucht. Der Fokus lag zunächst auf der Überprüfung der Hypothese, dass sich die Expression der Rezeptor-mRNA in verschieden alten Arbeiterinnen unterscheidet. Anschließend wurden Veränderungen der Rezeptorgenexpression im Tagesverlauf bei unterschiedlichen Bedingungen betrachtet.

Durch die Verfügbarkeit eines Antikörpers gegen das Am5-HT_{1A}-Rezeptorprotein (THAMM et al. 2010) konnte zusätzlich dessen Expression anhand von quantitativen Western Blot-Analysen untersucht werden.

3.2.1 Altersabhängige Expression der 5-HT-Rezeptorgene *Am5-ht1A*, *Am5-ht2a*, *Am5-ht2β* und *Am5-ht7* im Gehirn

Anhand von qPCR-Messungen wurden Unterschiede in der mRNA-Expression der 5-HT-Rezeptorgene in Gehirngewebe von 5 und 20 Tage alten Arbeiterinnen untersucht. Alle verwendeten 5 Tage alten Tiere wiesen bei der Präparation vergrößerte Acini der Hypopharynxdrüsen auf und wurden demnach als Ammenbienen betrachtet (DESEYN & BILLEN 2005). Die für die Untersuchung verwendeten 20 Tage alten Tiere besaßen Pollen in den Corbiculae und wurden demnach als Pollensammlerinnen klassifiziert.

Es zeigten sich keine statistisch signifikanten Unterschiede in der mRNA-Expression von *Am5-ht1A* (KI = -0,028; 0,004), *Am5-ht2a* (KI = -0,009; 0,023), *Am5-ht2β* (KI = -0,016; 0,016) oder *Am5-ht7* (KI = -0,015; 0,017) zwischen 5 und 20 Tage alten Arbeiterinnen (Abb. 3.5; einfaktorielle ANOVA: $F = 166,0$; $FG = 7$; $p < 0,0001$).

Für Vergleiche der verschiedenen Rezeptorgen-Transkripte miteinander im Gehirn von Pollensammlerinnen siehe Abschnitt 3.1.1 und Abb. 3.1 A.

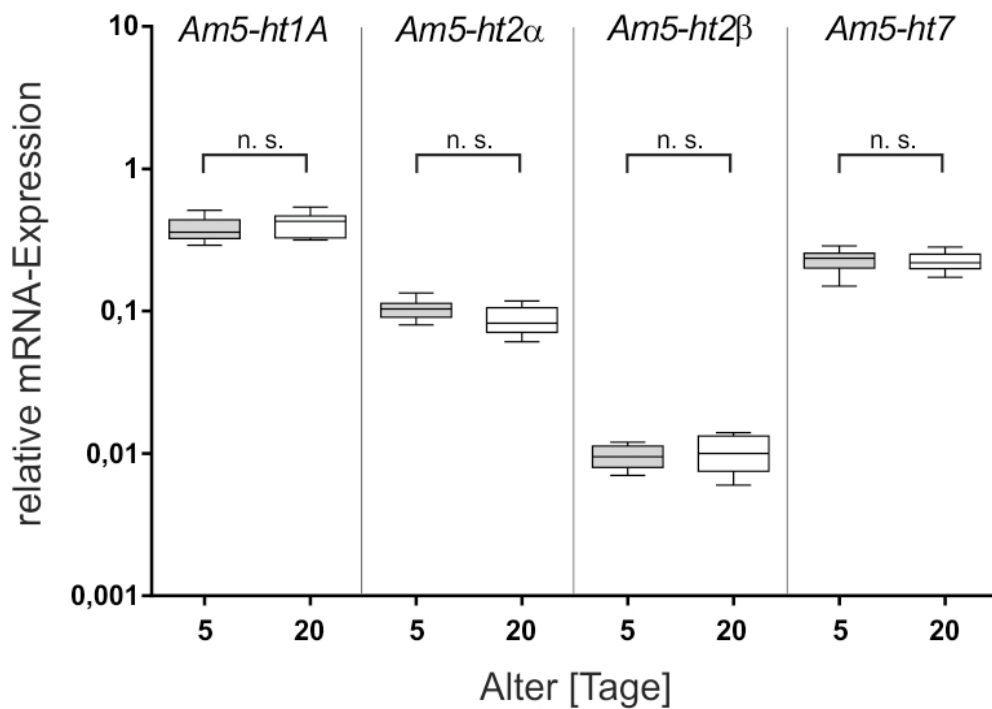


Abb. 3.5: Relative mRNA-Expression der *Am5-ht*-Rezeptorgene im Gehirn von 5 und 20 Tage alten Arbeiterinnen, gemessen mittels qPCR. Transkript-Level wurden auf die Expression von *Ameft-1a-f1* normalisiert. $n = 10$. Statistik durchgeführt an $\log(x+1)$ transformierten Daten: einfaktorische ANOVA gefolgt von Bonferronis Mehrfachvergleichstest ($p \leq 0,05$; n. s. = nicht signifikant). Für Vergleiche zwischen verschiedenen Rezeptorgenen-Transkripten siehe Abb. 3.1 A im Abschnitt 3.1.1.

3.2.2 Altersabhängige Expression des Am5-HT_{1A}-Rezeptorproteins im Gehirn

Die Expression des Am5-HT_{1A}-Proteins wurde in Gehirnen von 6 und 21 Tage alten Arbeiterinnen mittels quantitativen Western Blots untersucht (Abb. 3.6). Der Am5-HT_{1A}-Rezeptor wurde in 6 Tage alten Tieren mit einer relativen Expression von $1,103 \pm 0,118$ nachgewiesen. In 21 Tage alten Bienen stieg die Expression um das 2,7-Fache auf $2,947 \pm 0,590$ an (t-Test für unabhängige Stichproben: $t = 3,065$; FG = 22; $p = 0,006$). Hierin unterschied sich die Expression von Am5-HT_{1A} auf Protein- und mRNA-Ebene, wo keine Unterschiede zwischen jungen und alten Bienen festgestellt wurden (siehe 3.2.1).

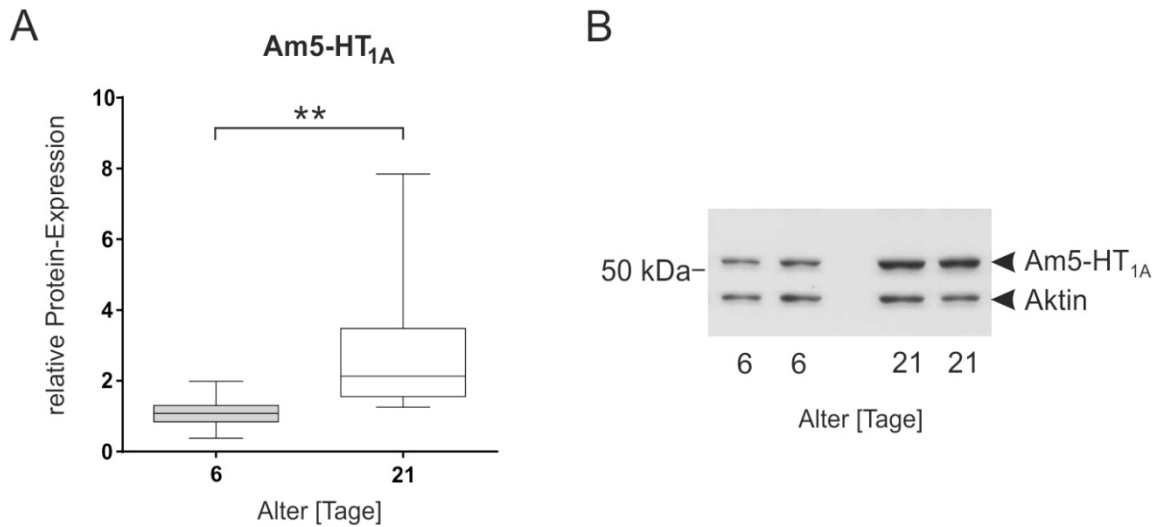


Abb. 3.6: Relative Expression des Am5-HT_{1A}-Rezeptorproteins im Gehirn von 6 und 21 Tage alten Arbeiterinnen, gemessen mittels quantitativem Western Blot. A: Am5-HT_{1A}-Expression wurde auf AmAktin-Expression normalisiert. n = 10. t-Test für unabhängige Stichproben (**p ≤ 0,01). **B:** Western Blot (exemplarische Darstellung), Primärantikörper: αAm5-HT_{1A}, 1:3.000 und αGdAktin, 1:10.000, Sekundärantikörper: *goat-anti-rabbit*-HRP, 1:20.000 und *goat-anti-mouse*-HRP, 1:20.000, 2 min Belichtungszeit.

3.2.3 Tageszeitliche Expression der 5-HT-Rezeptorgene *Am5-ht1A*, *Am5-ht2a*, *Am5-ht2β* und *Am5-ht7* im Gehirn

Expression in kompletten Gehirnen von 5 und 20 Tage alten Arbeiterinnen unter Freilandbedingungen

Für die Untersuchung der 5-HT-Rezeptorgenexpression im Tagesverlauf wurden Gehirne von 5 und 20 Tage alten Arbeiterinnen zu je sechs Zeitpunkten im Abstand von vier Stunden präpariert und mittels qPCR gemessen (Abb. 3.7). Die Versuchstiere wurden unter Freilandbedingungen gehalten.

Die mRNA-Expression des *Am5-ht1A*-Gens unterschied sich signifikant im Tagesverlauf, sowohl bei 5 Tage (einfaktorielle ANOVA: F = 8,5; FG = 29; p < 0,0001) als auch 20 Tage alten Tieren (einfaktorielle ANOVA: F = 14,0; FG = 29; p < 0,0001). Hierbei lag das maximal gemessene Expressionslevel 1,48-fach (5 Tage alt) sowie 1,46-fach (20 Tage alt) über dem niedrigsten Level. Ein kontinuierlicher Trend in Bezug auf die Tageszeit war nicht erkennbar, vielmehr zeigten sich zwei Maxima bei 10:00 Uhr und 22:00 Uhr (Abb. 3.7 A).

Demgegenüber zeigten sich deutliche Änderungen der *Am5-ht2a*-mRNA-Expression im Tagesverlauf, bei 5 Tage alten (einfaktorielle ANOVA: $F = 28,3$; $FG = 29$; $p < 0,0001$) ebenso wie bei 20 Tage alten Tieren (einfaktorielle ANOVA: $F = 25,4$; $FG = 29$; $p < 0,0001$). Während die Expression während des Tages zwischen 10:00 und 18:00 Uhr um das 2,2-Fache zunahm, zeigte sich im Verlauf der Nacht zwischen 18:00 und 10:00 Uhr eine Abnahme der Expression (Abb. 3.7 B).

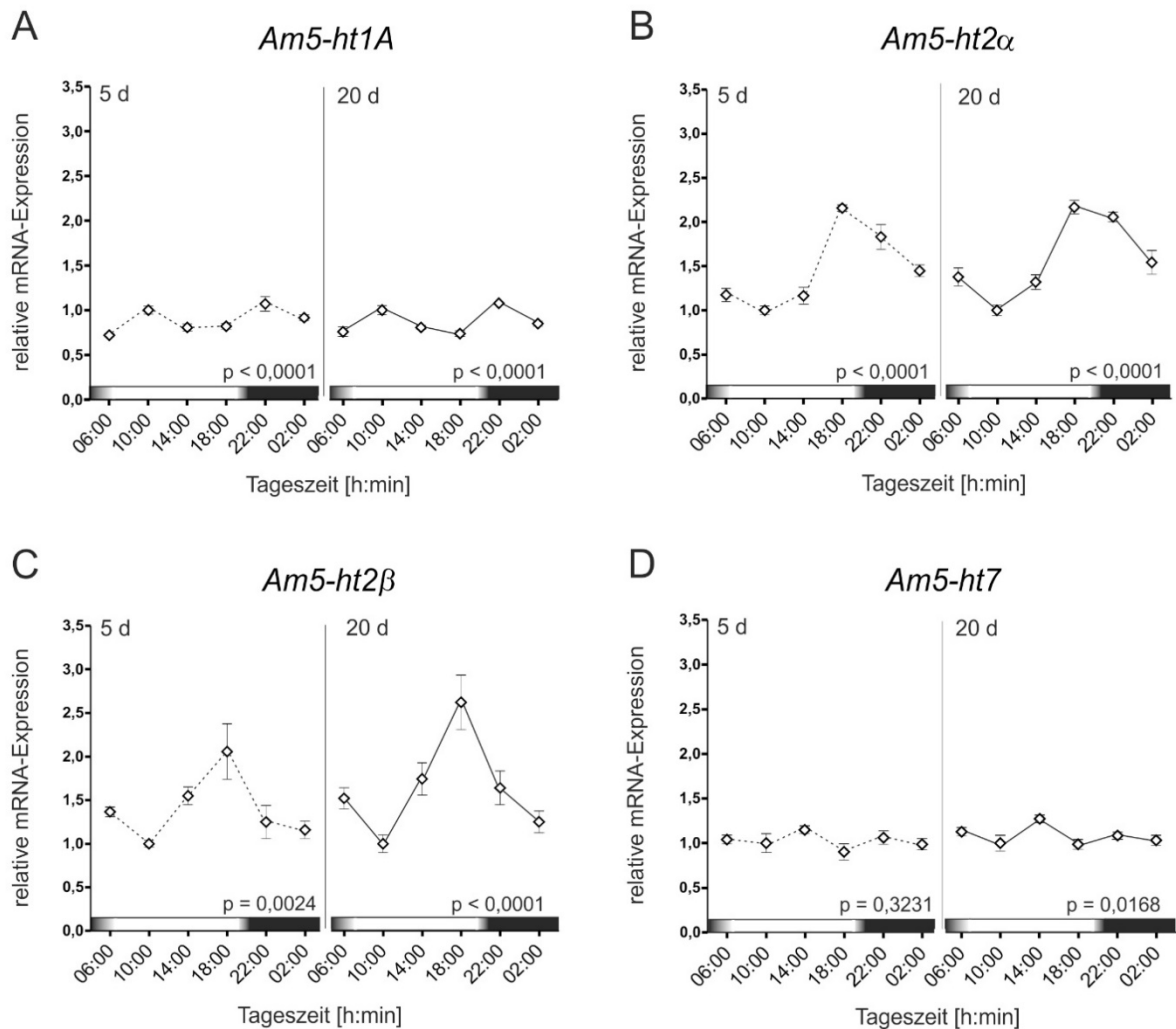


Abb. 3.7: Tageszeitlicher Verlauf der relativen Expression der *Am5-ht*-Rezeptorgene im Gehirn von 5 und 20 Tage alten Arbeiterinnen unter Freilandbedingungen (24. April – 9. Mai 2012), gemessen mittels qPCR. Transkript-Level wurden auf die Expression von *Ame1a-f1* normalisiert. Alle Werte wurden auf den jeweiligen Mittelwert von 10:00 Uhr = 1 bezogen. **A:** Relative mRNA-Expression von *Am5-ht1A*. **B:** Relative mRNA-Expression von *Am5-ht2a*. **C:** Relative mRNA-Expression von *Am5-ht2β*. **D:** Relative mRNA-Expression von *Am5-ht7*. Jeweils $n = 5$ pro Zeitpunkt. Einfaktorielle ANOVA (p -Werte in den Diagrammen dargestellt). Boxen über Abszisse repräsentieren die Lichtbedingungen: hell = Tag; dunkel = Nacht, Übergänge stellen Dämmerungsphasen während Sonnenauf- und -untergang dar.

Ein zu *Am5-ht2a* ähnliches tageszeitliches Expressionsmuster wurde auch für *Am5-ht2β* nachgewiesen (Abb. 3.7 C). Bei 5 Tage alten Bienen nahm die mRNA-Expression am Tag zwischen 10:00 und 18:00 Uhr um das 2,1-Fache zu und reduzierte sich im Verlauf der Nacht wieder (einfaktorielle ANOVA: $F = 5,1$; $FG = 29$; $p = 0,002$). Dies wurde auch bei 20 Tage alten Versuchstieren beobachtet (einfaktorielle ANOVA: $F = 8,9$; $FG = 29$; $p < 0,0001$). Hier stieg die mRNA-Expression zwischen 10:00 und 18:00 Uhr um das 2,6-Fache.

Die mRNA-Expression von *Am5-ht7* änderte sich hingegen bei 5 Tage alten Tieren nicht signifikant im Tagesverlauf (einfaktorielle ANOVA: $F = 1,2$; $FG = 29$; $p = 0,323$). Bei 20 Tage alten Bienen konnte zwar statistisch eine signifikante Expressionsänderung mit einem Expressionspeak um 14:00 festgestellt werden (einfaktorielle ANOVA: $F = 3,5$; $FG = 29$; $p = 0,017$), jedoch umfasste die Differenz der Änderung lediglich das 1,3-Fache des am geringsten gemessenen mRNA-Levels um 18:00 (Abb. 3.7 D). Es konnte kein genereller tageszeitlicher Trend gefunden werden.

Expression in Zentralgehirn und optischen Loben von 20 Tage alten Arbeiterinnen unter Freilandbedingungen

Es erfolgte die Untersuchung der 5-HT-Rezeptorgenexpression im Tagesverlauf im Zentralgehirn und in den optischen Loben von 20 Tage alten Arbeiterinnen (Abb. 3.8). Hierdurch wurde die Hypothese bearbeitet, dass es Expressionsmusterunterschiede in verschiedenen Gehirnbereichen geben könnte. Als Zentralgehirn wurde hier das Gehirn nach Entfernung der optischen Loben definiert. Die Gewebepreparation erfolgte zu je sechs Zeitpunkten im Abstand von vier Stunden. Es wurden dieselben Zeitpunkte wie bei der Untersuchung der tageszeitlichen Expression in kompletten Gehirnen gewählt. Die Versuchstiere wurden unter Freilandbedingungen gehalten. Es ist darauf hinzuweisen, dass die Präparation der Tiere später im Jahr erfolgte als bei der Untersuchung mit kompletten Gehirnen. Daraus resultierte eine um etwa 2 Stunden verkürzte Tageslänge aufgrund verschobener Sonnenauf- und -untergangszeiten.

Im Zentralgehirn ließ sich eine Änderung der *Am5-ht1A*-Expression im Tagesverlauf feststellen (einfaktorielle ANOVA: $F = 12,3$; $FG = 29$; $p < 0,0001$). Hierbei stieg das mRNA-Level während des Tages zwischen 06:00 und 18:00 Uhr um das 1,7-Fache und fiel in der Nacht wieder ab (Abb. 3.8 A). In den optischen Loben blieb die Expression der *Am5-ht1A*-mRNA

zwischen 06:00 und 18:00 relativ konstant, zeigte jedoch einen Abfall um das 1,3-Fache zwischen 18:00 und 22:00 Uhr (einfaktorielle ANOVA: $F = 4,4$; $FG = 29$; $p = 0,006$).

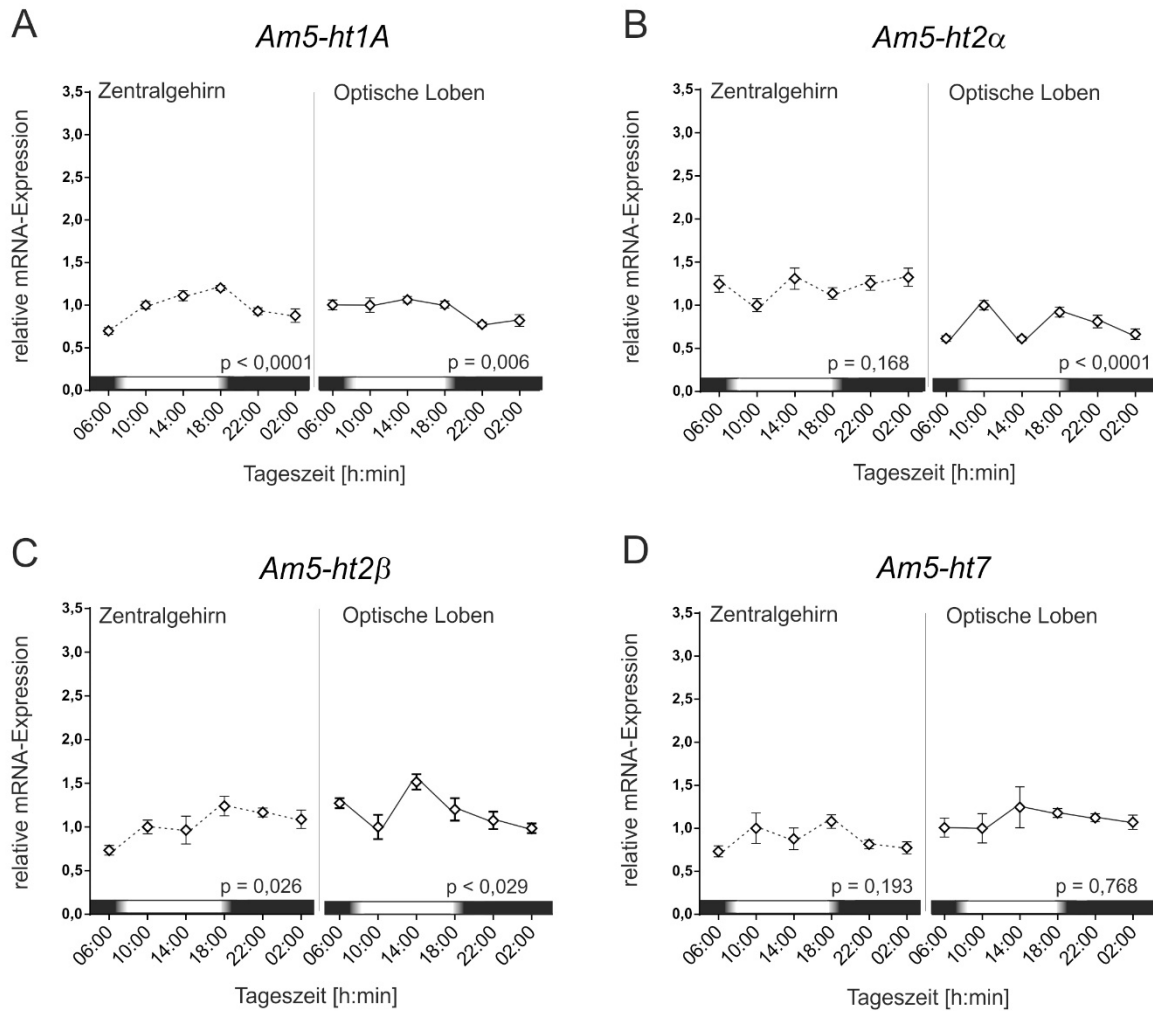


Abb. 3.8: Tageszeitlicher Verlauf der relativen Expression der *Am5-ht*-Rezeptorgene in Zentralgehirn und optischen Loben von 20 Tage alten Arbeiterinnen unter Freilandbedingungen (10. - 25. September 2013), gemessen mittels qPCR. Transkript-Level wurden auf die Expression von *AmeF-1a-f1* normalisiert. Alle Werte wurden auf den jeweiligen Mittelwert von 10:00 Uhr = 1 bezogen. **A:** Relative mRNA-Expression von *Am5-ht1A*. **B:** Relative mRNA-Expression von *Am5-ht2α*. **C:** Relative mRNA-Expression von *Am5-ht2β*. **D:** Relative mRNA-Expression von *Am5-ht7*. Jeweils $n = 5$ pro Zeitpunkt. Einfaktorielle ANOVA (p -Werte in den Diagrammen dargestellt). Boxen über Abszisse repräsentieren die Lichtbedingungen: hell = Tag; dunkel = Nacht, Übergänge stellen Dämmerungsphasen während Sonnenauf- und -untergang dar.

Die mRNA-Expression des *Am5-ht2a*-Gens zeigte keine statistisch signifikante Veränderung während des Tagesverlaufs im Zentralgehirn (einfaktorielle ANOVA: $F = 1,7$; $FG = 29$; $p = 0,168$). In den optischen Loben änderte sich der *Am5-ht2a*-mRNA-Titer (einfaktorielle ANOVA: $F = 9,9$; $FG = 29$; $p < 0,0001$). Ein kontinuierlicher Trend konnte lediglich in der Nacht zwischen 18:00 und 06:00 festgestellt werden, wo die Expression um das 1,5-Fache zurückging (Abb. 3.8 B).

Die *Am5-ht2 β* -mRNA unterschied sich im Tagesverlauf sowohl im Zentralgehirn (einfaktorielle ANOVA: $F = 3,1$; $FG = 29$; $p = 0,026$), als auch in den optischen Loben (einfaktorielle ANOVA: $F = 3,1$; $FG = 29$; $p = 0,029$). In beiden Gehirnbereichen stieg die Expression während des Tages um das 1,5 – 1,7-Fache an und fiel anschließend während der Nacht wieder ab (Abb. 3.8 C).

Es wurden keine statistisch signifikanten Änderungen der *Am5-ht7*-mRNA im Tagesverlauf nachgewiesen (Abb. 3.8 D), weder im Zentralgehirn (einfaktorielle ANOVA: $F = 1,6$; $FG = 29$; $p = 0,193$) noch in den optischen Loben (einfaktorielle ANOVA: $F = 0,5$; $FG = 29$; $p = 0,768$).

Expression in Zentralgehirn und optischen Loben von 20 Tage alten Arbeiterinnen unter konstanten Bedingungen

Zur Prüfung der Hypothese, dass die zum Teil im Freiland beobachteten Änderungen der *Am5-ht*-Rezeptorgenexpressionen im Tagesverlauf (siehe oben) Ausdruck endogener circadianer Rhythmen darstellen, wurden Arbeiterinnen unter konstanten Bedingungen (Dauerdunkel, konstante relative Luftfeuchtigkeit) gehalten. Im Alter von 20 Tagen erfolgte die Präparation von Zentralgehirn und optischen Loben, in welchen die *Am5-ht*-mRNA-Expression mittels qPCR gemessen wurde. Alle in die Untersuchung einbezogenen Tiere zeigten einen freilaufenden, circadianen Rhythmus der lokomotorischen Aktivität (Abb. 3.9).

Die Expression von *Am5-ht1A* zeigte keine statistisch signifikante Änderung im Zentralgehirn im Verlauf des Tages unter konstanten Bedingungen (einfaktorielle ANOVA: $F = 1,5$; $FG = 29$; $p = 0,245$). Im Gewebe der optischen Loben zeigte sich eine signifikante Änderung (einfaktorielle ANOVA: $F = 4,8$; $FG = 29$; $p = 0,004$), welche mit 1,1-fach relativ schwach ausgeprägt war (Abb. 3.10 A).

Weder im Zentralgehirn (einfaktorielle ANOVA: $F = 0,5$; $FG = 29$; $p = 0,786$), noch in den optischen Loben (einfaktorielle ANOVA: $F = 0,9$; $FG = 29$; $p = 0,475$) konnte eine tageszeitliche Änderung der *Am5-ht2a*-Expression festgestellt werden (Abb. 3.10 B).

Das *Am5-ht2 β* -Gen unterlag im Zentralgehirn einer tageszeitlichen mRNA-Expressionsänderung (einfaktorielle ANOVA: $F = 3,1$; $FG = 29$; $p = 0,031$), welche jedoch keinen kontinuierlich rhythmischen Verlauf zeigte und eher Schwankungscharakter aufwies (Abb. 3.10 C). In den optischen Loben wurden keine Unterschiede der *Am5-ht2 β* -mRNA-Expression zu verschiedenen Tageszeitpunkten festgestellt (einfaktorielle ANOVA: $F = 1,8$; $FG = 29$; $p = 0,143$).

Ein zu *Am5-ht2 β* ähnliches Expressionsmuster wurde auch für das *Am5-ht7*-Gen gemessen (Abb. 3.10 D). Im Zentralgehirn zeigte sich eine diskontinuierliche, wenngleich statistisch signifikante Änderung der mRNA-Level (einfaktorielle ANOVA: $F = 10,7$; $FG = 29$; $p < 0,0001$). In den optischen Loben wurde keine Expressionsänderung im Tagesverlauf unter konstanten Bedingungen festgestellt (einfaktorielle ANOVA: $F = 2,2$; $FG = 29$; $p = 0,093$).

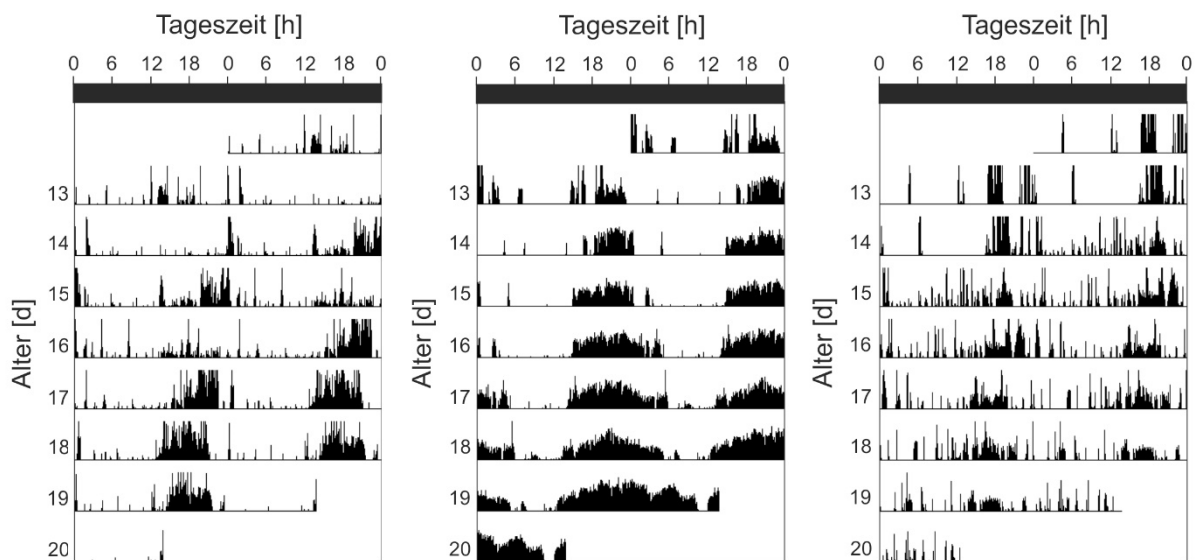


Abb. 3.9: Exemplarische Darstellung der lokomotorischen Aktivität dreier Versuchstiere im Dauerdunkel, welche für die qPCR-Messungen der *Am5-ht*-Rezeptorgene im Tagesverlauf unter konstanten Bedingungen verwendet wurden. Beispiele aus $n = 30$. Darstellung der Daten als Doppelplot-Aktogramme (aufeinanderfolgende Tage sind nebeneinander und untereinander aufgetragen), dunkle Boxen über Aktogrammen repräsentieren die Lichtbedingungen = Dauerdunkel.

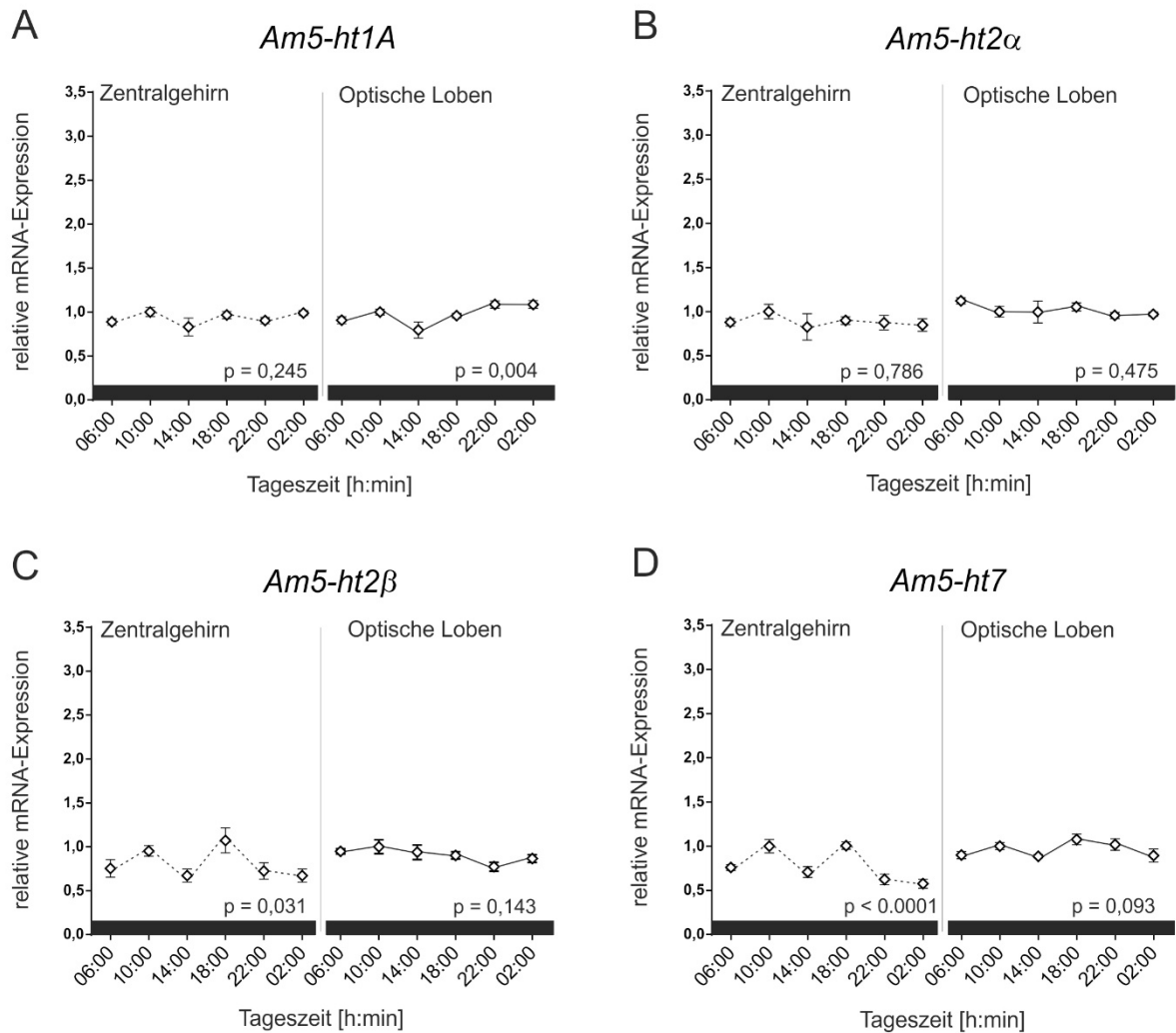


Abb. 3.10: Tageszeitlicher Verlauf der relativen Expression der *Am5-ht*-Rezeptorgene in Zentralgehirn und optischen Loben von 20 Tage alten Arbeiterinnen unter konstanten Bedingungen (Dauerdunkel, relative Luftfeuchtigkeit), gemessen mittels qPCR. Transkript-Level wurden auf die Expression von *Amef-1a-f1* normalisiert. Alle Werte wurden auf den jeweiligen Mittelwert von 10:00 Uhr = 1 bezogen. **A:** Relative mRNA-Expression von *Am5-ht1A*. **B:** Relative mRNA-Expression von *Am5-ht2a*. **C:** Relative mRNA-Expression von *Am5-ht2β*. **D:** Relative mRNA-Expression von *Am5-ht7*. Jeweils n = 5 pro Zeitpunkt. Einfaktorielle ANOVA (p-Werte in den Diagrammen dargestellt). dunkle Boxen über Abszisse repräsentieren die Lichtbedingungen = Dauerdunkel.

3.2.4 Tageszeitliche Expression des Am5-HT_{1A}-Rezeptorproteins im Gehirn

Mithilfe von quantitativen Western Blots wurde die tageszeitliche Expression des Am5-HT_{1A}-Proteins in kompletten Gehirnen von 6 und 21 Tage alten Arbeiterinnen untersucht (Abb. 3.11). Die Tiere wurden unter Freilandbedingungen gehalten und jeweils einen Tag später präpariert, als diejenigen Bienen, welche für die qPCR-Messungen der *Am5-HT*-Rezeptorgene (siehe 3.2.3; Abb. 3.7) verwendet wurden.

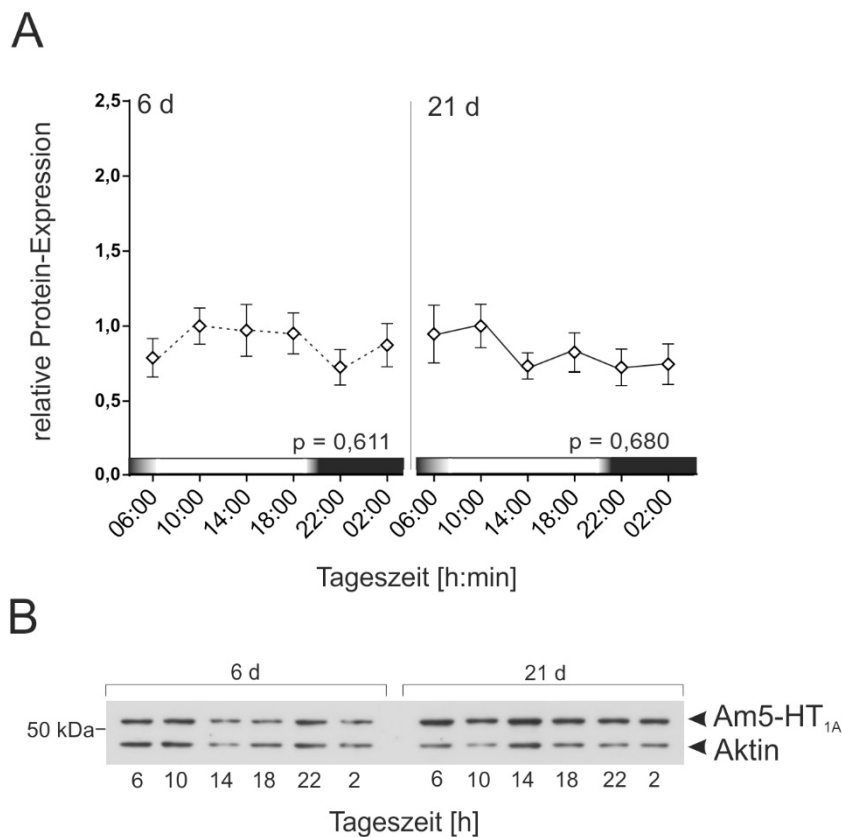


Abb. 3.11: Tageszeitlicher Verlauf der relativen Expression des Am5-HT_{1A}-Rezeptorproteins im Gehirn von 6 bzw. 21 Tage alten Arbeiterinnen unter Freilandbedingungen (25. April – 10. Mai 2012), gemessen mittels quantitativem Western Blot. A: Am5-HT_{1A}-Expression wurde auf AmAktin-Expression normalisiert. n = 5 pro Zeitpunkt. Einfaktorielle ANOVA (p-Werte in den Diagrammen dargestellt), Boxen über Abszisse repräsentieren die Lichtbedingungen: hell = Tag, dunkel = Nacht, Übergänge stellen Dämmerungsphasen während Sonnenauf- und -untergang dar **B:** Western Blot (exemplarische Darstellung), Primärantikörper: αAm5-HT_{1A}, 1:3.000 und αGdAktin, 1:10.000, Sekundärantikörper: *goat-anti-rabbit*-HRP, 1:20.000 und *goat-anti-mouse*-HRP, 1:20.000, 2 min Belichtungszeit.

In Gehirnen 6 Tage alter Tiere zeigten sich keine statistisch signifikanten Expressionsunterschiede zu verschiedenen Tageszeitpunkten (einfaktorielle ANOVA: $F = 0,726$; $FG = 29$; $p = 0,611$). Ebenso zeigte das Am5-HT_{1A}-Rezeptorprotein keine signifikante Veränderung im Tagesverlauf in 21 Tage alten Tieren (einfaktorielle ANOVA: $F = 0,628$; $FG = 29$; $p = 0,680$).

3.3 Generierung und Testung polyklonaler Antikörper gegen das Am5-HT_{2β}-Rezeptorprotein

Mithilfe spezifischer Antikörper gegen das Am5-HT_{2β}-Rezeptorprotein wäre eine umfassendere Beantwortung expressionsbezogener Fragestellungen möglich. Es wurde der Versuch unternommen, polyklonale Antikörper gegen zwei in der dritten cytoplasmatischen Schleife des Am5-HT_{2β}-Rezeptorproteins befindliche Antigenregionen (Antigen 1 und Antigen 2) zu generieren. Die von je zwei Kaninchen (hier jeweils als Tier 1 und Tier 2 bezeichnet) gewonnenen Immunsereen wurden affinitätschromatographisch aufgereinigt und in Western Blots getestet, um die Spezifität der Antikörperpopulationen zu beurteilen.

Die Antigenregionen wurden so gewählt, dass sowohl das Volllängenprotein Am5-HT_{2β}, als auch die durch alternatives Splicing entstandene verkürzte Variante Am5-HT_{2β}ΔII von den Antikörpern gebunden werden konnte. Dies diente der Prüfung der Hypothese, dass Am5-HT_{2β}ΔII *in vivo* als Protein vorliegt. Die erwarteten Molekulargewichte wurden mit Am5-HT_{2β} = 80 kDa und Am5-HT_{2β}ΔII = 54 kDa berechnet.

Zunächst erfolgte der Test der Antikörper auf *A. mellifera*-Gehirngewebe. Antikörper, gerichtet gegen das Antigen 1, wurden nur von Tier 1 weitergehend getestet, da das Antiserum von Tier 2 viele unspezifische Proteinmarkierungen im Western Blot zeigte (nicht dargestellt) und verworfen wurde. Die getesteten Antikörper gegen Antigen 1 (Tier 1) markierten eine Proteinbande mit einem Molekulargewicht von ca. 80 kDa. Eine Bande mit gleichem Molekulargewicht wurde auch von Antikörpern gegen das Antigen 2 (sowohl aus Tier 1 als auch Tier 2) markiert. Zusätzlich markierten die Antikörper gegen Antigen 2 eine Proteinbande bei ca. 65 kDa, welche nicht von Antikörpern gegen Antigen 1 markiert wurde (Abb. 3.12 A). Die Proteinbanden wurden schwächer oder gar nicht von Antikörpern gegen Antigen 1 und Antigen 2 markiert, wenn die Antikörperlösungen zuvor mit dem jeweiligen

Antigen-MBP-Fusionsprotein präadsorbiert wurden. Dieser Effekt war konzentrationsabhängig (Abb. 3.12 B und C).

Als G-Protein gekoppelter Rezeptor (GPCR) wurde eine Membranassoziation des Am5-HT_{2β}-Proteins erwartet. Nach Fraktionierung von Gehirnhomogenaten in eine cytosolische und eine Membranfraktion, markierten Antikörper gegen Antigen 1 und Antigen 2 Proteinbanden in beiden Fraktionen etwa gleich stark. Eine Deglykosylierung der Membranfraktion durch PNGase F bewirkte hierbei keine Abnahme des Molekulargewichts, wie es häufig bei GPCRs beobachtet werden kann (Abb. 3.12 D und E).

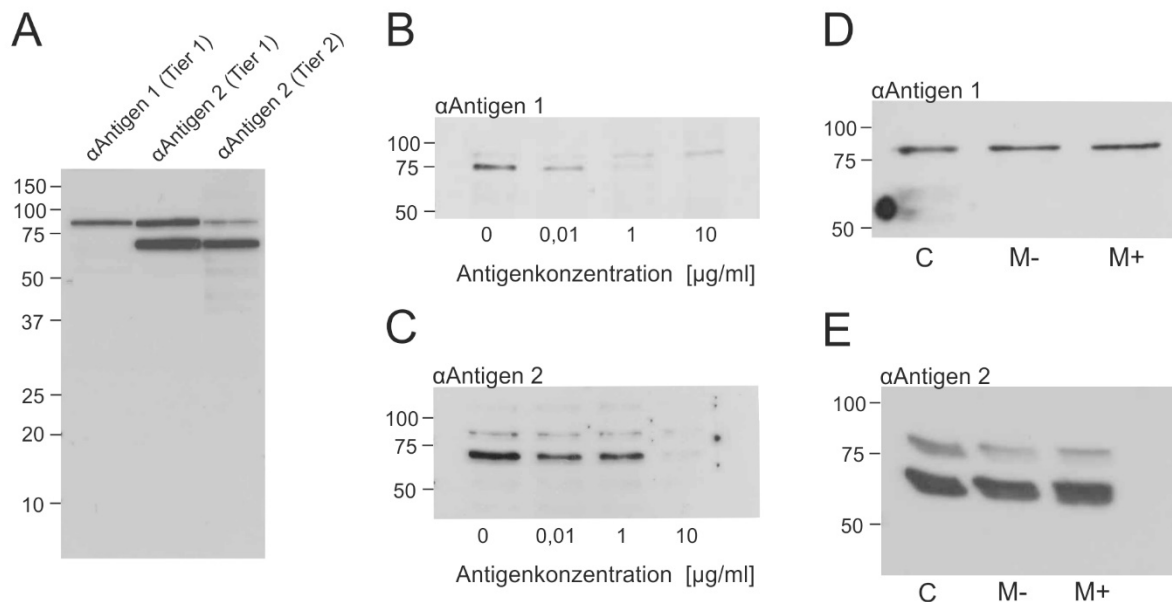


Abb. 3.12: Western Blot Analysen zur Beurteilung der Spezifität der generierten und aufgereinigten Antikörper gegen das Am5-HT_{2β}-Rezeptorprotein. **A:** Test der Antikörper gegen Antigen 1 und Antigen 2 auf Gehirnhomogenaten. αAntigen 1 (Tier 1): 1:10.000; αAntigen 2 (Tier 1): 1:18.000; αAntigen 2 (Tier 2): 1:3.000. **B:** Präadsorptionsexperiment: Test des Antikörpers gegen Antigen 1 (1:5.000) auf Gehirnhomogenaten. Antikörperlösungen präadsorbiert mit verschiedenen Antigen 1-MBP-Fusionsprotein-Konzentrationen. **C:** Präadsorptionsexperiment: Test des Antikörpers gegen Antigen 2 (1:10.000) auf Gehirnhomogenaten. Antikörperlösungen präadsorbiert mit verschiedenen Antigen 2-MBP-Fusionsprotein-Konzentrationen. **D:** Test des Antikörpers gegen Antigen 1 (1:10.000) auf fraktionierten und zum Teil deglykosylierten Gehirnhomogenaten **E:** Test des Antikörpers gegen Antigen 2 (1:13.000) auf fraktionierten und zum Teil deglykosylierten Gehirnhomogenaten.

C = cytosolische Fraktion; M- = Membranfraktion ohne PNGase F-Behandlung; M+ = Membranfraktion nach PNGase F-Behandlung. Verwendeter Sekundärantikörper jeweils *goat-anti-rabbit*-HRP, 1:10.000. Molekulargewichtangaben in kDa.

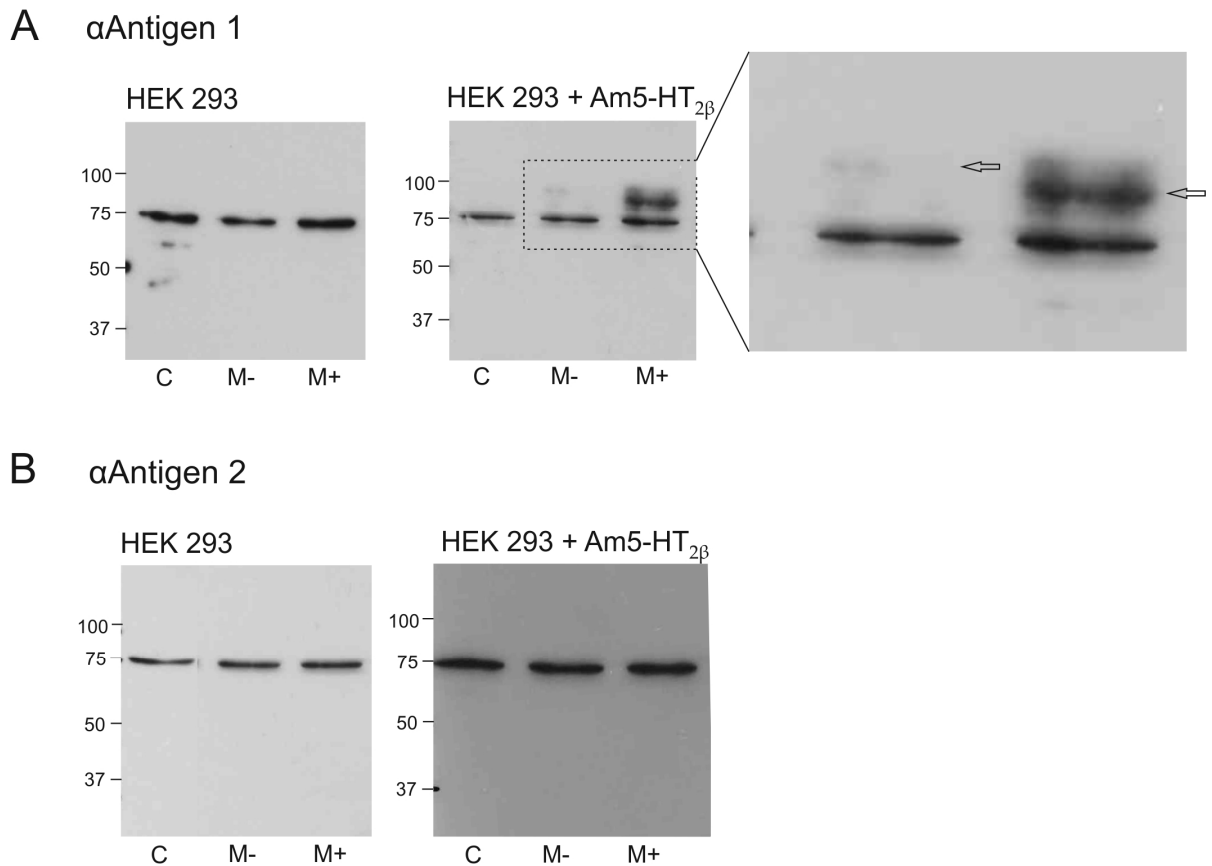


Abb. 3.13: Western Blot Analysen zur Beurteilung der Spezifität der aufgereinigten Antikörper gegen das Am5-HT_{2β}-Rezeptorprotein. A: Test des Antikörper gegen Antigen 1 (1:10.000) auf fraktionierten und zum Teil deglykosylierten HEK 293-Homogenaten (nicht-transfiziert und mit *Am5-ht2β* transfiziert). Pfeile zeigen Proteinbanden, welche vom Antikörper in Homogenaten transfizierter Zellen, jedoch nicht in nicht-transfizierten Zellen markiert werden. **B:** Test des Antikörper gegen Antigen 2 (1:20.000) auf fraktionierten und zum Teil deglykosylierten HEK 293-Homogenaten (nicht-transfiziert und mit *Am5-ht2β* transfiziert).

C = cytosolische Fraktion; M- = Membranfraktion ohne PNGase F-Behandlung; M+ = Membranfraktion nach PNGase F-Behandlung. Verwendeter Sekundärantikörper jeweils *goat-anti-rabbit*-HRP, 1:10.000. Molekulargewichtsangaben in kDa.

Die Antikörper wurden des Weiteren an menschlichen embryonalen Nierenzellen (HEK 293) im Western Blot getestet. Diese Zellen wurden entweder nicht-transfiziert verwendet oder zuvor mit einem Am5-HT_{2β}-Expressionskonstrukt transfiziert (freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Prof. Dr. Arnd BAUMANN, Forschungszentrum Jülich). Die transfizierten Zellen waren in der Lage, das vollständige Am5-HT_{2β}-Protein zu exprimieren, jedoch nicht die verkürzte Variante Am5-HT_{2β}ΔII. Antikörper gegen das Antigen 1 markierten

sowohl in nicht transfizierten als auch transfizierten HEK 293-Zellen Proteinbanden bei ca. 75 kDa. Diese traten sowohl in der cytosolischen, als auch Membranfraktion auf. Eine Molekulargewichtsverschiebung durch PNGase F-Verdau wurde nicht beobachtet. Jedoch wurde in transfizierten Zellen zusätzlich eine Bande bei ca. 90 kDa markiert, welche durch Deglykosylierung mit PNGase F eine Reduktion des Molekulargewichts auf ca. 80 kDa zeigte. Zudem wurde diese Bande in deglykosylierten Proben deutlicher markiert, was auf eine Behinderung der Antikörperbindung durch Glykosylierungen hindeutete (Abb. 3.13 A). Es ließ sich schlussfolgern, dass Antikörper gegen das Antigen 1 tatsächlich zum Binden des hier heterolog exprimierten Am5-HT_{2β}-Proteins fähig sind. Analog zu Antikörpern gegen Antigen 1 markierten Antikörper gegen das Antigen 2 Proteinbanden bei ca. 75 kDa in der cytosolischen und Membranfraktion, welche sowohl bei nicht-transfizierten als auch bei transfizierten HEK 293-Zellen auftraten. Eine Molekulargewichtsverschiebung durch PNGase F-Verdau war auch hierbei nicht nachweisbar (Abb. 3.13 B). Im Gegensatz zu Antikörpern gegen Antigen 1 wurde keine weitere Bande bei transfizierten Zellen markiert.

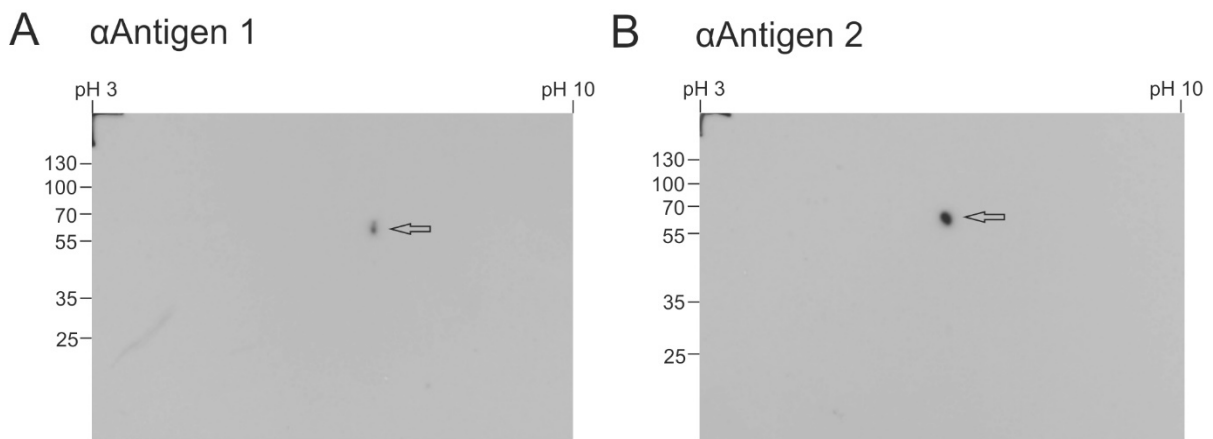


Abb. 3.14: 2D-Western Blot-Analysen zur Beurteilung der Spezifität der aufgereinigten Antikörper gegen das Am5-HT_{2β}-Rezeptorprotein. A: Test der Antikörper gegen Antigen 1 (1:5.000) auf Gehirnhomogenat. **B:** Test der Antikörper gegen Antigen 2 (1:10.000) auf Gehirnhomogenat.

Pfeile zeigen Proteinspots. Verwendeter Sekundärantikörper jeweils *goat-anti-rabbit-HRP*, 1:10.000. Molekulargewichtsangaben in kDa.

Mittels 2-D-Gelelektrophorese wurden Proteine aus homogenisiertem Bienenhirngewebe sowohl anhand des isoelektrischen Punktes, als auch nach dem Molekulargewicht aufgetrennt und in Western Blot-Analysen eingesetzt. Die isoelektrischen Punkte der untersuchten

Proteine wurden wie folgt berechnet: $\text{Am5-HT}_{2\beta} = 9,6$ und $\text{Am5-HT}_{2\beta}\Delta\text{II} = 10,7$. Sowohl Antikörper gegen Antigen 1, als auch Antigen 2, markierten einen Proteinspot bei ca. 70 kDa (die Molekulargewichtsangabe konnte durch das Fehlen eines Sammelgels bei der Auftrennung der zweiten Dimension nur als Richtwert angesehen werden). Die isoelektrischen Punkte der markierten Proteinspots konnten aufgrund der Verwendung eines nichtlinearen Gels zur isoelektrischen Fokussierung nicht exakt beziffert werden, jedoch befanden sie sich nicht im erwarteten Bereich des 2-D-Gels (bei ca. pH 10) (Abb. 3.14 A und B).

Die Ergebnisse der Tests der Antikörper gegen das $\text{Am5-HT}_{2\beta}$ -Protein ließen Zweifel an einer hinreichenden Spezifität aufkommen. Zwar markierten Antikörper gegen zwei verschiedene Antigenregionen des Rezeptorproteins in Gehirngewebe Proteinbanden gleichen Molekulargewichts, welche dem erwarteten Molekulargewicht von 80 kDa entsprechen. Jedoch markieren nur Antikörper gegen Antigen 2 auch eine zusätzliche Proteinbande, welche dem $\text{Am5-HT}_{2\beta}\Delta\text{II}$ im Molekulargewicht entsprechen könnte. Hierbei lieferten Antiseren gegen Antigen 2 aus zwei verschiedenen immunisierten Kaninchen das gleiche Ergebnis. Die markierten Banden werden in Präadsorptionsexperimenten schwächer oder gar nicht markiert. Die Antikörpertests auf fraktioniertem Gehirnhomogenat zeigten jedoch nicht wie erwartet eine prominentere Markierung von Proteinen in der Membranfraktion. In Tests auf HEK 293-Zellen zeigten sich nur Antikörper gegen Antigen 1 in der Lage, das heterolog exprimierte $\text{Am5-HT}_{2\beta}$ -Protein zu detektieren. Die zusätzlich in HEK 293-Zellen bei etwa 75 kDa auftretende dominante Proteinbande ähnelte hinsichtlich des Molekulargewichts, dem Auftreten in Cytosol- und Membranfraktion und der Unempfindlichkeit gegenüber PNGase F-Verdau derjenigen im nativen Bienengewebe. Jedoch wurde diese Bande nicht nur bei transfizierten, sondern auch bei nicht-transfizierten HEK 293-Zellen markiert. Zuletzt unterschieden sich die ermittelten isoelektrischen Punkte der durch die Antikörper markierten Proteine deutlich von dem zuvor berechneten und erwarteten Wert.

Aufgrund der bestehenden Unsicherheiten wurde von der weiteren Verwendung der Antikörper in Expressionsstudien und immunhistologischen Untersuchungen abgesehen.

3.4 Serotoningehalt im Gehirn von Arbeiterinnen

3.4.1 Altersabhängigkeit des Serotoningehalts im Gehirn

Es erfolgten HPLC-Messungen des Serotoningehalts in Gehirnen von 5 und 20 Tage alten Arbeiterinnen. Hierbei wurde darauf geachtet, dass es sich bei den 5 Tage alten Tieren um Ammenbienen und bei den 20 Tage alten Bienen um Sammlerinnen handelte.

Fünf Tage alte Ammenbienen wiesen einen Serotoningehalt von $488,6 \pm 25,7$ pg/Gehirn auf. In Gehirnen von 20 Tage alten Sammlerinnen wurde mit $783,9 \pm 29,3$ pg/Gehirn eine 1,6-fach höhere Serotonin-Konzentration gemessen (Abb. 3.15; t-Test für unabhängige Stichproben: $t = 7,589$; $FG = 63$; $p < 0,0001$).

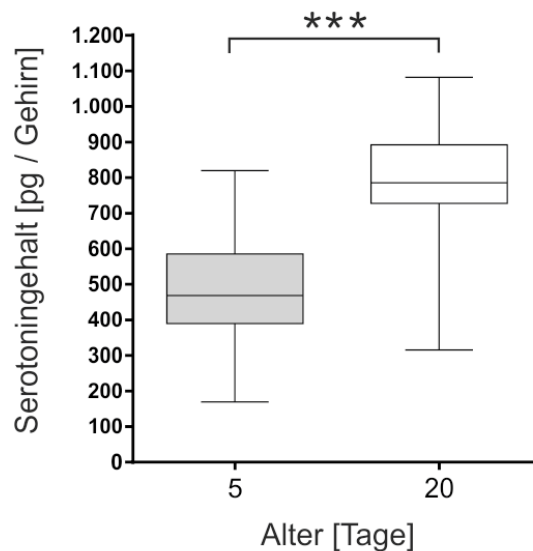


Abb. 3.15: Serotoningehalt in Gehirnen von 5 und 20 Tage alten Arbeiterinnen unter Freilandbedingungen (07. Januar - 22. Januar 2013, Sydney {Australien}), gemessen mittels HPLC. 5 Tage alte Tiere (Ammenbienen): $n = 33$; 20 Tage alte Tiere (Sammlerinnen): $n = 32$. t-Test für unabhängige Stichproben (** $p \leq 0,001$).

3.4.2 Tagesverlauf des Serotoningehalts im Gehirn

Gehirne von 5 Tage alten (Ammenbienen) und 20 Tage alten Arbeiterinnen (Sammlerinnen) wurden zu je 6 Tageszeitpunkten präpariert und deren Serotoningehalt mithilfe von HPLC-Messungen bestimmt. Die gewählten Tageszeitpunkte korrespondierten mit denjenigen der Versuche zur Messung der Serotonin-Rezeptor-Expression (siehe 3.2.3 und 3.2.4). Es handelte sich hierbei um unter Freilandbedingungen gehaltene Versuchstiere.

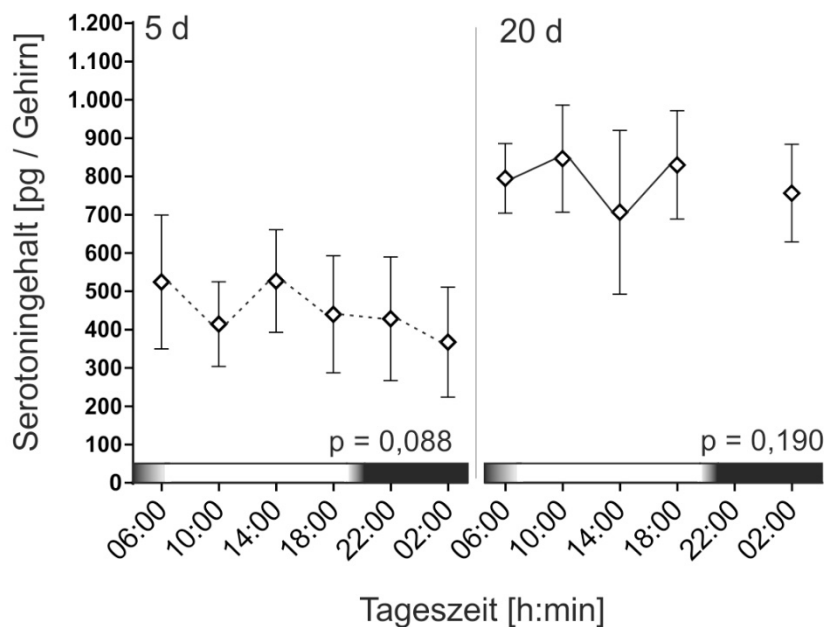


Abb. 3.16: Tageszeitlicher Verlauf des Serotoningehalts in Gehirnen von 5 und 20 Tage alten Arbeiterinnen unter Freilandbedingungen (07. Januar - 22. Januar 2013, Sydney {Australien}), gemessen mittels HPLC. 5 Tage alte Tiere (Ammenbienen): $n = 11$ pro Zeitpunkt mit Ausnahme von 18:00 Uhr: $n = 10$. 20 Tage alte Tiere (Sammlerinnen): 06:00 und 02:00 Uhr: $n = 9$; 14:00 Uhr: $n = 11$; 10:00, 18:00 und 22:00 Uhr: $n = 12$. Einfaktorielle ANOVA (p -Werte in den Diagrammen dargestellt), Boxen über Abszisse repräsentieren die Lichtbedingungen: hell = Tag, dunkel = Nacht, Übergänge stellen Dämmerungsphasen während Sonnenauf- und -untergang dar.

Der Gehalt an Serotonin im Gehirn von 5 Tage alten Bienen zeigte keine statistisch signifikanten Änderungen im Tagesverlauf (Abb. 3.16; einfaktorielle ANOVA: $F = 2,024$; $FG = 64$; $p = 0,088$). Ebenso blieb der Serotoningehalt in Gehirnen von 20 Tage alten Bienen konstant (einfaktorielle ANOVA: $F = 1,600$; $FG = 52$; $p = 0,190$), mit Ausnahme von Gehirnen,

welche 22:00 Uhr präpariert wurden: In diesen Proben ($n = 12$) konnte kein Serotonin nachgewiesen werden. Da jedoch in denselben HPLC-Läufen unter anderem weitere biogene Amine in üblichen Konzentrationen nachgewiesen werden konnten (Dopamin = $904,0 \pm 311,8$ pg/Gehirn; Octopamin = $610,9 \pm 215,5$ pg/Gehirn) erscheint ein technisches oder methodologisches Problem als Ursache für die fehlenden Serotonin-Peaks wenig wahrscheinlich. Bis zur Wiederholung der Messung wird auf die Darstellung der Messwerte von 22:00 Uhr verzichtet.

3.5 Einfluss von Serotonin auf die Ontogenese der circadianen Rhythmik lokomotorischer Aktivität

Bei *A. mellifera* unterliegt die Ausbildung einer circadianen Rhythmik der lokomotorischen Aktivität einem ontogenetischen Prozess (SPANGLER 1972, MOORE 2001). Anhand verhaltenspharmakologischer Experimente wurde die Beteiligung des serotonergen Systems bei diesem Prozess untersucht. Die Versuchstiere wurden mit verschiedenen Serotoninrezeptor-Agonisten und -Antagonisten gefüttert und ihre lokomotorische Aktivität unter konstanten Bedingungen gemessen.

Die Überlebensdauer der im Versuch eingesetzten Tiere unterschied sich je nach Behandlung voneinander (Log-Rank-Test: $X^2 = 22,73$; FG = 4; $p = 0,0001$). Nach 5 Tagen waren nur noch 46,2% der mit 5-Carboxamidotryptamin (5-CT), 30,8% der mit Methiothepin und 15,4% der mit 5-Methoxytryptamin (5-MeOT) behandelten Tiere am Leben. Demgegenüber überlebten 69,2% der mit 5-HT gefütterten und 91,7% der Kontrolltiere (Abb. 3.17). Im Weiteren wurde sich deshalb auf den Vergleich von mit 5-HT gefütterten Bienen und Kontrolltieren konzentriert. Nach 15 Tagen lebten noch 41,7% der Kontroll- und 15,4% der 5-HT-Gruppe (Abb. 3.17).

Hinsichtlich ihrer lokomotorischen Aktivität entwickelten Bienen der Kontrollgruppe nach 3 Tagen zu 70,0% und nach 6 Tagen zu 100% einen endogenen circadianen Rhythmus. Mit 5-HT gefütterte Tiere zeigten nach 3 Tagen zu 55,6% und nach 7 Tagen zu 100% einen circadianen Rhythmus (Abb. 3.18). Der Anstieg des Anteils rhythmischer Bienen war bei der 5-HT-Gruppe um etwa 12 Stunden verzögert, jedoch ohne statistisch signifikanten Unterschied zur Kontrollgruppe (Log-Rank-Test: $X^2 = 0,90$; FG = 1; $p = 0,342$).

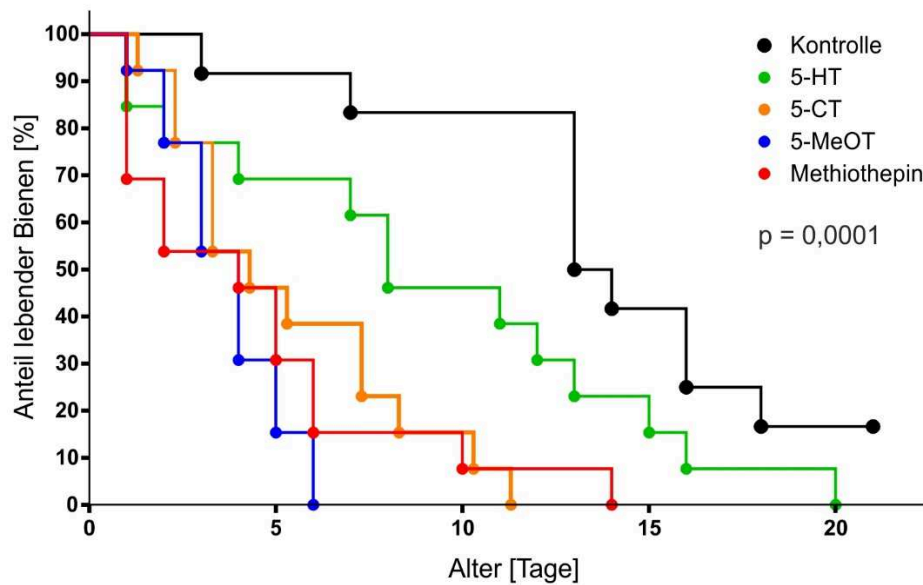


Abb. 3.17: Überlebenskurve der im Verhaltensexperiment eingesetzten Bienen. Fütterung der Versuchstiere *ad libitum* mit wässriger Pollen-Zucker-Lösung, welcher je nach experimenteller Gruppe 5-HT, 5-CT, 5-MeOT oder Methiothepin (je 10 mM) zugesetzt wurde. Kontrolle: n = 12; Behandlung: jeweils n = 13. Log-Rank-Test (p-Wert im Diagramm dargestellt).

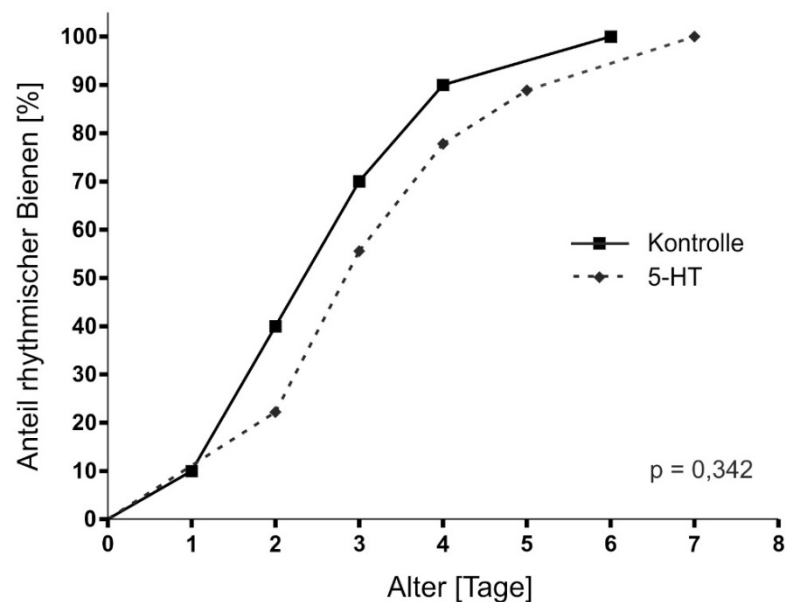


Abb. 3.18: Prozentualer Anteil von Bienen mit circadianem Rhythmus der lokomotorischen Aktivität im Dauerdunkel bei zunehmendem Alter. Fütterung der Versuchstiere *ad libitum* mit wässriger Pollen-Zucker-Lösung ohne (Kontrolle, n = 11) und mit 10 mM 5-HT (n = 9). Log-Rank-Test (p-Wert im Diagramm dargestellt).

Die Periodenlänge des circadianen Aktivitätsrhythmus wurde auf zwei statistisch unterschiedliche Methoden berechnet (X^2 -Periodogramm-Analyse und Lomb-Scargle-Periodogramm-Analyse). Bei Bienen der Kontrollgruppe zeigte sich eine mittlere Periodenlänge von $1.423 \pm 6,1$ min (X^2) bzw. $1.427 \pm 6,6$ min (Lomb-Scargle). Hierbei waren 70% (Lomb-Scargle) bzw. 80% (X^2) der ermittelten Perioden kürzer als 1.440 min (= 24 h) (Abb. 3.19 A). Versuchstiere, welchen 5-HT appliziert wurde, zeigten eine mittlere Periodenlänge von $1.459 \pm 14,1$ min (X^2) bzw. $1.455 \pm 8,5$ min (Lomb-Scargle). Die Periode war bei 71,4% (X^2 und Lomb-Scargle) länger als 1.440 min (= 24 h) (Abb. 3.19 B). Die mit beiden Methoden ermittelten Periodenlängen unterschieden sich signifikant zwischen Kontroll- und 5-HT-gefütterten Tieren (t-Test für unabhängige Stichproben: $t = 2,619$; $FG = 15$; $p = 0,019$ [X^2] und $t = 2,650$; $FG = 15$; $p = 0,018$ [Lomb-Scargle]) (Abb. 3.20 A und B).

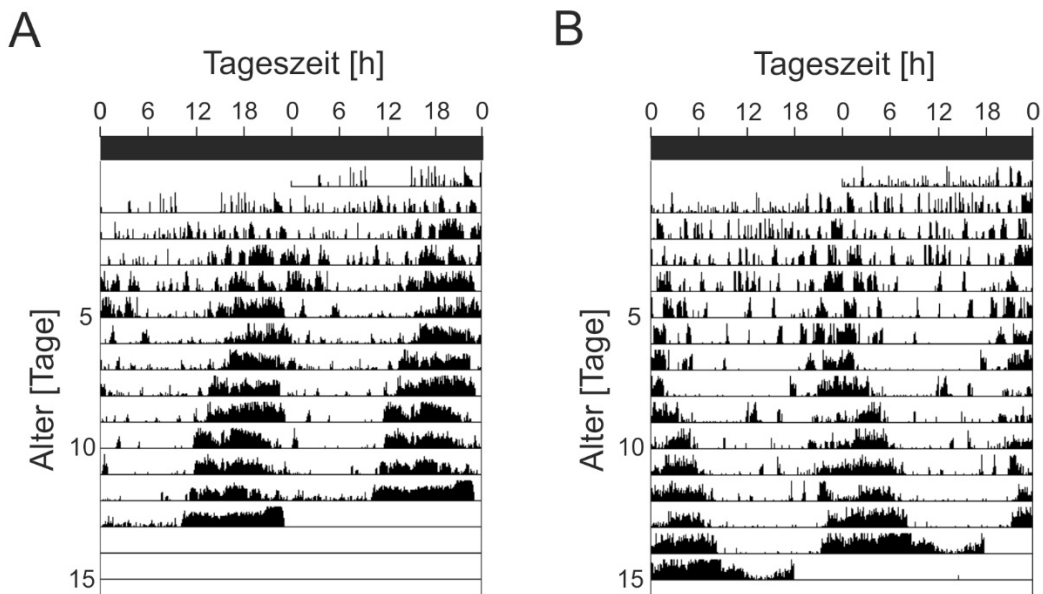


Abb. 3.19: Exemplarische Darstellung der lokomotorischen Aktivität zweier Versuchstiere im Dauerdunkel. **A:** Kontrolltier. **B:** Mit 5-HT gefüttertes Versuchstier. Beispiele aus $n = 17$. Darstellung der Daten als Doppelplot-Aktogramme (aufeinanderfolgende Tage sind nebeneinander und untereinander aufgetragen), dunkle Boxen über Aktogrammen repräsentieren die Lichtbedingungen = Dauerdunkel.

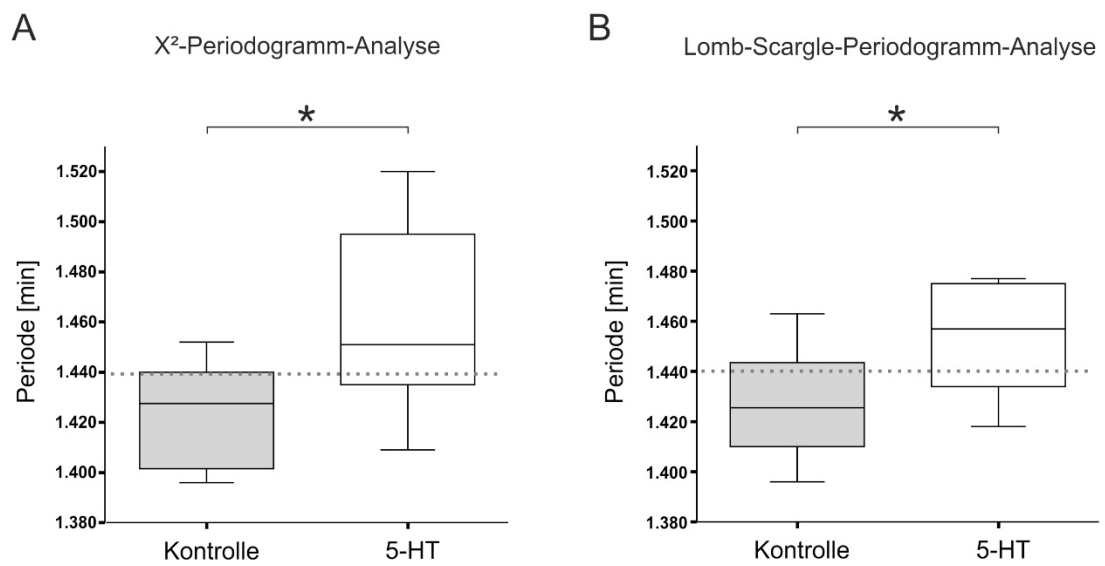


Abb. 3.20: Periode des circadianen Rhythmus der lokomotorischen Aktivität im Dauerdunkel bei unterschiedlicher Fütterung. A: Daten basierend auf X²-Periodogramm-Analyse. **B:** Daten basierend auf Lomb-Scargle-Periodogramm-Analyse. Fütterung der Versuchstiere *ad libitum* mit wässriger Pollen-Zucker-Lösung ohne (Kontrolle, n = 10) und mit 10 mM 5-HT (n = 7). Gestrichelte Linie bei Periode = 1.440 min (= 24 h). t-Test für unabhängige Stichproben (*p ≤ 0,05).

4 Diskussion

Serotonin (5-HT) fungiert als Botenstoff im gesamten Organismus der Honigbiene (BLENAU et al. 2013). Gleichzeitig sind die durch dieses biogene Amin hervorgerufenen Wirkungen vielfältig und oft räumlich und zeitlich begrenzt. Diese Vielfalt und Spezifität wird durch die Interaktion mit verschiedenen Serotonin-Rezeptor-Subtypen gewährleistet, deren Expression ebenfalls räumlichen und zeitlichen Mustern unterliegt.

4.1 Expressionsmuster der Serotonin-Rezeptor-Subtypen im zentralen Nervensystem

Das Nervensystem der Insekten kann im Wesentlichen in ein Zentralnervensystem, ein enterisches oder stomatogastrisches Nervensystem und ein peripheres Nervensystem unterteilt werden (PENZLIN 1985, DETTNER & PETERS 1999). Das zentrale Nervensystem setzt sich aus Ganglien zusammen, welche durch paarige Nervenstränge (Konnektive) miteinander verbunden und im cranialen Bereich zu einem Gehirn aggregiert sind. Die nicht dem Gehirn zugeordnete, ventral gelegene Ganglienkette wird als Bauchmark bezeichnet (analog dem dorsal angelegten Rückenmark bei Vertebraten). Im Gehirn von *A. mellifera* wurde die mRNA-Expression aller vier bekannten und untersuchten 5-HT-Rezeptorgene (*Am5-ht1A*, *Am5-ht2a*, *Am5-ht2 β* und *Am5-ht7*) nachgewiesen. Dies konnte erwartet werden, da Serotonin neben anderen biogenen Aminen wie Dopamin und Octopamin im Gehirn vorkommt (MERCER et al. 1983). Anhand von immunhistochemischen Färbungen wurde das Vorhandensein von etwa 75 serotonin-immunreaktiven Neuronen im Honigbienenhirn nachgewiesen (SCHÜRSMANN & KLEMM 1984). 5-HT wirkt sowohl als Neurotransmitter, als auch Neuromodulator in Insektengehirnen (BLENAU & THAMM 2011).

5-HT_{1A}

Das Vorhandensein der mRNA des *Am5-ht1A*-Gens im Gehirn der Honigbiene wurde durch SCHLENSTEDT (2005) beschrieben und konnte durch die vorliegenden qPCR-Messungen verifiziert werden. *Am5-ht1A*-mRNA wird sowohl im Zentralgehirn, als auch den optischen

Loben exprimiert. Darüber hinaus gelang der Nachweis des Am5-HT_{1A}-Proteins im Gehirn, welches von THAMM et al. (2010) dort insbesondere in optischen Neuropilen (Ocellartrakt, Lamina der optischen Loben) beschrieben wurde. Dies deckt sich mit Daten aus verschiedenen Organismen, bei welchen alle bekannten 5-HT₁-Rezeptoren im zentralen Nervensystem nachgewiesen wurden. Bei *D. melanogaster* werden beide bekannten 5-HT₁-Rezeptoren (Dm5-HT_{1A} und Dm5-HT_{1B}) im Gehirn und Bauchmark sowohl von Larven als auch adulten Tieren exprimiert (YUAN et al. 2005, YUAN et al. 2006). SAUDOU et al. (1992) beschrieben die Expression eines Dm5-HT₁-Rezeptors im Zentralnervensystem bereits während der Embryogenese. Der Reismehlkäfer *Tribolium castaneum* (Coleoptera: Tenebrionidae) weist ebenso wie *D. melanogaster* zwei 5-HT₁-Rezeptoren (Tc5-HT_{1A} und TC5-HT_{1B}) auf. Die mRNA-Expression beider zugehöriger Gene (*Tc5-ht1A* und *Tc5-ht1B*) wurde bei *T. castaneum* im Gehirn mittels qPCR nachgewiesen, wobei die Expressionsstärke im Zentralgehirn größer war, als in den optischen Loben (VLEUGELS et al. 2013, VLEUGELS et al. 2014). Die mRNA des 5-HT₁-Rezeptorgens (*Pa5-ht1*) der Schabe *Periplaneta americana* (Blattodea: Blattidae) wird im Gehirn exprimiert (TROPPMANN et al. 2010), ebenso die *Lm5-ht1*-mRNA bei der Wanderheuschrecke *Locusta migratoria* (Caelifera: Acrididae) (GUO et al. 2013). Die Expression von 5-HT₁-Rezeptorgenen in den Gehirnen stammesgeschichtlich separierter Insektentaxa weist auf die obligate Rolle von 5-HT₁-Rezeptoren bei der Funktion von Nervensystemen hin. Dies wird durch die Tatsache untermauert, dass die 5-HT_{1A}-Rezeptorgenexpression ebenso im Zentralnervensystem von Vertebraten verbreitet ist (HOYER et al. 2002, NICHOLS & NICHOLS 2008).

5-HT_{2a} und 5-HT_{2β}

Das Genom von *A. mellifera* weist zwei Gene auf, welche für 5-HT₂-Rezeptoren codieren: *Am5-ht2a* und *Am5-ht2β*. Zumindest für die *Am5-ht2a*-Gen liegen RT-PCR-Studien vor, welche auf eine mRNA-Expression im Gehirn der Honigbiene hindeuten (SCHLENSTEDT et al. 2005). Dieser Befund konnte nun mithilfe von qPCR-Messungen bestätigt werden. Darüber hinaus wurde auch die mRNA-Expression des *Am5-ht2β*-Gens im Gehirn von *A. mellifera* gezeigt. Das Genom von *D. melanogaster* beinhaltet ebenso wie das der Honigbiene sowohl ein *Dm5-ht2a*- (COLAS et al. 1995), als auch ein *Dm5-ht2β*-Rezeptorgen (GASQUE et al. 2013). Die *Dm5-ht2a*-mRNA wurde im zentralen Nervensystem von Larven und Imagines nachgewiesen (COLAS et al. 1995). In adulten Gehirnen erfolgt eine starke Expression vor allem im Ellipsoidkörper, den *large-field*-R-Neuronen und multipolaren Neuronen im Bereich der

Pilzkörpercalyces, aber auch in den Glomeruli der Antennalloben und im Suboesophagealganglion (NICHOLS 2007). Die Expression des *Dm5-ht2 β* -Rezeptorgens wurde im Gehirn adulter Fruchtfliegen anhand von Microarray-Studien vorrangig bei männlichen Tieren gemessen (GOLDMAN & ARBEITMAN 2007). Ein vergleichbares geschlechtsspezifisches Expressionsmuster wurde für *Am5-ht2 β* nicht gefunden, da das Vorhandensein der *Am5-ht2 β* -mRNA gleichermaßen im Gehirn von (weiblichen) Pollensammlerinnen, als auch von (männlichen) Drohnen gemessen wurde. Ebenfalls wurde die *Am5-ht2 β* -mRNA im Bauchmark von weiblichen und männlichen Honigbienen nachgewiesen. Beide 5-HT₂-Rezeptorgene von *G. bimaculatus*, *Gm5-ht2a* und *Gm5-ht2 β* , wurden anhand von RT-PCR-Experimenten im Gehirn nachgewiesen (WATANABE et al. 2011, WATANABE & AONUMA 2012). Während bei *A. mellifera* sowohl im Zentralgehirn als auch in den optischen Loben die Expression der *Am5-ht2a*- und *Am5-ht2 β* -mRNAs beobachtet wurde, wurde die *Gm5-ht2a*-mRNA (im Gegensatz zu *Gm5-ht2 β*) nicht in den optischen Loben der Feldgrille detektiert (WATANABE et al. 2011, WATANABE & AONUMA 2012). RÖSER et al. (2012) zeigten in RT-PCR-Experimenten das Vorhandensein des *Cv5-ht2a*-mRNA-Transkripts im Gehirn der Schmeißfliege *C. vicina*. In den Gehirnen von Säugetieren werden 5-HT_{2 α} -Rezeptoren vornehmlich in verschiedenen Bereichen des Cortex exprimiert, während 5-HT_{2 β} -Rezeptoren nur begrenzt und schwach im Nervensystem nachgewiesen werden konnten (NICHOLS & NICHOLS 2008).

5-HT₇

Die mRNA-Expression des *Am5-ht7*-Gens im Honigbienengehirn wurde anhand von qPCR-Messungen nachgewiesen. Eine Separierung des Gehirns in Zentralgehirn und optische Loben ergab dabei das Vorhandensein der *Am5-ht7*-mRNA in beiden Gehirnbereichen. SCHLENSTEDT et al. (2006) gelang zuvor mittels *in-situ*-Hybridisierungs-Experimenten an Gehirnschnitten von Pollensammlerinnen der Nachweis der *Am5-ht7*-mRNA in Nervenzellsomata der optischen Loben (erstes und zweites optisches Chiasma), der Kenyon-Zellen der Pilzkörper, der Peripherie der Antennalloben und des Subösophagealganglions. Anhand von qPCR-Experimenten wurde die mRNA des *Tc5-ht7*-Gens in *T. castaneum*-Gehirnen detektiert, wobei die Expressionsstärke im Zentralgehirn etwa 2-fach über derjenigen der optischen Loben lag (VLEUGELS et al. 2014). Sowohl Larven als auch Imagines von *D. melanogaster* zeigten die Expression des Dm5-HT₇-Rezeptors im Gehirn (BECNEL et al. 2011). WATANABE et al. (2011) zeigten das Vorhandensein der *Gb5-ht7*-mRNA im Gehirn von *G. bimaculatus* mittels RT-PCR.

In Gehirnen von *L. migratoria* wurde die Expression von *Lm5-ht7* ebenfalls nachgewiesen (GUO et al. 2013), wie auch von *Cv5ht7* bei *C. vicina* (RÖSER et al. 2012). Vertebraten exprimieren *5-ht7*-mRNA in verschiedenen Gehirnbereichen, etwa in Strukturen des Thalamus, Hypothalamus, Hippocampus und Cortex (NICHOLS & NICHOLS 2008).

Im Vergleich der mRNA-Expressionsstärken der vier 5-HT-Rezeptorgene der Honigbiene zeigte sich, dass *Am5-ht1A* im Gehirn am stärksten exprimiert wird, etwa doppelt so stark wie *Am5-ht7*. Beide zugehörigen Rezeptorproteine bewirken nach ihrer Aktivierung eine Änderung der intrazellulären cAMP-Konzentration in entgegengesetzter Weise. Während die Aktivierung von Am5-HT_{1A} zu einer Reduzierung der cAMP-Synthese führt (THAMM et al. 2010), führt die Aktivierung von Am5-HT₇ zu einer Steigerung der cAMP-Synthese (SCHLENSTEDT et al. 2006). Demgegenüber werden im Gehirn der Honigbiene die 5-HT-Rezeptorgene *Am5-ht2a* und *Am5-ht2β* deutlich niedriger exprimiert. Die entsprechenden Rezeptorproteine bewirken beide nach ihrer Aktivierung eine Steigerung der intrazellulären Ca²⁺-Konzentration (THAMM et al. 2013). Das unterschiedliche mRNA-Expressionsmuster deutet einerseits auf ein lokal deutlich eingegrenztes Vorhandensein der Am5-HT₂-Rezeptoren im Vergleich zu Am5-HT_{1A} und Am5-HT₇ im Gehirn hin. Sollten Am5-HT_{2α} und Am5-HT_{2β} nur in wenigen Neuronen vorhanden sein, könnte es lokal durchaus zu hohen Abundanzen dieser Proteine kommen. Andererseits dürfte bei einer eher weit gestreuten Verbreitung der Am5-HT₂-Rezeptoren im Gehirn die geringe mRNA-Expression auch auf niedrige Proteinlevel in Einzelneuronen hindeuten. Bislang liegen zur Klärung dieser Frage keine immunhistochemischen Daten zur zellulären Lokalisation der Am5-HT₂-Rezeptorproteine bei der Honigbiene vor. Vergleichbare Daten von Expressionsstudien im Gehirn von *D. melanogaster* belegen eine weite Verbreitung der 5-HT₂-Rezeptorexpression, jedoch mit deutlicher Konzentrierung im Ellipsoidkörper und Protocerebrum (NICHOLS 2007). Ein Vergleich der mRNA-Expression der verschiedenen 5-HT-Rezeptor-Subtypen im Gehirn von *G. bimaculatus* zeigte ebenfalls eine deutlich stärkere Expression der *Gb5-ht1A*- und *Gb5-ht1B*-mRNA im Vergleich zu *Gb5-ht2a* und *Gb5-ht7* (WATANABE et al. 2011). Möglicherweise kann das gefundene Muster einer stärkeren Expression von cAMP-gekoppelten (5-HT₁ und 5-HT₇) gegenüber Ca²⁺-gekoppelten 5-HT-Rezeptor-Subtypen (5-HT_{2α} und 5-HT_{2β}) im zentralen Nervensystem von Insekten als konserviert betrachtet werden.

Das Vorkommen aller vier 5-HT-Rezeptor-Subtypen in zum Teil unterschiedlichen Bereichen des Insektengehirns ermöglicht eine Diversifizierung der durch 5-HT

hervorgerufenen zellulären Reaktionen. Dies führt dazu, dass 5-HT durch die Interaktion mit unterschiedlichen 5-HT-Rezeptor-Subtypen an verschiedenen Funktionen des zentralen Nervensystems beteiligt sein kann. Anhand verhaltenspharmakologischer Studien konnte beispielsweise die Beteiligung des Am5-HT_{1A}-Rezeptors an der Verarbeitung visueller Informationen gezeigt werden. Dabei bewirkte die orale Applikation von 5-HT, sowie des Am5-HT_{1A}-Agonisten 5-CT (jeweils 10 mM), eine Reduzierung des positiv-phototaktischen Verhaltens von *A. mellifera*-Arbeiterinnen, welche bei Co-Applikation mit dem Am5-HT_{1A}-Antagonisten Prazosin (ebenfalls 10 mM) verhindert werden konnte (THAMM et al. 2010). Die Injektion von 10⁻⁸ M 5-HT in die Pilzkörper des Gehirns von *A. mellifera* führt zu einer Beeinträchtigung des olfaktorischen Lernens (BICKER & MENZEL 1989). Die Bildung eines olfaktorischen Gedächtnisses bei der Honigbiene steht mit Änderungen in der PKA-Aktivität in Verbindung (MÜLLER 2000). Die PKA-Aktivität kann durch beide cAMP-gekoppelte 5-HT-Rezeptor-Subtypen Am5-HT_{1A} und Am5-HT₇ beeinflusst werden (SCHLENSTEDT et al. 2006, THAMM et al. 2010). Das Vorhandensein verschiedener 5-HT-Rezeptor-Subtypen im zentralen Nervensystem erlaubt dem Organismus somit eine feiner abgestimmte Modulation von zellphysiologischen Vorgängen auf Grundlage ein und desselben Signalmoleküls (5-HT), welche sich letztlich in einer Modifikation komplexer Verhaltensweisen ausdrücken kann. So können beispielsweise bestimmte Aspekte des Aggressionsverhaltens von *D. melanogaster* durch pharmakologische Aktivierung des Dm5-HT_{2α}-Rezeptors unterdrückt werden, während wiederum andere Aggressionsaspekte durch die pharmakologische Aktivierung des Dm5-HT_{1A}-Rezeptors verstärkt werden können (JOHNSON et al. 2009).

4.2 Expressionsmuster der Serotonin-Rezeptor-Subtypen im Vorder- und Mitteldarm

Der Darm von *A. mellifera* ist wie bei anderen Insektenarten ontogenetisch, morphologisch und funktional in Vorder-, Mittel- und Hinterdarm gegliedert (SNODGRASS 1956). Der Vorderdarm der Honigbiene bildet im posterioren Bereich eine auffällige Aussackung, welche als Kropf oder Honigmagen bezeichnet wird (SNODGRASS 1956). Er dient Sammlerinnen als Speicher zum Transport von Nektar und Wasser, sowie Stockbienen zum Transport von Honig innerhalb des Stockes. Der Mitteldarm dient hauptsächlich der Verdauung. Sowohl der Kropf, als auch der Mitteldarm der Honigbiene sind serotonerg innerviert (FRENCH et al. 2013). Dies

ist generell bei Insekten beobachtbar, wie Studien an *D. melanogaster* (BUDNIK et al. 1989, NECKAMEYER 2010), *Stomoxys calcitrans* (Diptera: Muscidae) (LIU et al. 2011), *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) (MOFFETT & MOFFETT 2005), *L. migratoria* (MOLAEI & LANGE 2003, STERN et al. 2007) oder *Camponotus mus* (Hymenoptera: Formicidae) (FALIBENE et al. 2012) zeigen. Entsprechend gelang der Nachweis der mRNA-Expression der vier 5-HT-Rezeptorgene *Am5-ht1A*, *Am5-ht2a*, *Am5-ht2 β* und *Am5-ht7* sowohl im Kropf als auch Mitteldarm der Honigbiene. Die mRNA-Expressionenstärken aller vier gemessenen 5-HT-Rezeptorgene waren im Kropfgewebe 2,5 bis 4,5-fach größer als im Mitteldarm, im Falle des *Am5-ht2 β* -Gens sogar 93-fach. Eventuell ist dies mit der flächenmäßig dichteren serotonergen Innervation von Kropf und Proventriculus (Bereich zwischen Kropf und Mitteldarm) gegenüber des Mitteldarmes (FRENCH et al. 2013) in Zusammenhang zu bringen.

5-HT_{1A}

Die mittels qPCR gemessene mRNA-Expression des *Am5-ht1A*-Rezeptorgens im Kropf und Mitteldarm steht auf den ersten Blick im Gegensatz zu den Untersuchungen von THAMM (2009), welche eine Beschränkung des Am5-HT₁-Proteins auf das zentrale Nervensystem ergab. Anhand von Western Blot-Analysen und der Verwendung eines spezifischen Antikörpers gegen Am5-HT₁ konnte das Rezeptorprotein nicht im Kropf und Mitteldarm der Honigbiene nachgewiesen werden (THAMM 2009). Dies könnte einerseits durch die zum Teil erheblich größere diagnostische Sensitivität von qPCR- gegenüber Western Blot-Analysen erklärt werden. Demzufolge wäre eine geringe Abundanz des Am5-HT₁-Rezeptorproteins anhand des von THAMM (2009) verwendeten Antikörpers nicht nachweisbar. Andererseits besteht die Möglichkeit, dass es bei der Expression des *Am5-ht1A*-Gens zwar zu einer durch qPCR messbaren mRNA-Synthese kommt, diese allerdings nicht oder in nur sehr geringer Rate in Protein translatiert wird. Eventuell kann der Nichtnachweis von Am5-HT₁ durch THAMM et al. (2009) im Kropf und Mitteldarm auch durch die in diesen Geweben vorhandenen Proteasen hervorgerufen worden sein, die während des Probenaufschlusses für die Western Blot-Analysen zum Verdau des ohnehin gering exprimierten Proteins geführt haben könnte. In verschiedenen Studien an diversen Insektenpezies konnte ebenfalls die mRNA-Expression der entsprechenden *5-ht1*-Rezeptorgene nachgewiesen werden. So zeigten WATANABE et al. (2011) in RT-PCR-Experimenten eine im Vergleich zum Nerven- und Drüsengewebe recht schwache mRNA-Expression des *Gb5-ht1A*-Rezeptorgens im Mitteldarm von *G. bimaculatus*. Das Transkript des *Tc5-ht1*-Rezeptorgens konnte mittels qPCR im Darm von *T. castaneum*

detektiert werden (VLEUGELS et al. 2013). Ebenso wurde die mRNA-Expression des *Pa5-ht1*-Gens im Mitteldarm von *P. americana* durch RT-PCR-Analysen gezeigt (TROPPMANN et al. 2010).

5-HT_{2a} und 5-HT_{2β}

Sowohl das mRNA-Transkript des *Am5-ht2a*-, als auch des *Am5-ht2β*-Gens wurde im Kropf und im Mitteldarm der Honigbiene nachgewiesen. Es liegen bislang nur wenige vergleichbare Expressionsstudien von *5-ht2*-Rezeptorgenen im Darmtrakt von Insekten vor. So weist der Mitteldarm von *G. bimaculatus* das Vorhandensein der *Gb5-ht2β*-mRNA auf (WATANABE & AONUMA 2012), nicht jedoch die mRNA des *Gb5-ht2a*-Rezeptorgens (WATANABE et al. 2011). Im Darm der Raubwanze *Rhodnius prolixus* (Heteroptera: Reduviidae) findet die mRNA-Expression des *Rp5-ht2β*-Gens statt, dort vor allem im Vorder- und Hinterdarm (PALUZZI et al. 2015). In Säugetieren wurde ebenfalls die 5-HT_{2β}-Expression im Darmgewebe nachgewiesen (BORMAN et al. 2002, NICHOLS & NICHOLS 2008).

5-HT₇

In Kropf und Mitteldarm von *A. mellifera* wird auch die mRNA des *Am5-ht7*-Rezeptors exprimiert. Dies bestätigt Expressionsstudien an anderen Insektenspezies. WATANABE et al. (2011) zeigten die *Gb5-ht7*-Expression im Mitteldarm von *G. bimaculatus*, während VLEUGELS et al. (2014) die mRNA von *Tc5-ht7* im Darm von *T. castaneum* nachwiesen. Am Enddarm weiblicher *A. aegypti* verlaufen longitudinal zwei Axone des enterischen Nervensystems, welche in immunhistologischen Untersuchungen mit einem für das Ae5-HT₇-Rezeptorprotein spezifischen Antikörper markiert werden können (PIETRANTONIO et al. 2001, LEE & PIETRANTONIO 2003). Im Darm von Säugetieren wurde anhand von RT-PCR-Analysen und pharmakologischen Experimenten das Vorhandensein von 5-HT₇-Rezeptoren nachgewiesen (BARD et al. 1994, PRINS et al. 1999, NICHOLS & NICHOLS 2008).

Der Vergleich der vier 5-HT-Rezeptorgene im Kropf der Honigbiene ergab eine deutlich stärkere mRNA-Expression des *Am5-ht2a*-Gens gegenüber den Rezeptorgenen *Am5-ht2β*, sowie *Am5-ht1A* und *Am5-ht7*. Das gefundene Muster zeigt generell eine stärkere Expression der Gene der die Phospholipase C und damit die intrazellulären Ca²⁺-Konzentration

beeinflussenden 5-HT-Rezeptoren (Am5-HT_{2α} und Am5-HT_{2β}) im Kropf. Damit unterscheidet sich das Expressionsmuster grundsätzlich von demjenigen im zentralen Nervensystem, wo die Gene der die Adenylylzyklase und damit die intrazelluläre cAMP-Konzentration beeinflussenden Rezeptoren (Am5-HT_{1A} und Am5-HT₇) stärker exprimiert wurden. Mit Ausnahme von *Am5-ht2β*, welches im Mitteldarm ausgesprochen niedrig exprimiert wurde, setzt sich das im Kropf gefundene Muster im Mitteldarm fort. Die Expression von *Rp5-ht2β* ist im Mitteldarm von *R. prolixus* ebenfalls niedriger, als im Vorderdarm (PALUZZI et al. 2015). Es lässt sich die Hypothese ableiten, dass 5-HT in den untersuchten Bereichen des Honigbienen Darmes vor allem solche Prozesse und Funktionen beeinflusst, welche im Zusammenhang mit einer Änderung des intrazellulären Ca²⁺-Spiegels stehen. Diese Änderungen könnten über einen 5-HT₂-induzierten IP₃-Signalweg erreicht werden.

Zahlreiche Studien beschreiben den negativen Einfluss von 5-HT auf die Motilität bestimmter Darmabschnitte bei Insekten. Bei Honigbienen kontrahiert der frisch präparierte Kropf spontan 45 Mal pro Minute. Nach Zugabe von 10⁻⁶ bzw. 10⁻⁴ M einer 5-HT-Rezeptor-Antagonisten-Mischung (Mianserin, Ketanserin), verringert sich die Kontraktionsrate um ca. 30 bis 50% (FRENCH et al. 2013). 5-HT vermag den Basaltonus der Ringmuskulatur des Mitteldarms der Wanderheuschrecke *L. migratoria* dosisabhängig zu verringern und reduziert deren Kontraktionsfähigkeit bei Zugabe des Neuropeptids Proctolin (MOLAEI & LANGE 2003). Demgegenüber führt jedoch die Gabe von steigenden 5-HT-Konzentrationen zu einer Erhöhung der Kontraktionsrate der Kropfmuskulatur der Schmeißfliege *Phormia regina* (Diptera: Calliphoridae) (LISCIA et al. 2012). Da dieser Effekt allerdings nur in Gegenwart extrazellulären Ca²⁺ auftritt (LISCIA et al. 2012), ist eine Steigerung der Kontraktionsrate aufgrund einer Erhöhung der intrazellulären Ca²⁺-Konzentration aus intrazellulären Speichern wie etwa dem sarkoplasmatischen Retikulum, wie man es bei Aktivierung von 5-HT₂-Rezeptoren erwarten würde, unwahrscheinlich. Bei der hämophagen Wanze *R. prolixus* führt die Applikation von 5-HT auf isolierte Mitteldärme ebenso dosisabhängig zu einer Erhöhung der Kontraktionsfrequenz (TE BRUGGE et al. 2009). Die zum Teil gegensätzlichen Effekte von 5-HT auf die Darmmotilität von *A. mellifera* und *L. migratoria* einerseits, sowie *P. regina* und *R. prolixus* andererseits, deuten auf unterschiedliche Expressionsmuster der vorhandenen 5-HT-Rezeptor-Subtypen in den jeweiligen Spezies hin, wodurch unterschiedlich aktivierte Signalkaskaden zu den beobachteten Reaktionen führen. Daraus ließe sich ableiten, dass zwar die Grundausstattung an 5-HT-Rezeptor-Subtypen in Geweben mehr oder weniger konserviert wäre, sich jedoch deren Expressionsstärken vor einem evolutiven Hintergrund je nach Bedarf hoch oder herunterregulieren ließen. Vor allem die

unterschiedlichen Ernährungsstrategien der exemplarisch untersuchten Insektenarten, welche unterschiedliche Anforderungen an Morphologie und Funktion der jeweiligen Verdauungssysteme stellen, führten zu einer Verschiebung der Expressionsstärken einzelner 5-HT-Rezeptor-Subtypen. Da im Kropf von *A. mellifera* alle vier 5-HT-Rezeptorgen-Transkripte nachgewiesen wurden, könnte die beobachtete Blockierung der Kontraktion der Kropfmuskulatur durch 5-HT (FRENCH et al. 2013) sowohl durch Beeinflussung der intrazellulären Konzentrationen von Ca^{2+} als auch cAMP bewirkt werden. Die durch 5-HT bewirkte Relaxation der menschlichen Colonmuskulatur kann auf die Aktivierung von 5-HT₇-Rezeptoren zurückgeführt werden, welche zu einer Steigerung der cAMP-Synthese führen (PRINS et al. 1999, VANHOENACKER et al. 2000). Nach Applikation von 5-HT konnte auch im Darm von *R. prolixus* eine Steigerung der cAMP-Werte gemessen werden (BARRETT et al. 1993).

Weiterführende Studien müssen zeigen, ob die bei der Honigbiene gemessene Rezeptorgenexpression in Zellen der Darmmuskulatur, der Neuronen des enterischen Nervensystems, des Darmepithels selbst, oder einer Kombination daraus geschieht. Die Studie von PIETRANTONIO et al. (2001) an *A. aegypti* zeigt eine Beschränkung der Expression des Ae5-HT₇-Rezeptors auf das enterische Nervensystem des Enddarms.

4.3 Expressionsmuster der alternativen Spleißvarianten der Am5-HT₂-Rezeptor-Subtypen

Als alternatives Spleißen werden posttranskriptionale Prozesse zusammengefasst, welche zur Entstehung isoformer mRNAs aus einer durch ein einzelnes Gen codierten prä-mRNA führen (SMITH et al. 1989, BLACK 2003). Dieser evolutionär adaptive Mechanismus resultiert in einer Steigerung der Proteindiversität (BOUE et al. 2003, KIM et al. 2003). Alternatives Spleißen tritt bei Genen, welche für GPCRs codieren, ubiquitär auf (MARKOVIC & CHALLISS 2009). Auch für 5-HT-Rezeptorgene wurden alternativ gespleißte Varianten nachgewiesen, sowohl bei Invertebraten (SAUDOU et al. 1992, HUANG et al. 1999, ONO & YOSHIKAWA 2004) als auch Vertebraten (CANTON et al. 1996, PAUWELS 2000).

Bei *A. mellifera* kommt es im Zuge der Transkription der 5-HT-Rezeptorgene *Am5-ht2a* und *Am5-ht2β* zur Modifikation der entstehenden mRNAs durch alternatives Spleißen. Dementsprechend wurden neben den jeweiligen Vollängen-mRNAs *Am5-ht2a* und *Am5-ht2β*

zugehörige verkürzte Varianten, *Am5-ht2a Δ III* und *Am5-ht2 β Δ II*, nachgewiesen (THAMM et al. 2009, THAMM et al. 2013). Im Falle der alternativ gespleißten *Am5-ht2a Δ III*-mRNA fehlt das Exon III, welches in der Vollängenvariante *Am5-ht2a* vorhanden ist. In ähnlicher Weise wird die *Am5-ht2 β* -mRNA sowohl als Vollängenvariante, als auch durch Weglassen des Exons II als verkürzte Variante *Am5-ht2 β Δ II* transkribiert (Abb. 1.3, THAMM et al. 2013). Im Hinblick auf eine mögliche physiologische Relevanz der verkürzten Rezeptorvarianten wurde deren Expressionsmuster in verschiedenen Geweben der Honigbiene untersucht und mit den Expressionsmustern der entsprechenden Vollängenvarianten verglichen.

Sowohl im Gehirn als auch im Bauchmark konnte das Vorhandensein der verkürzten Varianten *Am5-ht2a Δ III* und *Am5-ht2 β Δ II* nachgewiesen werden. Dies trifft für Proben aus weiblichen Pollensammlerinnen ebenso zu, wie für Proben, welche aus Drohnen gewonnen wurden. Im Gehirn von Pollensammlerinnen zeigte sich eine 2,3-fach stärkere Expression des *Am5-ht2a*-Transkripts im Vergleich zu dessen verkürzter Variante *Am5-ht2a Δ III*. Interessanterweise lag im Falle des *Am5-ht2 β* -Transkripts das Gegenteil vor: die verkürzte Spleißvariante *Am5-ht2 β Δ II* wurde 3,4-fach stärker exprimiert, als das dazugehörige Vollängentranskript *Am5-ht2 β* . Ebenso wurde in Bauchmarkproben von Pollensammlerinnen die alternativ gespleißte *Am5-ht2 β Δ II*-mRNA 4,8-fach stärker exprimiert als die vollständige *Am5-ht2 β* -mRNA. Das reziproke Muster der geringeren Expressionsstärke der verkürzten Spleißvariante der *Am5-ht2a Δ III*-mRNA einerseits und der größeren Expressionsstärke der *Am5-ht2 β Δ II*-mRNA andererseits (jeweils im Verhältnis zu deren Vollängenvarianten) beschränkt sich nicht nur auf das zentrale Nervensystem, sondern ist auch in peripheren Geweben, zum Teil noch deutlicher, ausgeprägt. Zu den untersuchten peripheren Organen gehörten die Kopf- und Thoraxspeicheldrüse, die Hypopharynxdrüse, sowie der Kropf und die Malpighischen Gefäße.

Die paarigen Speicheldrüsen der Honigbiene bilden morphologisch jeweils zwei disjunkte Bereiche, welche sich im Kopf und Mesosoma befinden und über einen gemeinsamen Ausführkanal zur Labiumbasis verfügen (SNODGRASS 1956, CRUZ-LANDIM 1967). Der cephalen Teil der Speicheldrüse produziert ein öliges Sekret. Eine mögliche Funktion dieses Sekrets könnte im Zusammenhang mit der chemischen Kommunikation der Arbeiterinnen stehen (SIMPSON 1960, KATZAV-GOZANSKY et al. 2001, POIANI & CRUZ-LANDIM 2010a, POIANI & CRUZ-LANDIM 2010b, FUJITA et al. 2010). Demgegenüber bildet der thorakale Speicheldrüsenbereich ein eher wässriges Sekret, welches Verdauungsenzyme enthält

(SIMPSON 1960, POIANI & CRUZ-LANDIM 2010a, FENG et al. 2013). In Kopfspeicheldrüsengewebe wurde die Expression der *Am5-ht2a*-mRNA nachgewiesen. Auch die alternativ gespleißte *Am5-ht2aΔIII*-mRNA wurde detektiert, wobei deren Expressionsstärke 2,8-fach unter derjenigen der Vollängenvariante lag. In thorakalem Speicheldrüsengewebe wurden ebenfalls beide mRNAs, *Am5-ht2a* und *Am5-ht2aΔIII*, nachgewiesen, deren Expressionsstärke sich nicht signifikant voneinander unterschied. Auffällig war hingegen, dass in keiner der untersuchten Proben der Kopfspeicheldrüsen und nur in 40% der Thoraxspeicheldrüsen die mRNA des *Am5-ht2β*-Rezeptorgens detektiert werden konnte. Die verkürzte, alternativ gespleißte *Am5-ht2βΔII*-mRNA wurde jedoch in allen Speicheldrüsenproben sicher gemessen. Die Speichelsekretion von Insektenspeicheldrüsen kann durch 5-HT stimuliert werden, wie Studien etwa an *C. vicina* (BERRIDGE & PATEL 1968, RÖSER et al. 2012) und *P. americana* (WALZ et al. 2006, TROPFMANN et al. 2007) zeigten. Dabei können neben 5-HT₇- auch 5-HT_{2α}-Rezeptoren beteiligt sein und Ca²⁺- und cAMP-basierte Signalwege synergistisch wirken (RÖSER et al. 2012). Das Vorhandensein von *Am5-ht2a* in den Speicheldrüsen deutet somit auf eine Beteiligung dieses Rezeptor-Subtyps an der Modulation der Speichelsekretion der Honigbiene hin. Demgegenüber erscheint eine Funktion des *Am5-HT_{2β}*-Rezeptors aufgrund der Abwesenheit bzw. sehr geringen Expression der *Am5-ht2β*-mRNA im Speicheldrüsenystem der Honigbiene unwahrscheinlich.

Die in der Kopfkapsel lokalisierten paarigen Hypopharynx- oder Futtersaftdrüsen sind exokrine Drüsen, welche ihre Sekrete in die Mundhöhle der Honigbiene absondern (CRUZ-LANDIM & COSTA 1998). Die Morphologie und Funktion der Hypopharynxdrüsen korrelieren eng mit der Aufgabe der Arbeiterin im Volk. Ammenbienen weisen voluminöse Hypopharynxdrüsen auf, welche Komponenten des so genannten, an Larven und Königinnen verfütterten Gelée Royals bilden (PATEL et al. 1960, KNECHT & KAATZ 1990, KUBO et al. 1996). Dieser Futtersaft ist ein komplex zusammengesetztes Proteingemisch, welches Royalactin enthält (FUJITA et al. 2013), das maßgeblich die Königinnen-Entwicklung veranlasst (KAMAKURA 2011). Mit Beginn der Sammeltätigkeit verringert sich die Größe der Hypopharynxdrüsen der Arbeiterinnen und es verändert sich die Proteinzusammensetzung des Sekrets hin zu vorzugsweise Kohlenhydrate metabolisierenden Enzymen wie α-Glucosidase, Glucose-Oxidase und Invertase (DESEYN & BILLEN 2005, OHASHI et al. 1999, UENO et al. 2009, BUCEKOVA et al. 2014). In den Hypopharynxdrüsen von Pollensammlerinnen konnten sowohl die mRNA-Transkripte *Am5-ht2a* und *Am5-ht2aΔIII*, als auch *Am5-ht2β* und *Am5-ht2βΔII* nachgewiesen werden. Das vorgefundene Expressionsmuster ähnelt dem im zentralen Nervensystem und dem Speicheldrüsenystem. Da *Am5-ht2a* 178,7-fach stärker

exprimiert wurde als *Am5-ht2 β* , kann davon ausgegangen werden, dass eine hypothetische Funktion von 5-HT auf die Hypopharynxdrüsen verstärkt durch den Am5-HT_{2 α} -Rezeptor vermittelt werden würde. Es liegen bislang jedoch keine funktionellen Studien zur Wirkung von 5-HT an den Futtersaftdrüsen vor. Nichtsdestotrotz könnte ihm eine ähnliche Bedeutung wie im Speicheldrüsensystem zukommen, da sich sowohl die Morphologie und Funktionsweise, als auch das Rezeptorgen-Expressionsmuster ähneln. Hinsichtlich der alternativ gespleißten Varianten deutet die wiederholt beobachtete deutlich schwächere Expression von *Am5-ht2 α Δ III* gegenüber *Am5-ht2 α* und die deutlich stärkere Expression von *Am5-ht2 β Δ II* gegenüber *Am5-ht2 β* auf ein generelles Muster hin, welches in verschiedenen Zell- und Gewebetypen systematisch auftritt.

Kropfgewebe weist neben dem Vorhandensein der Vollängen-mRNAs *Am5-ht2 α* und *Am5-ht2 β* auch die alternativ gespleißten mRNAs *Am5-ht2 α Δ III* und *Am5-ht2 β Δ II* auf. Interessanterweise unterscheiden sich im Kropf die Expressionsstärken der verkürzten alternativen Spleißvarianten jeweils nicht signifikant von deren Vollängenvarianten. Hierin besteht ein Unterschied zu dem in Gehirn- und Drüsengewebe gefundenen Muster. Ebenfalls nicht signifikant verschieden zeigte sich die mRNA-Expression von *Am5-ht2 α* und *Am5-ht2 α Δ III* in den Malpighischen Gefäßen. Es wurde die *Am5-ht2 β* -mRNA nur in 25% der untersuchten Proben nachgewiesen, die alternativ gespleißte *Am5-ht2 β Δ II*-mRNA jedoch deutlich stärker und in allen gemessenen Proben. Diesbezüglich besteht Ähnlichkeit der Expressionsmuster der Malpighischen Gefäße mit den untersuchten Proben der Kopf- und Thoraxspeicheldrüsen. Die Malpighischen Gefäße sind blind endende, schlauchförmige Darmaussackungen und stellen Exkretionsorgane der Insekten dar, welche in die Region zwischen Mittel- und Enddarm münden (SNODGRASS 1956). Die Modulation der in diesen Organen ablaufenden Prozesse durch 5-HT wurde an einer ganzen Reihe unterschiedlicher Insekten gezeigt, wie etwa Diptera (SCHWARZT & REYNOLDS 1979, VEENSTRA 1988), Caelifera (MORGAN & MORDUE 1984), Ensifera (COAST 2011), Heteroptera (MADDRELL et al. 1991, GIOINO et al. 2014) und Lepidoptera (NICOLSON & MILLAR 1983, SKAER et al. 2002). Diese Studien zeigen eine diuretische Funktion von 5-HT, welches zu einer erhöhten Sekretionsrate der Malpighischen Gefäße führt. Bei der Grille *A. domesticus* wird die Wirkung von 5-HT sehr wahrscheinlich durch 5-HT₂-Rezeptoren hervorgerufen, wie pharmakologische Experimente nahelegen (COAST 2011). Die Applikation von 5-HT auf Malpighische Gefäße der Wanze *R. prolixus* löst cAMP- und PKA-vermittelte Ca²⁺-Wellen aus, welche sich auf Ionentransportprozesse auswirken (GIOINO et al. 2014). Hierfür kommen 5-HT₂-Rezeptoren nicht in Frage, da diese nicht an cAMP-basierte Signalwege koppeln. In den Malpighischen

Gefäßen von *R. prolixus* werden neben Rp5-HT₂-Rezeptoren (PALUZZI et al. 2015) wahrscheinlich auch Rp5-HT₇-Rezeptoren (GIOINO et al. 2014, PALUZZI et al. 2015) exprimiert, welche zu einer Erhöhung der intrazellulären Ca²⁺-Konzentration führen. Bei *A. mellifera* wird zusätzlich zu *Am5-ht2*-Rezeptorgenen auch *Am5-ht7* (SCHLENSTEDT et al. 2006) exprimiert, nicht jedoch *Am5-ht1A* (THAMM 2009). Es kann somit die Vermutung abgeleitet werden, dass sowohl Am5-HT₂- als auch Am5-HT₇-Rezeptoren an der exkretorischen Funktion der Malpighischen Gefäße der Honigbiene beteiligt sind.

Das systematische Vorhandensein der alternativ gespleißten mRNAs *Am5-ht2aΔIII* und *Am5-ht2βΔII* in so unterschiedlichen Gewebetypen wie Nervengewebe, Drüsengewebe und Gewebe des Verdauungs- und Exkretionssystems lässt die Frage nach deren physiologischer Relevanz aufkommen. THAMM (2009) gelang es, sowohl das Am5-HT_{2α}-Rezeptorprotein, als auch das verkürzte Am5HT_{2α}ΔIII-Protein jeweils heterolog in HEK293-Zellen zu exprimieren. Während es bei Am5-HT_{2α}-exprimierenden Zellen nach 5-HT-Applikation zu einem messbaren Anstieg der intrazellulären Ca²⁺-Konzentration kam, blieb dieser in Zellen, welche das verkürzte Am5HT_{2α}ΔIII-Protein exprimierten, aus. Somit kann ausgeschlossen werden, dass Am5HT_{2α}ΔIII eigenständig als funktioneller 5-HT-Rezeptor agieren kann. Dies erscheint ebenfalls aufgrund des Fehlens mehrerer Transmembrandomänen in der abgeleiteten Am5-HT_{2β}ΔII-Proteinsequenz unwahrscheinlich. Eine weitere mögliche Funktion der verkürzten Proteine Am5HT_{2α}ΔIII und Am5-HT_{2β}ΔII liegt eventuell in der Interaktion mit den dazugehörigen Vollängen-Rezeptoren Am5HT_{2α} und Am5-HT_{2β}. Ein solcher Mechanismus wurde bereits für den Dopaminrezeptor DOP-3 und dessen durch alternatives Spleißen entstandenen Variante DOP-3nf nachgewiesen (SUGIURA et al. 2005). Bei Expression in einem heterologen Zellsystem vermochte der DOP-3-Rezeptor nach Dopaminapplikation die durch Forskolin stimulierte cAMP-Bildung der Adenylylzyklase (AC) zu inhibieren. Die verkürzte Spleißvariante DOP-3nf hingegen zeigte bei Dopaminapplikation keine pharmakologischen Effekte auf die cAMP-Bildung. Jedoch wurde bei Co-Expression der DOP-3- und DOP-3nf-Proteine die Effektivität des DOP-3-Rezeptors zur Inhibierung der AC nach Dopaminapplikation herabgesetzt (SUGIURA et al. 2005). Aus diesen pharmakologischen Experimenten lässt sich eine Interaktion der verkürzten Spleißvariante mit dem entsprechenden Rezeptorprotein ableiten. Grundvoraussetzung für eine Interaktion ist die gemeinsame Co-Expression beider Varianten in denselben Zellen im nativen Gewebe. Dies wurde für die bei der Honigbiene vorkommenden *Am5-ht2*-Spleißvarianten gezeigt. In allen untersuchten Geweben konnte sowohl die *Am5-ht2a*-mRNA, als auch die *Am5-ht2aΔIII*-mRNA nachgewiesen werden. Demgegenüber traten die *Am5-ht2β*-mRNA und *Am5-ht2βΔII*-mRNA

nicht in allen Geweben gemeinsam auf. Interessanterweise war in allen Proben der Kopfspeicheldrüsen und in einigen Proben der Thoraxspeicheldrüsen und Malpighischen Gefäße lediglich die verkürzte *Am5-ht2 β Δ II*-mRNA messbar. Der Mechanismus einer möglichen Interaktion von vollständigem Rezeptorprotein und verkürzter Variante könnte in einer Dimerisierung liegen. 5-HT-Rezeptoren sind wie viele andere GPCRs (RIOS et al. 2001) in der Lage, sowohl Homodimere (HERRICK-DAVIS et al. 2004), als auch Heterodimere (SALIM et al. 2002, HERRICK-DAVIS et al. 2005) zu bilden. Das Vorhandensein der *Am5-ht2 β Δ II*-mRNA, nicht jedoch der *Am5-ht2 β* -mRNA, in den Kopfspeicheldrüsen der Honigbiene deutet darauf hin, dass das Am5-HT $_{2\beta}$ Δ II-Protein auch mit anderen GPCRs wie beispielsweise dem Am5-HT $_{2\alpha}$ -Rezeptor interagieren könnte. Aufschluss über die mögliche Homo- und/oder Heterodimerisierung bzw. Oligomerisierung von 5-HT-Rezeptor-Subtypen untereinander und mit verkürzten Spleißvarianten der Honigbiene könnten zukünftige Co-Immunitätspräzipitations- und Fluoreszenz-Resonanzenergietransfer-(FRET-)Experimente liefern (MAUREL et al. 2008, BÖHME & BECK-SICKINGER 2009).

4.4 Expressionsmuster der Serotonin-Rezeptor-Subtypen im Kontext der altersabhängigen Arbeitsteilung

Als eusoziale Insekten sind *A. mellifera*-Individuen in Völkern organisiert. Für die Aufrechterhaltung der Homöostase eines Honigbienenvolkes ist die Verrichtung einer Vielzahl verschiedener Aufgaben durch Arbeiterinnen notwendig, welche beispielsweise das Sauberhalten des Nests, die Brutfürsorge und den Nährstoffeintrag umfassen (WILSON 1971, WINSTON 1987). Die Arbeitsteilung der *A. mellifera*-Arbeiterinnen ist dynamisch reguliert, jedoch in weiten Teilen altersabhängig (SEELEY 1982, ROBINSON 1992, PAGE & PENG 2001). Mit fortschreitendem Alter der Arbeiterin verlagern sich die durch sie bewerkstelligten Aufgaben vom Nestzentrum verstärkt in die Nestperipherie. Zwei charakteristische Aufgaben sind hierbei das Füttern der Larven und der Königin durch Ammenbienen im Alter von etwa 4 bis 12 Tagen, und das Eintragen von Pollen und Nektar etc., das Arbeiterinnen ab einem Alter von etwa 18 bis 21 Tagen beginnen (SEELEY 1982, ROBINSON 1992). Der Übergang von der Stockbiene zur Sammlerin geht mit Veränderungen des Transkriptom (WHITFIELD et al. 2003) und der Physiologie einher. Diese Veränderungen können sowohl selbst intrinsische Faktoren für den Übergang zur Sammlerin darstellen, als auch als Reaktion auf äußere Reize wie soziale

Interaktionen zur Kommunikation eines Bedarfs an Sammlerinnen angesehen werden (BESHERS & FEWEL 2001). Da biogene Amine wie 5-HT physiologische und neuronale Prozesse modulieren können (SCHEINER et al. 2006, BLENAU & THAMM 2011, BLENAU et al. 2013), erscheint eine Beteiligung an der Regulation der altersabhängigen Arbeitsteilung als wahrscheinlich. Gestützt wird diese Hypothese durch Studien, welche den Anstieg des 5-HT-Titers im Gehirn von Arbeiterinnen in Abhängigkeit vom Alter und der sozialen Aufgabe zeigten (SCHULZ & ROBINSON 1999, WAGENER-HULME et al. 1999). Dieses Ergebnis konnte auch in der vorliegenden Arbeit reproduziert werden: Sammlerinnen wiesen eine 1,6-fach höhere 5-HT-Konzentration im Gehirn auf als Ammenbienen. Die gemessenen Konzentrationen waren mit früher gefundenen Werten vergleichbar (WAGENER-HULME et al. 1999).

Da die Wirkung von 5-HT das Vorhandensein von 5-HT-Rezeptoren voraussetzt, wurde die Hypothese abgeleitet, dass sich die Expression von 5-HT-Rezeptoren in gleichem Maße altersabhängig und somit aufgabenspezifisch verändert. Es erfolgten Messungen der mRNA-Expression der 5-HT-Rezeptorgene *Am5-ht1A*, *Am5-ht2a*, *Am5-ht2 β* und *Am5-ht7* im Gehirn von 5 Tage alten (Ammen-)Bienen und 20 Tage alten Sammlerinnen. Hierbei zeigte sich für keines der untersuchten Gene eine altersabhängig regulierte Veränderung der mRNA-Expression. Die Verfügbarkeit eines spezifischen Antikörpers gegen das Am5-HT_{1A}-Rezeptorprotein erlaubte jedoch die Betrachtung der altersabhängigen Expression dieses Rezeptor-Subtyps über die mRNA-Ebene hinaus. Interessanterweise zeigte sich auf Proteinebene eine 2,7-fach höhere Konzentration des Am5-HT_{1A}-Proteins im Gehirn von älteren Sammlerinnen im Vergleich zu jüngeren Ammenbienen. Damit konnte zumindest für einen der vier 5-HT-Rezeptor-Subtypen der Honigbiene die Vermutung bestätigt werden, dass dessen Proteinexpression proportional mit dem altersbedingten Anstieg des 5-HT-Titers im Gehirn ansteigt. Gleichzeitig wird die Frage aufgeworfen, wie es in den Gehirnen von Ammenbienen und Sammlerinnen trotz gleichbleibender mRNA-Expression zu einer unterschiedlichen Proteinexpression kommt. Erklärungen hierfür erwachsen aus der Vergegenwärtigung, dass vielfältige Regulationsmöglichkeiten der vier grundlegenden Prozesse der Genexpression (Transkription, mRNA-Degradation, Translation, Proteindegradation) vorhanden sind (SCHWANNHÄUSSER et al. 2011). Da die Konzentration des *Am5-ht1A*-mRNA-Transkripts im Gehirn von Ammen und Sammlerinnen gleich groß ist, muss der Grund für die höhere Am5-HT_{1A}-Proteinkonzentration entweder in der Translation und/oder Proteindegradation liegen. Eine erhöhte Translationsrate des *Am5-ht1A*-mRNA-Transkripts würde zu einer höheren Proteinkonzentration bei älteren Sammlerinnen führen. Umgekehrt würde eine

erhöhte Degradationsrate des Am5-HT_{1A}-Proteins bei jüngeren Ammenbienen eine niedrigere Konzentration zur Folge haben. Umfangreiche quantitative Expressionsdaten von über 5.000 Säugetiergenen zeigten, dass die Proteinabundanz hauptsächlich von der Transkriptions- und Translationsrate abhängig ist (SCHWANNHÄUSSER et al. 2011). Degradationsprozesse tragen hingegen zur Erklärung unterschiedlicher Proteinkonzentrationen nur wenig bei (SCHWANNHÄUSSER et al. 2011). Darauf aufbauend wird eine erhöhte Translationsrate der *Am5-ht1A*-mRNA im Gehirn von Sammlerinnen im Vergleich zu Ammenbienen vermutet. Der Am5-HT_{1A}-Rezeptor wird im Gehirn neben Pilzkörperstrukturen auch in den optischen Loben exprimiert. Dort ist er bei der Modulation der Verarbeitung visueller Informationen beteiligt (THAMM et al. 2010). Eventuell kommt dieser Funktion des Am5-HT_{1A}-Rezeptors bei Sammlerinnen, welche täglich mehrmals das Nest verlassen und sich optisch orientieren müssen, eine größere Bedeutung zu, als in Ammenbienen, bei welchen eine optische Orientierung im Dunkel des Nests weniger wichtig erscheint. Ob sich die Steigerung der Am5-HT_{1A}-Expression im Gehirn von Sammlerinnen auf alle Neuropile gleichmäßig verteilt, oder ob sich diese auf die optischen Loben begrenzt, müssen weitergehende Experimente zeigen.

Weiterhin bleibt zu untersuchen, ob der in den Gehirnen älterer Tiere gefundenen erhöhten Am5-HT_{1A}-Konzentration eine reine Altersabhängigkeit zugrunde liegt, oder ob diese aufgabenspezifisch im Sinne der Arbeitsteilung reguliert wird. Dies kann an Völkern mit experimentell veränderter Altersstruktur untersucht werden (ROBINSON 1992). Gewöhnlich korreliert die Aufgabe hauptsächlich mit dem Alter der Arbeiterin (SEELEY 1982), jedoch können besondere Situationen in einem Honigbienenvolk auftreten, in welchen sich die Plastizität der Arbeitsteilung zeigt (ROBINSON 1992). In Völkern, welche ausschließlich aus Arbeiterinnen einer Altersgruppe aufgebaut werden (*single-cohort*-Kolonien), beginnen junge Stockbienen vorzeitig mit der Sammeltätigkeit. Umgekehrt revertieren ältere Sammlerinnen zu Ammenbienen, wenn einem Volk experimentell junge Arbeiterinnen im Ammenbienenalter entnommen werden (ROBINSON et al. 1989, ROBINSON 1992). Anhand von Expressionsmessungen der *Am5-ht*-Rezeptorgene in den Gehirnen von „revertierten Ammenbienen“ und „vorzeitigen Sammlerinnen“ ließe sich der Aspekt der Altersabhängigkeit eliminieren und etwaige Unterschiede wie der erhöhten Am5-HT_{1A}-Konzentration auf eine reine Aufgabenspezifität zurückführen. Dass Unterschiede in der Expression von Rezeptoren biogener Amine durchaus streng aufgabenspezifisch auftreten können, zeigten Untersuchungen an dem Octopaminrezeptorgen *AmOctaR1* der Honigbiene,

welches altersunabhängig bei Sammlerinnen stärker als bei Ammenbienen exprimiert wird (REIM & SCHEINER 2014).

Die Beobachtung einer fehlenden Korrelation von mRNA- und Proteinlevel im Falle des *Am5-ht1A*-Gens weist auf die grundsätzliche Problematik der Beschränkung auf mRNA-Messungen in Expressionsstudien hin. Die Ergebnisse von Studien an diversen Organismen, welche Transkriptome und Proteome verglichen, zeigen, dass durchschnittlich etwa 40% der Variation der Proteinabundanz durch mRNA-Messungen erklärt werden kann (GYGI et al. 1999, PRADET-BALADE et al. 2001, SCHWANNHÄUSSER et al. 2011, VOGEL & MARCOTTE 2012). Jedoch erscheint eine pauschale Beurteilung der Aussagekraft von mRNA-Expressionsdaten unmöglich, da die Expression jedes Gens innerhalb eines Genoms verschieden reguliert werden kann und im Einzelfall sehr wohl gute Korrelationen zwischen mRNA- und Proteinkonzentration vorliegen können (VOGEL & MARCOTTE 2012). Zudem unterliegt die Erforschung spezieller proteomischer Fragestellungen bei der gentechnisch begrenzt zugänglichen Honigbiene einigen Beschränkungen. Nichtsdestotrotz können quantitative mRNA-Messungen wertvolle Daten zur Beurteilung der Genexpression liefern, vor allem hinsichtlich regulativer Prozesse. Eine Verifizierung der Ergebnisse auf Proteinebene, wie es hier anhand des Am5-HT_{1A}-Rezeptors durchgeführt wurde, sollte Ziel künftiger Experimente sein. Hierzu ist die Generierung spezifischer Antikörper gegen die zu untersuchenden Proteine notwendig. Der Versuch der Herstellung eines spezifischen Antikörpers gegen das Am5-HT_{2β}-Rezeptorprotein war leider nicht erfolgreich (siehe 3.3; die Diskussion der Ergebnisse erfolgte aus Gründen der Verständlichkeit direkt im Ergebnisteil).

4.5 Expressionsmuster der Serotonin-Rezeptor-Subtypen im Kontext der Plastizität circadianer Rhythmik

Die Ausbildung circadianer Rhythmen ermöglicht es Organismen, täglich wiederkehrende Veränderungen ihrer Umwelt zu antizipieren. Verhaltensweisen wie beispielsweise ein circadian regulierter lokomotorischer Aktivitätsrhythmus sind das Resultat einer komplexen Kaskade rhythmisch regulierter Genexpression und Proteinakkumulation (PANDA et al. 2002, ALLADA 2003). Interessanterweise zeigen Honigbienen eine aufgabenspezifische Plastizität circadian regulierter Verhaltensweisen und physiologischer Prozesse (EBAN-ROTHSCHILD &

BLOCH 2012). Ammenbienen verhalten sich unter anderem hinsichtlich ihrer lokomotorischen Aktivität arrhythmisch. Mit dem Übergang zur Sammeltätigkeit werden hingegen stabile circadiane Rhythmen ausgebildet (SPANGLER 1972, MOORE 2001, MOORE et al. 1998, KLEIN et al. 2008, BLOCH et al. 2013a). Diese chronobiologische Plastizität ist mit einer Veränderung der Expression vieler verschiedener Gene assoziiert (RODRIGUEZ-ZAS et al. 2012). Während in den Gehirnen von Ammenbienen die circadian regulierte Expression von 160 Genen nachgewiesen werden konnte, steigt die Zahl der identifizierten rhythmisch exprimierten Gene bei Sammlerinnen auf 561 (RODRIGUEZ-ZAS et al. 2012), darunter auch verschiedene *clock*-Gene wie *per*, *cry-m*, *tim2* oder *cyc* (TOMA et al. 2000, BLOCH et al. 2001, BLOCH et al. 2004, BLOCH & MESHI 2007, SHEMESH et al. 2007).

Aufgrund der Interaktion des circadianen und serotonergen Systems bei Insekten (PAGE 1987, SAIFULLAH & TOMIOKA 2002, CYMBOROWSKI 2003, YUAN et al. 2005, NICHOLS 2007, BLOCH et al. 2013b) wurde die Annahme einer rhythmisch regulierten Expression der vier 5-HT-Rezeptorgene (*Am5-ht1A*, *Am5-ht2a*, *Am5-ht2 β* und *Am5-ht7*) im Gehirn von Arbeiterinnen geprüft. Die verwendeten 5 Tage alten Arbeiterinnen wurden aufgrund vergrößerter Hypopharynxdrüsen als Ammenbienen angesehen. Demgegenüber konnten bei 20 Tage alten Versuchstieren am Versuchstag pollenbeladene Corbiculae festgestellt werden, woraufhin diese als Sammlerinnen klassifiziert wurden. Unter Freilandbedingungen wiesen die Gehirne sowohl von 5 als auch 20 Tage alten Tieren keine auffälligen tageszeitabhängigen Änderungen der mRNA-Expression von *Am5-ht1A* und *Am5-ht7* auf. Die gemessenen Schwankungen lagen lediglich im Bereich des 1,46 und 1,3-Fachen und zeigten keine kontinuierliche Oszillation. Im Falle des Am5-HT_{1A}-Rezeptor-Subtyps konnten auch auf Proteinebene keine tageszeitlichen Veränderungen gefunden werden. Bei *D. melanogaster* zeigt die Expressionsstärke der *Dm5-ht1A*-mRNA circadiane Änderungen, wohingegen der Dm5-HT_{1B}-Rezeptor ebenso wie der Am5-HT_{1A}-Rezeptor auf mRNA- und Proteinebene nicht in seiner Expression oszilliert (CLARIDGE-CHANG et al. 2001). Demgegenüber zeigten sich deutliche tageszeitabhängige Veränderungen der mRNA-Expression von *Am5-ht2a* und *Am5-ht2 β* . Dabei kam es zu einer kontinuierlichen Zunahme der Expressionsstärke beider Rezeptorgene im Verlauf des Tages zwischen 10:00 und 18:00 Uhr um das 2,2- bzw. 2,6-Fache. Im Verlauf der Nacht verringerten sich die mRNA-Konzentrationen wieder auf Ausgangsniveau. Dieses Ergebnis ähnelt der im Gehirn von *D. melanogaster* ebenfalls nachgewiesenen tageszeitlich regulierten Oszillation der *Dm5-ht2a*-Expression. Eine Steigerung der Expressionsstärken beider *Am5-ht2*-Rezeptorgene im Verlauf des Tages und der damit wahrscheinlich stattfindenden Steigerung der Konzentration der entsprechenden

Rezeptorproteine erhöht die Sensitivität der beteiligten Gehirnbereiche für ein 5-HT-Signal. Beide Am5-HT₂-Rezeptor-Subtypen bewirken nach Bindung von 5-HT eine Steigerung der intrazellulären Ca²⁺-Konzentration (THAMM et al. 2013), welche unter anderem die Aktivität der Proteinkinase C (PKC) beeinflusst (BLENAU & BAUMANN 2011). Unterschiede in der PKC-Konzentration im Gehirn von Honigbienen wurden mit Unterschieden im Sammelverhalten in Verbindung gebracht, welches wiederum durch veränderte Reizschwellen für z.B. Zuckerwasser hervorgerufen wird (HUMPHRIES et al. 2003). Eventuell werden bestimmte Informations- und Reizverarbeitungsprozesse mit Beteiligung der Am5-HT₂-Rezeptor-Subtypen im Tagesverlauf verschieden moduliert. Bei *D. melanogaster* führt die pharmakologische Aktivierung von Dm5-HT₂-Rezeptoren zu einer Veränderung der circadian gesteuerten lokomotorischen Aktivität und einer Reduzierung des für das *entrainment* der circadianen Uhr typischen antizipatorischen Verhaltens (NICHOLS 2007). Ebenfalls bei *D. melanogaster* führt die Aktivierung des Dm5-HT_{1B}-Rezeptor-Subtyps zu einer posttranslationalen Modifikation von *clock*-Proteine, welche das *entrainment* der circadianen Uhr beeinflusst (YUAN et al. 2005). Zwar unterscheiden sich die inneren Uhren von *D. melanogaster* und *A. mellifera* in einigen wichtigen Punkten, etwa in den beteiligten *clock proteins* und in der unterschiedlichen Ontogenese (PANDA et al. 2002, BELL-PEDERSEN et al. 2005, HARDIN 2005, EBAN-ROTHSCHILD & BLOCH 2013). Dennoch lassen die Experimente von NICHOLS (2007) und YUAN et al. (2005) eine generelle Beteiligung von 5-HT-Rezeptor-Subtypen an der Steuerung circadianer Rhythmen vermuten.

Interessanterweise zeigten sowohl Sammlerinnen, als auch Ammenbienen ähnliche tageszeitliche Expressionsmuster der untersuchten Am5-HT-Rezeptor-Subtypen. Obwohl arrhythmisch, zeigen Ammen eine tageszeitliche Oszillation der *Am5-ht2a*- und *Am5-ht2β*-Expression. Vor dem Hintergrund, dass auch im Gehirn von Ammenbienen die Expression von über 160 Genen circadian reguliert wird (RODRIGUEZ-ZAS et al. 2012), erscheint dieses Ergebnis nicht ungewöhnlich.

Da sich die zentralen Schrittmacher der circadianen Uhr bei Insekten in den optischen Loben befinden (HELFRICH-FÖRSTER et al. 1998, HELFRICH-FÖRSTER 2004) und diese zumindest teilweise serotonerg innerviert werden (HAMASAKA & NÄSSEL 2006, YUAN et al. 2005), wurde die Hypothese geprüft, ob die in kompletten Gehirnen gefundenen tageszeitlichen Expressionsunterschiede auch in unterschiedlichen Teilen des Sammlerinnengehirns nachgewiesen werden können. Hierzu erfolgten Expressionsmessungen an separierten optischen Loben und dem Zentralgehirn. Verglichen mit den Messungen, welche an

kompletten Gehirnen durchgeführt wurden, ergab sich hierbei leider kein eindeutiges Bild. Tageszeitliche, als kontinuierliche Oszillation interpretierbare Veränderungen der mRNA-Expression können im Zentralgehirn für *Am5-ht1A* und *Am5-ht2 β* , und in den optischen Loben für *Am5-ht2 β* beobachtet werden. Die *Am5-ht2a*-mRNA-Expression variiert tagsüber in den optischen Loben mit Anstiegen zwischen 06:00 und 10:00 bzw. 14:00 und 18:00 Uhr und einer Reduktion während der Nacht, jedoch in deutlich geringerem Umfang als in den Messungen an kompletten Gehirnen. Das Muster der *Am5-ht2 β* -Expression zeigt grundsätzlich einen ähnlichen Verlauf verglichen mit den an kompletten Gehirnen gewonnenen Daten. Einem Anstieg des *Am5-ht2 β* -mRNA-Titers im Verlauf des Tages folgt eine Reduktion in der Nacht, jedoch in geringerem Umfang als bei den vorherigen Messungen. Im Falle des *Am5-ht7*-Transkripts konnte keine signifikante tageszeitliche Änderung beobachtet werden. Dies ist vergleichbar mit der relativ gleichmäßigen Expression der *Am5-ht7*-mRNA in ganzen Gehirnen. Grundsätzlich sei darauf hingewiesen, dass aus arbeitsorganisatorischen Gründen für die Expressionsmessungen in verschiedenen Gehirnteilen von Sammlerinnen zwar ebenso wie für die Messungen von kompletten Gehirnen Bienen aus Freiland-Völkern genutzt wurden, diese jedoch deutlich später im Jahr beprobt wurden. Da sich diverse Parameter wie Populations- und Brutentwicklung in einem Bienenvolk im Laufe des Jahres verändern (WINSTON 1987) und womöglich Einfluss auf die Expression von Genen haben, mag dies die Vergleichbarkeit der Messungen an kompletten Gehirnen und Gehirnteilen verringern. Nichtsdestotrotz konnten Parallelen hinsichtlich einer regulativen, tageszeitabhängigen Expression der *Am5-ht*-Rezeptorgene gefunden werden. Gleichzeitig erwächst aus diesen Befunden die Vermutung, dass eine Veränderung der Umgebungssituation Einfluss auf die Regulation der Serotonin-Rezeptor-Expression besitzt. Zwar vermögen äußere Faktoren, so genannte Zeitgeber, bestimmte Eigenschaften von circadianen Rhythmen, etwa die Phasenlänge, zu modulieren (ASCHOFF 1954). Jedoch sind circadiane Rhythmen grundsätzlich endogener Natur und treten demzufolge auch unter konstanten Umweltbedingungen auf, bzw. sind in ihrem Auftreten robust gegenüber einer bestimmten Variation der Umgebungsbedingungen (EBAN-ROTHSCHILD & BLOCH 2013).

Die Frage, ob es sich bei den im Freiland beobachteten tageszeitlichen Änderungen der *Am5-ht2a*- und *Am5-ht2 β* -Expression um den Ausdruck eines endogenen circadianen Rhythmus handelt oder ob diese Expressionsänderungen biologische Rhythmen mit externen Ursachen sind, konnte anhand von Laborexperimenten unter konstanten Bedingungen (Dauerdunkel, gleichbleibende relative Luftfeuchtigkeit) untersucht werden. Hierbei konnte für keines der vier *Am5-ht*-Rezeptorgene eine kontinuierliche tageszeitliche Veränderung

festgestellt werden, welche als systematische Oszillation der Genexpression aufgefasst werden könnte. Dies lässt den Schluss zu, dass die im Freiland, besonders in kompletten Gehirnen gemessenen Oszillationen selbst keine circadianen Rhythmen darstellen, da sie unter konstanten Bedingungen nicht auftreten. Die tageszeitlich regulierte Veränderung der Expressionsstärke von *Am5-ht2a* und *Am5-ht2β* besitzt demnach externe Ursachen. Diese könnten eventuell Licht, Temperatur und/oder Luftfeuchtigkeit darstellen. Da die Änderungen der *Am5-ht2a*- und *Am5-ht2β*-Expression im Freiland sowohl bei Sammlerinnen, als auch Ammenbienen auftreten, könnte ein Stimulus für die tageszeitlichen Änderungen zusätzlich in dem Auftreten sozialer Kontakte vermutet werden. Ammenbienen sind in der Regel im Stock relativ konstanten Licht-, Temperatur- und Luftfeuchtigkeitsbedingungen ausgesetzt. Jedoch schwankt die Anzahl der gleichzeitig im Stock befindlichen Bienen stark in Abhängigkeit von der Tageszeit (WINSTON 1987). Während tagsüber Sammlerinnen aus- und einfliegen, sind nachts alle Mitglieder des Volkes im Nest. Dabei verändert sich die direkte Umgebung der Ammenbienen und stellt eventuell andere Anforderungen in die Reiz- und Informationsverarbeitung mit Beteiligung des serotonergen Systems. Die mögliche Bedeutung sozialer Kontakte für die Regulation der *Am5-ht2*-Expression wird zudem dadurch gestützt, dass der Versuchsaufbau im Labor unter konstanten Bedingungen die physische Separierung der Versuchstiere über die Versuchsdauer von 20 Tagen vorsah. In diesem Zusammenhang sind die weniger eindeutigen Ergebnisse der Messungen an zerlegten Gehirnen von Freilandtieren, welche spät im Jahr gesammelt wurden, möglicherweise auf eine für den Spätsommer typische Abnahme der Population des Bienenvolks zurückzuführen, welche die Anzahl, Intensität und Qualität der sozialen Kontakte beeinflusst. Eventuell werden die die regulative *Am5-ht2*-Expression hervorrufenden Reize auch von Sammlerinnen extern erfahren und indirekt an Ammenbienen übermittelt. Ein solcher Mechanismus liegt auch dem Erklärungsmodell zugrunde, wonach circadiane Rhythmen bei Stockbienen durch den sozialen Kontakt mit Sammlerinnen synchronisiert werden (BLOCH et al. 2013c).

Anhand der durchgeführten Messungen unter konstanten Laborbedingungen zeigte sich des Weiteren, dass die Ausbildung eines circadianen lokomotorischen Aktivitätsrhythmus unabhängig von einer tageszeitlich regulierten Veränderung der Serotonin-Rezeptor-Expression erfolgt. Dies wird deutlich, da alle untersuchten Tiere einen circadianen Aktivitätsrhythmus aufwiesen.

Für die Erarbeitung eines umfassenderen Bildes bezüglich der Veränderung des serotonergen Systems im Tagesverlauf und dessen möglicher Einfluss auf circadiane

Rhythmen der Honigbiene erscheint nicht nur eine Untersuchung der Serotonin-Rezeptor-Expression notwendig, sondern auch die Betrachtung des biogenen Amins 5-HT selbst. Hierfür wurden HPLC-Analysen an Gehirnen von Ammenbienen und Sammlerinnen, welche unter Freilandbedingungen gehalten wurden, durchgeführt. Die Haltung der Versuchstiere ähnelte in dieser Untersuchung derjenigen, welche zur Messung der Serotonin-Rezeptorgen-Expression an ganzen Gehirnen genutzt wurde. Es zeigte sich, dass sowohl in den Gehirnen von 5 Tage alten Ammenbienen, als auch 20 Tage alten Sammlerinnen keine signifikanten Änderungen des 5-HT-Titers zu beobachten waren. Dies erscheint insbesondere vor dem Hintergrund interessant, dass die unter ähnlichen Bedingungen gemessene mRNA-Konzentration von *Am5-ht2a* und *Am5-ht2β* selbst tageszeitlichen Änderungen unterliegt. Für eine Verstärkung des durch 5-HT vermittelten Signals zu einer bestimmten Zeit wäre somit nicht eine verstärkte 5-HT-Synthese notwendig, sondern bestimmte Gehirnbereiche würden durch eine verstärkte Am5-HT₂-Rezeptorexpression ihrerseits die Sensitivität gegenüber eines 5-HT-Signals erhöhen.

Interessanterweise wiesen die erhobenen Daten eine relativ große Streuung auf, welche auf größere Unterschiede zwischen den einzelnen Versuchstieren hindeutet. Dies wurde bereits von PYZA et al. (1991) für *A. domesticus* beschrieben, welche gar die untersuchten Tiere der verwendeten Laborpopulation anhand ihres 5-HT-Titers im Gehirn in unterschiedliche Gruppen einteilen konnten. Die große interindividuelle Variation mag auch dazu beitragen, dass die Ergebnisse tagesperiodischer Untersuchungen des 5-HT-Gehalts im Gehirn von Insekten mitunter inkonsistent sind. Während FOWLER et al. (1972) tageszeitliche Änderungen des 5-HT-Titers bei *D. melanogaster* zeigten, fanden YUAN et al. (2005) keine solche Oszillation im Gehirn adulter Tiere. Ebenso konnten die von MUSZYNSKA-PYTEL & CYMBOROWSKI (1978) beschriebenen Oszillationen des 5-HT-Titers im Gehirn von *A. domesticus* von PYZA et al. (1991) nicht bestätigt werden. Jedoch zeigen eine ganze Reihe von Studien an Insektengehirnen tageszeitabhängige Oszillationen des 5-HT-Gehalts (LINN et al. 1994, LINN et al. 1995, KLOPPENBURG 1999). Auch in den Gehirnen von Säugetieren kommt es zu tageszeitbedingter Variation des 5-HT-Titers (JAGOTA & KALYANI 2008). Es kann jedoch nicht ausgeschlossen werden, dass es in bestimmten serotonergen Neuronen im Honigbienenhirn zu Oszillationen des 5-HT-Titers kommt, während in anderen Gehirnbereichen keine tageszeitlichen Änderungen stattfinden. Messungen des 5-HT-Titers bei *Homarus americanus* (Decapoda: Nephropidae) ergaben, dass es durchaus in verschiedenen Gehirnregionen (optische Loben, Antennalloben) zu unterschiedlichen Oszillationen mit unterschiedlichen Phasen kommen kann (WILDT et al. 2004).

Insgesamt zeigten die durchgeführten Messungen der *Am5-HT*-Rezeptorgen-Expression und des 5-HT-Titers im Gehirn, dass die Plastizität der Arbeitsteilung zwischen Ammenbienen und Sammlerinnen, welche sich auch auf der Ebene der circadianen Rhythmik auswirkt (BLOCH 2010), nicht im Zusammenhang mit unterschiedlichen *Am5-HT*-Expressionsmustern oder unterschiedlichen tagesperiodischen Änderungen des 5-HT-Titers steht.

4.6 Einfluss von Serotonin auf Parameter der circadianen Aktivitätsrhythmik

Die Ausbildung einer circadianen Rhythmik der lokomotorischen Aktivität unterliegt bei *A. mellifera* einem ontogenetischen Prozess. Ammenbienen, welche in Völkern mit normaler Altersstruktur in der Regel jünger sind als Sammlerinnen, sind rund um die Uhr lokomotorisch aktiv (SPANGLER 1972, MOORE 2001, BLOCH 2010). Dies wird nur durch kurze Schlafphasen unterbrochen, welche keinem bestimmten circadian regulierten Muster folgen (BLOCH et al. 2013a). Mit dem Übergang zur Sammeltätigkeit bildet sich ein starker circadianer Aktivitätsrhythmus aus (SPANGLER 1972, MOORE 2001). Dieses Phänomen ist nicht strikt altersabhängig, sondern korreliert mit dem Kontext der sozialen Aufgabe der Arbeiterin (BLOCH & ROBINSON 2001). Interessanterweise ist das Fehlen des circadianen Aktivitätsrhythmus nicht darauf zurückzuführen, dass die im Normalfall jüngeren Ammenbienen nicht zur Ausbildung einer solchen Rhythmik in der Lage wären. So zeigte sich, dass junge *A. mellifera*-Arbeiterinnen bereits kurz nach der Entnahme aus dem Volk unter Laborbedingungen vorzeitig einen starken circadianen Aktivitätsrhythmus ausbilden (SHEMESH et al. 2007, SHEMESH et al. 2010). Die differenzierte Arbeitsteilung bei Honigbienen korreliert ebenfalls mit einer Veränderung des 5-HT-Titers im Honigbienenhirn (TAYLOR et al. 1992, WAGENER-HULME et al. 1999). Es wurde anhand verhaltenspharmakologischer Experimente der Einfluss des serotonergen Systems auf die Ausbildung des circadianen Aktivitätsrhythmus untersucht. Es erfolgte die Verabreichung von jeweils 10 mM 5-HT, 5-CT, 5-MeOT und Methiothepin. Hierbei wurde 5-CT als Agonist der Rezeptor-Subtypen 5-HT_{1A} und 5-HT₇ (SCHLENSTEDT et al. 2006, THAMM et al. 2010), 5-MeOT als Agonist der Rezeptor-Subtypen 5-HT_{2α} und 5-HT_{2β} (THAMM et al. 2013) und Methiothepin als genereller 5-HT-Rezeptor-Antagonist (SCHLENSTEDT et al. 2006, THAMM et al. 2010) verwendet. Leider zeigten die mit 5-CT, 5-MeOT und Methiothepin behandelten Tiere eine gegenüber der

Kontrollgruppe stark erhöhte Mortalität. Zwar wurden die verwendeten Substanzen bereits zuvor erfolgreich in dieser Konzentration in Verhaltensexperimenten mit *A. mellifera* eingesetzt (THAMM et al. 2010), jedoch war für die hier zu untersuchenden Parameter eine chronische Behandlung der Versuchstiere über mehr als 15 Tage notwendig. In weiterführenden Experimenten sollte demnach eine Anpassung der Konzentration der verwendeten Agonisten und Antagonisten erfolgen. Bei der Auswertung des Verhaltensexperiments wurden nur die Daten der Tiere, die mit 5-HT gefüttert wurden, berücksichtigt.

Es wurde kein signifikanter Einfluss der Aktivierung des serotonergen Systems mittels 5-HT-Applikation auf den zeitlichen Verlauf der Ausbildung eines circadianen Aktivitätsrhythmus unter Laborbedingungen festgestellt. Dies ergänzt die bisherigen Erkenntnisse der tagesperiodischen Messungen an (arrhythmischen) Ammenbienen und (rhythmischen) Sammlerinnen (siehe 4.5). Es erhärtet sich die Vermutung, dass das serotonerge System bei *A. mellifera* prinzipiell keinen Einfluss auf die generelle Funktionsweise der circadianen Uhr besitzt. Dieses Ergebnis ist vergleichbar mit den Erkenntnissen von BLOCH & MESHI (2007), welche ebenfalls keinen Einfluss des biogenen Amins Octopamin und von Juvenilhormon auf die Ausbildung eines circadianen lokomotorischen Aktivitätsrhythmus nachweisen konnten.

Jedoch zeigte sich, dass die Serotonin-Rezeptoraktivität einen signifikanten Einfluss auf die Periodenlänge des circadian gesteuerten lokomotorischen Aktivitätsrhythmus besitzt. Die unter konstanten Bedingungen gehaltenen Versuchstiere wiesen bei 5-HT-Applikation eine längere Periode des Aktivitätsrhythmus als Tiere der Kontrollgruppe auf. Die Periode des circadianen Aktivitätsrhythmus wird unter natürlichen Bedingungen permanent anhand der realen Umgebungsbedingungen synchronisiert. Dieses *entrainment* bedarf unter anderem einer Perzeption visueller Reize, deren photische Information über einen neuronalen Eingangssignalweg an die innere Uhr im Gehirn übermittelt werden muss. Über einen Ausgangssignalweg wird dann die lokomotorische Aktivität des Tieres angepasst (BELL-PEDERSEN et al. 2005). So zeigten MOORE & RANKIN (1985), dass die Periode des lokomotorischen Aktivitätsrhythmus bei Honigbienen unter konstanter Beleuchtung signifikant länger war als bei Tieren, welche konstanter Dunkelheit (DD) ausgesetzt waren. Da 5-HT die Periode des Aktivitätsrhythmus beeinflusst, kann auf eine Modulation des neuronalen Eingangssignalwegs, über welchen die photische Synchronisation der Periodenlänge abläuft, geschlossen werden. Diese Hypothese wird durch die

Erkenntnisse von THAMM et al. (2010) gestützt, wonach die Modulation der Aktivität des serotonergen Systems durch die Applikation von 5-HT die phototaktische lokomotorische Aktivität beeinflusst. Bei *D. melanogaster* wurde ebenfalls ein modulierender Effekt von 5-HT auf die Photosensitivität der circadianen Uhr nachgewiesen (YUAN et al. 2005). Dort führt die Aktivierung des Dm5-HT_{1B}-Rezeptor-Subtyps zu einer verstärkten Phosphorylierung der Proteinkinase *Shaggy*, welches in die posttranslationale Modifikation des *clock*-Gens *timeless* eingreift und dessen lichtinduzierte Degradation herabsetzt (YUAN et al. 2005). Obwohl *A. mellifera* kein orthologes Protein zu *timeless* exprimiert (BLOCH 2010), erscheint ein ähnlicher Mechanismus auch bei der Honigbiene vorstellbar. Die modulierende Wirkung des serotonergen Systems auf die lichtinduzierte Synchronisation bestimmter Funktionen der circadianen Uhr scheint generell im Tierreich weit verbreitet zu sein. Dies zeigen neben weiteren Studien an Insekten wie *A. domesticus* (CYMBOROWSKI 1970), *C. vicina* (CYMBOROWSKI 1998, CYMBOROWSKI 2003) oder *G. bimaculatus* (SAIFULLAH & TOMIOKA 2002, SAIFULLAH & TOMIOKA 2003) auch Experimente an Säugetieren (MORIN 1999). Die pharmakologische Modulation der 5-HT-Rezeptoraktivität beeinflusst die bei Säugern im suprachiasmatischen Nucleus (Gehirnregion im ventralen Hypothalamus) befindliche circadiane Uhr (ALBRECHT & EICHELE 2003) und führt beispielsweise ebenfalls zur Veränderung von lichtinduzierten Phasenverschiebungen (CUESTA et al. 2008, PAULUS & MINTZ 2011).

4.7 Ausblick

In dieser Arbeit konnte ein wichtiger Beitrag zum Verständnis des serotonergen Systems bei *A. mellifera*, insbesondere hinsichtlich der räumlichen und zeitlichen Expressionsmuster der *Am5-ht*-Rezeptorgene, geleistet werden. Vergleiche der Rezeptorexpression auf mRNA- und Proteinebene sowie umweltbedingte tageszeitliche Änderungen der Expression von Rezeptor-Subtypen zeigten, dass die gefundenen Expressionsmuster einer Reihe von regulativen Mechanismen unterliegen. Die Aufklärung der Ursachen, Wirkungsweisen und Funktionen dieser Regulationen bedarf weiterer Forschung. Weiterführende Experimente sollten den Fokus verstärkt von der mRNA- auf die Proteinebene der 5-HT-Rezeptorexpression lenken. Hierfür sollten weitere Anstrengungen zur Generierung spezifischer Antikörper unternommen werden. Aufgrund des Fehlens spezifischer Antikörper gegen die Am5-HT_{2α}-, Am5-HT_{2β}- sowie Am5-HT₇-Proteine konnten bislang keine immunhistochemischen Daten

zur zellulären Lokalisation dieser Rezeptor-Subtypen im Gehirn und anderen Geweben erhoben werden. Erkenntnisse aus immunhistochemischen Färbungen können jedoch einen wesentlichen Beitrag zur Aufklärung möglicher Funktionen der untersuchten Proteine leisten. Nicht nur im Gehirn sollte die Verteilung der 5-HT-Rezeptor-Subtypen genauer untersucht werden, auch in peripheren Organen wären solche Untersuchungen wertvoll. Es wurde zwar die Expression der Serotonin-Rezeptorgene im Darmtrakt nachgewiesen, jedoch bleibt offen, ob die Expression sich auf die Darmmuskulatur, das Darmepithel und/oder das enterische Nervensystem beschränkt.

Die durchgeführten Expressionsmessungen zeigten das systematische Vorkommen der alternativen Spleißvarianten *Am5-ht2 α Δ III* und *Am5-ht2 β Δ II* mit zum Teil gewebeübergreifend auftretenden Mustern. Es erscheint somit sehr wahrscheinlich, dass diesen verkürzten Proteinvarianten *in vivo* physiologisch relevante Funktionen zukommen. Zur Aufklärung dieser hypothetischen Funktionen erscheinen Co-Expressionsstudien der verkürzten Spleißvarianten mit deren Volllängenproteinen in heterologen Zellsystemen sinnvoll. Es bieten sich insbesondere HEK293-Zellen an, für welche bereits Expressionskonstrukte für die Volllängenproteine Am5-HT_{2 α} und Am5-HT_{2 β} vorliegen. Zur Überprüfung der Hypothese, dass es zu Interaktionen der Spleißvarianten mit den zugehörigen Rezeptorproteinen kommt, empfehlen sich beispielsweise Co-Immunpräzipitations- und FRET-Experimente (MAUREL et al. 2008, BÖHME & BECK-SICKINGER 2009).

Der insbesondere bei Am5-HT_{1A} gefundene unterschiedliche Proteintiter zwischen 6 und 21 Tage alten Arbeiterinnen lässt die Frage offen, ob es sich dabei um einen rein altersbedingten oder vielmehr aufgabenspezifischen Unterschied handelt. Die Arbeitsteilung unterliegt bei *A. mellifera* größtenteils einer altersbedingten Abfolge von Tätigkeiten (SEELEY 1982). Daher ist es notwendig, zur Entkopplung des Alters und der sozialen Aufgabe experimentell in die Altersstruktur des zu untersuchenden Honigbienenvolkes einzugreifen. Anhand von *single-cohort*- und Reversionskolonien (ROBINSON 1992) ließen sich Erkenntnisse über die Ursache und Funktion des gefundenen Unterschieds in der Am5-HT_{1A}-Expression gewinnen. Entsprechende Experimente erscheinen ebenso für die weiteren 5-HT-Rezeptor-Subtypen auf Proteinebene sinnvoll, sowie geeignete Antikörper vorhanden sind.

Es gelang, die Expression verschiedener *Am5-ht*-Rezeptorgene in exokrinen Drüsen wie Kopf- und Thoraxspeicheldrüsen und Hypopharynxdrüsen nachzuweisen. Untersuchungen an Speicheldrüsen anderer Insekten belegen eine funktionelle Steuerung der Aktivität dieser Organe durch 5-HT (BERRIDGE & PATEL 1968, TROPFMANN et al. 2007, WALZ et al. 2009,

RÖSER et al. 2012). Entsprechende funktionelle Untersuchungen, etwa pharmakologische Experimente an separierten Speichel- und Hypopharynxdrüsen, welche an Sekretionsmessungen koppeln, könnten Daten über die mögliche Beteiligung der Serotonin-Rezeptor-Subtypen an Sekretionsprozessen liefern.

Es bleibt unklar, welche externen Faktoren zu der im Freiland beobachteten Oszillation der *Am5-ht2*-Expression führen. Möglicherweise wäre eine Versuchsanordnung, wie sie im hier durchgeführten Verhaltensexperiment beschrieben wurde, zur Klärung dieser Frage hilfreich. Es sollte dabei die tageszeitliche Rezeptor-Expression im Gehirn bei Tieren unter Laborbedingungen gemessen werden, welche separat einer Variation möglicher Faktoren (Licht, Temperatur, relative Luftfeuchtigkeit, soziale Kontakte) im Tagesverlauf unterliegen.

Um einen tieferen Einblick in die Interaktion des serotonergen und circadianen Systems der Honigbiene zu erhalten, sollten weitere verhaltenspharmakologische Untersuchungen an separierten Honigbienen durchgeführt werden. Durch eine Anpassung der Konzentrationen der angewandten 5-HT-Rezeptor-Agonisten und Antagonisten könnte auch eine chronische Applikation dieser Substanzen über einen hinreichend langen Zeitraum gelingen. Denkbar ist auch eine Modulation der Rezeptor-Expression mittels RNA-Interferenz (RNAi) (MALESZKA et al. 2007, JAROSCH & MORITZ 2011). Auf diese Weise beeinflusste Bienen könnten beispielsweise zunächst unter konstanten Lichtbedingungen (DD) gehalten werden und nach einer gewissen Habituationszeit einem Lichtimpuls ausgesetzt werden. Durch Messung der lokomotorischen Aktivität sollte dies Daten über den Einfluss von 5-HT auf das lichtinduzierte *entrainment* der inneren Uhr der Honigbiene liefern.

5 Literatur

- ALBRECHT, U. & EICHELE, G. (2003): The mammalian circadian clock. – *Current Opinion in Genetics & Development* **13**: 271-277.
- ALLADA, R. (2003): Circadian clocks. A tale of two feedback loops. – *Cell* **112**: 284–286.
- AMDAM, G. V. & OMHOLT, S. W. (2003): The hive bee to forager transition in honeybee colonies: the double repressor hypothesis. – *Journal of Theoretical Biology* **223**: 451–464.
- ANSTEY, M. L.; ROGERS, S. M.; OTT, S. R.; BURROWS, M. & SIMPSON, S. J. (2009): Serotonin mediates behavioral gregarization underlying swarm formation in desert locusts. – *Science* **323**: 627-630.
- ASCHOFF, J. (1954): Zeitgeber der tierischen Tagesperiodik. – *Naturwissenschaften* **41**: 49-56.
- BARCHUK, A., CRISTINO, A., KUCHARSKI R., COSTA, L., SIMÕES, Z. & MALESZKA, R., (2007): Molecular determinants of caste differentiation in the highly eusocial honeybee *Apis mellifera*. – *BMC Developmental Biology* **7**: 70.
- BARD, J. A.; ZGOMBICK, J.; ADHAM, N.; VAYSSE, P.; BRANCHEK, T. A. & WEINSHANK, R. L. (1993): Cloning of a novel human serotonin receptor (5-HT₇) positively linked to adenylyate cyclase. – *The Journal of Biological Chemistry* **268**: 23422-23426.
- BARRETT, F. M.; ORCHARD, I. & TE BRUGGE, V. (1993): Characteristics of serotonin-induced cyclic AMP elevation in the integument and anterior midgut of the blood-feeding bug, *Rhodnius prolixus*. – *Journal of Insect Physiology* **39**: 581-587.
- BAUMANN, A., BLENAU, W. and ERBER, J. (2009) Biogenic amines. In: RESH, V. H. & CARDÉ, R. T.: Encyclopedia of insects. – *Academic Press, San Diego*, 2. Auflage.
- BECNEL, J.; JOHNSON, O.; LUO, J.; NÄSSEL, D. R. & NICHOLS, C. D. (2011): The serotonin 5-HT₇Dro receptor is expressed in the brain of *Drosophila*, and is essential for normal courtship and mating. – *PLOS One* **6**.
- BELL-PEDERSEN, D.; CASSONE, V. M.; EARNEST, D. J.; GOLDEN, S. S.; HARDIN, P. E.; THOMAS, T. L. & ZORAN, M. J. (2005): Circadian rhythms from multiple oscillators: lessons from diverse organisms. – *Nature Reviews Genetics* **6**: 544-556.
- BERRIDGE, M. J. & PATEL, N. G. (1968): Insect salivary glands. Stimulation of fluid secretion by 5-hydroxytryptamine and adenosine-3,5-monophosphate. – *Science* **162**: 462-463.
- BESHES, S. N. & FEWELL, J. H. (2001): Models of division of labor in social insects. – *Annual Reviews of Entomology* **46**: 413-440.

- BICKER, G. (1999): Biogenic amines in the brain of the honeybee: cellular distribution, development, and behavioral functions. – *Microscopy Research and Technique* **44**: 166–178.
- BICKER, G. & MENZEL, R. (1989): Chemical codes for the control of behaviour in arthropods. – *Nature* **337**: 33–39.
- BLACK, D. L. (2003): Mechanisms of alternative pre-messenger RNA splicing. – *Annual Review of Biochemistry* **72**: 291–336.
- BLENAU, W. & BAUMANN, A. (2001): Molecular and pharmacological properties of insect biogenic amine receptors: Lessons from *Drosophila melanogaster* and *Apis mellifera*. – *Archives of Insect Biochemistry and Physiology* **48**: 13–38.
- BLENAU, W. & THAMM, M. (2011): Distribution of serotonin (5-HT) and its receptors in the insect brain with focus on the mushroom bodies: Lessons from *Drosophila melanogaster* and *Apis mellifera*. – *Arthropod Structure and Development* **40**: 381–394.
- BLENAU, W.; THAMM, M. & BAUMANN, A. (2013): Serotonin in insects: distribution, biosynthesis, uptake, inactivation, receptors, functions, and implications for human health. In: HALL, F. S.: Serotonin: Biosynthesis, regulation and health implications. – *NOVA Publishers*, 1. Auflage.
- BLOCH, G. (2010): The social clock of the honeybee. – *Journal of Biological Rhythms* **25**: 307–317.
- BLOCH, G.; BARNES, B. M.; GERKEMA, M. P. & HELM, B. (2013a): Animal activity around the clock with no overt circadian rhythms: patterns, mechanisms and adaptive value. – *Proceedings of the Royal Society B* **280**: 20130019.
- BLOCH, G. & GROZINGER, C. M. (2011): Social molecular pathways and the evolution of bee societies. – *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* **366**: 2155–2170.
- BLOCH, G.; HAZAN, E. & RAFAELI, A. (2013b): Circadian rhythms and endocrine functions in adult insects. – *Journal of Insect Physiology* **59**: 56–69.
- BLOCH, G.; HERZOG, E. D.; LEVINE, J. D. & SCHWARTZ, W. J. (2013c): Socially synchronized circadian oscillators. – *Proceedings of the Royal Society B* **280**: 20130035.
- BLOCH, G. & MESHI, A. (2007): Influences of octopamine and juvenile hormone on locomotor behavior and period gene expression in the honeybee, *Apis mellifera*. – *Journal of Comparative Physiology A* **193**: 181–199.
- BLOCH, G. & ROBINSON, G. E. (2001): Reversal of honeybee behavioural rhythms. – *Nature* **410**: 1048–1048.
- BLOCH, G., RUBINSTEIN, C. D. & ROBINSON, G. E. (2004): Period expression in the honey bee brain is developmentally regulated and not affected by light, flight experience, or colony type. – *Insect Biochemistry and Molecular Biology* **34**: 879–891.

- BLOCH, G.; TOMA, D. P. & ROBINSON, G. E. (2001): Behavioral rhythmicity, age, division of labor and period expression in the honey bee brain. – *Journal of Biological Rhythms* **16**: 444-456.
- BOCKAERT, J. and PIN, J. P. (1999): Molecular tinkering of G protein-coupled receptors: an evolutionary success. – *EMBO Journal* **18**: 1723-1729.
- BÖHME, I. & BECK-SICKINGER, A. G. (2009): Illuminating the life of GPCRs. – *Cell Communication and Signaling* **7**: 16-16.
- BORMAN, R. A.; TILFORD, N. S.; HARMER, D. W.; DAY, N.; ELLIS, E. S.; SHELDRIK, R. L. G.; CAREY, J.; COLEMAN, R. A. & BAXTER, G. S. (2002): 5-HT_{2B} receptors play a key role in mediating the excitatory effects of 5-HT in human colon *in vitro*. – *British Journal of Pharmacology* **135**: 1144-1151.
- BOUE, S.; LETUNIC, I. & BORK, P. (2003): Alternative splicing and evolution. – *BioEssays: News and Reviews in Molecular, Cellular and Developmental Biology* **25**: 1031-1034.
- BRADFORD, M. M. (1976): A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. – *Analytical Biochemistry* **7**: 248-54.
- BUCEKOVA, M.; VALACHOVA, I.; KOHUTOVA, L.; PROCHAZKA, E.; KLAUDINY, J. & MAJTAN, J. (2014): Honeybee glucose oxidase - its expression in honeybee workers and comparative analyses of its content and H₂O₂-mediated antibacterial activity in natural honeys. – *Naturwissenschaften* **101**: 661-670.
- BUDNIK, V.; WU, C. F. & WHITE, K. (1989): Altered branching of serotonin-containing neurons in *Drosophila* mutants unable to synthesize serotonin and dopamine. – *Journal of Neuroscience* **9**: 2866-2877.
- CALDERÓN-ROSETE, G.; FLORES, G. & RODRÍGUEZ-SOSA, L. (2006): Diurnal rhythm in the levels of the serotonin 5-HT_{1A} receptors in the crayfish eyestalk. – *Synapse* **59**: 368-373.
- CAMERON, R. C.; DUNCAN, E. J. & DEARDEN, P. K. (2013): Biased gene expression in early honeybee larval development. – *BMC Genomics* **14**: 903.
- CAMERON, S. A. (1993): Multiple origins of advanced eusociality in bees inferred from mitochondrial DNA sequences. – *Proceedings of the National Academy of Sciences* **90**: 687-8691.
- CANTON, H.; EMESON, R. B.; BARKER, E. L.; BACKSTROM, J. R.; LU, J. T.; CHANG, M. S. & SANDERS-BUSH, E. (1996): Identification, molecular cloning, and distribution of a short variant of the 5-hydroxytryptamine_{2C} receptor produced by alternative splicing. – *Molecular Pharmacology* **50**: 799-807.
- CHEN, X.; HU, Y.; ZHENG, H.; CAO, L.; NIU, D.; YU, D.; SUN, Y.; HU, S. & HU, F. (2012): Transcriptome comparison between honey bee queen- and worker-destined larvae. – *Insect Biochemistry and Molecular Biology* **42**: 665-673.

- CIARLEGIO, C. M.; RESUEHR, H. E. & MCMAHON, D. G. (2011): Interactions of the serotonin and circadian systems: nature and nurture in rhythms and blues. – *Neuroscience* **197**: 8-16.
- CLARIDGE-CHANG, A.; WIJNEN, H.; NAEF, F.; BOOTHROYD, C.; RAJEWSKY, N. & YOUNG, M.W. (2001): Circadian regulation of gene expression systems in the *Drosophila* head. – *Neuron* **32**: 657-671.
- COAST, G. (2011): Serotonin has kinin-like activity in stimulating secretion by Malpighian tubules of the house cricket *Acheta domesticus*. – *Peptides* **32**: 500-508.
- COLAS, J.-F.; LAUNAY, J.-M.; KELLERMANN, O.; ROSAY, P. & MAROTEAUX, L. (1995): *Drosophila* 5-HT₂ serotonin receptor: coexpression with fushi-tarazu during segmentation. – *Proceedings of the National Academy of Sciences* **92**: 5441-5445.
- COLAS, J.-F.; CHOI, D.-S.; LAUNAY, J.-M.; MAROTEAUX L. (1997): Evolutionary conservation of the 5-HT_{2B} receptors. – *Annals of the New York Academy of Sciences* **812**: 149-153.
- COLAS, J.-F.; LAUNAY, J.-M.; VONESCH, J.-L.; HICKEL, P. & MAROTEAUX, L. (1999): Serotonin synchronises convergent extension of ectoderm with morphogenetic gastrulation movements in *Drosophila*. – *Mechanisms of Development* **87**: 77-91.
- CRAILSHEIM, K. (1991): Interadult feeding of jelly in honeybee (*Apis mellifera* L) colonies. – *Journal of Comparative Physiology B* **161**: 55–60.
- CRAILSHEIM, K. (1992): The flow of jelly within a honeybee colony. – *Journal of Comparative Physiology B* **162**: 681–689.
- CRESPI, B. J. & YANEGA, D. (1995): The definition of eusociality. – *Behavioral Ecology* **6**: 109-115.
- CRUZ-LANDIM, C. (1967): Estudo comparativo de algumas glândulas das abelhas (Hymenoptera, Apoidea) e respectivas implicações evolutivas. – *Arquivos de Zoologia* **15**: 177-290.
- CRUZ-LANDIM, C. & COSTA, R. A. C. (1998): Structure and function of the hypopharyngeal glands of Hymenoptera: A comparative approach. – *Journal of Comparative Biology* **3**: 151-163.
- CUESTA, M.; MENDOZA, J.; CLESSE, D.; PEVET, P. & CHALLET, E. (2008): Serotonergic activation potentiates light resetting of the main circadian clock and alters clock gene expression in a diurnal rodent. – *Experimental Neurology* **210**: 501–513.
- CYMBOROWSKI, B. (1970): The assumed participation of 5-hydroxytryptamine in regulation of the circadian rhythm of locomotor activity in *Acheta domesticus* L. – *Comparative and General Pharmacology* **1**: 316-322.
- CYMBOROWSKI, B. (1998): Serotonin modulates a photic response in circadian locomotor rhythmicity of adults of the blow fly, *Calliphora vicina* – *Physiological Entomology* **23**: 25-32.

- CYMBOROWSKI, B. (2003): Effects of 5,7-dihydroxytryptamine (5,7-DHT) on circadian locomotor activity of the blowfly, *Calliphora vicina*. – *Journal of Insect Science* **3**:14.
- DESEYN, J. & BILLEN, J. (2005): Age-dependent morphology and ultrastructure of the hypopharyngeal gland of *Apis mellifera* workers (Hymenoptera, Apidae). – *Apidologie* **36**: 49-57.
- DETTNER, K. & PETERS, W. (1999): Lehrbuch der Entomologie. – *Gustav Fischer Verlag*, 1. Auflage.
- DIERICK, H. A. & GREENSPAN, R. J. (2007): Serotonin and neuropeptide F have opposite modulatory effects on fly aggression. – *Nature Genetics* **39**: 678-682.
- EBAN-ROTHSCHILD, A. & BLOCH, G. (2008): Differences in the sleep architecture of forager and young honeybees (*Apis mellifera*). – *Journal of Experimental Biology* **211**: 2408-2416.
- EBAN-ROTHSCHILD, A. & BLOCH, G. (2012): Circadian rhythms and sleep in honey bees. – In: GALIZIA, C. G.; EISENHARDT, D. & GIURFA, M.: Honeybee Neurobiology and Behavior. A Tribute to Randolph MENZEL. – *Springer*, 1. Auflage.
- EBAN-ROTHSCHILD, A.; SHEMSH, Y. & BLOCH, G. (2012): The colony environment, but not direct contact with conspecifics, influences the development of circadian rhythms in honey bees. – *Journal of Biological Rhythms* **27**: 217-225.
- ELOFSSON, R. & KLEMM, N. (1972): Monoamine-containing neurons in the optic ganglia of crustaceans and insects. – *Zeitschrift für Zellforschung und mikroskopische Anatomie* **133**: 475-499.
- EVANS, J. D. & WHEELER, D. E. (1999): Differential gene expression between developing queens and workers in the honey bee, *Apis mellifera*. – *Proceedings of the National Academy of Sciences* **96**: 5575-5580.
- EVANS, J. D. & WHEELER, D. E. (2001): Expression profiles during honeybee caste determination. – *Genome Biology* **2**: 1-6.
- FALIBENE, A.; RÖSSLER, W. & JOSENS, R. (2012): Serotonin depresses feeding behaviour in ants. – *Journal of Insect Physiology* **58**: 7-17.
- FENG, M.; FANG, Y.; HAN, B.; ZHANG, L.; LU, X. & LI, J. (2013): Novel aspects of understanding molecular working mechanisms of salivary glands of worker honeybees (*Apis mellifera*) investigated by proteomics and phosphoproteomics. – *Journal of Proteomics* **87**: 1-15.
- FOWLER, D. J.; GOODNIGHT, C. J. & LABRIE, M. M. (1972): Circadian rhythms of 5-hydroxytryptamine (serotonin) production in larvae, pupae, and adults of *Drosophila melanogaster* (Diptera: Drosophilidae). – *Annals of the Entomological Society of America* **65**: 138-141.

- FRENCH, A. S.; SIMCOCK, K. L.; ROLKE, D. GARTSIDE, S. E.; BLENAU, W. & WRIGHT, J. A. (2014): The role of serotonin in feeding and gut contractions in the honeybee. – *Journal of Insect Physiology* **61**: 8-15.
- FRISCH, B. & ASCHOFF, J. (1987): Circadian rhythms in honeybees: entrainment by feeding cycles. – *Physiological Entomology* **12**, 41-49.
- FUJITA, T.; KOZUKA-HATA, H.; UNO, Y.; NISHIKORI, K.; MORIOKA, M.; OYAMA, M. & KUBO, T. (2010): Functional analysis of the honeybee (*Apis mellifera* L.) salivary system using proteomics. – *Biochemical and Biophysical Research Communications* **397**: 740-744.
- FUJITA, T.; KOZUKA-HATA, H.; AO-KONDO H.; KUNIEDA, T.; OYAMA, M. & KUBO, T. (2013): Proteomic analysis of the royal jelly and characterization of the functions of its derivation glands in the honeybee. – *Journal of Proteome Research* **12**: 404-411.
- GASQUE, G.; CONWAY, S.; HUANG, J.; RAO, Y. & VOSSHALL, L. B. (2013): Small molecule drug screening in *Drosophila* identifies the 5HT_{2A} receptor as a feeding modulation target. – *Scientific Reports* **3**: srep02120.
- GIANNONI-GUZMÁN, M. A.; AVALOS, A.; MARRERO PEREZ, J.; OTERO LOPERENA, E. J.; KAYIM, M.; ALEJANDRO MEDINA, J.; MASSEY, S. E.; KENCE, M.; KENCE, A.; GIRAY, T. & AGOSTO-RIVERA, J. L. (2014): Measuring individual locomotor rhythms in honey bees, paper wasps and other similar-sized insects. – *Journal of Experimental Biology* **217**: 1307-1315.
- GIOINO, P.; MURRAY, B. G. & IANOWSKI, J. P. (2014): Serotonin triggers cAMP and PKA-mediated intracellular calcium waves in Malpighian tubules of *Rhodnius prolixus*. – *American Journal of Physiology* **307**: 828-836.
- GOLDMAN, T. D. & ARBEITMAN, M. N. (2007): Genomic and functional studies of *Drosophila* sex hierarchy regulated gene expression in adult head and nervous system tissues. – *PLOS Genetics* **3**: 2278-2295.
- GUDERMANN, T.; KALKBRENNER, F. & SCHULTZ, G. (1996): Diversity and selectivity of receptor-G protein interaction. – *Annual Review of Pharmacology and Toxicology* **36**: 429-459.
- GUDERMANN, T.; SCHÖNEBERG, T. & SCHULTZ, G. (1997): Functional and structural complexity of signal transduction via G-protein-coupled receptors. – *Annual Review Neuroscience* **20**: 399-427.
- GUEST, P. C.; SALIM, K.; SKYNNER, H. A.; GEORGE, S. E.; BRESNICK, J. N. & MCALLISTER, G. (2000): Identification and characterization of a truncated variant of the 5-hydroxytryptamine_{2A} receptor produced by alternative splicing. – *Brain Research* **876**: 238-244.
- GUO, X.; MA, Z.; KANG, L. (2013): Serotonin enhances solitariness in phase transition of the migratory locust. – *Frontiers in Behavioral Neuroscience* **7**: 1-12.
- GYGI, S. P.; ROCHON, Y.; FRANZA, R. & AEBERSOLD, R. (1999): Correlation between protein and mRNA abundance in yeast. – *Molecular and Cellular Biology* **19**: 1720-1730.

- HAMASAKA, Y. & NÄSSEL, D. R. (2006): Mapping of serotonin, dopamine, and histamine in relation to different clock neurons in the brain of *Drosophila*. – *Journal of Comparative Neurology* **494**: 314-330.
- HANNON, J. & HOYER, D. (2008): Molecular biology of 5-HT receptors. – *Behavioural Brain Research* **195**: 198-213.
- HARDIN, P. E. (2005): The circadian timekeeping system of *Drosophila*. – *Current Biology* **15**, 714-722.
- HARRIS, J. W. & WOODRING, J. (1992): Effects of stress, age, season, and colony on levels of octopamine, dopamine and serotonin in the honey bee (*Apis mellifera* L.) brain. – *Journal of Insect Physiology*: **38**: 29-35.
- HAUSER, F.; CAZZAMALI, G.; WILLIAMSON, M.; BLENAU, W. & GRIMMELIKHUIJZEN, C. J. (2006): A review of neurohormone GPCRs present in the fruitfly *Drosophila melanogaster* and the honey bee *Apis mellifera*. – *Progress in Neurobiology* **80**: 1-19.
- HAYDAK, M. H. (1943): Larval food and development of castes in the honeybee. – *Journal of Economic Entomology* **36**: 778-792.
- HELFRICH-FÖRSTER, C. (2004): The circadian clock in the brain: a structural and functional comparison between mammals and insects. – *Journal of Comparative Physiology A* **190**: 601-613.
- HELFRICH-FÖRSTER, C.; STENGL, M. & HOMBERG, U. (1998): Organization of the circadian system in insects. – *Chronobiology International* **15**: 567-594.
- HERRICK-DAVIS, K.; GRINDE, E. & MAZURKIEWICZ, J. E. (2004): Biochemical and biophysical characterization of serotonin 5-HT_{2C} receptor homodimers on the plasma membrane of living cells. – *Biochemistry* **43**: 13963-13971.
- HERRICK-DAVIS, K.; GRINDE, E.; HARRIGAN, T. J. & MAZURKIEWICZ, J. E. (2005): Inhibition of serotonin 5-hydroxytryptamine_{2c} receptor function through heterodimerization: receptor dimers bind two molecules of ligand and one G-protein. – *Journal of Biological Chemistry* **280**: 40144-40151.
- HIRSH, J. & DAVIDSON, N. (1981): Isolation and characterization of the dopa decarboxylase gene of *Drosophila melanogaster*. – *Molecular and Cellular Biology* **1**: 475-485.
- HOLLAND, P. M.; ABRAMSON, R. D.; WATSON, R. & GELFAND, D. H. (1991): Detection of specific polymerase chain reaction product by utilizing the 5' → 3' exonuclease activity of *Thermus aquaticus* DNA polymerase. – *Proceedings of the National Academy of Sciences* **88**: 7276-7280.
- HÖLLDOBLER, B. & WILSON, E. O. (2009): The superorganism: the beauty, elegance, and strangeness of insect societies. – *W. W. Norton*, 1. Auflage.

- HOMBERG, U. (1994): Distribution of neurotransmitters in the insect brain. – *Progress in Zoology* **40**.
- HOYER, D.; CLARKE, D. E.; FOZARD, J. R.; HARTIG, P. R.; MARTIN, G. R.; MYLECHARANE, E. J.; SAXENA, P. R. & HUMPHREY, P. P. (1994): International Union of Pharmacology classification of receptors for 5-hydroxytryptamine (Serotonin). – *Pharmacological Reviews* **46**: 157-203.
- HOYER, D.; HANNON, J. P. & MARTIN, G. R. (2002): Molecular, pharmacological and functional diversity of 5-HT receptors. – *Pharmacology, Biochemistry and Behavior* **71**: 533-554.
- HUANG, X.; DURAN, E.; DIAZ, F.; XIAO, H.; MESSER, W. S. & KOMMUNIECKI, R. (1999): Alternative-splicing of serotonin receptor isoforms in the pharynx and muscle of the parasitic nematode, *Ascaris suum*. – *Molecular and Biochemical Parasitology* **101**: 95-106.
- 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.
- JAGOTA, A. & KALYANI, D. (2008): Daily serotonin rhythms in rat brain during postnatal development and aging. – *Biogerontology* **9**: 229-234.
- JAROSCH, A. & MORITZ, R. F. A. (2011): Systemic RNA-interference in the honeybee *Apis mellifera*: tissue dependent uptake of fluorescent siRNA after intra-abdominal application observed by laser-scanning microscopy. – *Journal of Insect Physiology* **57**: 851-857.
- JOHNSON, B. R. (2010): Division of labor in honeybees: form, function, and proximate mechanisms. – *Behavioral Ecology and Sociobiology* **64**: 305-316.
- JOHNSON, O.; BECNEL, J. & NICHOLS, C. D. (2009): Serotonin 5-HT₂ and 5-HT_{1A}-like receptors differentially modulate aggressive behaviors in *Drosophila melanogaster*. – *Neuroscience* **158**: 1292-1300.
- KAMAKURA, M. (2011): Royalactin induces queen differentiation in honeybees. – *Nature* **473**: 478-483.
- KATZAV-GOZANSKY, T.; SOROKER, V.; IONESCU, A.; ROBINSON, G. E. & HEFETZ, A. (2001): Task-related chemical analysis of labial gland volatile secretion in worker honeybees (*Apis mellifera ligustica*). – *Journal of Chemical Ecology* **27**: 919-926.
- KIM, E.; GOREN, A. & AST, G. (2008): Alternative splicing: current perspectives. – *BioEssays: News and Reviews in Molecular, Cellular and Developmental Biology* **30**: 38-47.
- KLEIN, B. A.; OLZSOWY, K. M.; KLEIN, A.; SAUNDERS, K. M. & SEELEY, T. D. (2008): Caste-dependent sleep of worker honey bees. – *Journal of Experimental Biology* **211**: 3028-3040.

- KLOPPENBURG, P.; FERNS, D. & MERCER, A. R. (1999): Serotonin enhances central olfactory neuron responses to female sex pheromone in the male sphinx moth *Manduca sexta*. – *Journal of Neuroscience* **19**: 8172-8181.
- KNADLER, J. J. & PAGE, T. L. (2009): Social interactions and the circadian rhythm in locomotor activity in the cockroach *Leucophaea maderae*. – *Chronobiology International* **26**: 415-429.
- KNECHT, D. & KAAZ, H. H. (1990): Patterns of larval food production by hypopharyngeal glands in adult worker honey bees. – *Apidologie* **21**: 457-468.
- KUBO, T.; SASAKI, M.; NAKAMURA, J.; SASAGAWA, H.; OHASHI, K.; TAKEUCHI, H. & NATORI, S. (1996): Change in the expression of hypopharyngeal-gland proteins of the worker honeybees (*Apis mellifera* L.) with age and/or role. – *Journal of Biochemistry* **119**: 291-295.
- LAEMMLI, U. K. (1970): Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. – *Nature* **227**: 680-685.
- LEE, D. W. & PIETRANTONIO, P. V. (2003): *In vitro* expression and pharmacology of the 5-HT₇-like receptor present in the mosquito *Aedes aegypti* tracheolar cells and hindgut-associated nerves. – *Insect Molecular Biology* **12**: 561-569.
- LIN, N. & MICHENER, C. D. (1972): Evolution of sociality in insects. – *The Quarterly Review of Biology* **47**: 131-159.
- LINN, C. E.; POOLE, K. R. & ROELOFS, W. L. (1994): Studies on biogenic amines and their metabolites in nervous tissue and hemolymph of adult male cabbage looper moths - I. Quantitation of photoperiod changes. – *Comparative Biochemistry and Physiology C* **108**: 73-85.
- LINN, C. E.; POOLE, K. R.; WU, W.-Q. & ROELOFS, W. L. (1995): Circadian changes in melatonin in the nervous system and hemolymph of the cabbage looper moth, *Trichoplusia ni* – *Comparative Biochemistry and Physiology A* **176**: 761-771.
- LISCIA, A.; SOLARI, P.; GIBBONS, S. T.; GELPERIN, A. & STOFFOLANO, J. G. (2012): Effect of serotonin and calcium on the supercontractile muscles of the adult blowfly crop. – *Journal of Insect Physiology* **58**: 356-366.
- LIU, S. S.; LI, A. Y.; WITT, C. M. & PÉREZ DE LEÓN, A. A. (2011): Immunohistological localization of serotonin in the CNS and feeding system of the stable fly *Stomoxys calcitrans* L. (Diptera: Muscidae). – *Archives of Insect Biochemistry and Physiology* **77**: 199-219.
- LIVINGSTONE, M. S. & TEMPEL, B. L. (1983): Genetic dissection of monoamine neurotransmitter synthesis in *Drosophila*. – *Nature* **303**: 67-70.
- LOVENBERG, W.; WEISSBACH, H.; UDENFRIEND, S. (1962): Aromatic L-amino acid decarboxylase. – *Journal of Biological Chemistry* **237**: 89-93.

- MCGOWAN, K., KANE, A., ASARKOF, N., WICKS, J., GUERINA, V., KELLUM, J., BARON, S., GINTZLER, A. R. & DONOWITZ, M. (1983). *Entamoeba histolytica* causes intestinal secretion: role of serotonin. – *Science* **221**: 762-764.
- MADDRELL, S. H. P.; HERMAN, W. S.; MOONEY, R. L. & OVERTON, J. A. (1991): 5-Hydroxytryptamine: a second diuretic hormone in *Rhodnius prolixus*. – *Journal of Experimental Biology* **156**: 557-566.
- MALESZKA, J.; FORÊT, S.; SAINT, R. & MALESZKA, R. (2007): RNAi-induced phenotypes suggest a novel role for a chemosensory protein CSP5 in the development of embryonic integument in the honeybee (*Apis mellifera*). – *Development Genes and Evolution* **217**: 189-196.
- MARKOVIC, D. & CHALLISS, R. A. J. (2009): Alternative splicing of G protein-coupled receptors: physiology and pathophysiology. – *Cellular and Molecular Life Sciences* **66**: 3337-3352.
- MAUREL, D.; COMPS-AGRAR, L.; BROCK, C.; RIVES, M. L.; BOURRIER, E.; AYOUB, M. A.; BAZIN, H.; TINEL, N.; DURROUX, T.; PRÉZEAU, L.; TRINQUET, E. & PIN, J. P. (2008): Cell-surface protein-protein interaction analysis with time-resolved FRET and snap-tag technologies: application to GPCR oligomerization. – *Nature Methods* **5**: 561-567.
- MENZEL, R.; HEYNA, A.; KINZEL, C.; GERBER, B. & FIALA, A. (1999): Pharmacological dissociation between the reinforcing, sensitizing, and response-releasing functions of reward in honeybee classical conditioning. – *Journal of Neuroscience* **113**: 744-754.
- MERCER, A. R. (1987): Biogenic amines in the insect brain. - In: GUPTA, A. P.: *Arthropod brain. Its evolution, development, structure, and functions*. – *John Wiley & Sons*, 1. Auflage.
- 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.
- MIAN, I. S. & ROSE, C. (2011): Communication theory and multicellular biology. – *Integrative Biology* **3**: 350-367.
- MICHENER, C. D. (1969): Comparative social behavior of bees. – *Annual Reviews of Entomology* **14**: 299-342.
- MISTLBERGER, R. E.; ANTLE, M. C.; GLASS, J. D. & MILLER, J. D. (2000): Behavioral and serotonergic regulation of circadian rhythms. – *Biological Rhythm Research* **31**: 240-283.
- MOFFETT, S. B. & MOFFETT, D. F. (2005): Comparison of immunoreactivity to serotonin, FMRFamide and SCPb in the gut and visceral nervous system of larvae, pupae and adults of the yellow fever mosquito *Aedes aegypti*. – *Journal of Insect Science* **5**: 20.
- MOLAEI, G. & LANGE, A. B. (2003): The association of serotonin with the alimentary canal of the African migratory locust, *Locusta migratoria*: distribution, physiology and pharmacology. – *Journal of Insect Physiology* **49**: 1073-1082.
- MOORE, D. (2001): Honey bee circadian clocks: behavioral control from individual workers to whole-colony rhythms. – *Journal of Insect Physiology* **47**: 843-857.

- MOORE, D. & RANKIN, M. A. (1985): Circadian locomotor rhythms in individual honeybees. – *Physiological Entomology* **10**: 191-197.
- MOORE, D. & RANKIN, M. A. (1993): Light and temperature entrainment of a locomotor rhythm in honeybees. – *Physiological Entomology* **18**: 271-278.
- MOORE, D.; ANGEL, J. E.; CHEESEMAN, I. M.; FAHRBACH, S. E. & ROBINSON, G. E. (1998): Timekeeping in the honey bee colony: integration of circadian rhythms and division of labor. – *Behavioral Ecology and Sociobiology* **43**: 147-160.
- MORGAN, P. J.; MORDUE, W. (1984): 5-Hydroxytryptamine stimulates fluid secretion in locust Malpighian tubules independently of cAMP. – *Comparative Biochemistry and Physiology C* **79**: 305-310.
- MORIN, L. P. (1999): Serotonin and the regulation of mammalian circadian rhythmicity. – *Annual Review of Medicine* **31**: 12-33.
- MÜLLER, U. (2000): Prolonged activation of cAMP-dependent protein kinase during conditioning induces long-term memory in honeybees. – *Neuron* **27**: 159-168.
- NALL, A. & SEHGAL, A. (2014): Monoamines and sleep in *Drosophila*. – *Behavioral Neuroscience* **128**, 264-272.
- NECKAMEYER, W. S. (2010): A trophic role for serotonin in the development of a simple feeding circuit. – *Developmental Neuroscience* **32**: 217-237.
- NICHOLS, C. D. (2007): 5-HT₂ receptors in *Drosophila* are expressed in the brain and modulate aspects of circadian behaviors. – *Developmental Neurobiology* **67**: 752-763.
- NICHOLS, D. E. & NICHOLS, C. D. (2008): Serotonin receptors. – *Chemical Reviews* **108**: 1614-1641.
- NICOLSON, S. & MILLAR, R. P. (1983): Effects of biogenic amines and hormones on butterfly Malpighian tubules: dopamine stimulates fluid secretion. – *Journal of Insect Physiology* **29**: 611-615.
- O'TOOLE, C. & RAW, A. (1991): Bees of the world. – *Blandford*, 1. Auflage.
- OHASHI, K.; NATORI, S. & KUBO, T. (1999): Expression of amylase and glucose oxidase in the hypopharyngeal gland with an age-dependent role change of the worker honeybee (*Apis mellifera* L.). – *European Journal of Biochemistry* **265**: 127-133.
- ONO, H. & YOSHIKAWA, H. (2004): Identification of amine receptors from a swallowtail butterfly, *Papilio xuthus* L.: cloning and mRNA localization in foreleg chemosensory organ for recognition of host plants. – *Insect Biochemistry and Molecular Biology* **34**: 1247-1256.
- PAGE, R. E.; FONDRK, M. K.; HUNT, G. J.; GUZMÁN-NOVOA, E.; HUMPHRIES, M. A.; NGUYEN, K. & GREEN, A. S. (2000): Genetic dissection of honey bee (*Apis mellifera* L.) foraging behavior. – *The Journal of Heredity* **91**: 474-479.

- PAGE, R. E. & PENG, C. Y.-S. (2001): Aging and development in social insects with emphasis on the honey bee, *Apis mellifera* L. – *Experimental Gerontology* **36**: 695-711.
- PAGE, R. E.; SCHEINER, R.; ERBER, J. & AMDAM, G. V. (2006): The development and evolution of division of labor and foraging specialization in a social insect (*Apis mellifera* L.). – *Current Topics in Developmental Biology* **74**: 253-286.
- PAGE, R. E. & AMDAM, G. V. (2007): The making of a social insect: developmental architectures of social design – *Bioessays* **29**: 334-343.
- PAGE, T. L. (1987): Serotonin phase-shifts the circadian rhythm of locomotor activity in the cockroach. – *Journal of Biological Rhythms* **2**: 23-34.
- PALUZZI, J.-P. V.; BHATT, G.; WANG, C.-H. J.; ZANDAWALA, M.; LANGE, A. B. & ORCHARD, I. (2015): Identification, functional characterization, and pharmacological profile of a serotonin type-2b receptor in the medically important insect, *Rhodnius prolixus*. – *Frontiers in Neuroscience* **9**: 175.
- PANDA, S.; HOGENESCH, J. B. & KAY, S. A. (2002): Circadian rhythms from flies to human. – *Nature* **417**: 329-335.
- PATEL, N. G.; HAYDAK, M. H. & GOCHNAUER, T. A. (1960): Electrophoretic components of the proteins in honeybee larval food. – *Nature* **186**: 633-634.
- PAULUS, E. V. & MINTZ, E. M. (2011): Developmental disruption of the serotonin system alters circadian rhythms. – *Physiology and Behavior* **105**: 257-263.
- PAUWELS, P. J. (2000): Diverse signalling by 5-hydroxytryptamine (5-HT) receptors. – *Biochemical Pharmacology* **60**: 1743-1750.
- PENZLIN, H. (1985): Stomatogastric nervous system. – In: KERKUT, G. A. & GILBERT, L. I.: *Comprehensive Insect Physiology, Biochemistry and Pharmacology*. – *Pergamon Press*, 1. Auflage.
- PEROUTKA, S. J. (1994): 5-Hydroxytryptamine receptors in vertebrates and invertebrates: why are there so many? – *Neurochemistry International* **25**: 533-536.
- PEROUTKA, S. J. & HOWELL, T. A. (1994): The molecular evolution of G protein-coupled receptors: focus on 5-hydroxytryptamine receptors. – *Neuropharmacology* **33**: 319-324.
- PIETRANTONIO, P. V.; JAGGE, C. & MCDOWELL, C. (2001): Cloning and expression analysis of a 5HT7-like serotonin receptor cDNA from mosquito *Aedes aegypti* female excretory and respiratory systems. – *Insect Molecular Biology* **10**: 357-369.
- POIANI, S. B. & CRUZ-LANDIM, C. (2010a): Cephalic salivary glands of two species of advanced eusocial bees (Hymenoptera: Apidae): morphology and secretion. – *Zoologia* **27**: 979-985.

- POIANI, S. B. & CRUZ-LANDIM, C. (2010b): Changes in the size of cephalic salivary glands of *Apis mellifera* and *Scaptotrigona postica* (Hymenoptera: Apidae) queens and workers in different life phases. – *Zoologia* **27**: 961–964.
- PRADET-BALADE, B.; BOULMÉ, F.; BEUG, H.; MÜLLNER, E. W. & GARCIA-SANZ, J. A. (2001): Translation control: bridging the gap between genomics and proteomics? – *TRENDS in Biochemical Sciences* **26**: 225–229.
- PRINS, N. H.; BRIEJER, M. R.; VAN BERGEN, P. J.; AKKERMANS, L. M. & SCHUURKES, J. A. (1999): Evidence for 5-HT₇ receptors mediating relaxation of human colonic circular smooth muscle. – *British Journal of Pharmacology* **128**: 849–852.
- PYZA, E.; GOLEMBIOWSKA, K. & ANTKIEWICZ-MICHALUK, L. (1991): Serotonin, dopamine, noradrenaline and their metabolites: Levels in the brain of the house cricket (*Acheta domesticus* L.) during a 24-hour period and after administration of quipazine - a 5-HT₂ receptor agonist. – *Comparative Biochemistry and Physiology C* **100**: 365–371.
- QI, Y.-X.; XIA, R.-Y.; WU, Y.-S.; STANLEY, D.; HUANG, J. & YE, G.-Y. (2014): Larvae of the small white butterfly, *Pieris rapae*, express a novel serotonin receptor. – *Journal of Neurochemistry* **131**: 767–777.
- 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* **4403**: 342–350.
- 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.
- RIOS, C. D.; JORDAN, B. A.; GOMES, I. & DEVI, L. A. (2001): G-protein-coupled receptor dimerization: modulation of receptor function. – *Pharmacology & Therapeutics* **92**: 71–87.
- ROBERTS, K. M. & FITZPATRICK, P. F. (2013): Mechanisms of tryptophan and tyrosine hydroxylase. – *IUBMB Life* **65**: 350–357.
- ROBINSON, G. E. (1987): Regulation of honey bee age polyethism by juvenile hormone. – *Behavioral Ecology and Sociobiology* **20**: 329–338.
- ROBINSON, G. E.; PAGE, R. E.; STRAMBLI, C. & STRAMBLI, A. (1989): Hormonal and genetic control of behavioral integration in honey bee colonies. – *Science* **246**: 109–112.
- ROBINSON, G. E. (1992): Regulation of division of labor in insect societies. – *Annual Reviews of Entomology* **37**: 637–665.
- RODRIGUEZ-ZAS, S. L.; SOUTHEY, B. R.; SHEMESH, Y.; RUBIN, E. B.; COHEN, M.; ROBINSON, G. E. & BLOCH, G. (2012): Microarray analysis of natural socially regulated plasticity in circadian rhythms of honey bees. – *Journal of Biological Rhythms* **27**: 12–24.
- ROEDER, T. (1994): Biogenic amines and their receptors in insects. – *Comparative Biochemistry and Physiology C* **107**: 1–12.

- RÖSER, C.; JORDAN, N.; BALFANZ, S.; BAUMANN, A.; WALZ, B.; BAUMANN, O. & BLENAU, W. (2012): Molecular and pharmacological characterization of serotonin 5-HT_{2α} and 5-HT₇ receptors in the salivary glands of the blowfly *Calliphora vicina*. – *PLOS One* **7**.
- SAIFULLAH, A. S. M. & TOMIOKA, K. (2002): Serotonin sets the day state in the neurons that control coupling between the optic lobe circadian pacemakers in the cricket *Gryllus bimaculatus*. – *Journal of Experimental Biology* **205**: 1305-1314.
- SAIFULLAH, A. S. M. & TOMIOKA, K. (2003): 5-HT₇-like receptors mediate serotonergic modulation of photo-responsiveness of the medulla bilateral neurons in the cricket, *Gryllus bimaculatus*. – *Zoological Science* **20**: 303-309.
- SALIM, K.; FENTON, T.; BACHA, J.; URIEN-RODRIGUEZ, H.; BONNERT, T.; SKYNNER, H. A.; WATTS, E.; KERBY, J.; HEALD, A.; BEER, M.; MCALLISTER, G. & GUEST, P. C. (2002): Oligomerization of G-protein-coupled receptors shown by selective co-immunoprecipitation. – *Journal of Biological Chemistry* **277**: 15482-15485.
- SAUDOU, F.; BOSCHERT, U.; AMLAIKY, N.; PLASSAT, J. L. & HEN, R. (1992): A family of *Drosophila* serotonin receptors with distinct intracellular signalling properties and expression patterns. – *The EMBO Journal* **11**: 7-17
- SAUDOU, F. & HEN, R. (1994): 5-Hydroxytryptamin receptor subtypes in vertebrates and invertebrates. – *Neurochemistry International* **25**: 503-532.
- SCHÄFER, S. & BICKER, G. (1986): Common projection areas of 5-HT- and GABA-like immunoreactive fibers in the visual system of the honeybee. – *Brain Research* **380**: 368-370.
- SCHEINER, R.; BAUMANN, A. & BLENAU, W. (2006): Aminergic control and modulation of honeybee behaviour. – *Current Neuropharmacology* **4**: 259-276.
- SCHLENSTEDT, J. (2005): Molekulare und pharmakologische Charakterisierung von Serotonin-Rezeptoren der Honigbiene *Apis mellifera*. – *Dissertation*, Universität Potsdam.
- SCHLENSTEDT, J.; BALFANZ, S.; BAUMANN, A. & BLENAU, W. (2006): Am5-HT₇: molecular and pharmacological characterization of the first serotonin receptor of the honeybee (*Apis mellifera*). – *Journal of Neurochemistry* **98**: 1985-1998.
- SCHMID, B.; HELFRICH-FÖRSTER, C. & YOSHII, T. (2011): A new ImageJ plug-in “ActogramJ” for chronobiological analyses. – *Journal of Biological Rhythms* **26**: 464-467.
- SCHULZ, D. J. & ROBINSON, G. E. (2001): 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.
- SCHÜRMMANN, F. W. & KLEMM, N. (1984): Serotonin-immunoreactive neurons in the brain of the honeybee. – *Journal of Comparative Neurology* **225**: 570-580.
- SCHWANNHÄUSER, B.; BUSSE, D.; LI, N.; DITTMAR, G.; SCHUCHHARDT, J.; WOLF, J.; CHEN, W. & SELBACH, M. (2011): Global quantification of mammalian gene expression control. – *Nature* **473**: 337-342.

- SCHWARTZ, L. M. & REYNOLDS, S. E. (1979): Fluid transport in *Calliphora* Malpighian tubules: a diuretic hormone from the thoracic ganglion and abdominal nerves. - *Journal of Insect Physiology* **25**: 847-854.
- SEELEY, T. D. (1979): Queen substance dispersal by messenger workers in honeybee colonies. - *Behavioral Ecology and Sociobiology* **5**: 391-415.
- SEELEY, T. D. (1982): Adaptive significance of the age polyethism schedule in honeybee colonies. - *Behavioral Ecology and Sociobiology* **11**: 287-293.
- SHARMA, V. K. (2003): Adaptive significance of circadian clocks. - *Chronobiology International* **20**: 901-919.
- SHEMESH, Y.; COHEN, M. & BLOCH, G. (2007): Natural plasticity in circadian rhythms is mediated by reorganization in the molecular clockwork in honey bees. - *FASEB Journal* **21**: 2304-2311.
- SHEMESH, Y.; EBAN-ROTHSCHILD, A. D.; COHEN, M. & BLOCH, G. (2010): Molecular dynamics and social regulation of context-dependent plasticity in the circadian clockwork of the honey bee. - *Journal of Neuroscience* **30**: 12517-12525.
- SIMPSON, J. (1960): The functions of salivary glands of *Apis mellifera*. - *Journal of Insect Physiology* **4**: 107-121.
- SITAMARAN, D.; ZARS, M.; LAFERRIERE, H.; CHEN, Y. C.; SABLE-SMITH, A.; KITAMOTO, T.; ROTTINGHAUS, G. E. & ZARS, T. (2008): Serotonin is necessary for place memory in *Drosophila*. - *Proceedings of the National Academy of Sciences* **105**: 5579-5584.
- SKAER, N. J. V.; NÄSSEL, D. R.; MADDRELL, S. H. P. & TUBLITZ, N. J. (2002): Neurochemical fine tuning of a peripheral tissue: peptidergic and aminergic regulation of fluid secretion by Malpighian tubules in the tobacco hawkmoth *M. sexta*. - *Journal of Experimental Biology* **205**: 1869-1880.
- SMITH, C. W.; PATTON, J. G. & NADAL-GINARD, (1989): B. Alternative splicing in the control of gene expression. - *Annual Review of Genetics* **23**: 527-577.
- SMITH, C. R.; TOTH, A. L.; SUAREZ, A. V. & ROBINSON, G. E. (2008): Genetic and genomic analyses of the division of labour in insect societies. - *Nature Reviews Genetics* **9**: 735-748.
- SNODGRASS, R. E. (1956): Anatomy of the honey bee. - *Cornell University Press*. 1. Auflage
- SPANGLER, H. G. (1972): Daily activity rhythms of individual worker and drone honey bees. - *Annals of the Entomological Society of America* **65**: 1073-1076.
- STERN, M.; KNIPP, S. & BICKER, G. (2007): Embryonic differentiation of serotonin-containing neurons in the enteric nervous system of the locust (*Locusta migratoria*). - *Journal of Comparative Neurology* **501**: 38-51.

- STOLC, V.; GAUHAR, Z.; MASON, C.; HALASZ, G.; VAN BATENBURG, M. F.; RIFKIN, S. A.; HUA, S.; HERREMAN, T.; TONGPRASIT, W.; BARBANO, P. E.; BUSSEMAKER, H. J. & WHITE, K. P. (2004): A gene expression map for the euchromatic genome of *Drosophila melanogaster*. – *Science* **306**: 655–660.
- SUGIURA, M.; FUKU, S.; SUO, S.; SASAGAWA, N.; VAN TOL, H. H. & ISHIURA, S. (2005): Characterization of a novel D2-like dopamine receptor with a truncated splice variant and a D1-like dopamine receptor unique to invertebrates from *Caenorhabditis elegans*. – *Journal of Neurochemistry* **94**: 1146–1157.
- TAYLOR, D. J.; ROBINSON, G. E.; LOGAN, B. J.; LAVERTY, R. & MERCER, A. R. (1992): Changes in brain amine levels associated with the morphological and behavioural development of the worker honeybee. – *Journal of Comparative Physiology A* **170**: 715–721.
- TE BRUGGE, V.; IANOWSKI, J. P. & ORCHARD, I. (2009): Biological activity of diuretic factors on the anterior midgut of the blood-feeding bug, *Rhodnius prolixus*. – *General and Comparative Endocrinology* **162**: 105–112.
- THAMM, M. (2009): Charakterisierung der Serotonin-Rezeptoren der Honigbiene *Apis mellifera*. – *Dissertation*, Universität Potsdam.
- 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-HT₂ receptors in the honeybee (*Apis mellifera*). – *PLOS One* **8**.
- THE HONEYBEE GENOME SEQUENCING CONSORTIUM (2006): Insights into social insects from the genome of the honeybee, *Apis mellifera*. – *Nature* **443**: 931–949.
- TIERNEY, A. J. (2001): Structure and function of invertebrate 5-HT receptors: a review. – *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular and Integrative Physiology* **128**: 791–804.
- TOMA, D. P.; BLOCH, G.; MOORE, D. & ROBINSON, G. E. (2000): Changes in *period* mRNA levels in the brain and division of labor in honey bee colonies. – *Proceedings of the National Academy of Sciences* **97**: 6914–6919.
- TROPFMANN, B.; WALZ, B. & BLENAU, W. (2007): Pharmacology of serotonin-induced salivary secretion in *Periplaneta americana*. – *Journal of Insect Physiology* **53**: 774–781.
- TROPFMANN, B.; BALFANZ, S.; BAUMANN, A. & BLENAU, W. (2010): Inverse agonist and neutral antagonist actions of synthetic compounds at an insect 5-HT receptor. – *British Journal of Pharmacology* **159**: 1450–1462.
- UENO, T.; NAKAOKA, T.; TAKEUCHI, H. & KUBO, T. (2009): Differential gene expression in the hypopharyngeal glands of worker honeybees (*Apis mellifera* L.) associated with an age-dependent role change. – *Zoological Science* **26**: 557–563.

- VANHOENACKER, P.; HAEGEMAN, G. & LEYSEN, J. E. (2000): 5-HT₇ receptors: current knowledge and future prospects. – *Trends in Pharmacological Sciences* **21**: 70-77.
- VEENSTRA, J. A. (1988): Effects of 5-hydroxytryptamine on the Malpighian tubules of *Aedes aegypti*. – *Journal of Insect Physiology* **34**: 299-304.
- VELTHUIS, H. H. (1972): Observations on transmission of queen substance in honey bee colony by attendants of queen. – *Behaviour* **41**: 105-129.
- VLEUGELS, R.; LENAERTS, C.; BAUMANN, A.; VANDEN BROECK, J. & VERLINDEN, H. (2013): Pharmacological characterization of a 5-HT₁-type serotonin receptor in the red flour beetle, *Tribolium castaneum*. – *PLOS One* **8**.
- VLEUGELS, R.; LENAERTS, C.; VANDEN BROECK, J. & VERLINDEN, H. (2014): Signalling properties and pharmacology of a 5-HT₇-type serotonin receptor from *Tribolium castaneum*. – *Insect Molecular Biology* **23**: 230-243.
- VLEUGELS, R.; VERLINDEN, H. & VANDEN BROECK, J. (2015): Serotonin, serotonin receptors and their actions in insects. – *Neurotransmitter*.
- VOGEL, C. & MARCOTTE, E. M. (2012): Insights into the regulation of protein abundance from proteomic and transcriptomic analyses. – *Nature Reviews Genetics* **13**: 227-232.
- VON FRISCH, K. (1967): The dance language and orientation of bees. – *Harvard University Press*, 1. Auflage.
- 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.
- WALZ, B.; BAUMANN, O.; KRACH, C.; BAUMANN, A. & BLENAU, W. (2006): The aminergic control of cockroach salivary glands. – *Archives of Insect Biochemistry and Physiology* **62**: 141-152.
- WANG, E. T.; SANDBERG, R.; LUO, S.; KHREBTUKOVA, I.; ZHANG, L.; MAYR, C.; KINGSMORE, S. F.; SCHROTH, G. P. & BURGE, C. B. (2008): Alternative isoform regulation in human tissue transcriptomes. – *Nature* **456**: 470-476.
- WATANABE, T.; SADAMOTO, H. & AONUMA, H. (2011): Identification and expression analysis of the genes involved in serotonin biosynthesis and transduction in the field cricket *Gryllus bimaculatus*. – *Insect Molecular Biology* **20**: 619-635.
- WATANABE, H. & AONUMA, H. (2012): Identification and expression analyses of a novel serotonin receptor gene, 5-HT_{2β}, in the field cricket, *Gryllus bimaculatus*. – *Acta Biologica Hungarica* **63**: 58-62.
- WEIGER, W. A. (1997): Serotonergic modulation of behaviour: a phylogenetic overview. – *Biological Reviews* **72**, 61-95.

-
- WHITFIELD, C. W., CZIKO, A. M., ROBINSON, G. E. (2003): Gene expression profiles in the brain predict behavior in individual honey bees. – *Science* **302**: 296-299.
- WILDT, M.; GOERGEN, E. M.; BENTON, J. L.; SANDEMAN, D. C. & BELTZ, B. S. (2004): Regulation of serotonin levels by multiple light-entrainable endogenous rhythms. – *Journal of Experimental Biology* **207**: 3765-3774.
- WILSON, E. O. (1971): The insect societies. – *Harvard University Press*, 1. Auflage.
- WILSON, E. O. (1975): Sociobiology. – *Belknap*, 1. Auflage.
- WILSON, E. O. & HÖLLDOBLER, B. (2005): Eusociality: Origin and consequences. – *Proceedings of the National Academy of Sciences* **102**: 13367-13371.
- WINSTON, M. L. (1987): The biology of the honeybee. – *Harvard University Press*, 1. Auflage.
- WOODARD, S. H.; FISCHMAN, B. J.; VENKAT, A.; HUDSON, M. E.; VARALA, K.; CAMERON, S. A.; CLARK, A. G. & ROBINSON, G. E. Genes involved in convergent evolution of eusociality in bees. – *Proceedings of the National Academy of Sciences* **108**: 7472-7477.
- YUAN, Q.; LIN, F.; ZHENG, X. & SEHGAL, A. (2005): Serotonin modulates circadian entrainment in *Drosophila*. – *Neuron* **47**: 115-127.
- YUAN, Q.; JOINER, W. J. & SEHGAL, A. (2006): A sleep-promoting role for the *Drosophila* serotonin receptor 1A. – *Current Biology* **16**: 1051-1062.
- ZAYED, A. & ROBINSON, G. E. (2012): Understanding the relationship between brain gene expression and social behavior: lessons from the honey bee. – *Annual Reviews of Genetics* **46**: 591-615.
- ZORNIK, E.; PAISLEY, K. & NICHOLS, R. (1999): Neural transmitters and a peptide modulate *Drosophila* heart rate. – *Peptide* **20**: 45-51.

6 Appendix

Abkürzungen

Allgemein gebräuchliche Abkürzungen und Maßeinheiten wurden nicht gesondert aufgeführt.

5-CT	5-Carboxamidotryptamin
5-HT	Serotonin (5-Hydroxytryptamin)
6-FAM	6-Carboxyfluorescein-phosphoramidit
A	Adenin
AADC	Aromatische-L-Aminosäure-Decarboxylase
AEBSF	4-(2-Aminoethyl)-benzonsulfonylfluorid
Am	<i>Apis mellifera</i>
ANOVA	Varianzanalyse
ATP	Adenosintriphosphat
BBQ	BlackBerry Quencher
bp	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin
C	Cytosin
C-Terminus	Carboxylterminus
cAMP	zyklisches Adenosinmonophosphat
cDNA	komplementäre DNA
CHAPS	3-[(3-Cholamidopropyl)-dimethylammonio]-1-propansulfonat
Cy5	Cyanin-Farbstoff 5
Cy5.5	Cyanin-Farbstoff 5.5
C _q	Quantifizierungszyklus
d	Tag
Da	Dalton
DAG	Diacylglycerin
DD	Dauerdunkel

DDC	DOPA-Decarboxylase
ddH ₂ O	zweifach destilliertes Wasser
DEPC	Diethylpyrocarbonat
Dm	<i>Drosophila melanogaster</i>
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	2'-Desoxyribonucleosid-5'-triphosphat
dpi	Punkte pro Zoll
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
FG	Freiheitsgrad
G	Guanin
G-Protein	Guaninnukeotid-bindendes Protein
GPCR	G-Protein-gekoppelter Rezeptor
HEK	Menschliche embryonale Nierenzellen
His	Histidin
HPLC	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie
HRP	Meerrettichperoxidase
IP ₃	Inositol-1,4,5-trisphosphat
IPTG	Isopropyl-β-D-thiogalaktopyranosid
kb	Kilobasenpaare
KI	Konfidenzintervall
L:D	Lichtregime (Dauer Licht : Dauer Dunkel in Stunden)
MBP	Maltose-Bindeprotein
MeOT	Methoxytryptamin
mRNA	Messenger-RNA
N-Terminus	Aminoterminus
OD	Optische Dichte
p	Überschreitungswahrscheinlichkeit
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PIP ₂	Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat
PNGase F	Peptid:N-Glycosidase F
PVDF	Polyvenylidenfluorid

qPCR	quantitative Echtzeit-PCR
RNA	Ribonukleinsäure
RNAi	RNA-Interferenz
RT	Reverse Transkriptase
SDS	Natrium-Dodecyl-Sulfat
SDS-PAGE	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese
T	Thymin
TE	Tris-EDTA
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
TRH	Tryptophan-Hydroxylase
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
UpM	Umdrehungen pro Minute
v/v	Volumen pro Volumen
w/v	Gewicht pro Volumen
YAK	Yakima Yellow

Tab. A.1: Temperatur- und Luftfeuchteregeime zur Haltung von Honigbienen für 2 Tage nach Transfer aus dem Volk ins Labor zum Zweck der Habituation

Uhrzeit	Temperatur [°C]	Relative Luftfeuchte [%]
00:00 – 01:00	26	65
01:00 – 05:00	25	65
05:00 – 06:30	25	65
06:30 – 08:00	26	65
08:00 – 09:30	27	65
09:30 – 11:00	28	65
11:00 – 12:00	29	50
12:00 – 13:00	30	50
13:00 – 14:00	31	50
14:00 – 17:00	32	50
17:00 – 18:00	31	50
18:00 – 19:00	30	50
19:00 – 20:30	29	65
20:30 – 22:00	28	65
22:00 – 23:30	27	65
23:30 – 00:00	26	65

Tab. A.2: Sequenzen der Primer für die Klonierung von 5-HT-Rezeptorgenen und *Ame1a-f1*

Zielgen	Primer (5' → 3')	Quelle (gegebenenfalls)
<i>Am5-ht1A</i>	Vorwärts: TTGAATTCATGGAGGAACACGTGAACCAG Rückwärts: TTAAATCCACTGTCAGCG	THAMM et al. (2010)
<i>Am5-ht2a</i>	Vorwärts: TTTGAATTCATGGAGGGGGATCTGATC Rückwärts: TCAACAATTCTGATCGTGC	THAMM et al. (2013)
<i>Am5-ht2β</i>	Vorwärts: CGTATTCACGCAGATGCC Rückwärts: CCCTGGTGACAGCGATCC	THAMM et al. (2013)
<i>Am5-ht7</i>	Vorwärts: CGCGAATCCGATCTGYTGGYTICCIITYTT Rückwärts: GCGGAATCCGATCGYRTADATIAYIGGRTT	SCHLENSTEDT et al. (2006)
<i>Ame1a-f1</i>	Vorwärts: GCAGGTAGCTAGAGCGTCC Rückwärts: CTCGCGGAGGAGACACTC	

Tab. A.3: Sequenzen der Primer für die Antikörperherstellung gegen Am5-HT_{2β}

Antigen	Primer (5' → 3')	Länge des Amplicons
Antigen 1	Vorwärts: TTTGGATCCGGCGCAGAGATGCTCAAGTTGTC Rückwärts: TTAAAGCTTCTACGACTTCCGGCTCTGCGG	435 bp
Antigen 2	Vorwärts: TTTGGATCCGACACGATGAGGCCGATCTC Rückwärts: TTTGTCGACCTAGCTGTTCCGGGACACCAC	370 bp

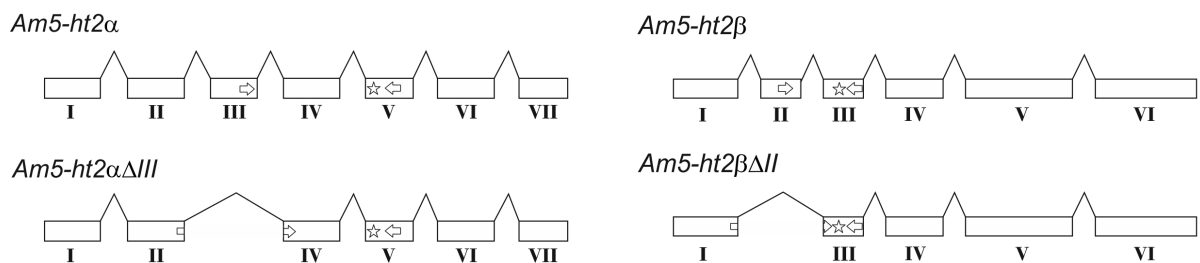


Abb. A.1: Schematische Darstellung der *Am5-ht2α* und *Am5-ht2β* cDNAs mit Angabe der Positionen der Primer und TaqMan-Sonden für qPCR (verändert nach THAMM et al. 2013). Dargestellt sind sowohl die vollständigen (oben) als auch verkürzten Varianten (unten). Darstellung der Primer als Pfeile und TaqMan-Sonden als Sternchen. Für Sequenzen siehe Tab. A4. Vergleiche auch Abb. 1.3.

Tab. A.4: Sequenzen der Primer und TaqMan-Sonden (inklusive 5'- und 3'-Modifikationen, siehe 2.4.5) für den Einsatz in der qPCR, sowie die erwarteten Ampliconlängen

Transkript	Primer und TaqMan-Sonden (5' → 3')	Länge des Amplicons
<i>Am5-ht1A</i>	Vorwärts: ATGGTCGCCTGTCTGGTCAT Rückwärts: TCGTGGATTCCCTCGCCTGTAT Sonde: Cy5-TTGAGATCGGTGACTGCCCAATATCTGT-BBQ	201 bp
<i>Am5-ht2a</i>	Vorwärts: GTCTCCAGCTCGATCACGGTT Rückwärts: GGGTATGTAGAAGGCGATCAGAGA Sonde: Cy5-CGTGATCAACAACAGAGCGTTTTTCGT-BBQ	126 bp
<i>Am5-ht2aΔIII</i>	Vorwärts: CCAGGCTTCTTGGGCATAAT Rückwärts: GGGTATGTAGAAGGCGATCAGAGA Sonde: Cy5-CGTGATCAACAACAGAGCGTTTTTCGT-BBQ	114 bp
<i>Am5-ht2β</i>	Vorwärts: GAGTTTGCCACTCAGTCTGATGTACT Rückwärts: GCAGATTATGCTGCCGATCAAC Sonde: Cy5.5-TGGTGGACGGTGCCCTGTCAAAA-BBQ	109 bp
<i>Am5-ht2βΔII</i>	Vorwärts: CACTTTGGTCAGAGGAGGACGA Rückwärts: GCAGATTATGCTGCCGATCAAC Sonde: Cy5.5-TGGTGGACGGTGCCCTGTCAAAA-BBQ	92 bp
<i>Am5-ht7</i>	Vorwärts: AATTATGIGCGACCTTTGGGTTAG Rückwärts: GGCTTCGTTATGGCACAGAA Sonde: YAK-CACAGAGATCATGCAGAGATTCAGGATGCT-BBQ	105 bp
<i>Amef-1a-f1</i>	Vorwärts: GAACATTTCTGTGAAAGAGTTGAGGC Rückwärts: TTAAAGGTGACACTCTTAATGACGC Sonde: 6FAM-ACCGAGGAGAATCCGAAGAGCATCAA-BBQ	394 bp

Tab. A.5: Nukleotid- und Aminosäuresequenzen der Antigenbereiche zur Antikörperherstellung gegen Am5-HT_{2β}

Antigen	Primer (5' → 3')	Größe
Antigen 1	Nukleotidsequenz: GGCGCAGAGATGCTCAAGTTGTCGAGGGGCCTGGAGGG TATCACCAGCCCTGGAAGCCCTATGGGCACACCGAGAT CCACGCCTCAACACTCGATCCAGCAACATCAGCATCAG CAACAGTCGCACAGGTGCAGCTTCCGTCACGGGAGCGG GGAGAGCGGCGGGAGCAGCGCTTCCGGTTCCAGGACGA GCCTCTCGATCCAAGAAGATCTCAGCTCGCCAACGCCG TGGAAGCATCCACGTCGACGCGCGTCCACGTTCAACGA GGTCACTTGAGCGGACCGAGTCGGGATCGCCGAAGA CGCTAGGAAGCGATCGTTCAGTTCCACGAGCAGCCC GTGTTCCGGCGTGGCTCCTCCGTTTCGAGGAAGAGCTCC TCGAACGAGGAAACGCCGCAGAGCCGGAAGTCG	435 bp
	Aminosäuresequenz: GAEMLKLSRGLGITSPGSPMGTTPRSTPQHSIQQHQQHQQQS HRCFRHGSGESGGSSASGSRISLIQEDLSSPTPWKHPRRR ASTFNEAHLERTESGSPKTPRKRSFSFHEQPVFGRGSSVSRKS SSNEETPQSRKS	15,1 kDa
Antigen 2	Nukleotidsequenz: GACACGATGAGGCCGATCTCGGGCAAGAACCTCGAGGC GGCTTTCCTGGGAAGGAGCAACAGCGGCAGGATGGAG GGCAGCAGAAGCTACGAGCTGAATCCGTTGTCACGTG GAGAGGGTGCAGGAGAGGGTCTAGTTTGGGAGGAAGC ACGAGGACCAGCCTGCTGACGTCGAGGCCAGCCCCGAT CCGCCGCGCGGCGACGATGCGTGCCCACAACGGGGCCG CGAGCCTCGGCTCGAGGCAAAGCAGCAATTCGTCGTCC CCGTGCCCCACAGATACCAAACGACAGTACGCAGCCA CCTCTCGAGGACGAGCAGCGTGGTGTCCCGGAACAGC	370 bp
	Aminosäuresequenz: DTMRPISGKNLEAAFLGRSNSGRMEGSRSYELNSVVTWRGC RRGSSLGGSTRISLLTSRPAPIRRAATMRAHNGAASLGSRQS SNSSSPCPHRYQTTVRSRHSRTSSVVSRSNS	12,2 kDa

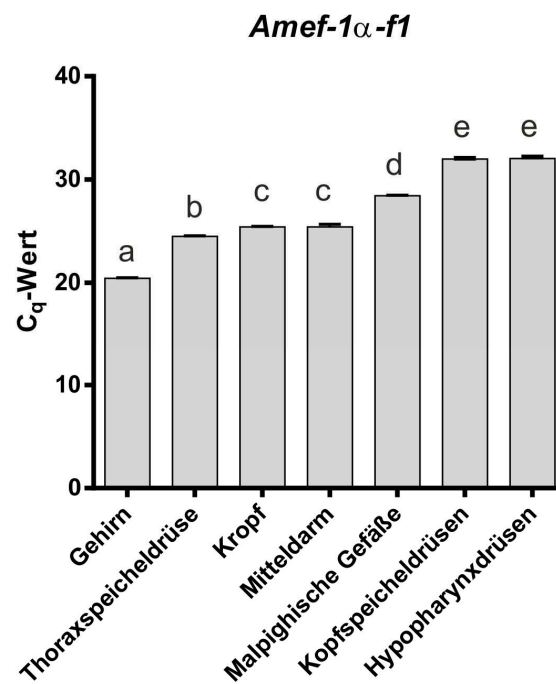


Abb. A.2: Vergleich der C_q-Werte der Fluoreszenzsignalkurven für *Ame1-1 α -f1* in verschiedenen Geweben, gemessen mittels qPCR. Jeweils n = 10. Einfaktorielle ANOVA gefolgt von Bonferronis Mehrfachvergleichstest ($p < 0,05$; Gruppen mit unterschiedlichen Buchstaben innerhalb eines Diagramms unterscheiden sich signifikant). Siehe 2.4.5.

Lebenslauf

Die auf dieser Seite enthaltenen persönlichen Daten (Lebenslauf) sind nicht Bestandteil der Online-Veröffentlichung.

Publikationen

- 1 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**03: 342-350.
- 2 THAMM, M.; **ROLKE, D.**; JORDAN, N.; BALFANZ, S.; SCHIFFER, C.; BAUMANN, A. & BLENAU, W. (2013): Function and distribution of 5-HT₂ receptors in the honeybee (*Apis mellifera*). – *PLOS One* **8**.
- 3 FRENCH, A. S.; SIMCOCK, K. L.; **ROLKE, D.**; GARTSIDE, S. E.; BLENAU, W. & WRIGHT, J. A. (2014): The role of serotonin in feeding and gut contractions in the honeybee. – *Journal of Insect Physiology* **61**: 8-15.
- 4 **ROLKE, D.**; PERSIGEHL, M.; GRÜNEWALD, B. & BLENAU, W. (2014): Large-scale Monitoring of Long-term Effects of Elado® (10 g Clothianidin & 2 g Beta-Cyfluthrin / kg seed) Dressed Oilseed Rape on Pollinating Insects in Mecklenburg-Vorpommern, Germany: VII Effects on Honey Bees (*Apis mellifera*). – *Final Report*, tier3 solutions GmbH Studien-Nr. P13081-1.
- 5 **ROLKE, D.**; FUCHS, S.; GRÜNEWALD, B.; GAO, Z. & BLENAU, W.: Large-scale monitoring of effects of clothianidin-dressed oilseed rape seeds on pollinating insects in Northern Germany: Effects on honey bees (*Apis mellifera*). – (eingereicht bei *Ecotoxicology* und momentan im *Review*-Prozess).
- 6 **ROLKE, D.**; PERSIGEHL, M.; PETERS, B.; STERK, G. & BLENAU, W.: Large-scale monitoring of effects of clothianidin-dressed oilseed rape seeds on pollinating insects in Northern Germany: Residues of clothianidin in pollen, nectar and honey. – (eingereicht bei *Ecotoxicology* und momentan im *Review*-Prozess).
- 7 RICHTER, K.; **ROLKE, D.**; BLENAU, W. & BAUMANN, O.: Structural organization of the secretory cells in the honeybee hypopharyngeal gland. – (eingereicht bei *Cell and Tissue Research* und momentan im *Review*-Prozess).

Konferenzbeiträge

- 9 **ROLKE, D.**; THAMM, M.; BEER, K.; HELFRICH-FÖRSTER, C. & BLENAU, W.: Temporal expression patterns of serotonin receptor subtypes and impact of serotonin on aspects of the circadian locomotor rhythm in the honeybee, *Apis mellifera*. 62. Jahrestagung der Arbeitsgemeinschaft der Institute für Bienenforschung e.V., Braunschweig, 2016. **(Vortrag)**
- 8 **ROLKE, D.**; GRÜNEWALD, B. & BLENAU, W.: Large-scale field study of seasonal effects of clothianidin-dressed oilseed rape on honey bees (*Apis mellifera*) in Northern Germany. 25. Jahrestagung der SETAC Europe, Barcelona, 2015. **(Vortrag)**
- 7 **ROLKE, D.**; THAMM, M., BAUMANN, A. & BLENAU, W.: Spatial and temporal expression patterns of serotonin receptor subtypes in the honeybee, *Apis mellifera*. 10. Tagung der Deutschen Neurowissenschaftlichen Gesellschaft, Göttingen, 2013. **(eingeladener Vortrag)**
- 6 **ROLKE, D.**; THAMM, M. & BLENAU, W.: Räumliche und zeitliche Expressionsmuster von Serotonin-Rezeptor-Subtypen der Honigbiene, *Apis mellifera*. 60. Jahrestagung der Arbeitsgemeinschaft der Institute für Bienenforschung e.V., Würzburg, 2013. **(Vortrag)**
- 5 **ROLKE, D.**; THAMM, M.; BAUMANN, A. & BLENAU, W.: Expression patterns of serotonin receptor subtypes in the honeybee, *Apis mellifera*. Arthropod Neuroscience Network Symposium (105. Jahrestagung der Deutschen Zoologischen Gesellschaft), Konstanz, 2012. **(Vortrag)**
- 4 **ROLKE, D.**; THAMM, M. & BLENAU, W.: Expression patterns of serotonin receptor subtypes in the honeybee, *Apis mellifera*. EurBee 5, Halle an der Saale, 2012. **(Poster)**
- 3 **ROLKE, D.** & BLENAU, W.: Expression patterns and functions of serotonin receptors in the honeybee. Rauschholzhausen-Seminar zum Thema „Plastizität und Entwicklung des Insektennervensystems, Marburg, 2012. **(Vortrag)**
- 2 **ROLKE, D.** & SEIDELMANN, K.: Die Bedeutung von Pheromonen bei der Paarung der Roten Mauerbiene, *Osmia bicornis*, (= *O. rufa*, syn.). DGaaE-Tagung, Berlin, 2011. **(Vortrag)**
- 1 **ROLKE, D.** & SEIDELMANN, K.: Die Bedeutung von Pheromonen bei der Paarung der Roten Mauerbiene, *Osmia bicornis*. 9. Hymenopterologen-Tagung am Staatlichen Museum für Naturkunde Stuttgart, 2010. **(Vortrag)**

Danksagung

PD Dr. Wolfgang Blenau danke ich für die Vergabe des spannenden Themas, die wertvolle Diskussionsbereitschaft und das mir entgegengebrachte Vertrauen, dieses Projekt auch unter dem Umstand der „Fernbetreuung“ bearbeiten zu dürfen.

Prof. Dr. Dorothea Eisenhardt und Prof. Dr. Gerd Bicker danke ich für die Bereitschaft, als Gutachter meiner Dissertation zu wirken.

Ich bedanke mich bei Prof. Dr. Walz für die Möglichkeit, mein Promotionsprojekt in der Arbeitsgruppe Zoophysiologie durchführen zu können.

Ein besonderer Dank gilt Dr. Markus Thamm für die fortwährende Diskussionsbereitschaft und die zahlreichen wertvollen Hinweise und Anregungen.

Allen weiteren Mitgliedern der AG Zoophysiologie, insbesondere Prof. Dr. Otto Baumann, Dr. Stefanie Blankenburg, Dr. Kristoffer Heindorff, Dr. Tina Reim, Dr. Anne-Katrin Rohlfing, Dr. Claudia Röser, Prof. Dr. Ricarda Scheiner, Bärbel Wuntke und Iljitsch, danke ich für die beste Arbeitsatmosphäre, die man sich nur wünschen konnte.

Den Mitarbeitern des Instituts für Bienenkunde Oberursel danke ich für die Möglichkeit zur Nutzung von Räumlichkeiten und Material bei Teilen der Experimente. Für die Bereitstellung von Bienenvölkern sei besonders den Imkermeistern Matthias Ullmann und Beate Springer sowie den Auszubildenden gedankt.

Bei Prof. Dr. Charlotte Helfrich-Förster bedanke ich mich für die Möglichkeit, die Versuche zur circadianen Rhythmik in der AG Neurobiologie und Genetik der Universität Würzburg durchführen zu können. Ganz besonders danke ich hierbei Katharina Beer für die tatkräftige Unterstützung.

Für die Kooperation zur Durchführung der HPLC-Messungen danke ich Dr. Andrew B. Barron (Macquarie University, Sydney). Prof. Dr. Arnd Baumann (Forschungszentrum Jülich) danke ich für zahlreiche Tipps und die Bereitstellung von HEK-Zellen. Für die Hilfe bei der 2-D-Gelelektrophorese danke ich Dr. Lothar Lehnhardt (AG Biochemie, Potsdam).

Meiner Familie und allen guten Freunden danke ich für die Unterstützung und Motivation.

Der größte Dank von allen gebührt Christiane und Simon für den bedingungslosen Rückhalt, die offenen Arme und die Erkenntnis darüber, was das Allerwichtigste im Leben ist.

Eidesstattliche Erklärung

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

Potsdam, den 21. März 2016

.....
Daniel Rolke