

Klonierung und funktionelle Charakterisierung eines Octopamin-Rezeptors aus der Honigbiene (*Apis mellifera*)

Vom Gen
zur Lokalisation im Gehirn

vorgelegt von
Lore Grohmann

am Fachbereich 7 – Umwelt und Gesellschaft
der Technischen Universität Berlin

zur Erlangung des akademischen Grades

Doktor der Naturwissenschaften
Dr. rer. nat.

genehmigte Dissertation

Promotionsausschuß:

Vorsitzende: Prof. Dr. R. Fuchs
1. Gutachter: Prof. Dr. J. Erber
2. Gutachter: PD Dr. A. Baumann

Tag der wissenschaftlichen Aussprache: 3. Juli 2001

Berlin im Mai 2001

Inhaltsverzeichnis

1.	Einleitung.....	1
1.1	Kommunikation zwischen Nervenzellen	1
1.2	Die Familie der G Protein-gekoppelten Rezeptoren	2
1.3	Biogene Amine	5
1.4	Octopamin <i>in vivo</i>	6
1.5	Zielsetzung der Arbeit	8
2	Methoden.....	9
2.1	Allgemeine Methoden	9
2.2	Allgemeine molekularbiologische Methoden.....	9
2.2.1	Präparation von Plasmid DNA.....	9
2.2.1.1	Mini-Präparation von Plasmid-DNA.....	9
2.2.1.2	LiCl-Präparation von Plasmid-DNA	10
2.2.2	DNA-Restriktionen	11
2.2.3	DNA-Restriktionsfragment-Isolierung.....	11
2.2.4	DNA-Ligationen	11
2.2.5	Subklonierungen	11
2.2.6	PCR-Bedingungen	12
2.2.7	DNA-Sequenzierung.....	12
2.3	Spezielle molekularbiologische Methoden	12
2.3.1	Verwendete Bienen-DNA-Bibliotheken und Klone	12
2.3.2	Hybridisierung der Bienen-Cosmid-DNA-Bibliothek	13
2.3.3	Anzucht der cosmidtragenden Bakterien	14
2.3.4	Präparation von Cosmid-DNA.....	14
2.3.5	Hybridisierung der Bienenhirn cDNA-Bibliothek	15
2.3.6	Restriktionsanalyse der Rekombinanten, Subklonierung und Sequenzierung	15
2.3.7	Konstruktion von Expressionsvektoren	15
2.3.7.1	Konstruktion des Expressionsvektors pcAmoc1	15
2.3.7.2	Konstruktion des Expressionsvektors pcAmoc1-HA-Tag	16
2.3.7.3	Konstruktion des Fusionsprotein-Vektors FUSGEXAmoc1	16
2.3.7.4	Konstruktion des Fusionsprotein-Vektors FUSMalAmoc1	17
2.3.8	Heterologe Expression des Rezeptorproteins in HEK 293 Zellen	17
2.3.9	Funktionalitätsnachweis des exprimierten Rezeptorproteins	17
2.3.9.1	cAMP-Assay	17
2.3.9.2	Ca ²⁺ -Imaging	18
2.3.10	<i>In situ</i> -Hybridisierung	18

2.4 Immunologische Methoden und Proteinbiochemie.....	20
2.4.1 Überexpression und Aufreinigung der Fusionsproteine	20
2.4.2 Herstellung polyklonaler Antikörper gegen den C-Terminus von AmOCT1	20
2.4.3 Tüpfelblots	21
2.4.4 Membranprotein-Isolierung aus transfizierten Zellen.....	21
2.4.5 Immunologischer Nachweis von Proteinen auf "Western-Blots"	22
2.4.6 Immuncytochemie an transfizierten HEK 293 Zellen.....	22
2.4.7 Immuncytochemie an Vibratomschnitten von Bienengehirnen	23
3 Ergebnisse.....	25
3.1 Isolierung genomischer Cosmid-Klone eines Octopamin-Rezeptorgens aus <i>Apis mellifera</i>	25
3.2 Isolierung der <i>Amoct1</i>-cDNA	28
3.3 Strukturelle Eigenschaften der abgeleiteten Aminosäuresequenz	30
3.4 Konstruktion des Expressionsvektors <i>pcAmoct1</i>	35
3.5 Konstruktion des Expressionsvektors <i>pcAmoct1</i>-HA-Tag.....	35
3.6 Heterologe Expression des Rezeptorproteins AmOCT1 in HEK 293 Zellen	36
3.7 Funktionelle Expression des Rezeptorproteins in HEK 293 Zellen	37
3.7.1 AmOCT1-Aktivierung führt zur Erhöhung der $[Ca^{2+}]_i$	37
3.7.2 AmOCT1-Aktivierung führt zu einem Anstieg der $[cAMP]_i$	41
3.8 Expressionsmuster des <i>Amoct1</i>-Gens.....	42
3.9 Immunologischer Nachweis des AmOCT1-Rezeptors auf "Western-Blots" von Bienenhirn Homogenaten.....	44
3.9.1 Immunhistochemischer Nachweis des Rezeptorproteins an <i>pcAmoct1</i> -HA transfizierten HEK 293 Zellen.....	46
3.10 Lokalisation des Rezeptorproteins im Bienenhirn- Immunhistochemie.....	46
4 Diskussion.....	52
4.1 Strukturelle Eigenschaften des klonierten AmOCT1 Rezeptors.....	52
4.2 Funktionelle Charakterisierung von AmOCT1	55
4.3 Verteilungsmuster der <i>Amoct1</i>-mRNA und Lokalisation des Rezeptorproteins im Bienenhirn	59
4.4 Mögliche Funktion des aus <i>Apis mellifera</i> klonierten Octopamin-Rezeptors <i>in vivo</i>: ein Ausblick	61
5 Zusammenfassung.....	64

6	Literatur.....	65
7	Abkürzungen.....	72
8	Danksagung.....	75
9	Lebenslauf.....	76

1. Einleitung

1.1 Kommunikation zwischen Nervenzellen

Alle Lebewesen sind mit einer veränderlichen Umwelt konfrontiert, auf die sie reagieren müssen. Sie nehmen dazu die Außenwelt mit speziellen Sinnesorganen wahr. Die Aufnahme der unterschiedlichsten physikalischen und chemischen Reize erfolgt bei höheren Eukaryonten durch spezialisierte Zellen oder Zellmembranbereiche (Sensoren). Die Reize werden in elektrische Potentiale (Sensorpotentiale, auch Rezeptor- oder Generatorpotentiale genannt) umgewandelt und an nachgeschaltete Nervenzellen (Neuronen) weitergeleitet. Für die Weitergabe der Informationen bilden Neurone sowohl untereinander als auch zu anderen, nicht-neuronalen Zellen, Kontakte aus.

Der Informationsaustausch im Nervensystem erfolgt überwiegend durch die Umwandlung des elektrischen in ein chemisches Signal. Die Erregung eines Neurons löst ein Aktionspotential aus, das sich entlang des Axons fortsetzt. Bei der elektro-chemischen Übertragung führt das Aktionspotential zur Freisetzung von chemischen Botenstoffen (Transmittern) aus der präsynaptischen Endigung des erregten Neurons. Solche Botenstoffe sind z.B. kleine organische Moleküle (häufig Aminosäurederivate) oder Peptide, die im Organismus als Neurotransmitter, Neuromodulatoren oder Neurohormone wirken können. Einige Substanzen besitzen mehrere der genannten Eigenschaften. Sie wirken lokal als synaptische Transmitter und nach der Ausschüttung in die Blutbahn bzw. Hämolymphe als Neurohormon an einem weiter entfernten Zielorgan.

Die Botenstoffe binden an spezifische Rezeptorproteine, die auf bzw. in der Zellmembran von Zielzellen lokalisiert sind. Die Interaktion des Botenstoffes mit seinem Rezeptor führt anschließend zu einer elektrischen oder biochemischen Antwort in der Zielzelle. Der Gesamtprozeß wird als neuronale Signaltransduktion bezeichnet.

Das chemische Signal löst in den meisten Fällen in der Zielzelle Änderungen von Membranpermeabilitäten aus, die zur elektrischen Erregung oder Hemmung der Zielzelle führen können. Die postsynaptischen Permeabilitätsänderungen werden von Ligand-gesteuerten Ionenkanälen (ionotrope Rezeptoren) vermittelt. Die Bindung der Transmitter an ionotrope Rezeptoren führt zur Öffnung einer wäßrigen Kanalpore. Ionotrope Rezeptoren können die Zielzelle entweder erregen oder inhibieren. Exzitatorisch wirkende Rezeptoren (z. B.: nikotinische Acetylcholinrezeptoren, AchR und Glutamatrezeptoren, GluR) ermöglichen den Durchtritt mono- und divalenter Kationen. Die Zelle wird depolarisiert. Demgegenüber erhöhen inhibitorische Rezeptoren (z.B. GABA- und Glycinrezeptoren) die Permeabilität von Anionen. Die Zielzelle wird hyperpolarisiert. Die durch das Aktionspotential aus der präsynaptischen Endigung freigesetzten Neurotransmitter können

aber auch an Rezeptoren binden, deren Aktivierung in der Zielzelle zu Änderungen intrazellulärer Botenstoffkonzentrationen führt. Diese Rezeptoren werden als metabotrope- oder G Protein-gekoppelte Rezeptoren (GPCR) bezeichnet. Die Bindung der Neurotransmitter bewirkt die Aktivierung der Rezeptoren. Sie ist mit einer Konformationsänderung des Rezeptorproteins verbunden. Diese Konformationsänderung wird auf der intrazellulären Seite über Protein-Protein Wechselwirkungen an GTP-bindende (G)-Proteine weitergegeben. Die aktivierten G-Proteine können verschiedene Zielproteine stimulieren oder inhibieren. Solche Zielproteine sind in der Regel Enzyme, die die Konzentration intrazellulärer Botenstoffe wie z.B. cAMP und Ca^{2+} kontrollieren. Diese sogenannten „sekundären“ Botenstoffe sind an der Regulation weiterer Enzyme beteiligt. Durch die Änderung der intrazellulären Konzentrationen von cAMP bzw. Ca^{2+} wird die Aktivität spezifischer Kinasen gesteuert. Die Kinasen übertragen Phosphatgruppen auf eine große Anzahl unterschiedlicher Zielproteine, u.a. Rezeptoren, Ionenkanäle oder Transkriptionsfaktoren. Die Phosphorylierung von Ionenkanälen kann bspw. die Permeabilitätseigenschaften der Zellmembran dramatisch verändern.

1.2 Die Familie der G Protein-gekoppelten Rezeptoren (GPCR)

Inzwischen sind ~2000 verschiedene Gene bekannt, die für GPCR kodieren (Ji et al., 1998, Bockaert und Pin, 1999). Die Mitglieder dieser "Supergenfamilie" werden durch so unterschiedliche Signale, wie z.B. Photonen, Geruchsstoffe, Peptide und Neurotransmitter aktiviert (Probst et al., 1992, Strader et al., 1995, Vernier et al., 1995, Hall et al., 1999). Die Rezeptoren werden in drei große Unterfamilien eingeteilt (Strader et al., 1995):

1. die Rhodopsin-ähnlichen Rezeptoren,
2. die peptidergen Rezeptoren und
3. die metabotropen Glutamaterezeptoren.

Aufgrund von Hydrophobizitätsuntersuchungen und Sequenzähnlichkeiten zum Bakteriorhodopsin, dessen Struktur seit längerem bekannt ist (Henderson et al., 1990), wird angenommen, daß alle GPCR als gemeinsames Strukturmerkmal ebenfalls sieben transmembranale Segmente (TM) besitzen. Diese Annahme wird durch die kürzlich ermittelte Kristallstruktur des Rinder-Rhodopsins gestützt (Palczewski et al., 2000). In der Literatur werden GPCR deshalb auch oft als **7-TM-** oder **heptahelikale** Rezeptoren bezeichnet. Die transmembranalen Segmente bestehen aus ca. 20 überwiegend hydrophoben Aminosäure-Resten. Sie werden durch drei intrazelluläre und drei extrazelluläre hydrophile Schleifen verbunden (siehe Abb. 1.1). Häufig wird eine vierte intrazelluläre Schleife durch die Insertion von posttranslational palmitoylierten Cystein-Resten des Carboxyterminus in die Zellmembran gebildet (Jin et al., 2000). Der Aminoterminus befindet sich auf der extrazellulären - der Carboxyterminus auf der cytoplasmatischen Seite der Membran (siehe Abb. 1.1).

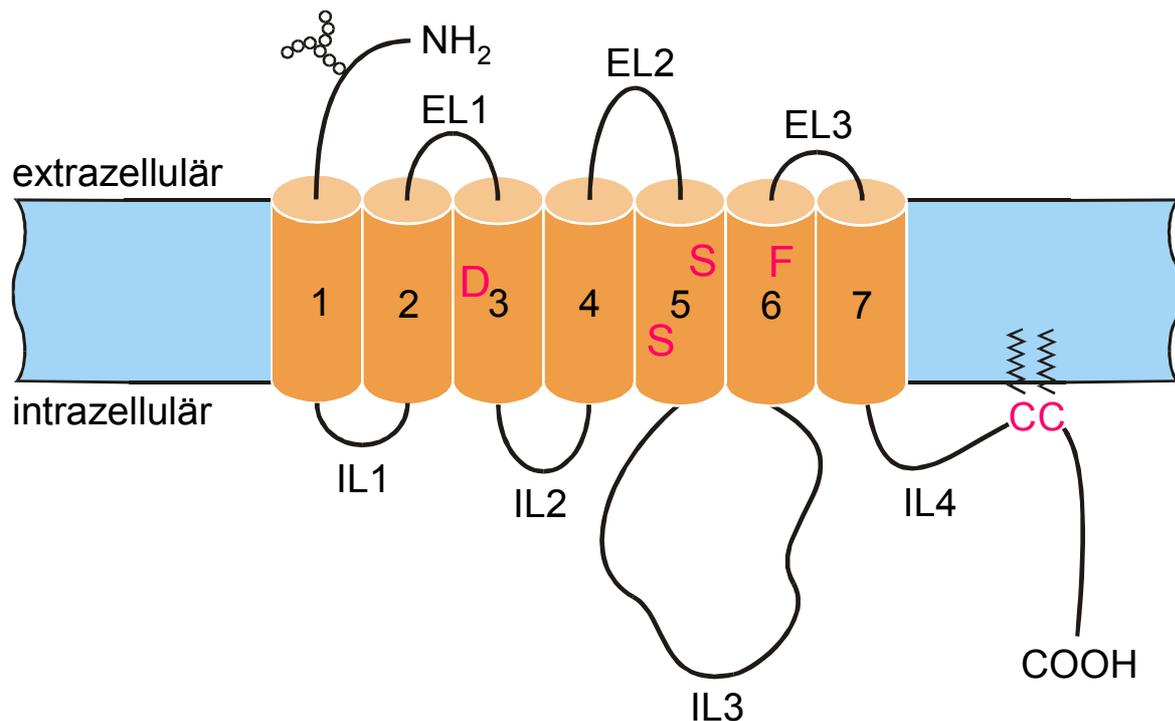


Abb.1.1: Transmembranale Topographie eines G Protein-gekoppelten Rezeptors. GPCR besitzen sieben hydrophobe transmembranale Segmente (TM 1-7). Die TM's sind durch drei hydrophile extrazelluläre (EL 1-3) und drei intrazelluläre Schleifen (IL 1-3) verbunden. Der N-Terminus befindet sich auf der extrazellulären, der C-Terminus auf der intrazellulären Seite der Membran. Eine vierte intrazelluläre Schleife (IL 4) kann durch die Insertion palmitoylierter Cystein-Reste in die Plasmamembran gebildet werden.

Obwohl die Aktivierung der Rezeptoren durch strukturell sehr unterschiedliche Liganden erfolgt, beruht die Umsetzung in ein zelluläres Signal grundsätzlich auf einem gemeinsamen Funktionsprinzip.

Die Bindung der Liganden bewirkt eine Konformationsänderung des Rezeptorproteins. Diese Strukturänderung wird auf trimere G-Proteine übertragen. Die G-Proteine bestehen aus α -, β - und γ -Untereinheiten. Im nicht aktivierten Zustand ist an die α -Untereinheit GDP gebunden. Die Wechselwirkung des G-Proteins mit dem aktivierten Rezeptor führt zum Austausch des gebundenen GDP durch GTP. Das G-Protein dissoziiert in die α - und $\beta\gamma$ -Untereinheiten. Die dissoziierten Untereinheiten können anschließend die Aktivität verschiedener Zielproteine, wie z.B. Phospholipase C (PLC) und Adenylatzyklase (AC), in der Zelle modulieren und damit die Konzentration intrazellulärer Botenstoffe regulieren.

Zu den wichtigsten GPCR-vermittelten Signalwegen gehören die Erhöhung bzw. Erniedrigung der intrazellulären cAMP Konzentration ($[cAMP]_i$) sowie die Synthese von Diacylglycerol (DAG) und Inositol-1,4,5-trisphosphat (IP_3). Das IP_3 bindet an spezifische Rezeptoren am endoplasmatischen Retikulum und bewirkt die anschließende Freisetzung von Ca^{2+} aus intrazellulären Speichern (siehe Abb. 1.2).

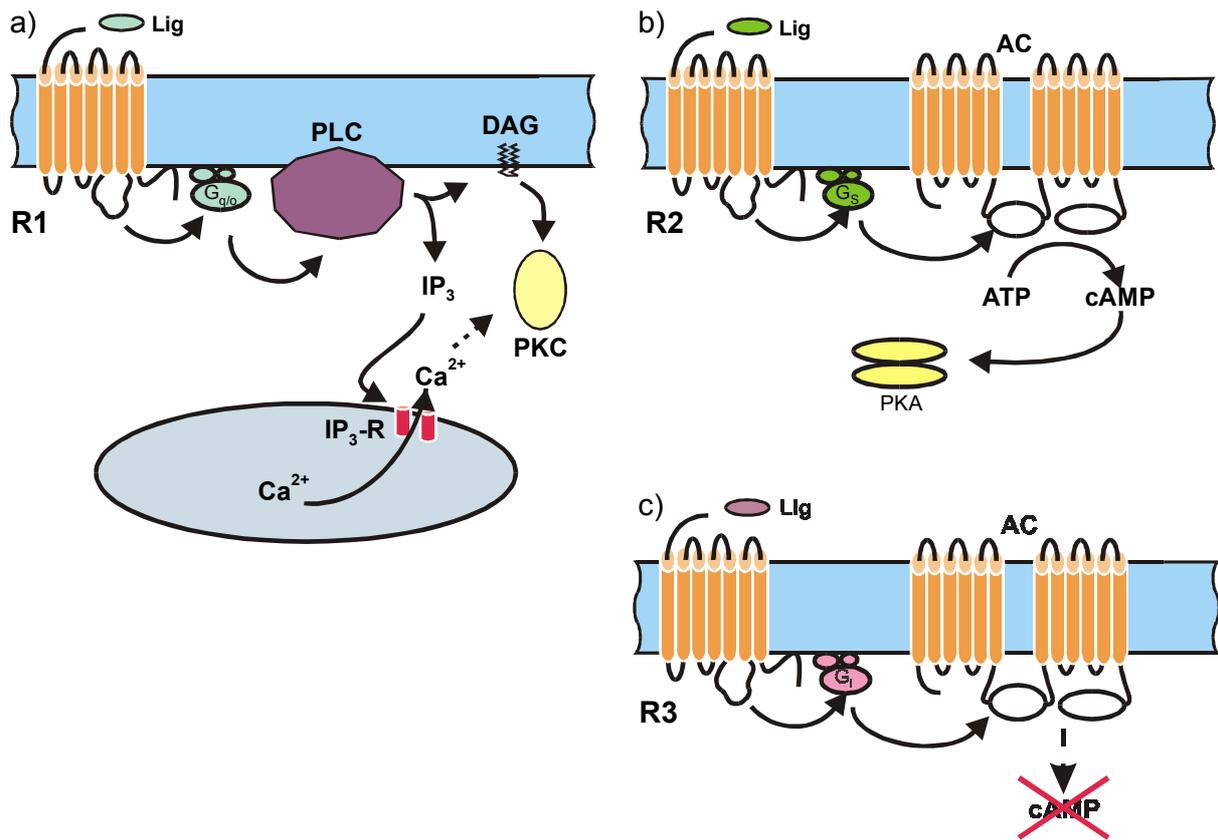


Abb. 1.2: Schematische Darstellung der wichtigsten Signalwege G Protein-gekoppelter Rezeptoren. a) Rezeptor 1 (R1) aktiviert nach der Bindung eines Liganden (Lig) ein heterotrimeres G Protein (Gq/o). Phospholipase C (PLC) wird stimuliert. Das Enzym hydrolysiert 1-Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat (PIP₂) zu Inositol-1,4,5-trisphosphat (IP₃) und Diacylglycerol (DAG). Das IP₃ bindet an intrazelluläre Rezeptoren, die die Freisetzung von Ca²⁺ bewirken. b) Rezeptor 2 (R2) aktiviert ein anderes heterotrimeres G-Protein (Gs), das eine Adenylatzyklase stimuliert. Das Enzym synthetisiert cAMP aus ATP. Der Anstieg der [cAMP]_i aktiviert u.a. die cAMP-abhängige Proteinkinase (PKA), die daraufhin z.B. Ionenkanäle und Transkriptionsfaktoren phosphoryliert. c) Rezeptor 3 (R3) aktiviert ein heterotrimeres G Protein (Gi). Die Adenylatzyklase wird inhibiert und [cAMP]_i sinkt.

In der größten Unterfamilie der GPCR, der Gruppe der Rhodopsin-ähnlichen Rezeptoren, erfolgt die Bindung der Liganden in einer Bindetasche, die von den transmembranalen Segmenten geformt wird (Strader et al., 1995). An der Wechselwirkung mit dem Liganden sind Aminosäure-Reste beteiligt, die sich in den transmembranalen Segmenten befinden. Durch Mutageneseuntersuchungen wurde gezeigt, daß ein Asparaginsäurerest in TM 3, Serin-Reste in TM 5 sowie hydrophobe Aminosäure-Reste wie z.B. Phenylalanin-Reste in TM 6 an der Ligandenbindung beteiligt sind (Strader et al., 1995, Valdenaire und Vernier, 1997).

Im N-Terminus der GPCR befinden sich Konsensussequenzen (N-X-S/T) für N-Glykosylierungen. Es wird angenommen, daß die Glykosylierung für die richtige Anordnung des Rezeptors in der Zellmembran benötigt wird. In der dritten intrazellulären Schleife und im C-Terminus enthalten GPCR viele Serin- und Threonin-Reste, die potentielle Phosphorylierungsstellen für Proteinkinasen wie z.B. PKA und Proteinkinase C (PKC) sind.

Die Phosphorylierung der Rezeptoren ist für die Abschaltung der Signalkaskade wichtig. Durch die Phosphorylierung nimmt die Affinität der Rezeptor – G-Protein Wechselwirkung stark ab und die Effizienz der Signalübertragung sinkt. Arrestine konkurrieren mit dem G-Protein um die Rezeptor-Bindestelle (Carman und Benovic, 1998, Chuang et al., 1996). Da die Bindung der Arrestine an die phosphorylierten Rezeptoren stärker ist als die an nicht phosphorylierte Rezeptoren, wird die Rezeptor-G-Protein-Interaktion schließlich völlig verhindert. Obwohl der Rezeptor noch den spezifischen Liganden gebunden hat, kann das Signal intrazellulär nicht mehr verarbeitet werden. Der Rezeptor ist desensitisiert. Erst wenn die Phosphatgruppen durch spezifische Phosphatasen vom Rezeptorprotein entfernt worden sind, kann die Rezeptoraktivierung wieder durch die Wechselwirkung mit dem G-Protein zu einer zellulären Antwort führen.

1.3 Biogene Amine

Biogene Amine sind kleine organische Moleküle. Sie werden in ein- bis mehrstufigen Schritten aus essentiellen Aminosäuren synthetisiert. Die biogenen Amine Dopamin, Serotonin und Histamin kommen sowohl in Vertebraten als auch in Invertebraten vor. Adrenalin und Noradrenalin sind funktionell nur bei Vertebraten (adrenerges System) nachgewiesen worden. In Invertebraten sind diese biogenen Amine vermutlich durch Tyramin und Octopamin funktionell ersetzt (siehe Tab. 1).

Vertebraten	Invertebraten
Dopamin	Dopamin
Serotonin	Serotonin
Histamin	Histamin
Adrenalin	Octopamin
Noradrenalin	Tyramin

Tabelle 1.1: Gegenüberstellung der bei Wirbeltieren und Wirbellosen physiologisch wirksamen biogenen Amine

Biogene Amine kontrollieren und modulieren viele Prozesse wie z.B. bei Säugetieren Gefühlszustände, zirkadiane Rhythmen, Sexualverhalten, endokrine Sekretion sowie Lern- und Gedächtnisvorgänge. Sie können zusätzlich die Differenzierung des Nervensystems regulieren.

Die biogenen Amine Dopamin, Serotonin, Octopamin, Noradrenalin, Tyramin und Histamin wurden im Nervensystem verschiedener Insektenarten mit biochemischen und

histochemischen Methoden nachgewiesen (Osborne, 1996, Monastirioti, 1999). Interessanterweise synthetisieren jeweils nur wenige Interneurone im Insektengehirn die entsprechenden biogenen Amine. So wurden z.B. nur ~100 Octopamin-immunreaktive Somata im Gehirn der Honigbiene identifiziert (Kreissl et al., 1994). Da diese Neurone sich jedoch erheblich verzweigen und in weite Bereiche des Gehirns projizieren, wird angenommen, daß sie die Aktivität großer Gehirnbereiche beeinflussen können. Ähnliche Beobachtungen wurden bei verschiedenen Insekten auch für serotonerge und dopaminerge Nervenfasern gemacht (Schürmann und Klemm, 1984, Erber et al., 1991, Schürmann et al., 1989, Schäfer und Rehder, 1989).

Biogene Amine wirken bei Insekten als Neurotransmitter, Neuromodulatoren und Neurohormone. Bei der Honigbiene ist die Wirkung biogener Amine auf verschiedene Verhaltensweisen gezeigt worden (Bicker und Menzel, 1989; Erber et al., 1993).

1.4 Octopamin in vivo

Octopamin (OA) ist neben Tyramin das einzige biogene Amin, dessen physiologische Wirkung auf Invertebraten beschränkt ist. Octopamin wird aus der Aminosäure L-Tyrosin über das Zwischenprodukt Tyramin synthetisiert.

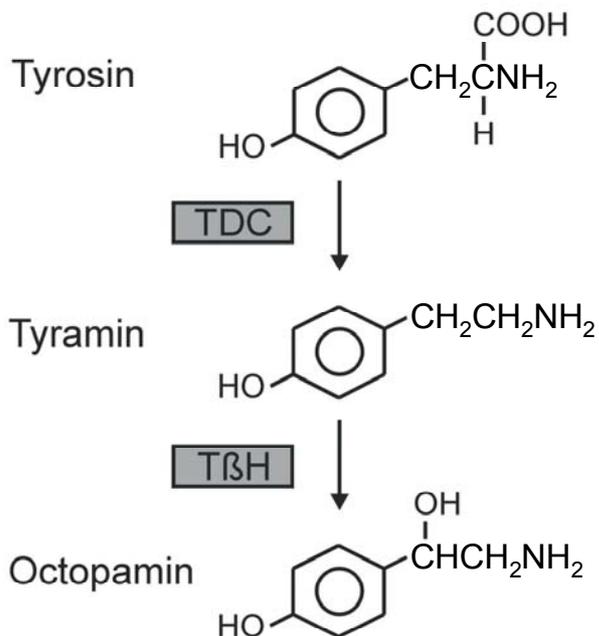


Abb. 1.3: Syntheseweg des Octopamins. L-Tyrosin wird durch das Enzym Tyrosin Decarboxylase (TDC) decarboxyliert, es entsteht Tyramin. Die Einführung einer OH-Gruppe durch die Tyramin β-Hydroxylase (TβH) setzt Tyramin zu Octopamin um.

Seit der Entdeckung des Moleküls in den Speicheldrüsen des Tintenfisches *Octopus* (Erspamer und Boretti, 1951) wurde Octopamin in neuronalen und nicht-neuronalen Geweben

der meisten untersuchten Wirbellosen gefunden (Roeder, 1999). Octopamin hat demnach in Wirbellosen periphere als auch zentrale Wirkung und wird daher auch als multipotente Substanz bezeichnet (Axelrood und Saavedra, 1977; Roeder, 1999). Octopamin kann aber auch Effektororgane wie beispielsweise das Leuchtorgan der „Glühwürmchen“ (*Photuris*) stimulieren (Nathanson, 1979).

Es wird angenommen, daß Octopamin als Stresshormon wirken kann. Es wurde gezeigt, daß Temperaturerhöhungen, Nahrungsmangel und starke mechanische Reizung des ganzen Tieres die OA-Konzentration in der Hämolymphe der Heuschrecke *Schistocerca gregaria* (Davenport und Evans, 1984) und der Honigbiene (Harris und Woodring, 1992) erhöhen. OA vermittelt ebenfalls die Mobilisierung gespeicherter Diglyceride aus dem Fettkörper der Heuschrecke (Orchard et al., 1993), die in den ersten Phasen des Fluges erfolgt.

In Insekten werden auch die beiden wichtigsten endokrinen Organe, die corpora cardiaca und corpora allata durch Octopamin moduliert (Orchard et al., 1993, Rachinsky 1994, Kaatz et al., 1994). Viele Sinnesorgane können bei Insekten durch Octopamin moduliert werden. Bei der Honigbiene, *Apis mellifera*, erhöht die Applikation von OA die Sensitivität der Photorezeptoren (Erber et al., 1993). In vielen Wirbellosen wurde auch eine verhaltensmodulatorische Wirkung von Octopamin gezeigt. Bei der Honigbiene wurde diese Wirkung von Octopamin auf zwei Reflexe, den Rüsselreflex und den optisch ausgelösten Antennenreflex besonders gut untersucht (Erber et al., 1993, Kloppenburg und Erber, 1995). Die Injektion von Octopamin in den Dorsallobus führt zu einer Erhöhung der antennalen Abtastfrequenz (Pribbenow und Erber, 1996). Octopamin ist auch an der Erkennung von stockfremden – und stockzugehörigen Bienen (Robinson et al., 1999) und an der Arbeitsteilung im Bienenvolk beteiligt (Schulz und Robinson, 2001). Bei der *Drosophila* Mutante *inactive*, die einen erniedrigten OA-Spiegel besitzt, zeigen Männchen ein gestörtes, erfahrungsabhängiges Paarungsverhalten gegenüber anderen Männchen (O'Dell, 1994). Auch bei der Honigbiene spielt Octopamin eine wichtige Rolle bei Lern- und Gedächtnisprozessen: Bei einer olfaktorischen Konditionierung kann die Injektion von OA in die Pilzkörperkelche oder den Antennallobus den unkonditionierten Stimulus (US) ersetzen (Hammer 1997, Hammer und Menzel, 1998). Die instrumentelle Depolarisation des octopaminergen Neurons VUM_{mx1}, unmittelbar nach der Präsentation des konditionierten Stimulus (CS), hat den gleichen Effekt (Hammer, 1993).

Lern- und Gedächtnisprozesse bei Insekten (*Drosophila melanogaster* und *Apis mellifera*) werden seit längerem mit transienten Änderungen der intrazellulären cAMP-Konzentration neuronaler Zellen in Verbindung gebracht (Dubnau und Tully, 1998, Menzel und Müller, 1996). In *Drosophila* Kopf-Homogenaten bewirkt Octopamin eine Aktivierung der Adenylatzyklase (Uzzan und Dudai, 1982). Diese Wirkung wurde auch an Membranpräparationen aus Bienengehirnen nachgewiesen (Blenau et al., 2000). Ein aus *Drosophila* klonierter Octopamin-Rezeptor, OAMB (Han et al., 1998) bewirkt nach der

Aktivierung in heterologen Expressionssystemen einen Anstieg der intrazellulären cAMP-Konzentration. Das zugehörige Rezeptorprotein wurde bei *Drosophila* vor allem in den Pilzkörpern nachgewiesen. Die Pilzkörper sind Strukturen des Insektenhirns, von denen angenommen wird, daß sie an Lern- und Gedächtnisprozessen entscheidend beteiligt sind (De Belle und Heisenberg, 1994, Erber et al., 1980, Menzel et al., 1994). Es wurde vorgeschlagen, daß der OAMB-Rezeptor an der Modulation der physiologischen Prozesse beteiligt ist, die für das assoziative Lernen wichtig sind (Han et al., 1998).

1.5 Zielsetzung der Arbeit

Biogene Amine wirken bei Wirbeltieren und Wirbellosen als modulatorische Neurotransmitter. Sie aktivieren spezifische membranständige Rezeptoren und steuern Signalkaskaden, die zu Konzentrationsänderungen intrazellulärer Botenstoffe führen. Das Verständnis der molekularen und funktionellen Eigenschaften biogener Amin-Rezeptoren ist bei Wirbellosen im Vergleich zum Kenntnisstand bei Wirbeltieren immer noch begrenzt. Die Honigbiene gilt seit langem als Modellsystem für verhaltensbiologische Untersuchungen. Obwohl verhaltensmodulatorische Effekte biogener Amine an diesem System vielfach beschrieben worden sind, ist über den Beitrag von biogenen Amin-Rezeptoren an diesen Prozessen verhältnismäßig wenig bekannt.

In unserer Arbeitsgruppe wurde deshalb mit der Klonierung und funktionellen Charakterisierung biogener Amin-Rezeptoren aus der Honigbiene begonnen. Im Rahmen dieser Arbeiten wurde ein Dopamin- und ein Tyramin-Rezeptor aus *Apis mellifera* kloniert und funktionell charakterisiert (Blenau et al., 1998, 2000). Es konnte gezeigt werden, daß beide Rezeptoren die intrazellulären cAMP-Spiegel beeinflussen. Der Dopamin-Rezeptor bewirkt nach Aktivierung eine Erhöhung, der Tyramin-Rezeptor eine Senkung der intrazellulären cAMP-Spiegel.

Die verhaltensmodulatorische Wirkung von Octopamin ist bei der Honigbiene sehr gut untersucht (Braun und Bicker, 1992, Burell und Smith, 1995, Erber et al., 1993, Pribbenow und Erber, 1996). Bislang wurde aber noch kein Octopamin-Rezeptor aus der Honigbiene kloniert. Dies steht in einem deutlichen Mißverhältnis zur Bedeutung des octopaminergen Systems bei Lern- und Gedächtnisprozessen.

Das primäre Ziel dieser Arbeit war daher die Klonierung eines Octopamin-Rezeptors aus *Apis mellifera*. Anhand von Sequenzvergleichen sollte geprüft werden, welcher Unterfamilie der GPCR-Gene das klonierte Gen zuzuordnen ist. Die funktionelle Kopplung des Rezeptors an intrazelluläre Botenstoffwege sollte in einem heterologen Expressionssystem untersucht werden. Das zelluläre Expressionsmuster des Rezeptor-Gens sollte durch *in situ*-Hybridisierungen aufgeklärt und die Verteilung des Rezeptor-Proteins im Bienenhirn mit spezifischen Antikörpern bestimmt werden.

2. Methoden

2.1 Allgemeine Methoden

Alle nicht detailliert beschriebenen molekularbiologischen Methoden sind Standardmethoden der Laborpraxis (Sambrook et al., 1989).

2.2 Allgemeine molekularbiologische Methoden

2.2.1 Präparation von Plasmid-DNA

2.2.1.1 Mini-Präparation von Plasmid-DNA

Zur schnellen Isolierung von Plasmid-DNA wurden Plasmid-Minipräparationen durchgeführt. 5 ml LB-Medium (10 g Bacto Tryptone; 10 g NaCl; 5 g Hefeextrakt; ad 1 l H₂O, autoklavieren) wurden mit dem entsprechenden Antibiotikum versetzt (Ampicillin: 100 µg/ml; Kanamycin: 30 µg/ml), mit einer Einzelkolonie beimpft und für mindestens 6 h im Rollschüttler bei 37°C inkubiert. 1,5 ml der Kulturflüssigkeit wurden in ein Eppendorfreaktionsgefäß (ER) überführt und für 1 min bei Raumtemperatur (RT) und 14.000 rpm in einer Eppendorfzentrifuge (EZ) zentrifugiert. Alle weiteren Zentrifugationen erfolgten ebenfalls in der EZ.

Der Überstand wurde dekantiert. Das Bakterienpellet wurde in 100 µl Lösung I (50 mM Glukose; 25 mM Tris-HCl, pH 8,0; 10 mM EDTA; autoklavieren) durch vortexen resuspendiert. Die Suspension wurde sofort mit 200 µl Lösung II (0,2 M NaOH; 1 % SDS) versetzt und durch vortexen gemischt. Die klare, viskose Lösung wurde mit 150 µl Lösung III (60 ml 5 M Kac; 11,5 ml Essigsäure; pH 4,8 mit konz. HCl einstellen; ad 100 ml H₂O) versetzt, auf dem Vortex durchmischt und anschließend 3 min bei Raumtemperatur (RT) und 14.000 rpm zentrifugiert. Die wäßrige Phase wurde zu 200 µl Phenol/CHCl₃ (1:1 Mischung, TE-gesättigt), das in ein sauberes ER vorgelegt worden war, pipettiert und gevortext. Es folgten 2 min Zentrifugation bei RT und 14.000 rpm. Die wäßrige Phase wurde in ein ER überführt, in das 200 µl CHCl₃ vorpipettiert wurden. Die Phasen wurden durchmischt. Es wurde 1 min bei 14.000 rpm und RT zentrifugiert. Die wäßrige Phase wurde in ein sauberes ER überführt, mit 1 ml 100% Ethanol versetzt, gevortext und 3 min bei RT und 14.000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde dekantiert. Das Nukleinsäurepellet wurde mit 100 - 200 µl 70% Ethanol gewaschen. Nach einer 1 min Zentrifugation bei 14.000 rpm und RT wurde der Überstand abgesaugt. Das Pellet wurde für maximal 1 min in der Vakuumzentrifuge getrocknet und anschließend in 20 µl TE-Puffer (10 mM Tris-HCl, pH 7,4; 1 mM EDTA; autoklaviert) aufgenommen.

2.2.1.2 LiCl-Präparation von Plasmid-DNA

Zur Präparation besonders reiner Plasmid-DNA, z.B. für eine anschließende Sequenzreaktion, wurden LiCl-Präparationen durchgeführt.

50 ml LB-Medium wurden mit Antibiotikum (siehe Methoden 2.2.1.1) versetzt, mit ca. 50 µl einer Vorkultur beimpft und über Nacht im Warmluftschüttler (185 UpM) bei 37°C inkubiert.

Die Kulturflüssigkeit wurde in Falcon-Röhrchen (FR) überführt und für 10 min in der Sigma-Zentrifuge bei 5.500 rpm und 4°C zentrifugiert.

Der Überstand wurde dekantiert und das Bakterienpellet in 4 ml Lösung I (siehe Methoden 2.2.1.1) resuspendiert. Anschließend wurde die Suspension mit 8 ml Lösung II (siehe Methoden 2.2.1.1) versetzt und durch Invertieren des Röhrchens vorsichtig vermischt. Es wurden 8 ml Lösung III (siehe Methoden 2.2.1.1) zugegeben, gemischt und anschließend 5 min bei 5.500 rpm und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde durch ein Faltenfilter in ein sauberes FR filtriert und die Nukleinsäuren durch Zugabe von 25 ml Isopropanol gefällt. Es folgte eine 10 min Zentrifugation bei 5.500 rpm und 4°C. Der Überstand wurde dekantiert. Der Niederschlag wurde in 1,45 ml ddH₂O gelöst. Die Lösung wurde mit 2,5 ml 4 M LiCl und 50 µl 1 M Tris-HCl, pH 7,5 versetzt, gut durchmischt und 5 min bei 5.500 rpm und 4°C zentrifugiert.

Der Überstand wurde auf zwei Greiner Röhrchen (GR) verteilt, mit 2,5 Vol. 100% Ethanol versetzt, gut durchmischt und für 10 min bei 5.500 rpm und 4°C zentrifugiert.

Der Überstand wurde dekantiert. Der Niederschlag wurde kurz in der Vakuumzentrifuge getrocknet, in 200 - 300 µl TE-Puffer resuspendiert, mit 2 - 3 µl RNase-Cocktail (Ambion) versetzt und in ER überführt. Der RNase-Verdau erfolgte für mindestens 30 min bei 37°C.

Nach der Zugabe von 1 Volumen Phenol/Chloroform (siehe Methoden 2.2.1.1) wurde durchmischt und für 2 min bei 15.300 rpm und RT zentrifugiert. Die wäßrige Phase wurde in ein sauberes ER pipettiert und die Phenol/Chloroform-Extraktion wiederholt. Die wäßrige Phase wurde mit 1 Volumen CHCl₃ versetzt, durchmischt und 1 min bei 15.300 rpm und RT zentrifugiert. Die wäßrige Phase wurde in ein sauberes ER pipettiert und die Chloroform-Extraktion wiederholt.

Die wäßrige Phase wurde in ein sauberes ER pipettiert und mit je 1/10 Volumen 3 M LiCl und dem 3-fachen Volumen 100% Ethanol versetzt, gevortext und 5 min bei 15.300 rpm und RT zentrifugiert. Der Überstand wurde dekantiert und das Pellet mit ca. 200 µl 70% Ethanol gewaschen (Vortex). Es wurde 1 min bei 15.300 rpm und RT zentrifugiert und der Überstand abgesaugt. Das Pellet wurde für maximal 1 min in der Vakuumzentrifuge getrocknet und anschließend in 100 – 200 µl TE-Puffer (siehe Methoden 2.2.1.1) über Nacht gelöst.

2.2.2 DNA-Restriktionen

Zur Spaltung von DNA mit einem Restriktionsenzym wurden 15 µl-Ansätze, für Doppelrestriktionen 25 µl große Restriktionsansätze verwendet.

Für den **15 µl**-Ansatz wurden 2 µl (100-500 ng) präparierte DNA in ein ER pipettiert, mit 13 µl Restriktionsmix [1,5 µl 10×RD-Puffer (600 mM KAc, 100 mM Mg(Ac)₂, 330 mM Tris-HAc, pH 7,4); 1 µl Restriktionsenzym (10 U/µl); 10,5 µl dH₂O] versetzt und für mindestens 1 h bei 37°C inkubiert.

Für den **25 µl**-Ansatz wurde die DNA mit 24 µl Restriktionsmix (2,5 µl 10×RD-Puffer; 0,75 µl Restriktionsenzym 1; 0,75 µl Restriktionsenzym 2; 20 µl dH₂O) versetzt und für mindestens 1,5 h bei 37°C inkubiert.

2.2.3 DNA-Restriktionsfragment-Isolierung

DNA-Fragmente wurden nach der Restriktion (oder PCR) in einem 0,75% Agarosegel mit Ethidiumbromid aufgetrennt. Das Agarosegel wurde im Gelträger auf einen UV-Leuchttisch gelegt und das gewünschte DNA-Fragment möglichst exakt mit einem Skalpell ausgeschnitten. Überstehende Agarosebereiche, die keine DNA enthielten, wurden abgeschnitten. Das Gelstück wurde in ein ER überführt.

Ein sauberes ER wurde in der Mitte durchtrennt und der untere Teil mit einer heißen Kanüle durchstoßen. Das Loch wurde mit silikonisierter Glaswatte verschlossen und das Gelstück auf die Glaswatte in dem halbierten ER überführt.

Das halbierte ER wurde in ein intaktes ER gesteckt. Die DNA-Fragmente wurden durch 5 min Zentrifugation bei 6.000 rpm und RT isoliert.

Das Eluat wurde anschließend für weitere Inkubationen eingesetzt.

2.2.4 DNA-Ligationen

DNA-Ligationen wurden in standardisierten 15 µl-Ligationsansätzen durchgeführt.

Ein Ligationsansatz enthielt 5 µl Fragment-Eluat (bzw. PCR-Produkt), 1 µl restringierte Vektor-DNA (z.B. pBluescript), 1,5 µl 10× Ligase-Puffer, 1,5 µl ATP, 1 µl T4-DNA-Ligase (1 U/µl; Boehringer) und wurde für 2 h bei RT inkubiert. Anschließend wurde der Ligationsansatz zu 100 µl kompetenten Zellen (XL-1 Blue) gegeben, für ca. 30 min auf Eis inkubiert und auf LB-Amp-Platten ausgestrichen.

2.2.5 Subklonierungen

Geleluierte Restriktionsfragmente oder PCR-Produkte wurden zur Subklonierung in entsprechend geschnittene Vektoren ligiert. Die Subklonierungen erfolgten überwiegend in

pBluescript-Vektoren (Stratagene). Die Plasmide wurden in XL-1 Blue-Zellen transformiert und anschließend vermehrt.

2.2.6 PCR-Bedingungen

Zur Amplifikation von DNA-Fragmenten sowie zur Mutagenese wurden PCR-Reaktionen durchgeführt. Die zu amplifizierende DNA wurde mit PCR-Mix (dNTP's, spezifische Oligonukleotid-Paare, Taq-Polymerase, dH₂O) versetzt. Es wurden 100 µl-Ansätze verwendet. Ein Ansatz bestand aus: x µl DNA (1-10 ng), x µl Primerpaare (10 ng/Base + µl), 1 µl dNTP's (20 mM), 10 µl 10×RD-Puffer, 1 µl Taq-Polymerase (1 U/µl, Boehringer-Roche) ad 100 µl dH₂O. Die Reaktion erfolgte in Thermocyclern (Perkin Elmer) nach 2 min Denaturierung bei 94°C für 30-35 Zyklen: 40 s 94°C; 40 s T_m-2°C des verwendeten Primerpaares; 1 min 70°C.

2.2.7 DNA-Sequenzierung

DNA-Sequenzierungen wurden mit dem „Thermo Sequenase fluorescent-labeled primer cycle sequencing kit“ (Amersham-Pharmacia) durchgeführt. Pro Reaktion wurden zwischen 70-120 ng DNA/kb eingesetzt. Die Sequenzierprimer wurden auf eine Konzentration von 2 pmol/µl eingestellt. Für einen Voransatz wurde folgendes Pipettierschema verwendet: DNA: x µl; DMSO (50%): 0,7 µl; Primer (2 pmol/µl): 0,6 µl; dH₂O: 5,7-x µl, so daß ein Gesamtvolumen von 7 µl resultiert. Von diesem Voransatz wurden je 1,5 µl auf 4 PCR-Reaktionsgefäße verteilt und mit 1,5 µl Terminationsmix (0,75 µl Mix + 0,75 µl dH₂O) versetzt. Jeder Ansatz wurde mit 20 µl „Chill out wax“ überschichtet. Die PCR-Reaktion wurde nach 2 min Denaturierung bei 94°C nach folgendem Temperaturprotokoll durchgeführt:

40 s Denaturierung bei 94°C; 40 s „Annealing“ bei 52°C; 1 min Synthese bei 70°C. Die Amplifizierung erfolgte für 30-35 Zyklen. Die Reaktionen wurden danach auf 4°C abgekühlt. Durch das Abkühlen härtet das Wachs aus. Auf das Wachs wurden 3 µl Stopp-Puffer pipettiert. Vor dem Auftragen auf ein Sequenziergel wurden die Proben für 2 min bei 70°C denaturiert. Die Proben wurden mit dem LICOR Elektrophoresesystem (MWG Biotech) analysiert.

2.3 Spezielle molekularbiologische Methoden

2.3.1 Verwendete Bienen-DNA-Bibliotheken und Klone

Bibliotheken:

- Genomische Bienenlarven-DNA in Cosmid-Vektor „Lawrist 7“ (Beye et al., 1998)
- Bienen-cDNA (Gehirn) in Lambda-Zap II (Blenau et al., 1998)

Klone:

- AmBAR1, Bienen cDNA-Klon, der für ein Protein der Familie der GPCR kodiert, zur Verfügung gestellt von Dr. P. Ebert (University of Queensland, Australien)
- Dmoct1A/B, *Drosophila*-cDNA-Klone, Splicevarianten des *Drosophila*-Octopaminrezeptorgens Dmoct1, zur Verfügung gestellt von Dr. A. Baumann (FZ Jülich)

2.3.2 Hybridisierung der Bienen Cosmid-DNA-Bibliothek

Die genomische Bienen-Cosmid-DNA-Bank (Beye et al., 1998) wurde vom Ressourcenzentrum (RZPD) bezogen. Die Bibliothek enthält auf vier Filtermembranen ca. 110.000 Klone. Dies entspricht etwa einer 22fachen Genomabdeckung. Vorteil solcher Genbibliotheken ist, daß die Klone aus sogenannten „masterplates“ automatisiert immer doppelt auf die Membran übertragen werden. Dadurch wird die Zuordnung einzelner Klone zu einer spezifischen X-Y-Position im Koordinatenkreuz möglich. Diese X-Y-Position führt zur schnellen Identifizierung gewünschter Klone, die über das Ressourcenzentrum (RZPD) bezogen werden können (Zehetner und Lehrach, 1994).

Zum Durchmustern der Bibliothek wurden Restriktionsfragmente benutzt, die von einem alternativ gespleißten *Drosophila*-Octopamin-Rezeptorgen stammen.

Die zur Hybridisierung eingesetzten Fragmente wurden mit der „random priming“-Methode radioaktiv markiert (Amersham, RPN 1601). Die DNA-Fragmente wurden denaturiert und mit synthetisch hergestellten Hexameren hybridisiert. In der nachfolgenden Markierungsreaktion benutzt eine DNA-Polymerase diese Oligonukleotide als Startpunkte für die DNA-Neusynthese. Während der Synthese wird radioaktiv markiertes Deoxycytidin-5'-[α -³²P]-triphosphat (Amersham, AA0005) in die DNA eingebaut. Für die Markierungsreaktion wurden 25 ng DNA und 5 μ l Deoxycytidin-5'-[α -³²P]-triphosphat pro 50 μ l „random-priming“-Ansatz verwendet. Zur Abtrennung nicht-eingebauter Nukleotide wurde der Markierungsansatz über eine Sephadex-Säule (Nick-Column, Amersham-Pharmacia, 17-0855-01) gereinigt.

Die Hybridisierung der Filter wurde in 5 \times SET (20 \times SET: 3 M NaCl, 0,4 M Tris-HCl, pH 7,5, 0,02 M EDTA), 5 \times Denhardts-Lösung (100 \times Denhardts-Lsg.: 2% BSA, 2% Ficoll 400, 2% Polyvinylpyrrolidon), 100 μ g/ml autoklavierte Heringssperma-DNA, 0,1% SDS, 10⁶ cpm/ml denaturierter, radioaktiv markierter Sonden-DNA bei 58°C im Rotorofen (Biometra) über Nacht durchgeführt. Die Filter wurden 2 \times für 30 min in 2 \times SET, 0,1% SDS bei 58°C gewaschen. Die Exposition der Röntgenfilme wurde für 2 Tage bei -80°C unter Verwendung von Verstärkerfolien durchgeführt. Positive Signale wurden anhand der X-Y-Position auf den Filtern Klonen zugeordnet und die Klone vom RZPD bezogen.

2.3.3 Anzucht der cosmidtragenden Bakterien

Bei den vom RZPD bezogenen Klonen handelt es sich um Bakterienstämme, die mit Cosmiden transformiert sind. Die Cosmide vermitteln den Bakterien eine Kanamycin-Resistenz.

Es wurde ein Verdünnungsausstrich auf LB-Agarplatten (30 µg Kanamycin/ml) hergestellt. Die Platten wurden über Nacht bei 37°C inkubiert. Mit einem sterilen Zahnstocher wurden einzelne Kolonien „gepickt“ und 5 ml LB-Medium (30 µg Kanamycin/ml) in einem 25 ml-Erlenmeyerkolben beimpft. Die Anzucht der Bakterien erfolgte für 16 h bei 37°C auf einem Schüttler.

2.3.4 Präparation von Cosmid-DNA

Die Cosmid-DNA wurde anhand eines modifizierten Protokolls von Ivens und Little (1995) isoliert.

1,5 ml stationäre Bakteriensuspension wurde in ein ER pipettiert und in einer EZ für 1 min bei 14.000 rpm und RT pelletiert. Alle nachfolgenden Zentrifugationen erfolgten ebenfalls in einer EZ. Der Überstand wurde dekantiert. Die Zellen wurden in 200 µl kalter Lsg. I (25% (w/v) Glukose, 50 mM Tris-HCl, pH 8,0, 10 mM EDTA) vorsichtig resuspendiert und 5 min auf Eis inkubiert. Nach der Zugabe von 400 µl Lsg. II (0,2 M NaOH, 1% SDS) wurde die Suspension durch dreimaliges Invertieren der Röhrchen gemischt und für 10 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurden 200 µl kalte Lsg. III (3 M K-Acetat pH 4,8) zugegeben und durch Schütteln gemischt. Es wurde 10 min auf Eis inkubiert und danach 10 min bei 14.000 rpm und RT zentrifugiert. Der Niederschlag wurde mit einem sterilen Zahnstocher entfernt.

Nach der Zugabe von 480 µl Isopropanol wurde „gevortext“ und anschließend für 30 min bei -80°C inkubiert. Es wurde für 10 min bei 14.000 rpm und RT zentrifugiert. Der Überstand wurde dekantiert und die Röhrchen einige Minuten zum Abtropfen kopfüber gestellt. Das Pellet wurde in 100 µl dH₂O bei 65°C für 10 min resuspendiert. Nach der Zugabe von 100 µl eiskaltem 5 M LiCl wurde kurz „gevortext“ und für 10 min auf Eis inkubiert. Es wurde für 10 min bei 14.000 rpm und RT zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein sauberes ER überführt, mit 2 Volumen EtOH versetzt und die DNA für mind. 15 min bei 14.000 rpm und RT präzipitiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet mit 70% EtOH gewaschen. Es wurde 5 min bei 14.000 rpm und RT zentrifugiert und der Überstand verworfen. Die DNA wurde luftgetrocknet und danach in 10 µl TE-Puffer resuspendiert. Pro 5 ml Bakteriensuspension wurden ca. 1,5 µg Cosmid-DNA isoliert.

2.3.5 Hybridisierung der Bienenhirn cDNA-Bibliothek

Zur Isolierung von cDNA-Klonen wurde eine Honigbienen cDNA-Bibliothek (Blenau et al., 1998), die aus Gehirn-spezifischer mRNA hergestellt worden war, mit einem radioaktiv markierten 900 bp-großen EcoRI/XbaI Fragment des AmBAR1-cDNA-Klons durchmustert.

Das Fragment wurde mit der „Random Priming“-Methode radioaktiv markiert (siehe Methoden 2.3.2).

Die Hybridisierung erfolgte unter hoch stringenten Bedingungen in 5× SET, 5× Denhardts-Lösung, 100 µg/ml Heringssperma-DNA, 0,1% SDS, 10⁶ cpm/ml markierter Sonden-DNA bei 61°C über Nacht. Die Filter wurden für 5 min bei RT, anschließend für 2× 30 min in 1× SET, 0,1% SDS bei 61°C gewaschen. Die Exposition der Filme erfolgte über Nacht bei -80°C mit Verstärkerfolien.

2.3.6 Restriktionsanalyse der Rekombinanten, Subklonierung und Sequenzierung

Die DNA einzelner genomischer Cosmid-Klone wurde mit EcoRI verdaut. Die DNA-Fragmente wurden in 0,8%igen Agarosegelen in einer Biometra-Gelkammer aufgetrennt und anschließend durch alkalischen Transfer auf Nylonmembranen übertragen („Southern-Blot“). Die „Southern Blots“ wurden mit radioaktiv markierter Sonden-DNA des *Drosophila*-Octopamin-Rezeptorklons (siehe Methoden 2.3.2) hybridisiert. Der Nachweis gebundener Sonden-DNA erfolgte autoradiographisch.

Plasmid-DNA positiver cDNA-Klone wurde nach dem „*in vivo* Excision“-Protokoll (Stratagene) isoliert. Plasmid-DNA dieser Klone wurde mit EcoRI geschnitten und gelelektrophoretisch aufgetrennt.

Der AmBAR1-Klon wurde in pBlueskript Vektoren (Stratagene) kloniert und doppelsträngig sequenziert.

2.3.7 Konstruktion von Expressionsvektoren

2.3.7.1 Konstruktion des Expressionsvektors pcAmoct1

Zur heterologen Expression in eukaryontischen Ammenzellen wurde die cDNA modifiziert. Durch eine Mutagenese-PCR wurde vor das Start-Kodon (ATG) des offenen Leserahmens eine singuläre HindIII-Schnittstelle sowie die Kozak-Konsensussequenz eingefügt. Folgende Oligonukleotide wurden als PCR-Primer verwendet:

5'-Oligo: 5'-GATAAGCTTCCACCATGCGATCCGTATTC (fügt eine HindIII-Schnittstelle {fett} sowie die Kozak-Konsensussequenz {unterstrichen} ein)

3'-Oligo: 3'-ATGGATCCTCAAGGTCAA (enthält eine BamHI-Schnittstelle)

Das PCR-Fragment wurde HindIII/XbaI geschnitten, die geschnittene DNA gelelektrophoretisch aufgetrennt und das resultierende ~800 bp große Fragment aus dem Gel eluiert.

Die *Amoct1*-cDNA in pBluescript wurde mit XbaI/EcoRI geschnitten, ebenfalls gelelektrophoretisch aufgetrennt und das XbaI/EcoRI-Fragment eluiert. Das PCR-Fragment (HindIII/XbaI) und das Restriktionsfragment (XbaI/EcoRI) wurden in HindIII/EcoRI geschnittenem pcDNA1.amp-Vektor (Invitrogen) subkloniert. Der Klon wurde als *pcAmoct1* bezeichnet.

2.3.7.2 Konstruktion des Expressionsvektors *pcAmoct1-HA-Tag*

Zum Nachweis der Expression des Rezeptorproteins in HEK 293-Ammenzellen wurde die *Amoct1*-cDNA am 3'-Ende modifiziert. Das Stop-Kodon des offenen Leserahmens wurde entfernt und durch eine Sequenz ersetzt, die für ein Nonapeptid kodiert, das im Hämagglutinin A vorkommt (YPYDVPDYA). Zum Ersetzen des Stop-Codons und Einfügen der Hämagglutinin A-(HA)-Tag codierenden Sequenz wurde eine PCR auf *pcAmoct1* durchgeführt. Für die PCR wurden folgende Oligonucleotide verwendet:

5'-Oligo: 5'-CGGGAGCTCACTCAAGTCA (enthält eine SacI-Schnittstelle)

3'-Oligo: 5'-ATCTCGACTCGCTCTGCGA

Das Fragment wurde in die EcoV-Schnittstelle des pBK-T7-Stop-Klons (zur Verfügung gestellt von R. Gauß, FZ-Jülich), der die HA-kodierende Sequenz bereits trägt, kloniert. Direkt hinter der HA-kodierenden Sequenz schließt sich in pBK-T7-Stop eine XbaI-Schnittstelle an.

Die korrekte Orientierung des eingefügten Fragmentes wurde durch Restriktion mit SacI bestimmt. Der „Zwischenklon“ wurde sequenziert. Aus dem Klon wurde das 3'-SacI/XbaI-Fragment (enthält die HA-Sequenz) ausgeschnitten und zusammen mit dem 5'-Fragment, das durch den Verdau von *pcAmoct1* mit HindIII/SacI erhalten wurde, in HindIII/XbaI geschnittenen pcDNA1.amp Vektor kloniert.

2.3.7.3 Konstruktion des Fusionsprotein- Vektors FUSGEX*Amoct1*

Zur Konstruktion des Fusionsprotein-Vektors FUSGEX*Amoct1*, wurde eine PCR auf *pcAmoct1* durchgeführt. Folgende Oligonukleotide wurden eingesetzt:

5'-AGCGGATCCTTCCGGTTCGCGTTCAAA (fügt eine BamHI-Schnittstelle ein)

3'-ACGGAATTCTCATCTCGACTCGCTCTG (fügt eine EcoRI-Schnittstelle ein)

Das Fragment (bp 1545-1778) kodiert für den C-terminalen Abschnitt des Rezeptorproteins. Das Fragment wurde mit EcoRI/BamHI geschnitten, geleluert und „in frame“ hinter den

offenen Leserahmen des Glutathion-S-Transferase (GST)-Proteins in pGEX-2T-Vektor (Pharmacia Biotech) kloniert.

2.3.7.4 Konstruktion des Fusionsprotein- Vektors FUSMalAmoct1

Zur Konstruktion des Fusionsprotein-Vektors FUSMALAmoct1 wurde eine PCR auf pcAmoct1 durchgeführt. Folgende Oligonukleotide wurden eingesetzt:

5'-AAGGAATTCCGGTTCGCGTTCAAA (fügt eine EcoRI-Schnittstelle ein)

3'-ACGTCTAGATCATCTCGACTCGCTCTG (enthält eine XbaI-Schnittstelle)

Das Fragment (bp 1548-1778) kodiert für den C-terminalen Abschnitt des Rezeptorproteins. Das Fragment wurde mit EcoRI/XbaI geschnitten und „in frame“ hinter den Leserahmen des Maltose Bindeproteins (MBP) in den pMal-C2-Vektor (NEB) kloniert.

2.3.8 Heterologe Expression des Rezeptorproteins in HEK 293 Zellen

Exponentiell wachsende HEK 293 Zellen ($\sim 2 \times 10^5$ Zellen je 5cm-Petrischale) wurden mit 10 μ g pcAmoct1-DNA pro Schale transfiziert.

Die Transfektion erfolgte nach einer modifizierten Calciumphosphat-Kopräzipitations-Methode (Chen und Okayama, 1987).

Nach 20-22 h Inkubation im Brutschrank (35°C, 3% CO₂) wurden die Zellen in 1× PBS, 1× PBS/EDTA, 1× PBS gewaschen. Die Zellen wurden entweder auf Poly-D-Lysin beschichtete Glasplättchen umgesetzt (für Immuncytochemie, Ca²⁺-Imaging) oder in den Petrischalen belassen (für Membranproteinpräparationen, Pharmakologie) und anschließend mit frischem M10-Medium [MEM (1×), 31095-029; 10% fötales Kälberserum, 10106-078; L-Glutamin (0.2 M = 100×), 25030-024; Antibiotika/Antimykotika-Mix (1×) und MEM nichtessentielle Aminosäuren (100×), 11140-035; alle Produkte von GIBCO] „gefüttert“.

Nach 7-8 stündiger Inkubation im Brutschrank (37°C, 5% CO₂) wurde 3 mM Butyrat zur Steigerung der Expressionsrate zugesetzt. Die Zellen wuchsen anschließend für weitere 16-18 h im Brutschrank. Die Zellen wurden 3× in 1× PBS gewaschen und anschließend weiter verarbeitet.

2.3.9 Funktionalitätsnachweis des exprimierten Rezeptorproteins

2.3.9.1 cAMP-Assay

Mit pcAmoct1-transfizierte Zellen (siehe Methoden 2.3.8) wurden 2× in 1× PBS/100 μ M IBMX gewaschen und anschließend für 20 min in PBS/IBMX-Lösungen inkubiert, die verschiedene Konzentrationen der Test-Liganden enthielten. Die Ligandenlösung wurde abgesaugt und die Reaktion mit 1,5 ml eiskaltem Ethanol gestoppt.

Zur Freisetzung der gebildeten Botenstoffe wurden die Schalen für 2 h bei 4°C auf einem Taumler inkubiert. Die Zellysate wurden in 2 ml-ER pipettiert. Die Deckel wurden mit einer Kanüle durchstochen. Das EtOH wurde über Nacht in der Vakuumentrifuge verdampft.

Die cAMP-Konzentration der Zellysate wurde mit dem „TRK 432 cAMP assay kit“ (Amersham) bestimmt. Für jeden Meßwert wurden Doppelbestimmungen von mindestens zwei unabhängigen Transfektionen durchgeführt. Die intrazellulären cAMP-Konzentrationen der Lysate wurden anhand einer Eichgerade, die parallel aus Standardkonzentrationen von radioaktiv markiertem cAMP erstellt wurde, abgelesen.

2.3.9.2 Ca^{2+} -Imaging

Die Veränderung der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration nach Ligandenapplikation wurde fluoreszenzspektroskopisch gemessen.

Mit *pcAmoc1* transfizierte Zellen wurden mit dem Ca^{2+} -sensitiven Farbstoff Fura-2-AM (Fura-2-acetomethylester, 5 μ M) geladen.

Der Anstieg der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration wurde mit einer Ca^{2+} -Imaging-Apparatur (Applied Imaging) registriert. Unmittelbar nach der Applikation des Liganden wurden ausgewählte Zellen für 400 s beobachtet und die Ca^{2+} -Signale registriert.

2.3.10 *In situ*-Hybridisierung

Es wurden Gehirne aus Arbeitsbienen präpariert und für zwei Stunden in 1× PBS/4% Paraformaldehyd bei 4°C fixiert. Die Gehirne wurden 4× 15 min in 1× PBS gewaschen und über Nacht in PBS/25% Saccharose bei 4°C inkubiert.

Für die *in situ*-Hybridisierungen wurden 12 μ m dicke Kryotomschnitte der fixierten Bienenhirne angefertigt und auf Poly-D-Lysin-beschichtete Objektträger (Sigma, S4651) überführt. Die Präparate wurden in einer Alkoholreihe entwässert. Die Schnitte wurden für 5 min in 2× SSC (20× SSC: 3 M NaCl, 0,3 M Na-Citrat, pH 7,4) bei RT equilibriert. Zum Ablösen unzureichend fixierter Schnitte wurden die Präparate in 2× SSC bei 70°C für 20 min inkubiert. Die Präparate wurden zur besseren Zugänglichkeit mit Proteinase K (4 μ g/ml in DEPC- H_2O) für 2 min bei RT behandelt. Anschließend wurden die Schnitte in PBS/0,2% Glycin für 2 min bei RT inkubiert. Die Schnitte wurden in PBS/4% Paraformaldehyd für 20 min bei RT fixiert und anschließend erneut über eine Alkoholreihe dehydriert.

Die Hybridisierung der Gewebeschnitte wurde mit Digoxigenin-markierten RNA-Sonden durchgeführt.

Für die Herstellung eines Plasmids zur *in vitro*-Transkription der Ribosonden wurde zunächst eine PCR auf *pcAmoct1* durchgeführt. Als PCR-Primer wurden die folgenden Oligonukleotide eingesetzt:

5'-Oligo: 5'-TGAGGATCCATCGTGGC (enthält BamHI-Schnittstelle)

3'-Oligo: 5'-CGTGAATTCATACGACACCGAGATTTTA (fügt EcoRI-Schnittstelle ein)

Die PCR-Produkte wurden präzipitiert und anschließend mit EcoRI/BamHI geschnitten. Das 121 bp lange EcoRI/BamHI-Fragment, das für einen Teilbereich der dritten intrazellulären Schleife des Rezeptors kodiert (Basenpaare 919-1.040), wurde in EcoRI/BamHI-geschnittenen pBlueskript-Vektor (Stratagene) subkloniert.

Zur Vermeidung von Kreuzhybridisierungen wurde anschließend die GC-reiche pBluescript Polylinker-Region deletiert. Dazu wurden zwei Doppel-Restriktionen angesetzt: Eine Restriktion mit SacI/XbaI für die spätere Transkription mit der T3-Polymerase und eine KpnI/HindIII-Restriktion für die spätere Transkription mit T7-Polymerase. Anschließend wurden die Schnittstellen aufgefüllt und die Konstrukte religiert. Mit den religierten, GC-deletierten Konstrukten wurden kompetente XL-1 Blue-Zellen transformiert. Die Transkription der „antisense“- bzw. „sense“-Sonde erfolgte (auf dem entsprechend linearisierten Plasmid) mit T7- bzw. T3-Polymerase.

Die prozessierten Schnitte (siehe oben) wurden mit 0,5 µg/ml Dig-markierter RNA-Sonde hybridisiert. Die Hybridisierung erfolgte in 50% Formamid, 5× SSC, 100 µg/ml autoklavierte Heringssperma-DNA, 50 µg/ml Heparin, 0,1% Tween 20 über Nacht bei 45°C. Es wurden 100 µl Hybridisierungslösung pro Objektträger aufgetragen und ein Deckglas aufgelegt.

Die Hybridisierung wurde in einer feuchten Kammer durchgeführt. Als Equilibrierungslösung wurde 1 ml 50% Formamid/5× SSC pro cm² Kammerboden verwendet. Die Präparate wurden für 1 h und anschließend 2× 1,5 h in Waschlösung (50% Formamid, 2× SSC) bei 37°C gewaschen.

Die Schnitte wurden zum Nachweis der Hybride mit einem gegen Digoxigenin gerichteten Antikörper inkubiert, der an das Enzym Alkalische Phosphatase gekoppelt ist (Anti-Dig-AP Fab-Fragmente, Boehringer, 1093274).

Die Präparate wurden 2× 1min in P1 (0,1 M Tris-HCl, 150 mM NaCl, pH 7,5) inkubiert und anschließend 30 min in P2 (P1 mit 0,5% Blocking-Reagenz, Boehringer, 1096176) blockiert. Die Schnitte wurden mit je 100 µl Antikörperlösung (Anti-Dig-Fragmente 1:500 in P2) unter einem Deckglas bei RT in einer feuchten Kammer (Equilibrierungslösung ist P1) über Nacht inkubiert.

Die Präparate wurden 2× 15min bei RT in P1 gewaschen. Die Schnitte wurden zur Einstellung des pH-Wertes für 1 min in P3 (0,1 M Tris-HCl, 100 mM NaCl, 50 mM MgCl₂,

pH 9,5) inkubiert. Die Schnitte wurden anschließend im Dunkeln in Färbelösung (175 µg/ml BCIP, 337,5 µg/ml NBT, 1 mM Levamisol in P3) inkubiert. Die Farbreaktion wurde für 45 min bis 1 h durchgeführt und anschließend mit TE-Puffer abgestoppt. Der TE-Puffer wurde 3× gewechselt und die Präparate über Nacht bei 4°C in TE-Puffer inkubiert. Zur Dokumentation wurden die Präparate in Glycerin-Gelatine (1:1) eingedeckt. Die Auswertung der Farbreaktionen erfolgte am Lichtmikroskop.

2.4 Immunologische Methoden und Proteinbiochemie

2.4.1 Überexpression und Aufreinigung der Fusionsproteine

Kompetente Zellen wurden mit dem entsprechenden Plasmid (BL21-Zellen mit FUSGEXA*moct1*, XL1 Blue-Zellen mit FUSMALA*moct1*) transformiert. Eine 5 ml-Übernachtskultur wurde mit einer Einzelkolonie angeimpft und bei 37°C im Rollinkubator bebrütet. 500 ml LB-Amp-Medium wurden mit der Vorkultur beimpft und bis zu einer OD₆₀₀ von 0,4-0,6 im Warmluftschüttler bei 37°C inkubiert. Die Induktion der Fusionskonstrukte erfolgte durch Zugabe von IPTG (Endkonzentration: 0,5 mM). Die Kulturen wurden für weitere 2-3 h bei 37°C inkubiert und anschließend für 10 min bei 5.500 rpm und 4°C in GSA-Bechern zentrifugiert. Das Pellet wurde in 5 ml PBS resuspendiert und anschließend für 5× 45 s mit einem Stabsonifizierer sonifiziert. Das Solubilisat wurde auf ER verteilt (je 1 ml) und zur Abtrennung der unlöslichen Bestandteile für 20 min bei 15.300 rpm und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde mit Proteingelprobenpuffer versetzt und gelelektrophoretisch aufgetrennt.

Das Gel wurde in 0,3 M Kupfersulfat gefärbt. Die überexprimierte Proteinbande wurde ausgeschnitten und in einen Dialyseschlauch mit 5-10 ml Dialysepuffer (0,5 M Ammoniumhydrogenphosphat, 100 mM Natriumhydrogencarbonat) überführt. Das überexprimierte Protein wurde über Nacht gegen 100 mM Natriumhydrogencarbonat dialysiert. Die Proteinmenge der Dialysate wurde nach der Methode von Bradford (1976) bestimmt.

2.4.2 Herstellung polyklonaler Antikörper gegen den C-Terminus von AmOCT1

Die Herstellung der polyklonalen Antikörper wurden bei der Firma „Pineda Antikörper-Service“ (Berlin) in Auftrag gegeben. Es wurden zwei Kaninchen mit dem MBP-OCT-Fusionsprotein immunisiert. Für die Immunisierung wurden insgesamt 250 µg MBP-OCT-Fusionsprotein pro Tier benötigt. Die Immunisierung erfolgte nach einem Standardprotokoll der Firma Pineda und kann über das Internet unter www.pineda-abservice.de bezogen werden.

Die Qualität der Seren wurde anhand von Tüpfelblots („dot blots“) mit Verdünnungsreihen von MBP-OCT und GST-OCT (100 ng-10 pg) Fusionsproteinen getestet.

2.4.3 Tüpfelblots

Für die Tüpfelblots wurden Fusionsproteinverdünnungen in 10er Schritten von 100 ng/µl - 10 pg/µl hergestellt. Je 1 µl der Verdünnungen wurde auf eine Nitrocellulosemembran aufgetragen und getrocknet. Zur Blockierung unspezifischer Bindungsstellen wurden die Membranen für 30 min bei RT in PBS/5% Milchpulver auf einem Taumler inkubiert.

Das Serum wurde 1:3.000 in PBS/0,05% Tween 20 verdünnt und die Membran für 1 h bei RT mit der Serumverdünnung inkubiert. Alternativ wurden die Serumproben 1:10.000 verdünnt und über Nacht bei 4°C inkubiert. Die Membran wurde 3× 5 min bei RT in PBS/0,05% Tween 20 gewaschen. Es folgte die Inkubation in α-rabbit-HRP (Sigma, A9169) 1:2.000 in PBS/5% Milchpulver/0,05% Tween 20 für 30 min bei RT.

Anschließend wurde die Membran 2× 10 min in PBS/0,05% Tween 20 und 1× 5 min in PBS gewaschen, da das Detergenz die Peroxidasereaktion hemmt. Die Detektion der Signale erfolgte mit dem ECL-System (Amersham-Pharmacia, RPN 2106; siehe auch Methoden 2.4.5).

2.4.4 Membranprotein-Isolierung aus transfizierten Zellen

Das Kultur-Medium der 5 cm-Schalen wurde abgesaugt und die Zellen 2× mit sterilem 1× PBS gewaschen. Das PBS wurde abgesaugt und 1 ml steriles PBS in die Zellkulturschale pipettiert.

Die Zellen wurden mit einem Gummiwischer vom Schalenboden abgelöst und die Zellsuspension in ein ER pipettiert. Die Zellen wurden durch 5 min Zentrifugation bei 2.000 rpm und RT sedimentiert. Der Überstand wurde abgesaugt und das Zellpellet entweder in flüssigem N₂ eingefroren und bei -80°C gelagert oder sofort zur Membranpräparation eingesetzt. Zur Lyse der Zellen wurde das Zellpellet in 0,2 ml Puffer A (10 mM NaCl, 25 mM HEPES, pH 7,5, 2 mM EDTA, Protease-Inhibitor [Pefablock (500 mg/ml); Verdünnung 1:250]) resuspendiert und anschließend mit einem Pistill homogenisiert.

Das Homogenat wurde 10 min auf Eis inkubiert und in einer Sigma-Zentrifuge für 30 min bei 15.300 rpm und 4°C zentrifugiert. Der Überstand enthielt die cytosolischen Proteine, wurde abpipettiert und aufbewahrt.

Das Membran-Sediment wurde in 30 µl Puffer B (200 mM NaCl, 50 mM HEPES, pH 7,5, [Pefablock (500 mg/ml); Verdünnung 1:250]) vollständig resuspendiert.

Zu der Suspension wurden tropfenweise 30 µl einer 2%igen CHAPS-Lösung gegeben und auf dem Vortex gemischt. Zum Solubilisieren der Membranproteine wurde die Lösung 10 min auf Eis inkubiert. Es folgten 10 min Zentrifugation bei 10.100 rpm und 4°C.

Der Überstand enthält die Membranproteine und wurde in ein sauberes ER pipettiert.

Die Konzentration der Membranproteine wurde durch eine Amido Schwarz-Proteinbestimmung ermittelt.

2.4.5 Immunologischer Nachweis von Proteinen auf „Western-Blots“

Proteinproben wurden gelelektrophoretisch in 10%igen, denaturierenden Polyacrylamidgelen (SDS-Page) in einer Biometra Gelkammer (010-300) aufgetrennt. Als Molekulargewichtsstandard wurde der „Prestained SDS molecular weight marker“ von Sigma (SDS-7B) verwendet. Die Proteine wurden nach der Gelelektrophorese durch Elektroblothing (Fastblot, Biometra 014-800) auf eine PVDF-Membran übertragen („Western-Blot“). Die Markerspuren wurden nach dem Transfer abgeschnitten und aufbewahrt. Die Membran wurde für 1 min in 1× PBS/0,05% (w/v) Tween 20 equilibriert. Unspezifische Bindungsstellen wurden durch die Inkubation in Blockierungslösung (1× PBS/5% Magermilchpulver/0,05% Tween 20) bei RT für mindestens 30 min abgesättigt. Der Primärantikörper (Serum gegen AmOCT1 - C-Terminus) wurde 1:10.000 in Blockierungslösung verdünnt, auf die Membran gegeben und für eine Stunde bei RT, oder alternativ über Nacht bei 4°C, auf einem langsam eingestellten Schüttler inkubiert. Die Membran wurde 2× 5 min in 1× PBS/0,05% Tween 20 und 1× 5 min in 1× PBS bei RT gewaschen.

Der Sekundärantikörper (goat anti-rabbit-Peroxidasekonjugat, Sigma A9169) wurde 1:5.000 (in 1× PBS/ 0,05% Tween 20) verdünnt und für 30 min bei RT inkubiert. Die Detektion der gebundenen Antikörper erfolgte mit dem ECL- System (ECL Western blotting detection reagents, Amersham-Pharmacia RPN 2109). Zur Detektion wurde die feuchte Membran in einem 1:1 Gemisch aus ECL-Lösung 1 und ECL-Lösung 2 ohne Schütteln für 1 min bei RT inkubiert, vorsichtig abgetropft und in eine Prospekthülle überführt. In der Dunkelkammer wurden anschließend ECL-Filme (Amersham-Pharmacia, RPN1674K) unterschiedlich lang (z. B. 1 min, 5 min), aufgelegt und entwickelt. Das Molekulargewicht der detektierten Banden wurde anhand des Molekulargewichtstandards bestimmt.

2.4.6 Immunocytochemie an transfizierten HEK 293-Zellen

Die mit pcAmoctl-HA transfizierten Zellen wurden in die Vertiefungen von 4-Loch-Mikrotiterplatten ausgesät. Das Zellkultur-Medium wurde abgesaugt und die Zellen 2× kurz mit 500 µl 1× PBS gewaschen. Anschließend wurden die Zellen mit 4% Paraformaldehyd-Lösung für 15 min bei RT fixiert. Die Zellen wurden 3× 10 min mit je 500 µl 1× PBS bei RT gewaschen. In jede Vertiefung wurden 200-300 µl Präinkubationslösung (45 ml 1× PBS, 5 ml normales Ziegen Serum (NGS, Sigma G 9023) und 0,25 g Triton X100) pipettiert und für 30-60 min bei RT inkubiert.

Der primäre Antikörper (rat anti-HA, Boehringer-Roche) wurde 1:200 in PBS (47,5 ml PBS, 2,5 ml NGS, 0,25 g Triton X100) verdünnt, je 200 µl in jede Vertiefung pipettiert und bei RT für 60 min inkubiert.

Die Zellen wurden anschließend 3× 15 min mit je 500 µl 1× PBS gewaschen.

Der sekundäre Antikörper (sheep anti-rat-HRP, Amersham-Pharmacia) wurde 1:100 in PBS verdünnt.

Je 200 µl der Verdünnung wurden in jede Vertiefung pipettiert und für 30 min bei RT inkubiert. Die Zellen wurden 3× 15 min mit je 500 µl 1× PBS bei RT gewaschen. In jede Vertiefung wurden 200 µl Färbelösung (3 ml 1× PBS; 74 µl DAB; 9 µl H₂O₂) pipettiert und das Einsetzen der Farbreaktion am Mikroskop beobachtet. Die Reaktion wurde mit 1× PBS gestoppt. Anschließend wurde das Verhältnis von gefärbten zu ungefärbten Zellen mikroskopisch bestimmt.

Alternativ wurde das gegen den C-Terminus von AmOCT1 gerichtete Serum in einer Verdünnung von 1:200 als Primärantikörper eingesetzt. In diesem Fall wurde die Bindung des Antikörpers über einen fluoreszenzmarkierten Sekundärantikörper (goat anti-rabbit-Cy3, Sigma C 2306) nachgewiesen.

Für **die Co-Lokalisation** wurden mit pcAmoct1-HA transfizierte Zellen wie oben beschrieben fixiert, gewaschen und anschließend in einer Primärantikörpermischung aus 100 µl des gegen den C-Terminus von AmOCT1 gerichteten Serums (1:200 in PBS) und 100 µl rat anti-HA (1:200 in PBS) inkubiert. Zur Detektion des anti-HA-Antikörpers wurde nun ebenfalls ein fluoreszenzmarkierter Zweitantikörper (goat anti rat-FITC, Sigma F 6258) eingesetzt. Zur Detektion der gebundenen Antikörper wurden 200 µl einer Zweitantikörpermischung (goat anti-rat-FITC (1:100), sheep anti rabbit-Cy3 (1:50), 1:1) in jede Vertiefung pipettiert. Die Zellen wurden unter dem Fluoreszenzmikroskop bei Rot- und Grünlichtanregung betrachtet. Es wurde die Anzahl der Zellen bestimmt, die bei beiden Wellenlängen fluoreszierten.

2.4.7 Immuncytochemie an Vibratomschnitten von Bienengehirnen

Frisch aus Arbeiterinnen präparierte Bienengehirne wurden für 2 h in Fixativ: 2% Paraformaldehyd, 1% Glutaraldehyd in 0,1 M Sörensen Phosphat Puffer [SPB] (0,2 M SPB, pH 7,4: 6,8g KH₂PO₄ und 21,3g NaHPO₄ in 500 ml Aqua dest. lösen, pH Wert kontrollieren und filtrieren) bei 4°C inkubiert.

Die Gehirne wurden 4× 15 min in 0,1 M SPB bei RT gespült und über Nacht bei 4°C in frischem 0,1 M SPB aufbewahrt. Die Gehirne wurden in Gelatine (1,2 g in 10 ml SPB, lösen durch Erhitzen auf 50-60°C) eingebettet. Am Vibratom wurden 50 µm dicke Gewebeschnitte angefertigt und mit einem Pinsel in 0,1 M SPB aufgenommen. Die Schnitte wurden 2× 15

min in 0,1 M SPB bei RT gewaschen. Es folgten 20 min Inkubation in 1% Natriumborohydrid in 0,1 M SPB. Die Schnitte wurden 6× 5 min in 0,1 M SPB gespült und anschließend für 2 h in Antikörpermedium (5 ml normales Ziegen Serum, 3 g BSA in 0,1 M TSPB [SPB mit 0,3% Triton X100]) inkubiert.

Die Inkubation in Primärantikörper (Serum, 1:10 in Antikörpermedium) erfolgte über Nacht bei 4°C. Die Schnitte wurden danach 4× 30 min in TSPB gewaschen und für 4 h mit dem sekundären Antikörper (anti-rabbit-IgG-Cy3, Sigma) 1:50 in Antikörpermedium inkubiert. Anschließend wurden die Schnitte 6× 15 min in 0,1 M SPB gewaschen.

Die Schnitte wurden unter dem Mikroskop mit einem Pinsel auf Objektträger überführt (2 Schnitte pro Objektträger) und mit einem Gemisch aus 50% Glycerin und 50% 0,1 M SPB unter Deckgläschen eingedeckt. Die Auswertung der Signale erfolgte am Fluoreszenzmikroskop. Die Schnitte wurden zur Dokumentation der Ergebnisse photographiert.

3. Ergebnisse

3.1 Isolierung genomischer Cosmid-Klone eines Octopamin-Rezeptorgens aus *Apis mellifera*

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war die Klonierung und funktionelle Charakterisierung eines Octopamin-Rezeptors der Honigbiene (*Apis mellifera*). Da alle bisher bekannten Octopamin-Rezeptoren zur Supergenfamilie der G Protein-gekoppelten Rezeptoren (GPCR) gehören, sollte die Sequenzhomologie innerhalb der Genfamilie genutzt werden, um das neue Gen zu isolieren. Diese Strategie wurde bereits zweimal erfolgreich zur Klonierung biogener Amin-Rezeptoren der Honigbiene eingesetzt (Blenau et al., 1998, 2000).

DNA-Sonden, die für zwei Splice-Varianten des *Drosophila* Octopamin-Rezeptorgens *Dmoct1* (*Dmoct1A* und *Dmoct1B*) kodieren (Arnd Baumann, 1999), wurden zum Durchmustern einer genomischen Bienen-Cosmid-Bibliothek (Beye et al., 1998) verwendet. Für die Hybridisierung der „Array“-Filter wurden Restriktionsfragmente benutzt, die sowohl Sequenzabschnitte enthalten, die in beiden Rezeptoren gemeinsam vorkommen (~TM 3 - TM 5) als auch Sequenzabschnitte, die jeweils für spezifische Teilbereiche der Rezeptoren kodieren (G-Protein-Bindestelle - TM 7) [siehe Abb. 3.1 und Methoden 2.3.2].

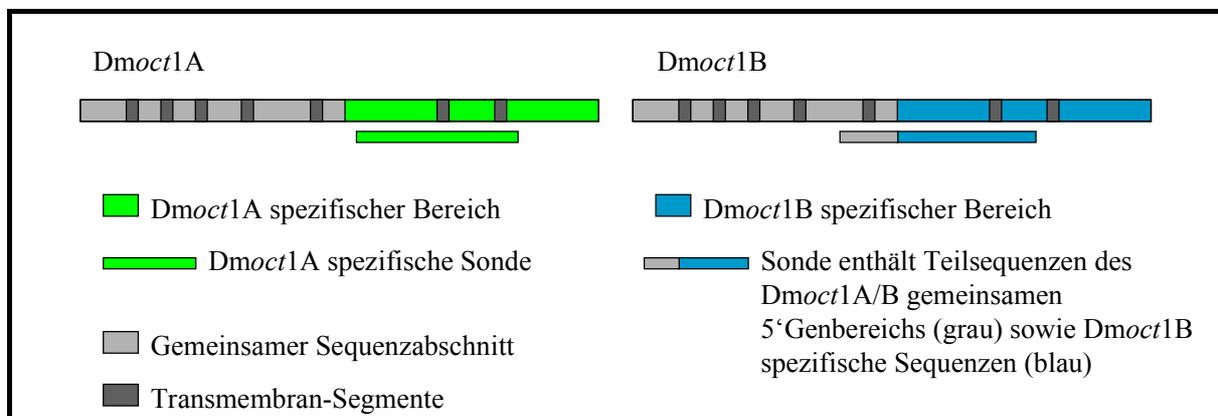


Abb. 3.1: Schematische Darstellung der beiden Splicevarianten des *Dmoct1*-Gens und der zur Hybridisierung der Cosmid-Bibliothek eingesetzten Sequenzabschnitte.

Die Filter wurden unter mäßig stringenten Bedingungen hybridisiert (siehe Methoden 2.3.2). Nach der Autoradiographie wurden ca. 40 Signale gefunden, von denen sechs spezifischen Klon-Nummern eindeutig zugeordnet wurden.

Die Klone (N16214Q3, O0753Q3, G1564Q3, N0748Q3, P01259Q3, J2452Q3) wurden vom Ressourcenzentrum Primärdatenbank (RZPD) in Berlin bezogen. Zur Eingrenzung der Sequenzabschnitte, die zu den benutzten Sonden homolog sind, wurden Restriktionsanalysen durchgeführt. Die Cosmid-DNA wurde mit EcoRI geschnitten, gelelektrophoretisch aufgetrennt und auf eine Nylonmembran übertragen. Der „Southern-Blot“ wurde mit den gleichen Sonden hybridisiert, die auch für die Hybridisierung der „Array“-Filter verwendet worden waren.

Die *Dmoct1B* Sonde markierte drei Fragmente (N16: ~5,5 kb; O07: ~6 kb; G15: ~6 kb).

Zwei dieser Fragmente (O07: ~6 kb; G15: ~6 kb) hybridisierten auch mit der *Dmoct1A*-spezifischen Sonde.

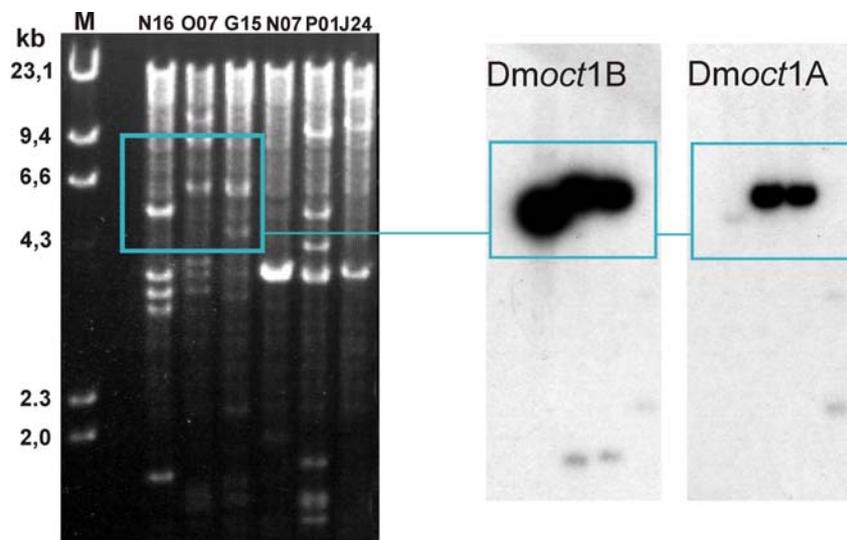


Abb. 3.2: Restriktion der präparierten Cosmid-DNA und Autoradiografie des „Southern Blots“ nach Hybridisierung mit *Dmoct1A*- und *Dmoct1B*-spezifischen Sonden. Die EcoRI-restringierte Cosmid-DNA der Klone N16, O07, G15, N07, P01, J24 wurde in einem 0,8%igen Agarosegel aufgetrennt (links) und die DNA anschließend auf eine Nylonmembran übertragen. Die Hybridisierung des „Southern Blots“ mit der *Dmoct1B*-Sonde lieferte für die Klone N16, O07 und G15 starke Hybridisierungssignale (blauer Kasten Mitte): Im Klon N16 wurde ein ~5,5 kb großes Fragment detektiert. In den Klonen O07 und G15 wurde jeweils ein ~6 kb großes Fragment erkannt. Die ~6 kb großen Fragmente der Klone O07 und G15 wurden auch von der *Dmoct1A*-Sonde detektiert (blauer Kasten rechts).

Die restringierte DNA der drei weiteren Klone (N07, P01, J24) lieferte kein Hybridisierungssignal. Diese Klone wurden daher nicht weiter untersucht.

Von den Klonen **N16**, **O07**, und **G15** wurden Glycerin-Kulturen der cosmidtragenden Bakterien hergestellt und bei -80°C gelagert. Ausgehend von diesen Glycerin-Kulturen wurden die Bakterien vermehrt. Die Cosmid-DNA wurde präpariert, mit EcoRI geschnitten und gelelektrophoretisch aufgetrennt. Die Restriktionsmuster der DNA unterschieden sich deutlich von den Mustern, die nach der ersten Restriktion erhalten wurden. Die Fragmente wurden danach auf eine Nylonmembran übertragen und erneut mit radioaktiv markierter Sonden-DNA der *Drosophila* Octopamin-Rezeptoren hybridisiert.

Mit der *Dmoct1B*-Sonde wurde im Klon **N16** ein 2,5 kb großes Fragment detektiert. Das 5,5 kb-Fragment (siehe Abb. 3.3) wurde nicht mehr erkannt. Das 2,5 kb-Fragment wurde aus dem Agarosegel eluiert und in pBluescript-Vektor (Stratagene) subkloniert. Die nachfolgende Sequenzierung ergab, daß das Fragment lediglich Homologie zur Vektorsequenz (Lawrist 7), aber keine Homologie zu der *Dmoct1*-Sonde aufwies. Es ist möglich, daß dieses Ergebnis auf die Rekombination der Cosmid-DNA zurückzuführen ist. Cosmide sind für das häufige Auftreten von „rearrangements“ bekannt, in deren Verlauf Teile der klonierten Fremd-DNA verloren gehen oder in anderen Bereichen des Inserts neu integriert werden (Ivens et al., 1995).

Im Klon **O07** wurden mit der *Dmoct1A*-Sonde jetzt vier Fragmente markiert. In der Autoradiographie wurde eine sehr schwache Bande bei 6 kb und drei sehr intensive Banden bei $\sim 2,2$ kb, ~ 900 bp, ~ 450 bp gefunden.

Das 6 kb-Fragment wurde aus dem Agarosegel eluiert und in pBluescript subkloniert. Die anschließende Sequenzierung zeigte, daß das genomische Fragment Sequenzabschnitte enthält, die zur 3'-Sequenz des *Drosophila* Octopamin-Rezeptors (OAMB, Han et al., 1998) ca. 75% Sequenzhomologie aufwies. Die Sequenzhomologie ist in dem genomischen Fragment von einem Intron unterbrochen. Dieses Ergebnis zeigt, daß das Bienen Octopamin-Rezeptorgen gespleißt wird. Mit der Isolierung des Klons O07 ist die Voraussetzung geschaffen, die *Amoct1*-Genstruktur in Zukunft aufzuklären.

Im Klon **G15** wurde mit der *Dmoct1A* Sonde ebenfalls das 6 kb-Fragment erkannt. Der Klon wurde aufgrund der bereits vorhandenen Sequenzinformation für den Klon O07 nicht weiter untersucht.

3.2 Isolierung der *Amoct1*-cDNA

Etwa zeitgleich zur Isolierung des genomischen Octopamin-Rezeptorgenfragments, wurde von Dr. Paul Ebert (Australien) ein Bienen cDNA-Klon zur Verfügung gestellt. Ebenfalls wurde die dazugehörige Sequenz bereitgestellt. Der cDNA-Klon AmBAR1 (*Apis mellifera* biogenic amine receptor 1, siehe Methoden 2.3.1 und Ebert et al., 1998) kodiert für einen G-Protein-gekoppelten Rezeptor. Diese Aussage stützt sich auf Sequenzvergleiche der abgeleiteten Aminosäure-Sequenz mit den Sequenzen anderer biogener Amin-Rezeptoren.

Die funktionelle Charakterisierung dieser cDNA wurde nicht durchgeführt (Ebert et al., 1998). Restriktionsfragmente des AmBAR1-Klons wurden in pBluescript-Vektor (Stratagene) subkloniert und vollständig sequenziert. Die neu ermittelte Sequenz unterschied sich im 5'-Bereich des Gens von der Sequenz, die von Dr. P. Ebert zur Verfügung gestellt worden war. Aus diesem Grund wurden Teilbereiche des AmBAR1-Klons nochmals zum Durchmustern einer Bienenhirn-spezifischen cDNA-Bibliothek (Blenau et al., 1998) verwendet. Ein 2 kb-EcoRI/XbaI-Fragment, sowie ein 900 bp-EcoRI/XbaI-Fragment wurden radioaktiv markiert und für die Hybridisierung der Bienenhirn cDNA-Bibliothek eingesetzt (siehe Methoden 2.3.5). Drei positive Klone wurden isoliert und anschließend sequenziert. Die Klone wurden als *AmoctA*, *AmoctB2*, und *AmoctD2* bezeichnet.

Die isolierten Klone sind unterschiedlich lang. Der *AmoctA*-Klon ist am 3'-Ende 71 bp länger als der AmBAR1-Klon. Die *AmoctA*-cDNA besitzt einen poly(dA)-Schwanz von 15 Resten. *AmoctB2* und *AmoctD2* reichen in 3'-Richtung bis zur Position 2979 des AmBAR1-Klons. Am 5'-Ende ist der AmBAR1-Klon länger als die neu isolierten Klone. *AmoctB2* startet an Position 868 der AmBAR1-Sequenz, *AmoctD2* an Position 904.

Das Startkodon (ATG) des offenen Leserahmens befindet sich in der AmBAR1-cDNA an Position 1065-1067. Dieser Translationsstart ist ebenfalls in den beiden Klonen *AmoctB2* und *AmoctD2* enthalten. Der offene Leserahmen des AmBAR1-Klons wird durch ein Stopp-Kodon an Position 2826-2828 beendet. Das Stopp-Kodon ist in *AmoctB2* und *AmoctD2* konserviert. Demnach kodieren beide neu isolierten cDNA-Klone für vollständige Rezeptor-Proteine.

AmoctA ist am 3'-Ende identisch zu *AmoctB2* und *AmoctD2*. Im 5'-Bereich besitzt die *AmoctA*-cDNA keine Übereinstimmung zu *AmoctB2*, *AmoctD2* und AmBAR1. Vermutlich handelt es sich bei dem klonierten Sequenzabschnitt um ein Intron, das von einem unvollständig gespleißten mRNA Molekül bei der cDNA Synthese abgeschrieben wurde.

Die rezeptorkodierenden Sequenzabschnitte sowie die flankierenden 5'- und 3'-nicht-kodierenden Regionen sind durch zwei (*AmoctB2/D2*) bzw. drei (*AmoctB2/D2/A*) unabhängige cDNA-Klone abgesichert. Im folgenden wird deshalb der cDNA-Klon AmBAR1 als ***Amoct1*** (*Apis mellifera* Octopamin-Rezeptor 1) bezeichnet.

Der cDNA-Klon besteht aus 3031 bp. Der längste offene Leserahmen ist 1.761 bp lang. Das Start-Kodon (ATG), das den Translationsstart des längsten offenen Leserahmens markiert, befindet sich an Position 1065-1068 (siehe Abb. 3.3). In 5'-Richtung sind vor dem Initiationskodons dieses offenen Leserahmens in allen drei Leserahmen Stopp-Kodons vorhanden.

Für eukaryotische Gene wurden im Bereich des Translationsstarts charakteristische Nukleotidabfolgen beobachtet. Bei Wirbeltieren lautet die Konsensussequenz: CCACCATGG (Kozak, 1984). Im Vergleich zu dieser Sequenz sind in der Basenfolge, die das ATG-Triplett von *Amoctl* umgibt (GATCCATGC), zwei Positionen unmittelbar vor dem ATG-Kodon konserviert. Bei *Drosophila* Genen ist häufig eine abgewandelte Konsensus-Sequenz (CCAA^A/CATGG) gefunden worden (Cavener und Ray, 1991).

An Position 2.287-2.290 befindet sich das Stopp-Kodon (TGA), das den offenen Leserahmen beendet. Der offene Leserahmen wird demnach von einer 201 bp langen, nicht-kodierenden 3'-Sequenz und einer 1.064 bp langen, nicht-kodierenden 5'-Sequenz flankiert. Die *Amoctl*-cDNA besitzt einen poly-(dA) Schwanz von 40 Resten.

```

GAATTCGGCAGCAGAAATAATGGACAGGACGAGGGGAGGGCGGTAATAGAAATCAATCCCGAACTCGAAAATTTCTATCTATCCTCGACGGATAATAATTCGAGGAATTTATCAA- 120
CACGCCTCTCGAAGCGTGAAAACGGGAGGGATTCTTGATTCTTTTCGGCAGGAAATGAAGAACTTTTCTCTGGAAAACCGGTTATCGAATACTGATATTTCCAGGTGTATCTATCCC- 240
CAGTGCCTTTCTATTCGAAACAAGAAAAAGGGTTCGGATCGAGAAATATTTCTCCATTTCTGATGGAGAAGCTTTCTGGACACGTGATATATCCTGAATCAAGTGGACGAGTCAAAA- 360
TTTGTTGTTAAAGCAGTGTGAATATGTTTAAATTTTAAAGGACGATCGGAGGAGGAGCGGTGAAAATAATTTTTTGGTGTATGATAAATAAGGAAGGTTGAGATAATATAGACCGA- 480
TTTCGAATTAAGTGGAGTGAACGAGACAATAAGGAAATCAGACGACGAAAGTGAAGAAAGAAAGGAAAGGATGGCGTTTGTGAGGATGAATGGTAAATCTCGAAGGTGCTAATAGT- 600
TTTAATTTCTTTCTGGAACGTTTGGAGAGGATTGAACGAGGTGCATGATTCGAAGCTAATTTTATCATTATCATTTAAAAATTTCCCTGAAACATCGATCAGTTGTTTATAAT- 720
TCTCTTAATCTCCGATTATAAGCTGAATCCAAAAGAAAAAATCAAGAAGAACCTAACCTCTAATCTAACCTCAAAAAACTTGATGAAAACAATCGAGCAAAAATAATGATCAAAACAC- 840
GTGTAATAAATAAGGAAGCTCGAAACGAACTAACCTCAAAAATAAAGAACAGTATCTTCTCCAAAGACCAACAAAACGAATAGAACCTAACCTCAAAAACCTAATTAATAATTCCT- 960
GAACGAACAAAGATATACAAGAGAGAGAAAAAGAAATCGATCAACGATGATCTCAGGATTGCAAAGGATCGATGATCGAATCGTTGCCGTGATGGAGCGGATCCGCGATCCGATCCGATTC-1080
GTCCGTTTTCTCCAGTGAATCGTTTTCGCGAGAGTCTGTTTCGGTCCGTTGTTTCGGCAGCAACCGGCTGAGATGGTTGCGAGATTTGGCCGCGACAGCTTGCCAACTAAAATCGGAGAG-1200
CTGAACCGCAACCGCATGTGCTGCCCTTTACGAGCGCGTCGAGTGGTCCGGACCGTGGATCCTGGTTACCCCTGATCCTGCTCGCGATAGTGAACGTGATGGTGGTGTGGGCAACGTGCTC-1320
GTGATACTCGCTGCTATCACACGAGCAAGCTGCGAAACGTGACGAATATGTTTATCGTTAGCCTCGCGGTGGCGGATCTGATGGTGGCCTGGCTGCTCCTCCGTTTACGGCTACGTTGG-1440
GAGGTTTTCAAGGTGTGGATATTCGGTGTCTATGGTGTCTCATCTGGCTGGCGGTGCGAGTATGGATGTGACCCGCGTGCATATTGAATTTGTGCGCCATCAGCCTGGATAGACTTA-1560
GCTGTGACCAGCGCAGTCAGTTTCTCAGATCATGTCCCGGAGGAGCAAGGCTGCTGGTTGCAACCGTGTGGATCTTGAGCTTCGTCATCTGCTTCCCAACCCCTGGTGGGCTGGAAA-1680
GACAAAACGGTCTCATCCCGGTACAACATGACGTTTGCTCAAAAACGGACCGTTCAACACCACCACCCTCTTCGTCGCCCGTGAACCGGTGTCCTTGGATCTGCGAGCTGACCAACGATGCC-1800
GGCTACGTCGTTTATAGCGCTCTTGGTTCTTTCTATATACCGATGTTGGTCAATGCTGTTTTCTACTGGAGGATCTATAACGGCGGCTCCTCCACCACAAGGCTAATTAATCAAGGCTTC-1920
CGCAGCAAAAAGTTCGAAATGTTTGGCTAGATTTCGACGAAAGAGAGTTGACCTTGAGGATCCATCGTGGCCGAGGAAAGCGTGACAATGGGAGCAACAACGGAAGTCCGAGGAGC-2040
CCCGAGTCGAACAGTCGGTCTCGGTGAAAAGGGAGAGATAAAAATCTCGGTGTCGATCCGAGCACGGAGAGCTGAATACAAAAGTGAACACCCCTCGAAAGAACGCCATCCAAGTGT-2160
TCTCAGACCTCTGTGATACAGCAATGGCGAGACGACAGCCAAATTTGTGTCCAACCCCGAAGCACTCATTTAAAGGTGAGCGGCATCAACAGGTTTGGAAACCCAGAACCTAGC-2280
AGGAGAACAGCTGCGAGTCAAATGATGGTGTGATGAGATGCTGTTGCGGAGCTCACTCAAGTACCGAGGAGAACCAAGGATGATGAAGTGGGGAAGAAAATAATAAGCTCAG-2400
GTGAAGAGATTTGAAATGGAGACGAAGCGCGGAAGCACTGGGATCATCTGCGCGGGTTCATCCTCTGCTGGCTTCTTTTTCACAATGTAATTTGGTGGCGCCTTTTGGCCCAAC-2520
TGATCCACCCACTGTGTTTAGCGTACTGTTTTGGCTAGGCTACTGCAACTCCGCAATAAATCCGTGATATCAGCGCTGTTTAGCAAGGACTTCCGGTTCCGCTTCAAAAGTATCATC-2640
TGCAAGTCTTCTGCAACGGCGACGAACACTTTGAGACCGCGCAGCGATGGAAGTCAATTAGCGATGAGAAACGATCGGAGCCCAAGCTACTCGATGCAAGTTCCCAACAGGGGGCG-2760
TCCATCGACGACTCGGACCCGACCAAGCTCAGAACCGACTGTGATTCGAGAGCGAGTCGAGATGAGCTGAGCTGAGCTGAGCTGAGCTGAGCTGAGCTGAGCTGAGCTGAGCTGAGCT-2880
TCGAAAGTGGATCCAATCTTTCAAGGATTTACAGTTTCAGCTTTCGTCGCCGAAATCGAGCACGACGAGATCGAGTCCGAAAGGATGGACGTGGAATTCGCGACAAAAA-3000
AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAATCCGAGGCG

```

Abb. 3.3: Nukleinsäuresequenz des *Amoctl*-cDNA-Klons. Die Nukleotidabfolge ist in 5'-3'-Richtung angegeben. Die Position des letzten Nukleotids jeder Zeile ist rechts neben der Sequenz angegeben. Das Startkodons ist grün, das Stopp-Kodon violett unterlegt.

3.3 Strukturelle Eigenschaften der abgeleiteten Aminosäuresequenz

Die abgeleitete Aminosäuresequenz der *Amoct1*-cDNA besteht aus 587 Aminosäure-Resten (AS). Das errechnete Molekulargewicht beträgt 66,5 kD. Das Hydrophobie-Profil von AmOCT1 zeigt sieben hydrophobe Bereiche, die die Membran durchspannen können.

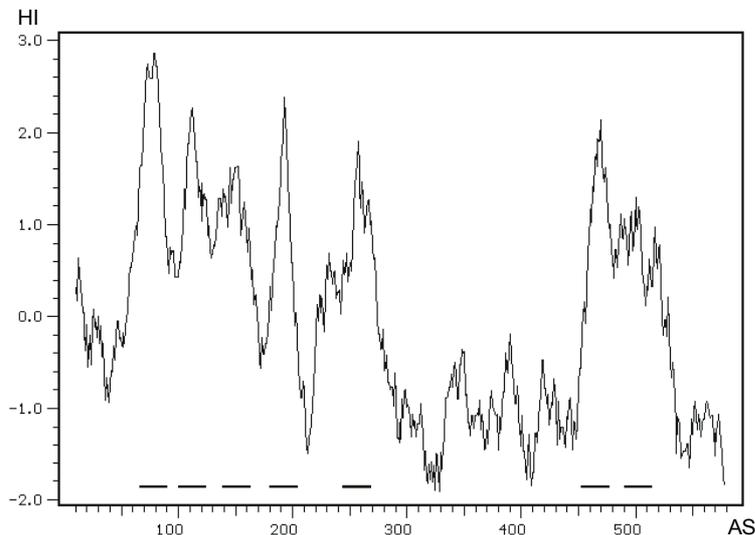


Abb. 3.4: Hydrophobizitätsprofil der abgeleiteten AS-Sequenz des AmOCT1-Rezeptors. Der Hydrophobizitäts-Index (HI) wurde nach Kyte und Doolittle (1982) mit einer Fensterweite von 19 Aminosäuren ermittelt und gegen die jeweilige Aminosäure-Position aufgetragen. HI-Werte $> 1,6$ gelten als Indiz für die Existenz einer möglichen Transmembranregion (TM). Die potentiellen TM's des AmOCT1-Rezeptors sind als Balken eingezeichnet.

In allen Rhodopsin-ähnlichen GPCR ist der N-Terminus extrazellulär lokalisiert. Dieser Abschnitt ist bei AmOCT1 65 Aminosäuren lang (Position 1-65). Zwischen dem fünften und sechsten transmembranalen Segment liegt die dritte intrazelluläre Schleife. Mutageneseuntersuchungen haben gezeigt, daß dieser Bereich der Rezeptoren an der Interaktion mit dem G-Protein beteiligt ist (siehe Einleitung 1.2). Bei AmOCT1 ist die dritte intrazelluläre Schleife 184 AS lang. Der Bereich hinter dem siebten transmembranalen Segment liegt intrazellulär und wird als C-Terminus bezeichnet. Der C-Terminus ist ebenfalls an der Interaktion mit dem G-Protein beteiligt. Er besitzt bei vielen GPCR Konsensusstellen für die Phosphorylierung durch Proteinkinasen, wie z.B. PKC.

Zusätzlich können Cystein-Reste in diesem Abschnitt der Proteine posttranslational palmitoyliert werden. Durch die „Verankerung“ dieser Fettsäuren in der Plasmamembran entsteht eine zusätzliche intrazelluläre Schleife (IL 4, siehe Einleitung, Abb. 1.1). Der C-Terminus von AmOCT1 ist 72 Aminosäuren lang und besitzt Cysteine die potentiell palmitoyliert werden können.

AmOCT1 enthält drei potentielle Konsensusstellen für N-Glykosylierung (Konsensusmotiv: NX^S/T). Das erste Sequenzmotiv befindet sich an Position 47-49 ($N_{47}AT$) im N-Terminus. Die nachfolgenden Konsensusstellen liegen dicht hintereinander im Bereich der zweiten extrazellulären Schleife bei Position 214-216 ($N_{214}MT$) und Position 224-226 ($N_{224}TT$).

AmOCT1 weist fünf potentielle Konsensusstellen für die Phosphorylierung durch PKC (Konsensusmotiv: $S/T-X-R/K$) auf. Die erste Konsensusstelle liegt an Position 93-95 ($T_{93}SK$). Die drei nächsten Sequenzmotive liegen im Bereich der dritten intrazellulären Schleife an den Positionen 322-324 ($S_{322}PR$), 333-335 ($S_{333}VK$) und 384-386 ($T_{384}PR$). Eine weitere Konsensusstelle befindet sich an Position 536-538 ($T_{536}LR$) im C-Terminus (siehe Abb. 3.5).

MRSVFVAFLPVKSFRESRCSVRC SAASGLRWF EIWRDSLPTKMRELNATA CAALYERVEW	60
TM 1 TM 2	
SGPWILVTLIVLAI VNV MVVLGNVLVILAVYHTSKLRNV TNMFIVSLAVADLMVGLAVLP	120
TM 3 <div style="display: flex; justify-content: space-around; width: 100%;"> ❖ ▼ </div>	
FSATWEVFKVWIFGDLWCSIWLAVDVVMCTASILNLCAISLD RYLAVTRPVSYPQIMSPR	180
TM 4 <div style="display: flex; justify-content: space-around; width: 100%;"> ▼ ▼ </div>	
RARLLVATVWILSFVICFPPLVGWKDKRSHPAYNMTFAQNGPFNTTTIFVPVKPCPWICE	240
TM 5 <div style="display: flex; justify-content: space-around; width: 100%;"> ❖ ❖ </div>	
LTNDAGYVVYSALGSFYIPMLVMLFFYWRIYNAAVSTTKAINQGFRTTKSSKMFGSRFDE	300
ERLTLRIHRGRGSVHNGSNNGSPRSPE S NSRCSVKREKIKISVSYPSTETLNTKCN TLER	360
TM 6 <div style="display: flex; justify-content: space-around; width: 100%;"> ❖ </div>	
LREL TQVTEEKPRVMKMGKRNIKAQVKRFRMETKA AKTLGIIVGGFILCWL PFF TMYLVR	480
TM 7 <div style="display: flex; justify-content: space-around; width: 100%;"> ❖ </div>	
AFCRNCIHP TVFSVLFWLGYCNSA INPCIYALFSKDFRFAFKSIICKCFCKRR TNLRRG	540
SDGSQLAMRND RSPSYSMQVPQOGASIDDS DPDPSPSEPTVHSQSESR	587

Abb. 3.5: Abgeleitete Aminosäuresequenz des Amoct1-Klons

Die Position der letzten AS jeder Zeile ist rechts neben der Sequenz angegeben. Die potentiellen Transmembran-Segmente sind blau unterlegt und nummeriert (TM 1-7). Konsensusstellen für N-Glykosylierung sind mit (▼) gekennzeichnet. Potentielle Konsensusstellen für Phosphorylierung durch PKC sind durch (❖) gekennzeichnet.

Die Aminosäuresequenz des AmOCT1-Rezeptors wurde mit AS-Sequenzen verglichen, die in der Protein-Datenbank (SWISS-PROT) veröffentlicht sind. Die Sequenz weist große Ähnlichkeiten zu biogenen Amin-Rezeptorsequenzen verschiedener wirbelloser aber auch Vertebraten-Spezies auf. Die größte Ähnlichkeit der AmOCT1-Sequenz besteht jedoch zum *Drosophila*-DmOCT1B-Octopamin-Rezeptor. Insgesamt sind 49,4% aller Aminosäuren identisch. Zusätzlich sind 15% der Aminosäuren konservativ ausgetauscht. Die Gesamthomologie beträgt demnach 64,4%. Zwischen der Splicevariante DmOCT1A (= OAMB, Han et al., 1998) und AmOCT1 besteht eine Sequenzidentität von 47,4%. Unter Berücksichtigung konservativer AS-Austausche beträgt die Gesamthomologie 59,5%.

AS-Sequenzen	identischeAS (%)	konservativ ausgetauschte AS (%)	Gesamthomologie (%)
AmOCT1 : DmOCT1B	49,4	15	64,4
AmOCT1 : OAMB	47,4	12,1	59,5
AmOCT1 : LymOA1	36,5	19,1	55,6
AmOCT1 : AmTYR1	36,6	18,5	55,1
AmOCT1 : AmDOP1	32,6	20,9	53,5

Tabelle 3.1: AS-Sequenzvergleiche zwischen AmOCT1 und verschiedenen biogenen Amin-Rezeptoren. In Spalte 1 ist angegeben mit welcher Sequenz AmOCT1 verglichen wurde. In Spalte 2 ist der Anteil identischer AS (in %) angegeben. Spalte 3 zeigt den Anteil (in %) konservativ ausgetauschter AS. In Spalte 4 wird die Summe aus identischen AS und konservativ ausgetauschten AS als Gesamthomologie (in %) angegeben. **AmDOP1**: *Apis mellifera* Dopamin-Rezeptor (Blenau et al., 1998); **AmTYR1**: *Apis mellifera* Tyramin-Rezeptor (Blenau et al., 2000); **DmOCT1B**: *Drosophila* Octopamin-Rezeptor; Splicevariante B (Baumann, persönliche Mitteilung); **LymOA1**: *Lymnea stagnalis* Octopamin-Rezeptor (Gerhardt et al., 1997); **OAMB**: *Drosophila* Octopamin-Rezeptor, (Han et al., 1998).

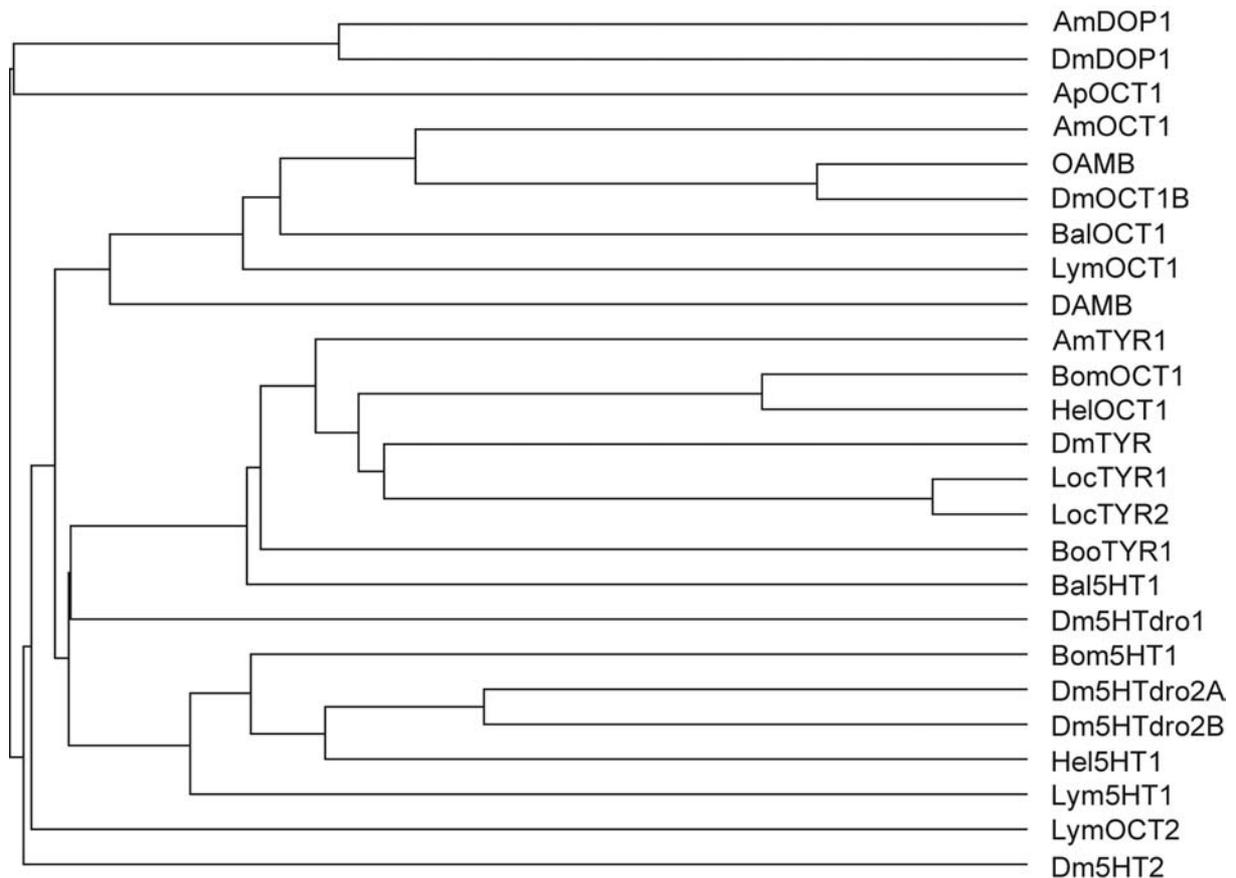


Abb. 3.7: Dendrogramm: Sequenzhomologie von AmOCT1 mit klonierten biogenen Amin-Rezeptoren aus Wirbellosen. Der Sequenzvergleich wurde mit dem CLUSTAL Programm der PCGENE-Anwendung erstellt. Die abgeleitete AS-Sequenz des AmOCT1-Rezeptors wurde mit vollständigen AS-Sequenzen von:

a) Octopamin-Rezeptoren aus *Aplysia* (ApOCT1, swiss prot accession nr. Q9NHF3), *Drosophila* (OAMB, nr. O61730, DmOCT1B, Baumann pers. Mitteilung), *Bombyx* (BomOCT1, nr. Q17232), *Lymnea* (LymOCT1, nr. O77408) und *Heliothis* (HelOCT1, nr. Q25188); **b) Dopamin-Rezeptoren** aus *Apis mellifera* (AmDOP1, nr. O44198) *Drosophila* (DAMB, nr. Q24563, DmDOP1., nr. P41596.); **c) Tyramin-Rezeptoren** aus *Apis* (AmTYR1, nr. Q9NG02), *Locusta* (LocTYR1, nr. Q25321, LocTYR2, nr. Q25322), *Boophilus* (BooTYR1, nr. O77254); **d) Serotonin-Rezeptoren** aus *Heliothis* (Hel5HT1, nr. Q25190), *Balanus* (Bal5HT1, nr. Q93127), *Bombyx* (Bom5HT1, nr. Q17239), *Lymnea* (Lym5HT1, nr. O61232), *Drosophila* (Dm5HTdro1, nr. P20905, Dm5HTdro2A, nr. P28285, Dm5HTdro2, nr. P28286). Die Abkürzungen entsprechen: Am: *Apis mellifera*, Dm: *Drosophila melanogaster*, Ap: *Aplysia*, Bal: *Balanus*, Lym: *Lymnea*, Bom: *Bombyx*, Hel: *Heliothis*, Loc : *Locusta*, Boo: *Boophilus*.

3.4 Konstruktion des Expressionsvektors pcAmoet1

Zur Expression des Rezeptorproteins in eukaryotischen Ammenzellen wurde eine verkürzte und am 5'-Ende modifizierte Version der *Amoet1*-cDNA in einen Säugerzellen-Expressionsvektor subkloniert. Am 5'-Ende des *Amoet1*-cDNA-Klons wurde in einer Mutagenese-PCR (siehe Methoden 2.3.7.1) eine singuläre HindIII-Schnittstelle sowie die Kozak-Konsensussequenz (CCACC; Kozak, 1984) vor dem ATG-Kodon (Position 1065-1067) eingefügt. Als PCR-Primer wurden folgende Oligonukleotide verwendet:

5'-Oligo: 5'GATAAGCTTCCACCATGCGATCCGTACCT;

3'-Oligo: 5'ATGGATCCTCAAGGTCAA

Das PCR Fragment wurde HindIII/XbaI geschnitten, gelelektrophoretisch aufgetrennt und das resultierende ~800 bp Fragment aus dem Gel eluiert. Die *Amoet1*-cDNA in Bluescript-Vektor wurde XbaI/EcoRI geschnitten, im Gel aufgetrennt und das 900 bp große XbaI/EcoRI-Fragment aus dem Gel eluiert. Die eluierten Fragmente wurden anschließend in HindIII/EcoRI-geschnittenen pcDNA1.1amp-Vektor (Invitrogen) subkloniert. Die Richtigkeit des Konstruktes wurde durch Restriktionsanalyse und Sequenzierung überprüft.

3.5 Konstruktion des Expressionsvektors pcAmoet1-HA-Tag

Zum Ersetzen des Stopp-Kodons und Einfügen der HA-Tag kodierenden Sequenz wurde eine Mutagenese-PCR auf dem pcAmoet1-Konstrukt durchgeführt (siehe Methoden 2.3.7.2). Die HA-Sequenz kodiert für ein Nonapeptid (YPYDVPDYA), das im Hämagglutinin A vorkommt. Gegen dieses sogenannte „HA-Tag“ sind Antikörper kommerziell erhältlich. Für die PCR wurden folgende Oligonukleotide verwendet:

5'-Oligo: 5'- CGGGAGCTCACTCAAGTCA (enthält eine SacI-Schnittstelle)

3'-Oligo: 5'- ATCTCGACTCGCTCTGCGA

Das PCR-Fragment wurde in die EcoRV-Schnittstelle des pBK-t7-Stop-Klons (bereitgestellt von R. Gauß, FZ-Jülich), der die HA-kodierende Sequenz bereits trägt, subkloniert. Im Polylinkerbereich des Vektors befindet sich 3' zur HA-kodierenden Sequenz eine XbaI-Schnittstelle.

Die korrekte Orientierung des Konstrukts wurde durch Restriktion mit SacI und Sequenzierung überprüft. Aus dem Klon wurde das SacI/XbaI-Fragment (enthält die HA-Sequenz) ausgeschnitten. Aus dem pcAmoet1-Klon wurde das 5'-Ende des Gens mit HindIII/SacI ausgeschnitten. Die Restriktionsfragmente wurden gelelektrophoretisch aufgetrennt, eluiert und in HindIII/XbaI-geschnittenen pcDNA1.1amp-Vektor kloniert.

3.6 Heterologe Expression des Rezeptorproteins AmOCT1 in HEK 293 Zellen

Die „HA-Tag“ modifizierte pcAmo $ct1$ -cDNA wurde transient in HEK 293 Zellen transfiziert (s. Methoden, 2.3.8). Die Expression des Rezeptorproteins wurde an fixierten Zellen mit anti-HA-Antikörpern untersucht (siehe Methoden 2.4.6). In Abhängigkeit von der transfizierten DNA-Menge wurden bis zu fünfzig Prozent der Zellen gefärbt. Die beste Expressionsrate wurde bei der Verwendung von 10 μ g pcAmo $ct1$ -HA pro Transfektionsansatz erzielt.

Zur Bestimmung der relativen Molmasse des heterolog exprimierten Rezeptorproteins wurden Membranfraktionen Amo $ct1$ -HA-Tag transfizierter Zellen präpariert (siehe Methoden 2.4.4), gelelektrophoretisch getrennt und auf eine PVDF Membran übertragen („Western Blot“, siehe Methoden 2.4.5). Mit dem anti-HA-Antikörper wurden vier Protein-Banden detektiert: Zwei starke Banden von \sim 100 kD und \sim 67 kD sowie zwei schwächere Banden von \sim 40 kD und \sim 30 kD. Das aus der abgeleiteten Aminosäuresequenz errechnete Molekulargewicht des AmOCT1-Rezeptors beträgt 66,5 kD. Die Bande bei 67 kD stimmt recht gut mit dem erwarteten Molekulargewicht eines nicht-modifizierten Rezeptorproteins überein.

In der Sequenz des AmOCT1-Rezeptors befinden sich drei Konsensusstellen für N-Glykosylierung. Alle Konsensusstellen liegen in extrazellulären Bereichen des Proteins (siehe Ergebnisse 3.3) Die posttranslationale Glykosylierung des Proteins kann die Mobilität in denaturierenden Polyacrylamid Gelen stark beeinflussen. Ob die 100 kD-Bande eine glykosylierte Form des Rezeptorproteins repräsentiert wurde in einem weiteren Experiment geprüft.

Membranfraktionen pcAmo $ct1$ -HA-Tag transfizierter Zellen wurden mit PNGaseF behandelt. Dieses Enzym entfernt alle N-glykosidisch gebundenen Zuckerreste von einem modifizierten Protein. Gleiche Mengen glykosylierter sowie deglykosylierter Membranproteine wurden auf ein denaturierendes Polyacrylamidgel aufgetragen (siehe Methoden 2.4.5). Die Proteine wurden gelelektrophoretisch aufgetrennt, auf eine PVDF Membran übertragen und mit dem anti-HA-Antikörper inkubiert. In der glykosylierten Membranfraktion wurden, wie bereits oben beschrieben, vier Banden von \sim 100 kD, \sim 67 kD, \sim 40 kD und \sim 30 kD gefunden. In der deglykosylierten Membranfraktion wurden Banden bei \sim 67 kD, \sim 40 kD und \sim 30 kD detektiert. Die \sim 100 kD-Proteinbande fehlt nahezu vollständig. In HEK 293-Zellen wird das HA-Tag modifizierte Rezeptorprotein demnach glykosyliert und die Zuckerreste werden durch Behandlung mit PNGaseF entfernt.

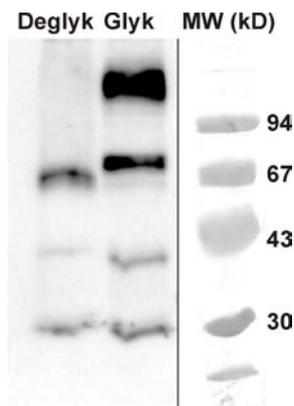


Abb. 3.8: Western Blot mit Membranproteinen pcAmoct1-HA-Tag-transfizierter HEK 293 Zellen. In der linken Spur sind PNGaseF-behandelte Membranproteine aufgetragen worden (Deglykosylierte Fraktion, Deglyk). In der rechten Spur wurde unbehandelte Membranproteinfraction (Glykosylierte Fraktion, Glyk) aufgetragen. Das Rezeptorprotein wurde mit einem anti-HA-spezifischen Antikörper nachgewiesen. Der Molekulargewichtsstandard (kD) ist rechts angegeben.

Welche Proteine bei ~ 40 kD und ~ 30 kD angefärbt werden, ist gegenwärtig unklar. Beide Banden werden sowohl in glykosylierten als auch in deglykosylierten Proben erkannt. Es ist möglich, daß die Banden Abbauprodukte des Rezeptors repräsentieren, die bei der Präparation der Membranfraktion entstanden sind. Da sie von dem anti-HA-Antikörper erkannt werden, müssen sie C-terminale Sequenzabschnitte des Rezeptorproteins enthalten.

3.7 Funktionelle Expression des Rezeptorproteins in HEK 293 Zellen

Die Aktivierung G Protein-gekoppelter Rezeptoren führt in Zellen zu Konzentrationsänderungen intrazellulärer Botenstoffe (*second messenger*). In den meisten Fällen lösen biogene Amine enzymatische Reaktionskaskaden aus, die entweder zu einer Erhöhung oder Senkung der $[cAMP]_i$ führen. Darüber hinaus bewirken einige biogene Amin-Rezeptoren die Änderung der $[Ca^{2+}]_i$.

Von Octopamin-Rezeptoren ist bekannt, daß sie entweder einen Anstieg $[cAMP]_i$ oder der $[Ca^{2+}]_i$ bewirken (Roeder, 1999). Welcher Signalweg vom AmOCT1-Rezeptor reguliert wird, sollte an transient mit pcAmoct1 transfizierten HEK 293 Zellen (siehe Methoden 2.3.8) untersucht werden.

3.7.1 AmOCT1 Aktivierung führt zur Erhöhung der $[Ca^{2+}]_i$

Die mit pcAmoct1-cDNA transfizierten HEK 293-Zellen wurden mit dem Ca^{2+} -sensitiven Farbstoff FURA-2-AM geladen. Nach Zugabe der Testsubstanzen (siehe Methoden 2.3.9.2) wurden an einzelnen Zellen die Veränderungen in der $[Ca^{2+}]_i$ untersucht.

Die Ausgangskonzentration der $[Ca^{2+}]_i$ betrug in allen untersuchten Zellen etwa 50 nM.

Nach der Zugabe von 1 μM Octopamin wurde in den transfizierten Zellen ein Anstieg der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ auf bis zu 275 nM gemessen. Die Inkubation mit 1 μM Tyramin (siehe Abb. 3.9) löste nur in einer einzigen Zelle einen sehr geringen Anstieg der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ auf 75 nM aus.

Nicht-transfizierte HEK 293 Zellen reagierten weder auf die Zugabe von Octopamin (1 μM) noch auf die Zugabe von Tyramin (1 μM).

Die Zugabe von Octopamin löste in den transfizierten Zellen eine regelmäßige Oszillation der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ aus (siehe auch Diskussion 4.2). Diese Ca^{2+} -Oszillationen wurden ab Octopamin-Konzentrationen von 0,1 μM beobachtet (siehe Abb. 3.10). Das erste Ca^{2+} -Signal wurde nach ca. 100 s registriert. Bei höheren Octopamin-Konzentrationen (1 μM) trat das erste Ca^{2+} -Signal bereits deutlich früher (nach ca. 50 s) auf. Zusätzlich nahm die Frequenz der Ca^{2+} -Signale zu.

Die Ca^{2+} -Antwort der transfizierten Zellen auf die Zugabe von Octopamin ist demnach abhängig von der Konzentration des Liganden. Eine weitere Erhöhung der Octopamin-Konzentration auf 10 μM führte zu einer nochmaligen Frequenzsteigerung der Ca^{2+} -Signale. Zusätzlich stieg auch die Amplitude des gemessenen Ca^{2+} -Signals (siehe Abb. 3.10).

Die Inkubation in 100 μM Octopamin führte zu einem schnell einsetzenden, anfänglich starken und danach langsam schwächer werdenden Ca^{2+} -Signal. Nach ca. 200 - 300 s erreichte die $[\text{Ca}^{2+}]_i$ wieder den Basalwert von etwa 50 nM. Die transienten Ca^{2+} -Signale, die bei niedrigeren Octopamin-Konzentrationen beobachtet wurden, traten bei der Inkubation mit 100 μM Octopamin bei den meisten Zellen nicht mehr auf.

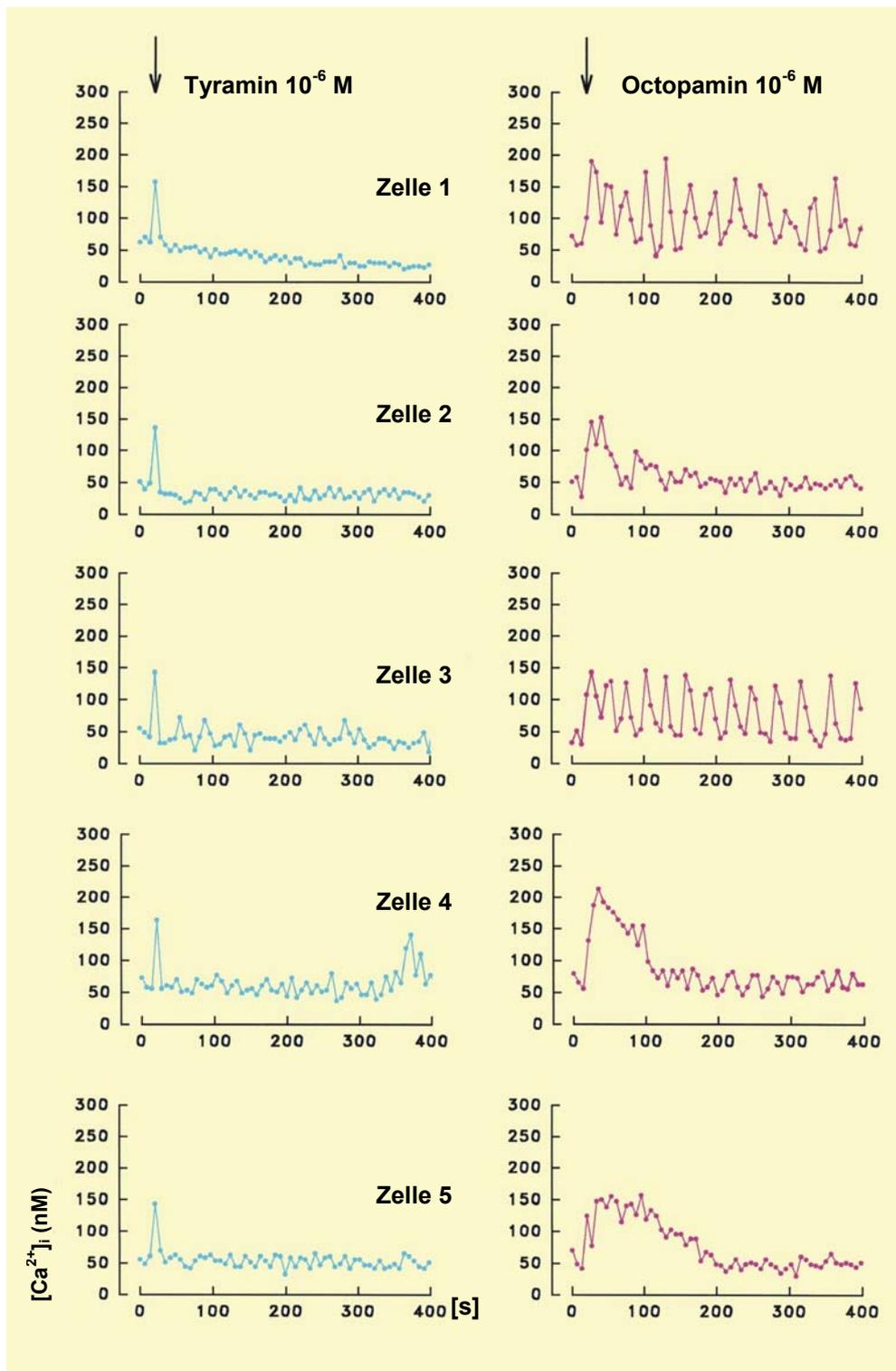


Abb. 3.9: Octopamin (1 μM), aber nicht Tyramin (1 μM) bewirkt in HEK 293 Zellen, die AmOCT1 exprimieren einen Anstieg der $[\text{Ca}^{2+}]_i$. Zellen wurden mit 1 μM Tyramin inkubiert und die Veränderung von $[\text{Ca}^{2+}]_i$ für 400 Sekunden aufgezeichnet (türkis). Die Tyraminlösung wurde abgesaugt und die gleichen Zellen wurden anschließend nach der Zugabe von Octopamin (1 μM) aufgezeichnet (magenta). Der Pfeil markiert die Zugabe der Liganden. Der erste transiente Anstieg entsteht versuchsaufbaubedingt durch die Zugabe der Liganden.

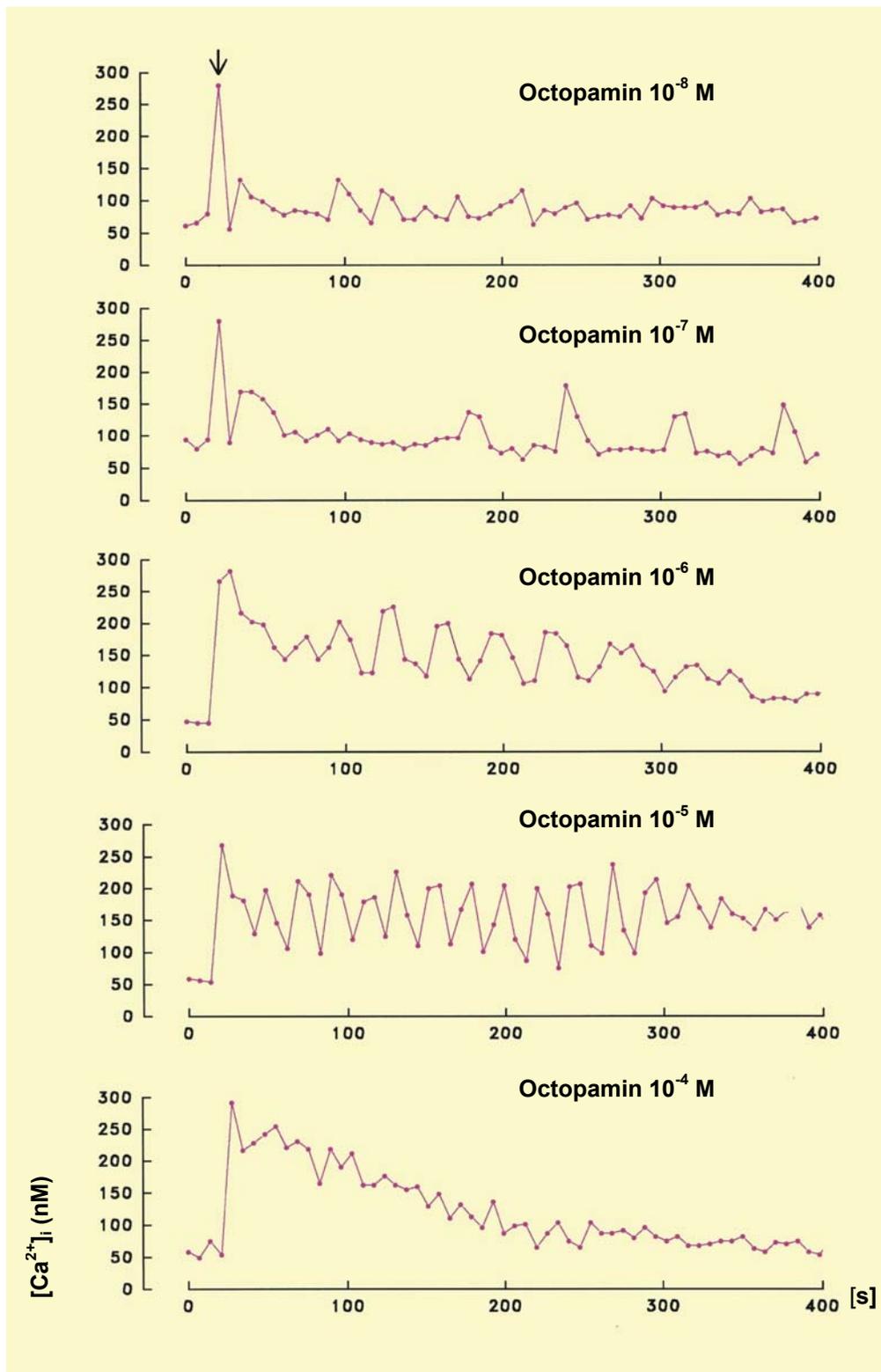


Abb. 3.10: Octopamin bewirkt in pcAmoc1-transfizierten HEK 293-Zellen konzentrationsabhängige Veränderungen der $[Ca^{2+}]_i$. Calcium-Antworten fünf repräsentativer Zellen auf die kontinuierliche Stimulation mit 0.01-100 μ M Octopamin. Die Ca^{2+} -Signale wurden für jeweils vierhundert Sekunden aufgezeichnet. Der Pfeil markiert die Zugabe der Octopaminlösung. Der erste transiente Anstieg entsteht versuchsaufbaubedingt durch die Zugabe des Liganden.

3.7.2 AmOCT1-Aktivierung führt zu einem Anstieg der [cAMP]_i

Transient mit *pcAmoct1* transfizierte Zellen wurden in Anwesenheit von IBMX (100 μ M), einem Inhibitor der Phosphodiesterase, mit verschiedenen biogenen Aminen inkubiert. Die Menge des von den Zellen gebildeten cAMP wurde bestimmt (siehe Methoden 2.3.9.1).

Abbildung 3.11 zeigt die nach der Inkubation mit den verschiedenen Liganden von den Zellen produzierte Menge des cAMP. Alle Prozentangaben beziehen sich auf den gemessenen [cAMP]_i-Maximalwert (in Gegenwart von 10 μ M Octopamin) abzüglich des Kontrollwertes (nur IBMX im Ansatz).

Die Inkubation mit 1 μ M Octopamin führte zu einem deutlichen Anstieg (37,7%) der cAMP-Produktion. Die Inkubation mit 10⁻⁶ M Serotonin, Dopamin oder Tyramin bewirkte dagegen in den transfizierten Zellen keinen oder nur sehr geringe Änderungen des cAMP-Haushalts (Serotonin: 5,8%; Dopamin: 0%; Tyramin: 2,6%).

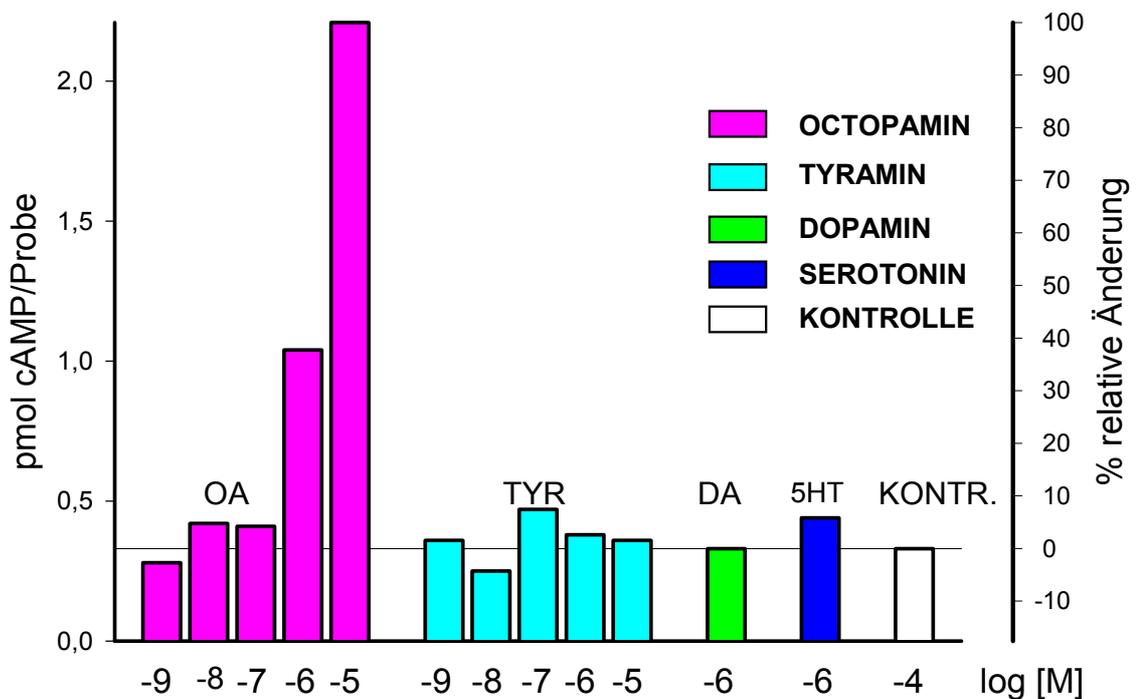


Abb. 3.11: Octopamin führt konzentrationsabhängig zu einem Anstieg von [cAMP]_i in *pcAmoct1*-transfizierten HEK 293-Zellen. Die Konzentration des cAMP ist in pM/Schale angegeben. Die Prozentangaben (relative Änderung) beziehen sich auf den ermittelten Maximalwert (10 μ M Octopamin) abzüglich des Kontrollwertes (nur IBMX). Die angegebenen Werte sind Mittelwerte aus Doppelmessungen von je zwei unabhängigen Transfektionen. Alle Messungen erfolgten in Gegenwart von IBMX (100 μ M). Für Octopamin (OA; magenta) und Tyramin (Tyr; türkis) wurden Konzentrationen von 1 nM – 10 μ M eingesetzt. Dopamin (DA; grün) und Serotonin (5-HT; blau) wurden in einer Konzentration von 1 μ M eingesetzt. Der Kontrollwert (Kontr.; weiß) enthielt nur IBMX.

Dosis-Wirkungskurven für Octopamin und Tyramin über einen Bereich von 1 nM - 10 μ M zeigten, daß der Anstieg des cAMP nach Octopamin-Applikation konzentrationsabhängig erfolgt. Die Inkubation mit 10^{-9} M Octopamin bewirkt keinen Anstieg (0%) der [cAMP]. Inkubationen in 10^{-8} M bzw. 10^{-7} M Octopamin bewirken nur einen sehr geringen Anstieg (4,8%, 4,3%). Tyramin bewirkt selbst bei Konzentrationen von 10 μ M keinen Anstieg (1,6%) des cAMP. Die große Schwankungsbreite der cAMP-Werte (kleiner als 10%) resultieren möglicherweise aus den unterschiedlichen Mengen des bereits vor Versuchsbeginn intrazellulär in den Zellen vorhandenen cAMP. Für diese Annahme spricht unter anderem, daß der für 10^{-7} M Tyramin gemessene Wert (7,4%) über dem für 10^{-6} M Tyramin gemessenen Wert (2,6%) und auch über dem für 10^{-5} M Tyramin (1,6%) liegt.

3.8 Expressionsmuster des *Amoct1*-Gens

Das Verteilungsmuster der *Amoct1*-mRNA im Gehirn von *Apis mellifera* wurde durch *in situ*-Hybridisierungen untersucht. Dazu wurden 12 μ m dicke Gefrierschnitte (frontal) der Gehirne adulter Arbeiterinnen hergestellt. Zur Hybridisierung wurden Digoxigenin-markierte Ribosonden eingesetzt. Die Sonde war 121 bp lang und kodiert für einen Teilbereich der dritten intrazellulären Schleife des Rezeptors (siehe Methoden 2.3.10).

Spezifische Markierungen wurden in den Somata vieler Gehirnbereiche gefunden (siehe Abb. 3.12.a) Besonders auffällig waren die Markierungen in den Somata intrinsischer Pilzkörperzellen (Kenyon-Zellen). Deutliche Markierungen finden sich aber auch in Somata die den Antennallobus umgeben und in Somata der Optischen Loben. Weitere Markierungen wurden im Unterschlundganglion und im Protocerebrum gefunden.

Dieses Verteilungsmuster der *Amoct1*-mRNA ist im Vergleich zum Expressionsmuster des *Drosophila*-Octopaminrezeptors (OAMB, Han et al., 1998) besonders interessant: Die Expression der OAMB-mRNA ist fast ausschließlich auf die intrinsischen Pilzkörperzellen, den Ellipsoidkörper des Zentralkomplexes und einzelne Somata der Medulla beschränkt. Besonders auffällig ist die Inhomogenität der gefundenen Markierungen für die *Amoct1*-mRNA: Insbesondere in den Somata der Kenyon-Zellen, aber auch in den Somata, die den Antennallobus umgeben, sind einige Somata sehr stark angefärbt. Die direkt benachbarten Somata sind hingegen nur äußerst schwach angefärbt.

Interessanterweise ist das Expressionsmuster der *Amoct1*-mRNA nahezu identisch mit dem Expressionsmuster eines kürzlich aus der Biene klonierten Tyramin-Rezeptors (*Amtyr1*, Blenau et al., 2000). Ein deutlicher Unterschied im mRNA-Expressionmuster der beiden Rezeptoren besteht jedoch bei den Markierungen der Somata der intrinsischen Pilzkörperzellen: Für die *Amtyr1*-mRNA wurde ein sehr homogenes Färbemuster gefunden, alle Somata sind nahezu gleich stark gefärbt. Wie oben beschrieben, ist das Färbemuster für die *Amoct1*-mRNA demgegenüber sehr inhomogen, einige Somata sind nur äußerst schwach, andere sind sehr stark gefärbt (siehe Abb. 3.12.b)

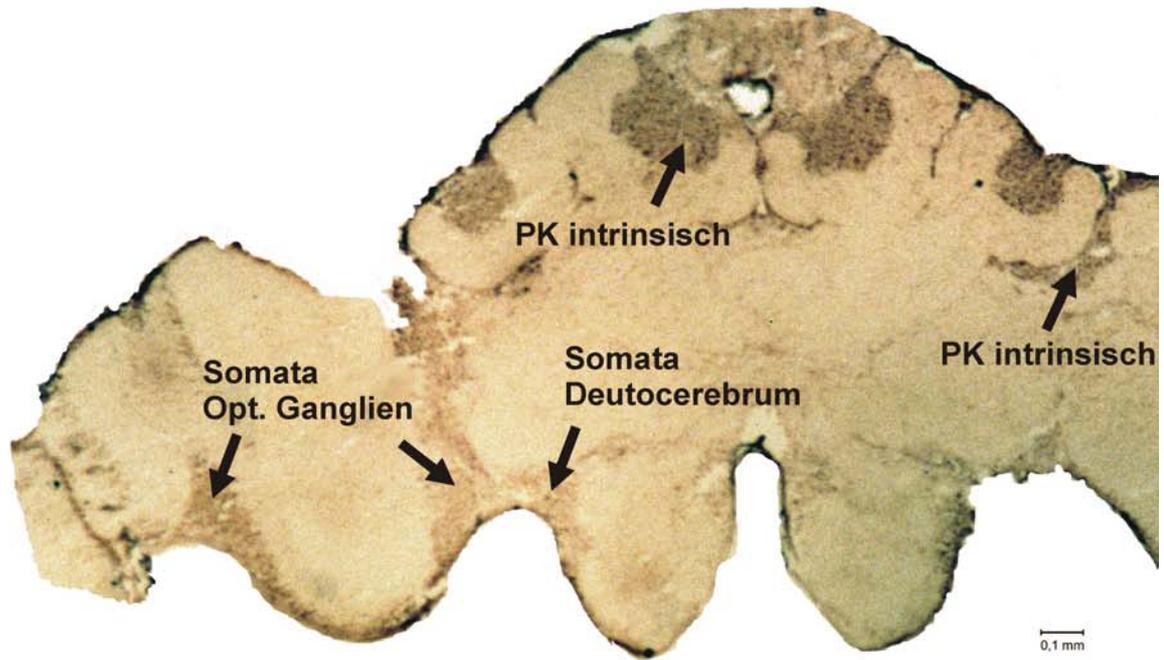


Abb. 3.12 a): *In situ*-Hybridisierung an frontalen Gefrierschnitten von Gehirnen adulter Arbeiterinnen. Die Pfeile zeigen spezifische Markierungen in den Somata der intrinsischen Pilzkörperzellen, der optischen Ganglien und dem Deutocerebrum.

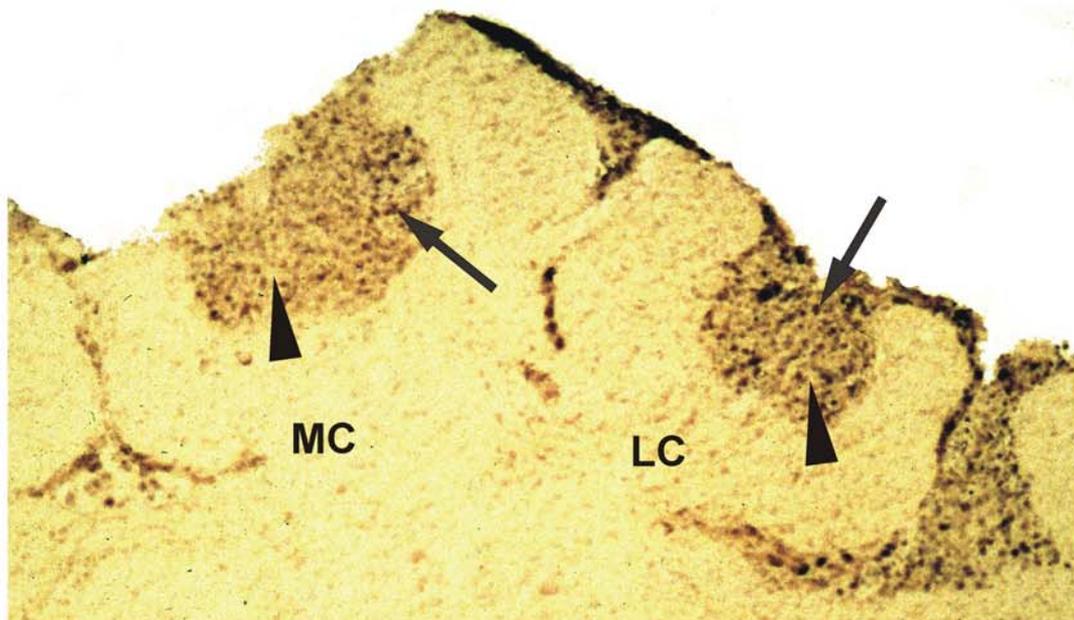


Abb.3.12 b): *In situ*-Hybridisierung; Detailaufnahme der Pilzkörperkelche. Die Pfeile zeigen stärker, Pfeilspitzen schwächer markierte Somata intrinsischer PK-Zellen; MC: medianer Calyx, LC: lateraler Calyx.

3.9 Immunologischer Nachweis des AmOCT1-Rezeptors auf „Western Blots“ von Bienenhirn-Homogenaten

Das heterolog in HEK-Zellen exprimierte Rezeptorprotein wurde über das angefügte „HA-Tag“ immunologisch auf „Western-Blots“ von HEK-Membranfraktionen nachgewiesen (siehe Ergebnisse 3.6).

Zum Nachweis des Rezeptorproteins in Bienenhirnhomogenaten und zur späteren immunhistochemischen Lokalisierung des Rezeptorproteins im Bienenhirn wurden polyklonale Antikörper gegen Fusionsproteine hergestellt, die einen Teil des C-Terminus des Rezeptorproteins trugen (siehe Methoden 2.4.2).

Das polyklonale Serum erkennt auf „Western-Blots“, die mit Membranpräparationen von Bienenhirnhomogenaten hergestellt wurden, drei Proteinbanden. Die Banden entsprechen Proteinen mit Molekulargewichten von ~100 kD, ~67 kD und ~40 kD. Das Präimmunserum erkannte ebenfalls das ~40 kD-Protein. Dieses Bandenmuster korrespondiert recht gut mit dem Muster, das nach der heterologen Expression des HA-Tag-modifizierten Rezeptorproteins in HEK 293-Zellen mit dem anti-HA-Antikörper gefunden wurde (siehe Ergebnisse 3.6).

Mit dem anti-HA-Antikörper wurden zwei Proteine gleicher Größe von ~100 kD und ~67 kD spezifisch markiert. Die Intensität der ~100 kD-Bande war nach der Behandlung mit PNGaseF deutlich reduziert. Es handelt sich demnach bei der ~100 kD-Bande um die glykosylierte Form des exprimierten Rezeptors (siehe 3.6). Da das polyklonale Serum auf „Western-Blots“ von Bienenhirnhomogenaten Proteine mit identischen Molmassen von 100 und 67 kD spezifisch markiert, kann davon ausgegangen werden, daß die ~100 kD-Bande dem glykosylierten Rezeptorprotein und die ~67 kD-Bande dem nicht-modifizierten Rezeptorprotein entspricht.

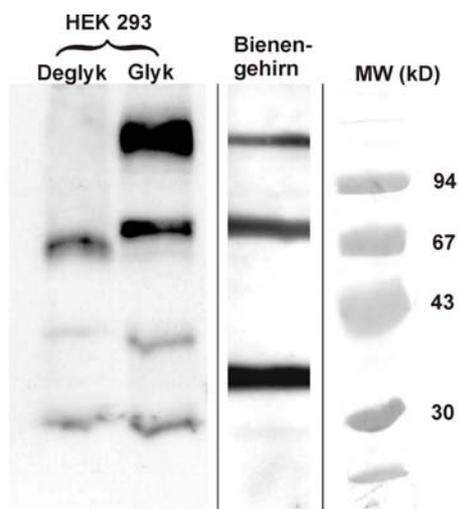


Abb. 3.13 Western Blots mit Membranproteinen pcAmoct1-HA-transfizierter HEK 293-Zellen und Membranproteinen aus Bienenhirnhomogenat. In Spur 1 sind PNGaseF-behandelte Membranproteine aus pcAmoct1-HA-transfizierten HEK 293 Zellen aufgetragen (Deglyk). In Spur zwei wurde die gleiche Menge unbehandelter Membranproteine aufgetragen (Glyk). Das Rezeptorprotein wurde in Spur 1 und 2 mit einem anti-HA-spezifischen Antikörper nachgewiesen. In Spur 3 wurden Membranproteine aus Bienenhirnhomogenat aufgetragen (Bienenhirn). Das Rezeptorprotein wurde in Spur 3 mit dem polyklonalen anti-AmOCT1-Antikörper detektiert. In Spur vier wurde der Molekulargewichtsstandard (kD) aufgetragen.

In einem weiteren Experiment wurde untersucht, ob das rezeptorspezifische Serum auch das heterolog in HEK 293-Zellen exprimierte Rezeptorprotein erkennt. Es wurden gleiche Mengen glykosylierter und deglykosylierter Membranfraktionen pcAmoct1-transfizierter HEK 293-Zellen sowie Bienenhirnhomogenat auf ein denaturierendes Polyacrylamidgel aufgetragen. Die Proteine wurden gelelektrophoretisch aufgetrennt und auf eine PVDF Membran übertragen. Der „Western-Blot“ wurde mit dem rezeptorspezifischen polyklonalen Serum (siehe Methoden 2.4.5) inkubiert. In der glykosylierten Membranfraktion werden zwei Banden von ~100 kD und ~67 kD erkannt. In der deglykosylierten Fraktion wird nur noch das ~67 kD große Protein markiert. Dieses Ergebnis bestätigt somit die Untersuchung, die mit dem HA-modifizierten, heterolog exprimierten Rezeptorprotein durchgeführt wurde: Die ~100 kD-Bande ist in der deglykosylierten Membranfraktion nicht mehr nachzuweisen (siehe Ergebnisse 3.6). Da das Serum in der glykosylierten Membranfraktion nur zwei, in der deglykosylierten nur noch eine Bande erkennt, sind die zwei weiteren Banden (bei ~40 kD und ~30 kD), die mit dem anti-HA-Antikörper gefunden wurden, wahrscheinlich auf eine Kreuzreaktivität des anti-HA-Antikörpers mit Abbauprodukten des Rezeptors zurückzuführen (siehe Ergebnisse 3.6). In der Spur, in der das Bienenhirnhomogenat aufgetragen wurde, erkennt das Serum drei Banden: ~100 kD, ~67 kD und ~40 kD. Zwei Proteine identischer Größe (~100 kD, ~67 kD) wurden vom Serum ebenfalls in der Membranfraktion pcAmoct1-transfizierter Zellen erkannt. Die ~100 kD-Bande entspricht wieder dem glykosylierten Rezeptorprotein, die ~67 kD-Bande entspricht dem nicht-modifizierten Rezeptorprotein. Die Identität des ~40 kD großen Proteins ist gegenwärtig unbekannt.

3.9.1 Immunhistochemischer Nachweis des Rezeptorproteins an pcAmoct1-HA transfizierten HEK 293-Zellen

Zum Nachweis der Antikörperspezifität wurden pcAmoct1-HA-transfizierte HEK 293-Zellen gleichzeitig mit den beiden Erstantikörpern (anti-HA-Antikörper, polyklonales anti-AmOCT1-C-Terminus-Serum) inkubiert. Die beiden primären Antikörper wurden mit zwei unterschiedlichen sekundären Antikörpern nachgewiesen, an die verschiedene Fluoreszenz-Farbstoffe gekoppelt waren (siehe Methoden 2.4.6). Alle Zellen, die mit dem anti-HA-Antikörper gefärbt wurden, wurden auch mit dem polyklonalen Anti-AmOCT1-Serum gefärbt.

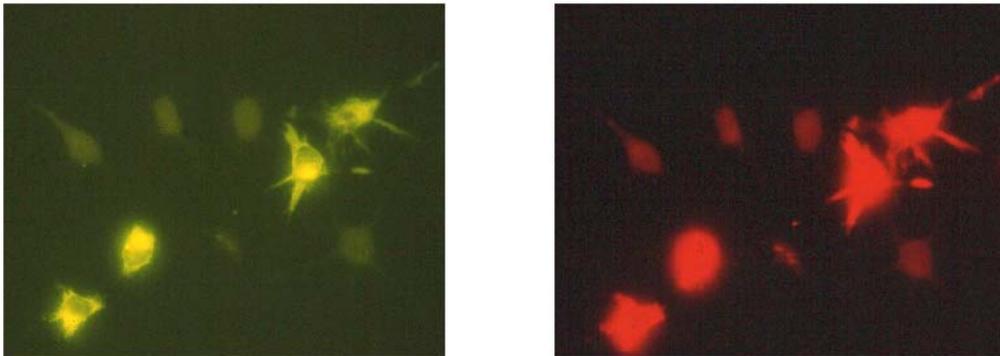


Abb. 3.14: Co-Lokalisation des anti-HA-spezifischen AK und des receptorspezifischen AK an pcAmoct1-HA-transfizierten HEK 293 Zellen. Aufnahme der gleichen Zellen: Der FITC-konjugierte anti-HA 2.AK wurde durch Rotlichtanregung sichtbar gemacht (links). Der Cy3-konjugierte anti-rabbit AK wurde durch Grünlichtanregung sichtbar gemacht (rechts).

3.10 Lokalisation des Rezeptorproteins im Bienenhirn - Immunhistochemie

Die Verteilung des Octopamin-Rezeptors im Bienenhirn wurde an Vibratonschnitten von Gehirnen adulter Arbeiterinnen untersucht. Zur Detektion des Rezeptors wurden die receptorspezifischen polyklonalen Antikörper eingesetzt. Der Nachweis der gebundenen primären Antikörper erfolgte über Cy3-konjugierte anti-Kaninchen-Sekundärantikörper (siehe Methoden 2.4.7).

Starke Immunreaktivität wurde in den optischen Loben, den Pedunculi und α - und β -Loben der Pilzkörper sowie im Antennallobus detektiert. Weiterhin wurde Immunreaktivität im Unterschlundganglion, im Zentralkomplex und in den Pilzkörperkelchen gefunden. Kontrollfärbungen von Gehirnschnitten mit dem Präimmunserum zeigten keine spezifischen Fluoreszenzsignale (siehe Abb. 3.15 – 3.19).

Diese immunhistochemischen Ergebnisse stimmen gut mit dem Expressionsmuster der Amoct1-mRNA überein (siehe Ergebnisse 3.8). Demnach ist das Rezeptorprotein in fast allen Gehirnregionen vorhanden.

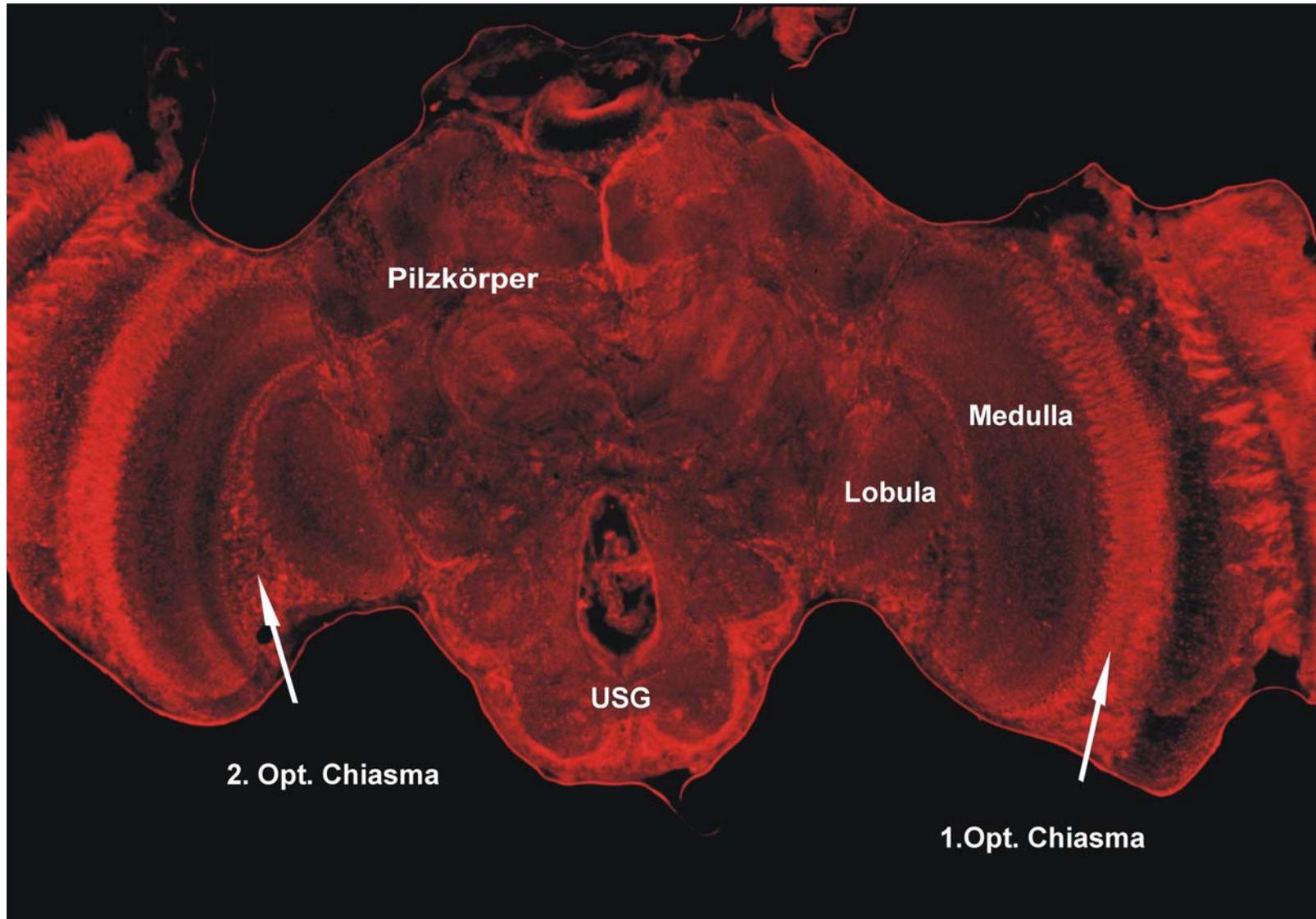


Abb. 3.15 Anti-AmOCT1-Immunreaktivität.

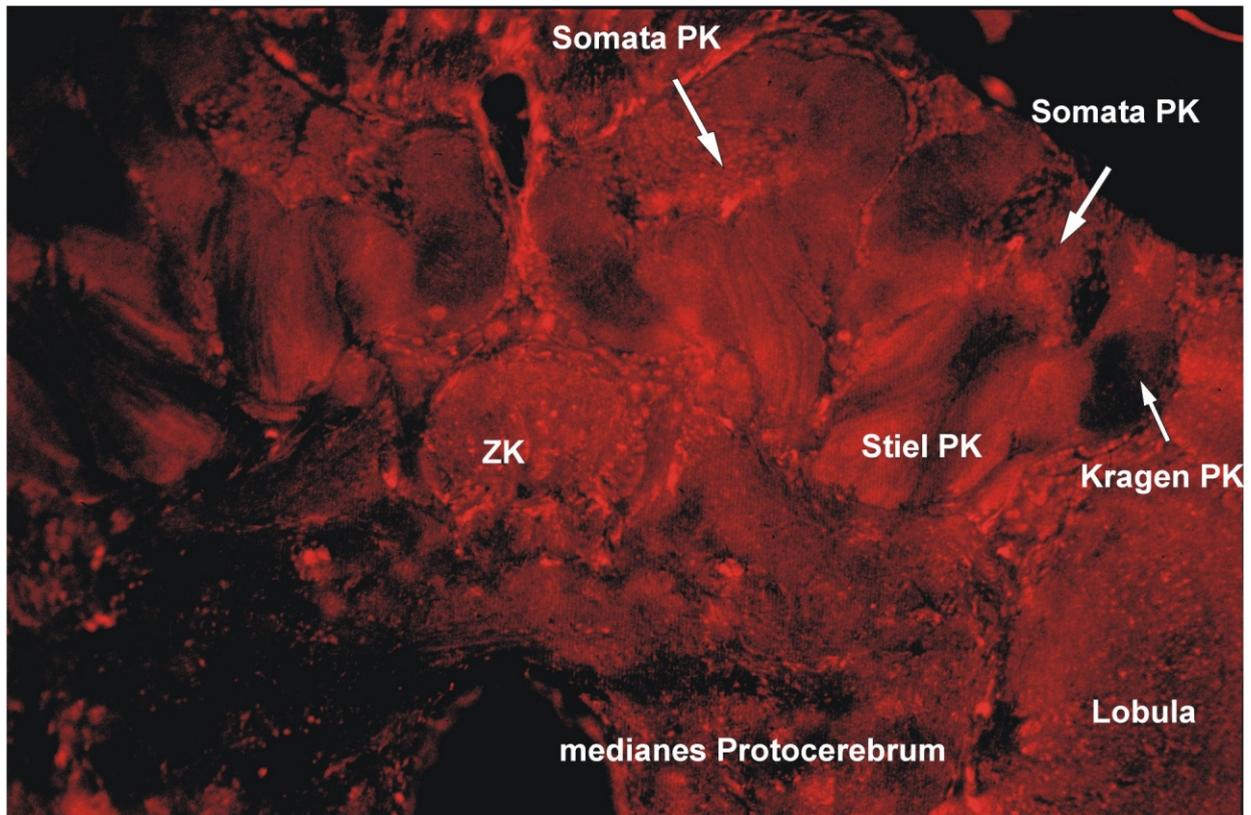


Abb. 3.16 a) Anti- AmOCT1-IR



Abb. 3.16 b) Kontrolle (Präimmunserum)

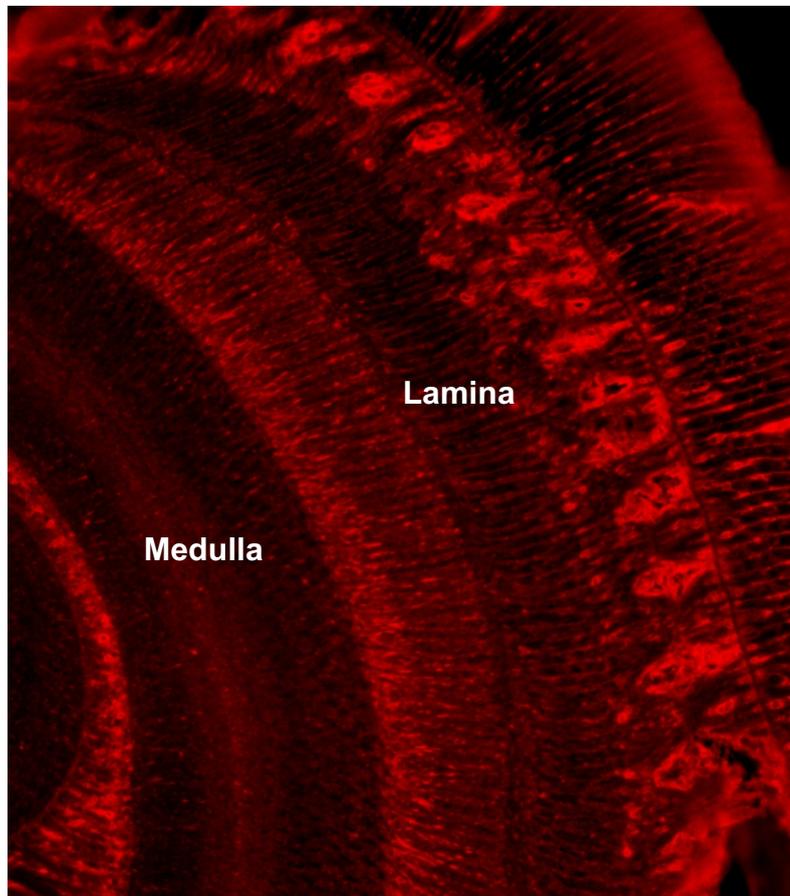


Abb.: 3.17 a): Optische Loben; Anti-AmOCT1-IR



Abb.: 3.17 b): Optische Loben; Kontrolle (Präimmunserum)

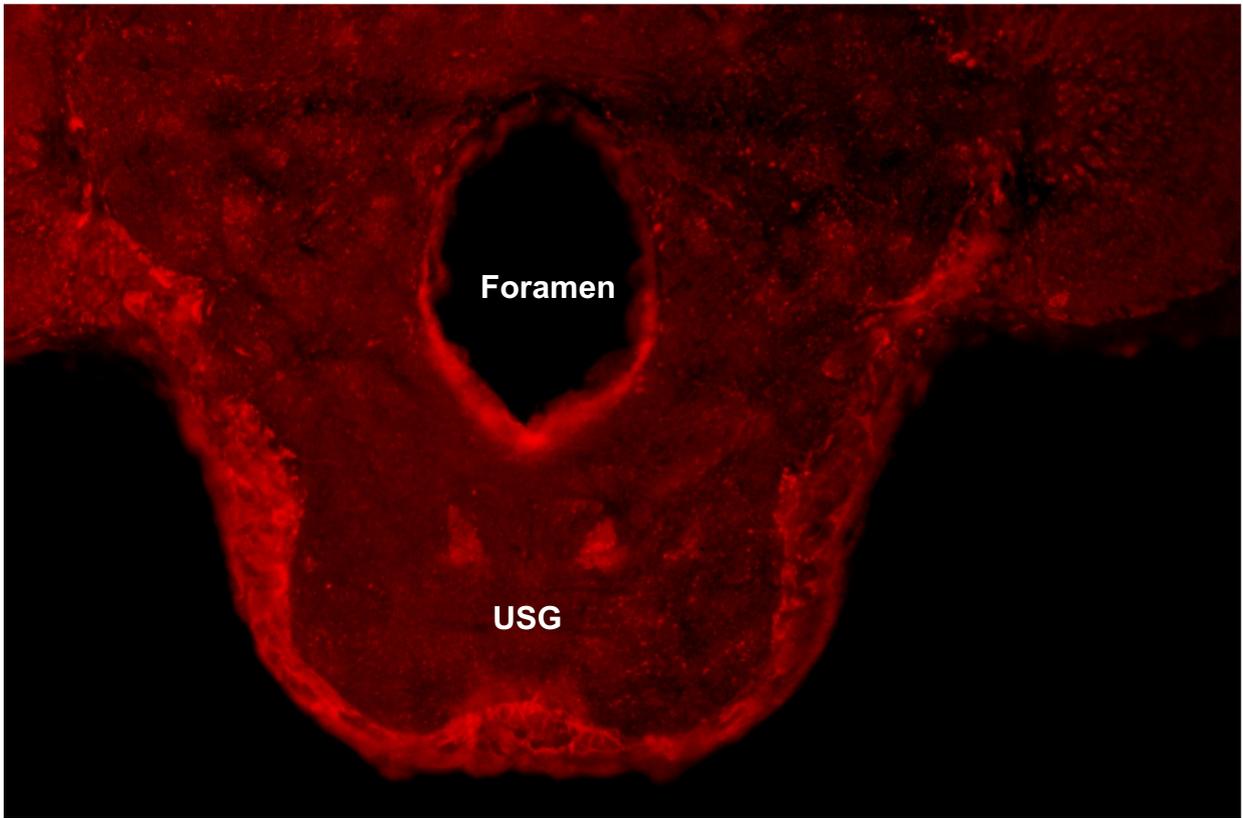


Abb. 3.18 Anti-AmOCT1-IR im Unterschlundganglion (USG)

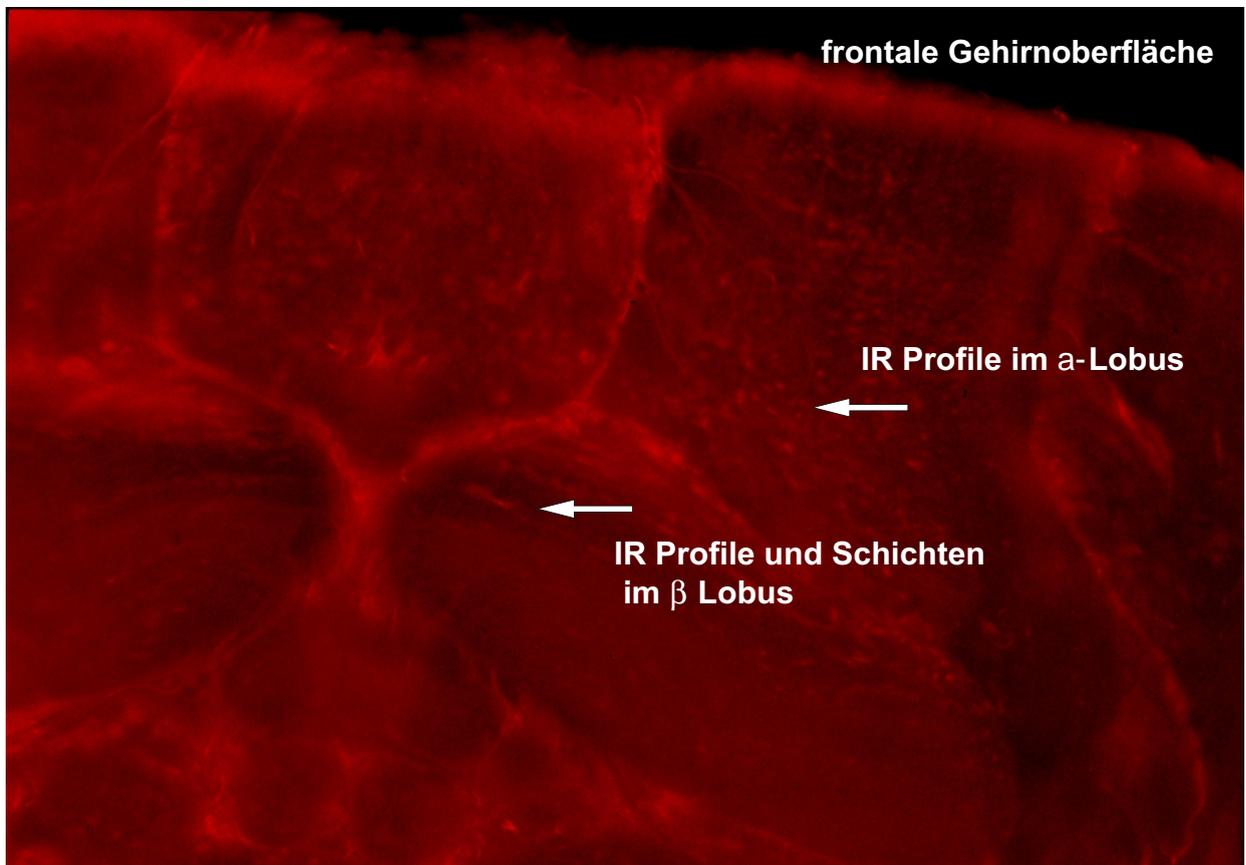


Abb. 3.19 Horizontal-Schnitt, Anti-AmOCT1-IR im α -und β -Lobus

Abb. 3.15 – 3.19 siehe Seite 47-50: Anti AmOCT1-Immunreaktivität (IR) in Gehirnen adulter Arbeitsbienen. Abb. 3.15 – 3.18: Frontalschnitte (50µm) von Gehirnen adulter Arbeiterinnen. Abb. 3.19: Horizontalschnitt (50µm).

Abb. 3.15: Übersicht der anti-AmOCT1-IR, Pilzkörper, optische Loben, Unterschlundganglion;

Abb. 3.16 a): Zentralhirn, Anti- AmOCT1-IR; **b):** Kontrolle, Inkubation in Präimmunserum, die Pilzkörperumrisse sind schematisch eingezeichnet;

3.17 a): anti-AmOCT1-IR in den optischen Loben; **b):** Kontrolle, optische Loben nach der Inkubation mit Präimmunserum, der Umriß der Medulla ist schematisch eingezeichnet;

Abb. 3.18: anti-AmOCT1-IR im Unterschlundganglion (USG);

Abb. 3.19: Horizontalschnitt, anti-AmOCT1-IR im α - und β -Lobus.

4. Diskussion

Die folgende Diskussion wird in vier thematische Abschnitte unterteilt: Im ersten Teil werden die strukturellen Eigenschaften des klonierten Octopamin-Rezeptors (AmOCT1) erläutert. Im zweiten Abschnitt wird die funktionelle Kopplung des Rezeptors an intrazelluläre Botenstoff-Wege diskutiert. Teil drei beschreibt die Expression der rezeptorspezifischen mRNA und die Verteilung des Rezeptors im Bienenhirn. Der vierte Abschnitt gibt einen Ausblick, welche Funktion der Rezeptor im adulten Tier haben könnte.

4.1 Strukturelle Eigenschaften des klonierten AmOCT1 Rezeptors

Aus pharmakologischen Untersuchungen an verschiedenen Insektenarten ist bekannt, daß Octopamin-Rezeptoren (OA-R) sowohl im ZNS als auch in der Peripherie, beispielsweise auf Muskeln, exprimiert werden. Eine Einteilung in OA 1-, OA 2- und OA 3-Rezeptoren wurde aufgrund spezifischer Radioligandenbindungseigenschaften vorgenommen (Roeder, 1999). Diese pharmakologisch unterscheidbaren Rezeptorsubtypen koppeln auf der intrazellulären Seite an zwei unterschiedliche, intrazelluläre Signalwege. Die Aktivierung von OA 1-Rezeptoren bewirkt einen Anstieg der intrazellulären Calcium-Konzentration ($[Ca^{2+}]_i$). OA 2- und OA 3-Rezeptoren führen zu einer Erhöhung der intrazellulären cAMP-Konzentration ($[cAMP]_i$).

Obwohl die pharmakologischen Eigenschaften und die zellulären Aktivierungswege schon längere Zeit bekannt sind, wurden Octopamin-Rezeptoren erst in jüngster Zeit kloniert.

Inzwischen sind (7) Octopamin-Rezeptor-Sequenzen bekannt: Zwei aus *Lymnea stagnalis* (Gerhardt et al., 1997a, Gerhardt et al., 1997b), zwei aus *Drosophila melanogaster* (Han et al., 1998, Baumann pers. Mitteilung), eine aus *Aplysia californica* (Li et al., 1994), eine aus *Heliothis virescens* und eine aus *Bombyx mori* (von Nickisch-Rosenegk et al., 1996).

Es war das Ziel der vorliegenden Arbeit, eine Octopamin-Rezeptor-cDNA aus der Honigbiene zu klonieren, funktionell zu charakterisieren und das Expressionsprofil im Gehirn aufzuklären. Alle bislang beschriebenen Octopamin-Rezeptoren gehören zur Supergenfamilie der G Protein-gekoppelten Rezeptoren. Sie besitzen untereinander, wie die meisten Mitglieder anderer GPCR-Genfamilien, große Sequenzhomologie. Diese Sequenzähnlichkeiten sind in der Vergangenheit schon oft benutzt worden, um homologe Sequenzen aus derselben oder aus anderen Spezies zu klonieren (Blenau et al., 1998, 2000, Gotzes et al., 1994).

Mit einer Sonde der *Drosophila* Octopamin Rezeptor cDNA (siehe Ergebnisse 3.1) wurden aus einer genomischen Bienenlarven Cosmid-DNA-Bibliothek drei positive Klone isoliert (siehe Ergebnisse 3.1). In einem 6 kb großen EcoRI-Fragment des Klons O07 wurden zwei Sequenzabschnitte identifiziert, die zum 3'-Bereich des *Drosophila* Rezeptors homolog sind. In dem genomischen Bienen DNA-Fragment sind zwei kodierende Bereiche von einer nicht-

kodierenden Sequenz unterbrochen. Es ist daher anzunehmen, daß das Bienen-Octopamin-Rezeptorgen – wie das *Drosophila*-Rezeptorgen – gespleißt wird. Das 6 kb große Restriktionsfragment des Klons O07 wurde bislang nur ansequenziert. Sowohl von der 5'- als auch von der 3'-Seite des Restriktionsfragments wurden je ca. 1000 bp sequenziert. Ob sich in den verbleibenden ca. 4 kb genomischer DNA, die im Rahmen dieser Arbeit nicht sequenziert wurden, weitere Exonabschnitte des Bienen Octopamin-Rezeptorgens befinden, sollte in Zukunft geprüft werden. Die Aufklärung der Genstruktur des Bienen Octopamin-Rezeptorgens könnte zu einem Vergleich mit der bekannten Genstruktur des *Drosophila* Octopamin-Rezeptorgens benutzt werden. Dabei würde sich zeigen, ob die Spleißmuster der Gene konserviert sind oder in welchen Bereichen mögliche Unterschiede auftreten.

Etwa zeitgleich zur Aufklärung der genomischen DNA-Sequenzen (siehe oben) wurde von Dr. P. Ebert (Australien) ein cDNA-Klon (AmBAR1) zur Verfügung gestellt, der für einen bisher unbekanntes GPCR kodiert. Die funktionellen Eigenschaften des Rezeptorproteins waren nicht untersucht worden. Ein Vergleich der mitgelieferten AmBAR1 Sequenz mit den oben angegebenen genomischen Sequenzabschnitten sowie den *Drosophila* Octopamin-Rezeptorsequenzen zeigte, daß der Bienen cDNA-Klon AmBAR1 mit den kodierenden Bereichen des genomischen Fragmentes bis auf wenige Nukleotidaustausche übereinstimmte und auch zur *Drosophila*-Sequenz ~ 75 % identisch war.

Dieses Ergebnis ließ vermuten, daß der AmBAR1-cDNA-Klon für einen Octopamin-Rezeptor kodiert. Die kodierende Region des AmBAR1-Klons wurde nochmals sequenziert, da sich nach den ersten Restriktions- und Sequenzanalysen Unterschiede zur mitgelieferten Sequenzinformation ergeben hatten. Parallel wurden cDNA-Klone aus der Bienenhirn cDNA-Bibliothek isoliert (Amoct B2 und Amoct D2, siehe Ergebnisse 3.2). Die Sequenzüberprüfung ergab, daß auch Amoct B2 und Amoct D2 für vollständige Rezeptoren kodieren. Die abgeleiteten AS-Sequenzen sind identisch zur AmBAR1-Sequenz. Die überprüfte AmBAR1-Sequenz wurde schließlich in Amoct1 (*Apis mellifera* Octopamin-Rezeptor 1) umbenannt.

Die abgeleitete Aminosäuresequenz der Amoct1-cDNA besteht aus 587 Aminosäuren (siehe Ergebnisse 3.3) und entspricht einem berechneten Molekulargewicht von 66,5 kD. Das Hydrophathieprofil (siehe Abb. 3.4) zeigt, wie für alle GPCR üblich, sieben potentielle transmembranale Segmente (Strader et al., 1995, Valdenaire und Vernier, 1997).

Die Rezeptoren besitzen häufig eine oder mehrere Konsensusstellen für N-Glykosylierung, die meist im N-terminalen Abschnitt liegen. Es wird angenommen, daß diese Modifikation für die richtige Anordnung des Rezeptors in der Zellmembran und möglicherweise auch für den gerichteten Transport zur Zellmembran benötigt wird (Clagett-Dame und McKelvy, 1989).

AmOCT1 enthält drei Konsensusstellen für N-Glykosylierung (siehe Abb. 3.5). Mindestens eine dieser Konsensusstellen wird bei der heterologen Expression des Rezeptors in HEK 293 Zellen glykosyliert (siehe Ergebnisse 3.6). Diese Aussage stützt sich auf die Ergebnisse der

Western Blot-Analysen von Membranproteinen die aus pcAmoct1-transfizierten HEK 293 Zellen isoliert wurden. In den Membranproteinen pcAmoct1-transfizierter Zellen wurden zwei Proteine von ~67 und ~100 kD mit dem polyklonalen AK spezifisch erkannt. Die Behandlung der Proteinfraction mit dem Enzym PNGaseF, das spezifisch alle N-glykosidisch gebundenen Zucker von Proteinen entfernt, führte zum nahezu vollständigen Verschwinden der ~100 kD Bande. Die ~67 kD Bande wird unverändert detektiert (siehe Ergebnisse 3.9). Dieses Ergebnis zeigt, daß das 100 kD Protein die glykolysierte Form des exprimierten Rezeptors darstellt.

Die Länge der Aminotermini biogener Amin-Rezeptoren von Wirbellosen ist sehr variabel. Es ist bislang noch nicht gezeigt worden, daß längere N-Termini die Bindungseigenschaften biogener Amin-Rezeptoren beeinflussen (Probst et al., 1992). Vielmehr wurde für den *Drosophila* Dopamin-Rezeptors DmDOP1 (Gotzes und Baumann, 1996) durch Mutagenese-Experimente gezeigt, daß für die Integration des Rezeptors in die Zellmembran und die funktionelle Kopplung an intrazelluläre Botenstoffwege nur 16 Aminosäuren vor TM1 notwendig sind. Der AmOCT1 Rezeptor besitzt 65 AS vor der TM1 (siehe Abb. 3.5). Im Vergleich zu den bereits aus *Apis* klonierten biogenen Amin-Rezeptoren, AmDOP1 (34 AS vor TM1) und AmTYR1 (40 AS vor TM1) ist der N-Terminus von AmOCT1 etwa 20 AS länger.

Im C-Terminus vieler GPCR wurden Cystein-Reste identifiziert, die posttranslational palmitoyliert werden (Jin et al., 1999). Es wird angenommen, daß diese Modifikation zur Stabilisierung des Rezeptorproteins beiträgt. Der hydrophobe Schwanz der Palmitinsäure inseriert in die Plasmamembran und führt so zur Ausbildung einer vierten intrazellulären Schleife, die, zumindest in einigen Fällen, an der Interaktion mit dem G-Protein beteiligt ist (Jin et al., 2000). Im C-Terminus von AmOCT1 liegen drei Cysteine(C₅₂₆, C₅₂₈, C₅₃₀), die potentielle Kandidaten für die Palmitoylierung sind (siehe Abb. 3.5).

Die Bindung des Liganden erfolgt bei allen biogenen Amin-Rezeptoren in einer Bindetasche, die von den transmembranalen Segmenten geformt wird. An der Bindung des Liganden sind einzelne Aminosäuren beteiligt, die in diesen Segmenten liegen. Durch Mutageneseuntersuchungen konnte gezeigt werden, daß ein Asparaginsäurerest in TM3, der in allen biogenen Amin-Rezeptoren konserviert ist, an der Wechselwirkung mit der protonierten Aminogruppe des Liganden beteiligt ist. Dieser Asparaginsäurerest findet sich auch in TM3 von AmOCT1 (D₁₄₅). Weitere an der Ligandenbindung beteiligte Aminosäure-Reste sind Serin-Reste in TM5 und aromatische Aminosäure-Reste (z.B. Phenylalanin) in TM6. Die Serin-Reste (S₂₅₁ und S₂₅₅) in TM5 von AmOCT1 sind potentielle Kandidaten für die Wechselwirkung mit der Hydroxylgruppe des Benzolrings des Octopamins.

GPCR desensibilisieren, wenn sie längere Zeit durch Agonisten aktiviert werden. Die schnelle Desensibilisierung erfolgt durch Phosphorylierung von Serin- und Threonin-Resten in der dritten intrazellulären Schleife (IL3) und im C-Terminus durch *second messenger*-abhängige Proteinkinasen wie beispielsweise PKA und PKC (Valdenaire und Vernier, 1997). Ein weiterer Mechanismus ist die Phosphorylierung durch rezeptorspezifische Kinasen, sogenannte G-Protein-gekoppelte Rezeptor-Kinasen (GRK, Palczewski, 1997, Penn et al., 2000).

Die Phosphorylierung bewirkt, daß die Wechselwirkung zwischen Rezeptor und G-Protein schwächer wird. So sinkt die Effizienz der Signalübertragung auf nachgeschaltete Effektorenzyme. Parallel zur sinkenden Affinität zwischen Rezeptor und G-Protein steigt aber die Bindungsaffinität von Arrestin-Proteinen (β -Arrestine, Carman und Benovic, 1998, Chuang et al., 1996) an den phosphorylierten Rezeptor. G-Proteine und Arrestine konkurrieren um dieselben Bindestellen. Da die Bindung der Arrestine an den phosphorylierten Rezeptor jedoch begünstigt ist, wird nachfolgend die Signaltransduktionskette (Rezeptor – G-Protein) abgeschaltet. AmOCT1 enthält fünf Konsensusstellen für die Phosphorylierung durch PKC (siehe Abb. 3.5). Ob AmOCT1 durch die Phosphorylierung dieser Aminosäure-Reste von der nachfolgenden Signalkaskade entkoppelt wird, wurde im Rahmen dieser Arbeit nicht untersucht.

4.2 Funktionelle Charakterisierung von AmOCT1

Zur funktionellen Charakterisierung des Bienen Octopamin-Rezeptors wurde das Bienen Octopamin-Rezeptorgen transient in Ammenzellen (HEK 293 Zellen) transfiziert. Die Änderung der Konzentration von intrazellulären Botenstoffen wurde anschließend an dem heterolog exprimierten Rezeptor bestimmt.

Die Aktivierung von AmOCT1 durch Octopamin bewirkt in HEK 293 Zellen die Erhöhung der $[Ca^{2+}]_i$ und $[cAMP]_i$. Die Inkubation pcAmoct1-transfizierter Zellen mit den biogenen Aminen, Dopamin, Serotonin und Tyramin bewirkt demgegenüber keine, oder nur eine sehr geringe Veränderung von $[Ca^{2+}]_i$ und $[cAMP]_i$ (siehe Ergebnisse 3.7.1 und 3.7.2). Es ist daher anzunehmen, daß AmOCT1 ein funktioneller Octopamin-Rezeptor ist. Die Zellantwort Amoct1-transfizierter HEK 293 Zellen auf Octopamin ist konzentrationsabhängig. Die Ergebnisse des Ca^{2+} -Imagings (siehe Ergebnisse 3.7.1) zeigen, daß erste Ca^{2+} -Signale schon bei 0,01 μ M Octopamin auftreten. Die Akkumulation von intrazellulärem cAMP ist demgegenüber erst ab Octopaminkonzentrationen von 1 μ M nachweisbar (siehe Ergebnisse 3.7.2). Die Erhöhung der $[Ca^{2+}]_i$ und $[cAMP]_i$ wurde auch für den heterolog exprimierten *Drosophila* Octopamin-Rezeptor beschrieben (OAMB; Han et al., 1998). Die Aktivierungseigenschaften des AmOCT1-Rezeptors unterscheiden sich jedoch deutlich von denen des *Drosophila* Rezeptors:

Bei OAMB löst schon 0,01 μM Octopamin eine Zunahme des $[\text{cAMP}]_i$ aus. Demgegenüber bewirkt diese Konzentrationen bei AmOCT1 noch keine Zunahme des $[\text{cAMP}]_i$ (siehe Ergebnisse 3.7.2). Erst 1 μM Octopamin führt bei AmOCT1 zu einem Anstieg von $[\text{cAMP}]_i$. Auch für OAMB ist die Zunahme von $[\text{cAMP}]_i$ im Bereich von 0,01-100 μM konzentrationsabhängig.

Die Ergebnisse des Ca^{2+} -Imagings (siehe Ergebnisse 3.7.1) sind besonders interessant: Schon bei 0,01 μM Octopamin-Konzentrationen wurden in einzelnen pcAmoct1 transfizierten HEK 293 Zellen Calciumsignale gemessen. Die Ca^{2+} -Antwort der Zellen auf die Aktivierung des AmOCT1-Rezeptors setzt also schon bei submikromolaren Octopamin-Konzentrationen und damit vor der cAMP-Antwort ein. Auch für den *Drosophila*-Octopamin-Rezeptor OAMB wurde ein Anstieg der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ nach der Aktivierung des Rezeptors in HEK 293 Zellen beschrieben (Han et al., 1998). Im Gegensatz zum AmOCT1-Rezeptor wurde die Bestimmung der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ jedoch nicht an einzelnen Zellen, sondern an Zellsuspensionen in Küvetten durchgeführt. Dies ist eine weit weniger sensitive Methode, da bei der Einzelzellaufzeichnung gezielt die Zellen ausgewählt werden, die den Rezeptor tatsächlich exprimieren. Weiterhin wurden die OAMB-transfizierten Zellen ausschließlich mit einer hohen Konzentration (100 μM) Octopamin inkubiert. Es ist denkbar, daß auch für OAMB, unter entsprechend veränderten Versuchsbedingungen, eine Konzentrationsabhängigkeit für die Erhöhung der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ nachweisbar wäre. Es ist ebenfalls nicht auszuschließen, daß auch für OAMB die Calcium-Antwort vor der cAMP-Antwort der Zellen einsetzt. Für diese Annahme spricht, daß dies für die Splicevariante 1B des *Drosophila*-Rezeptors (DmOCT1B) beobachtet wurde (Baumann, persönliche Mitteilung).

Vergleichbare Dosis-Wirkungsbeziehungen wurden auch für einen Octopamin-Rezeptor aus *Lymnea* (Lym_{oa1} , Gerhardt et al., 1997a) gefunden. Die Rezeptoraktivierung führt in HEK 293 Zellen zu einem Anstieg von $[\text{IP}_3]_i$ und $[\text{cAMP}]_i$. Auch bei Lym_{oa1} bewirkt schon eine submikromolare Octopamin-Konzentration (0,1 μM) einen Anstieg von $[\text{IP}_3]_i$ um ca. 10%, wohingegen diese Konzentration noch keinen Anstieg des $[\text{cAMP}]_i$ bewirkt.

Die Kopplung eines Rezeptors an zwei unterschiedliche intrazelluläre Signalwege kann mehrere Ursachen haben:

- 1.) Das Rezeptorprotein koppelt an zwei unterschiedliche G-Proteine, wie z.B. Gq/o und Gs
- 2.) Das Rezeptorprotein koppelt an ein spezifisches G-Protein, das eine PLC aktiviert. Im Anschluß wird eine AC indirekt über aktivierte PKC oder die erhöhte Ca^{2+} -Konzentration in der Zelle aktiviert.
- 3.) Das Rezeptorprotein koppelt an ein spezifisches G-Protein, dessen α -Untereinheit die AC und dessen $\beta\gamma$ -Untereinheit die PLC aktiviert.

Die von AmOCT1 regulierten intrazellulären Signalwege werden in unterschiedlichen Konzentrationsbereichen von Octopamin ausgelöst. Es ist deshalb davon auszugehen, daß die Ca^{2+} -Freisetzung aus intrazellulären Speichern die direkte Zellantwort auf die Aktivierung von AmOCT1 darstellt (Hypothese 2). In einer nachfolgenden Reaktion könnte dann das gebildete Calcium z.B. eine Ca^{2+} /Calmodulin abhängige AC stimulieren und so einen Anstieg der $[\text{cAMP}]_i$ auslösen. Es ist unklar, ob diese Beobachtungen auch für die Expression in einem anderen Expressionssystem oder sogar für den Octopamin-Rezeptor *in vivo* gelten: Es konnte gezeigt werden, daß die Ansteuerung von zwei unterschiedlichen intrazellulären Botenstoff-Wegen durch einen Rezeptor sowohl abhängig von der Rezeptordichte als auch von der verwendeten Zelllinie ist (Zhu et al., 1994, Perez et al., 1993, Reale et al., 1997). Es wäre daher interessant zu prüfen, ob das für AmOCT1 in HEK 293 Zellen gefundene „Doppelsignal“ auch in einer anderen Ammenzelllinie ausgelöst wird.

Ein besonderes Merkmal der Ca^{2+} -Antwort *Amoct1*-transfizierter HEK 293 Zellen ist das Auftreten von Ca^{2+} -Oszillationen nach der Zugabe von Octopamin. Ca^{2+} -Oszillationen sind universelle intrazelluläre Signale, die in den unterschiedlichsten Zelltypen auftreten (Thomas et al., 1996, Berridge et al., 2000). Die Oszillationen wurden in *Amoct1*-transfizierten HEK 293 Zellen ab Octopamin-Konzentrationen von 0,01 μM beobachtet. Mit zunehmender Konzentration des Liganden steigt die Frequenz dieser Ca^{2+} -Signale (siehe Abb. 3.10). Bei hoher Octopamin-Konzentration (100 μM) wurden die transienten Calciumsignale in den meisten Zellen nicht mehr beobachtet. Die charakteristische Zellantwort war statt dessen ein schnell einsetzendes, starkes, dann langsam schwächer werdendes Ca^{2+} -Signal. Diese Zellantwort spiegelt vermutlich die massive Rezeptoraktivierung durch den hoch konzentrierten Liganden und damit eine ständige Produktion von IP_3 durch die PLC wieder. Das in der Zelle im Überschuß vorhandene IP_3 verursacht dann die starke Aktivierung von IP_3 -Rezeptoren in der Membran des Endoplasmatischen Retikulums. Es resultiert die Entleerung der intrazellulären Ca^{2+} -Speicher. Der Rücktransport von Ca^{2+} ist im Vergleich zur Freisetzung deutlich langsamer und die Ca^{2+} -Oszillationen können nicht mehr ausgelöst werden.

Was könnte die molekulare Ursache der beobachteten Ca^{2+} -Oszillationen sein?

Möglicherweise entstehen sie durch die rasch aufeinanderfolgende Desensitisierungen und Aktivierungen der Rezeptoren. Für einen metabotropen Glutamat-Rezeptor der Ratte (mGluR5) wurden ähnliche Oszillationen der intrazellulären Calcium-Konzentrationen beschrieben (Kawabata et al., 1996). Ein homologer Glutamat-Rezeptor (mGluR1) bewirkte nur ein einzelnes, transientes Calcium-Signal. Es wurde gezeigt, daß die Beschaffenheit der Calciumsignale durch die Phosphorylierung der Rezeptoren beeinflusst wird. Der mGluR5-Rezeptor enthält im C-Terminus, kurz hinter TM7, eine Konsensusstelle für die Phosphorylierung durch Protein Kinase C (PKC). Dieses Motiv fehlt im mGluR1-Rezeptor. Durch gerichtete Mutagenese wurde die PKC-Phosphorylierungsstelle in die Sequenz des

mGluR1-Rezeptors eingebaut. Die Aktivierung des „mutierten“ Rezeptors löste intrazelluläre Ca^{2+} -Oszillationen aus, die von denen des mGluR5-Rezeptors kaum zu unterscheiden sind (Kawabata et al., 1996). Auch AmOCT1 besitzt im C-Terminus eine Konsensusstelle für die Phosphorylierung durch PKC (T₅₃₆LR, siehe Abb. 3.5). Ob die Phosphorylierung von AmOCT1 an der Generierung der Ca^{2+} -Oszillationen beteiligt ist, könnte durch gerichtete Mutageneseexperimente, durch die die Phosphorylierungsstelle zerstört wird, aufgeklärt werden.

Eine interessante funktionelle Rolle der Ca^{2+} -Oszillationen wurde in T-Lymphozyten gezeigt. Die Freisetzung von intrazellulärem Calcium bewirkt in T-Lymphozyten die Stimulation der Ca^{2+} -abhängigen Transkriptionsfaktoren NF- κ B, Oct/OAP und NF- κ B. Es wurde beschrieben, daß Ca^{2+} -Oszillationen die $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -Schwelle, die für die Aktivierung dieser Transkriptionsfaktoren nötig ist, senkt (Dolmetsch et al., 1998). Darüber hinaus wurde nachgewiesen, daß die Frequenz der Ca^{2+} -Oszillationen eine spezifische Zellantwort vermittelt: Hochfrequente Ca^{2+} -Oszillationen aktivieren alle drei Transkriptionsfaktoren, niederfrequente Ca^{2+} -Oszillationen bewirken demgegenüber ausschließlich die Aktivierung von NF- κ B.

Kürzlich konnte auch eine Beteiligung der Erhöhung der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ an der Expression eines neuronalen Na^+ -Kanals nachgewiesen werden. Der Nervenwachstumsfaktor (NGF) stimuliert *in vitro* und *in vivo* unter anderem die Expression des PN1-Gens (peripheral nerve type 1 voltage-dependent sodium channel gene), das für einen spannungsgesteuerten Natriumkanal codiert (D'Arcangelo et al., 1993, Gould et al., 2000). Es wurde gezeigt, daß für die Genexpression die anhaltende Aktivierung von PLC γ notwendig ist (Choi et al., 2001). Die Erhöhung der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ induziert die Genexpression von PN1. In Zellen, die mit dem Calcium-Chelatbildner BAPTA-AM beladen wurden, konnte die NGF-vermittelte Genexpression von PN1 fast vollständig unterdrückt werden (Choi et al., 2001).

Es wäre möglich, daß auch Octopamin über die Wechselwirkung mit AmOCT1 in einigen Zellen des Bienenhirns die Genexpression steuert, indem z.B. Ca^{2+} -abhängige Transkriptionsfaktoren stimuliert werden. Alternativ könnte über das gebildete cAMP die Proteinkinase A aktiviert werden, die anschließend die Phosphorylierung und damit Aktivierung von Transkriptionsfaktoren wie z.B. CREB bewirkt.

4.3 Verteilungsmuster der *Amoct1*-mRNA und Lokalisation des Rezeptorproteins im Bienenhirn

Octopamin wird häufig als zentrale modulatorisch wirksame neuroaktive Substanz bei Invertebraten bezeichnet. So sind auch für die Biene verschiedene verhaltensmodulatorische Wirkungen von Octopamin beschrieben worden (Braun und Bicker 1992, Erber et al., 1993, Menzel et al., 1994, Blenau und Erber, 1998). Für das bessere Verständnis der Wirkungen von Octopamin im Bienenhirn ist die genaue Kenntnis der neuronalen Komponenten, die an der octopaminergen Signalübertragung beteiligt sind, wichtig. Eine erste Voraussetzung für die octopaminerge Signaltransduktion ist das Vorhandensein von Octopamin-Rezeptoren auf synaptischen Neuronen. Deshalb wurde in dieser Arbeit das Expressionsmuster der *Amoct1*-mRNA durch *in situ*-Hybridisierungen an Gefrierschnitten der Gehirne adulter Arbeitsbienen bestimmt. Das Octopamin-Rezeptorgen wird in allen Gehirnbereichen exprimiert (siehe Ergebnisse 3.8). Das Verteilungsmuster der *Amoct1*-mRNA unterscheidet sich damit deutlich von dem der *Drosophila* OAMB-mRNA (Han et al., 1998). Han et al. (1998) konnten zeigen, daß die Expression der OAMB-mRNA fast ausschließlich auf die Somata der intrinsischen Pilzkörperzellen (Kenyon-Zellen) beschränkt ist. Daneben fanden sie OAMB-mRNA-Markierungen nur noch im Ellipsoidkörper des Zentralkomplexes und in einzelnen Somata der Medulla. Han et al. (1998) nahmen daher an, daß die Spezifität der OAMB-mRNA Expression Rückschlüsse auf die mögliche Rezeptorfunktion zuließe: Die Pilzkörper sind für das olfaktorische Lernen von *Apis* (Erber et al., 1980, Menzel et al., 1994) und *Drosophila* (Davis, 1993, de Belle und Heisenberg, 1994) von besonderer Bedeutung. Weiterhin wird die Modulation der $[cAMP]_i$ mit Lern- und Gedächtnisprozessen in Verbindung gebracht (Davis und Meller, 1995, Dubnau und Tully, 1998, Menzel und Müller, 1996). Die Aktivierung von OAMB bewirkt in einem heterologen Expressionssystem einen Anstieg der $[cAMP]_i$ (Han et al., 1998). Daher sollte ein hauptsächlich in dieser Gehirnregion exprimierter Rezeptor, der positiv an die AC koppelt, eine Schlüsselposition bei Lern- und Gedächtnisprozessen besitzen können (Han et al., 1998).

Aus der Biene ist bislang nur das Verteilungsmuster der mRNA eines Tyramin-Rezeptorgens (*Amtyr1*, Blenau et al., 2000) und eines Dopamin-Rezeptorgens (*Amdop1*, Blenau et al. 1998) bekannt. Auch diese beiden Rezeptorgene werden, wie *Amoct1*, ubiquitär im Gehirn exprimiert. Besonders starke Markierungen werden in den intrinsischen Pilzkörperzellen gefunden. Das Verteilungsmuster von *Amdop1*-, *Amtyr1*- und *Amoct1*-mRNA ist nahezu identisch. Alle drei Rezeptoren modulieren die $[cAMP]_i$ nach ihrer Aktivierung durch die entsprechenden biogenen Amine, wenn sie in HEK 293 Zellen exprimiert werden. Der Dopamin-Rezeptor bewirkt eine Erhöhung, der Tyramin-Rezeptor dagegen die Abnahme von $[cAMP]_i$. Der Octopamin-Rezeptor bewirkt neben der Erhöhung von $[Ca^{2+}]_i$ ebenfalls eine Erhöhung von $[cAMP]_i$. Es ist daher denkbar, daß die bisher aus der Biene klonierten

Rezeptoren für biogene Amine eine Rolle bei der Integration/ Verarbeitung höherer sensorischer Informationen spielen.

Die Expression rezeptorspezifischer mRNA gibt jedoch nur einen Anhaltspunkt für das Vorhandensein dieses Rezeptors in der entsprechenden Gehirnregion, sagt aber nichts über die subzelluläre Verteilung des Rezeptorproteins aus. Insbesondere bei der Untersuchung von Nervenzellen ist dies ein großer Nachteil, da Neurone weit verzweigt sein können und viele Kontakte untereinander ausbilden. Darum wurde in dieser Arbeit die Verteilung des AmOCT1-Rezeptorproteins im Gehirn mit einem polyklonalen Antikörper, der gegen den C-terminalen Abschnitt des Rezeptors gerichtet ist, an Vibratonschnitten von Gehirnen adulter Arbeiterinnen untersucht (siehe Ergebnisse 3.10). Das Rezeptorprotein wurde in vielen Zellen des Bienenhirns gefunden. Starke Immunreaktivität (IR) wurde in den optischen Loben, den Stielen (Pedunkuli), α - und β -Loben der Pilzkörper, im Antennallobus, im Zentralkörper und im Unterschlundganglion gefunden. Schwächere Immunreaktivität wurde in den Kelchen der Pilzkörper und den Somata der intrinsischen PK-Zellen gefunden. Die Lokalisation des Bienen Octopamin-Rezeptors korreliert recht gut mit der Verteilung von [3 H]Octopamin Bindungsstellen im Bienenhirn (Erber et al., 1991), die potentielle Octopamin-Rezeptoren darstellen. Hier wurde die größte [3 H]Octopamin-Bindungsichte (>250 fmol/mg) in den Stielen und den α - und β -Loben der Pilzkörper sowie im Zentralkörper gefunden (Erber et al., 1991). Demgegenüber bestehen deutliche Diskrepanzen zur Verteilung der Octopamin-IR (Kreissl et al., 1994). Die Stiele und β -Loben der Pilzkörper sind frei von OA-IR. Die größte OA-IR wurde für die Pilzkörperkelche gefunden. Ähnliche gravierende Unterschiede wurden auch für [3 H]Serotonin-Bindungsstellen und Serotonin-IR im Bienenhirn beschrieben: Die Calyces der Pilzkörper sind frei von Serotonin-IR wohingegen in dieser Region eine hohe [3 H]Serotonin-Bindungsichte nachgewiesen wurde (Schürmann und Klemm, 1984, Erber et al., 1991). Es wird daher angenommen, daß freigesetzte biogene Amine über relativ weite Strecken diffundieren müssen, um entfernt exprimierte Rezeptoren zu erreichen (Bicker und Menzel, 1989, Homberg, 1994).

Es ist bemerkenswert, daß die anti-AmOCT1-Immunreaktivität in den Kelchen, der Eingangsregion der Pilzkörper, nur vergleichsweise schwach ist. Weiterhin ist auffällig, daß die Kragenregion der Kelche frei von Immunreaktivität, wohingegen deutliche Färbungen in der Lippenregion und dem Basalring nachgewiesen wurden. Dieses Ergebnis korreliert nur teilweise mit der Verteilung von [3 H]Octopamin Bindungsstellen im Bienenhirn. In den Regionen der Lippe und des Basalringes innerhalb der Pilzkörperkelche wurden hohe [3 H]Octopamin-Bindungsichten bestimmt (>100 - 250 fmol/mg). In der Kragen-Region wurde eine geringere Bindungsichte (50 - 100 fmol/mg) gefunden. Der Vergleich der Verteilung von AmOCT1-IR im Bienenhirn und der Bindungsichte von [3 H]Octopamin läßt deshalb vermuten, daß noch ein weiterer (oder mehrere weitere) Octopamin-Rezeptor(en) im Bienenhirn exprimiert wird (werden).

Für diese Annahme sprechen auch Verdrängungsexperimente mit nichtmarkierten Liganden: Die Spezifität der [³H]Octopamin-Bindung beträgt im Bienehirn 94%. Phentolamin, ein OA-Rezeptor-Antagonist, kann in allen Gehirnregionen (außer in den Pilzkörpern), die [³H]Octopamin-Bindung um 93% verdrängen. In den Pilzkörpern wird die [³H]Octopamin-Bindung jedoch nur um 70% reduziert (Scheidler, 1991). Eine gewisse Übereinstimmung besteht zwischen der Verteilung des AmOCT1-Rezeptors im Bienehirn und der Verzweigung des octopaminergen Neurons VUM_{mx1} (Hammer, 1993, Kreissl et al., 1994), das ein neuronales Substrat für die appetitive Verstärkung bei der olfaktorischen Konditionierung der Biene darstellt (Menzel et al., 1999, Menzel, 2001). Das VUM_{mx1}-Neuron (Hammer, 1993) wird durch die Applikation von Zuckerwasser an die Antennen erregt. Bei einer olfaktorischen Konditionierung der Biene kann die Depolarisation des Neurons die Zuckerwasserbelohnung ersetzen (Hammer, 1993). Dies ist allerdings nur dann der Fall, wenn die Bedingung der Vorwärtspaarung von konditioniertem Stimulus (CS) und unkonditioniertem Stimulus (US) erfüllt ist, d.h. der Duft muß direkt vor der Depolarisierung des Neurons präsentiert werden. Das VUM_{mx1} Neuron projiziert in die Antennalloben, das laterale Protocerebrum und in die Kelche der Pilzkörper. Dies sind Gehirnregionen, die eine bedeutende Rolle bei der olfaktorischen Konditionierung der Biene spielen (Erber et al., 1980, Maelshagen, 1993, Menzel und Müller, 1996). Der AmOCT1-Rezeptor wurde in allen drei Gehirnregionen mit dem anti-AmOCT1 Antikörper nachgewiesen. Interessanterweise werden von VUM_{mx1} (Hammer, 1993) nur die Lippen und der Basalring der Pilzkörperkelche innerviert. Auch AmOCT1 wurde nur in der Lippenregion und dem Basalring der Calyces nachgewiesen. Es ist deshalb denkbar, daß AmOCT1 als Teil einer octopaminergen Signalkette die appetitive Verstärkung beim olfaktorischen Lernen der Biene unterstützt.

4.4 Mögliche Funktion des aus *Apis mellifera* klonierten Octopamin-Rezeptors *in vivo*: Ein Ausblick

Biogene Amine sind bei Insekten an der Steuerung bzw. Modulation von Neuronen beteiligt, die das Verhalten und Lern- und Gedächtnisprozesse beeinflussen können. Die Aufklärung der molekularen Grundlagen dieser Prozesse ist Gegenstand intensiver Forschungsarbeit. Insbesondere die Untersuchung von *Drosophila*-Mutanten hat zum Verständnis der molekularen Signaltransduktionswege im Insektengehirn einen großen Beitrag geleistet (Davis, 1996, Dubnau und Tully, 1998).

Für das olfaktorische Lernen wurden zwei notwendige Komponenten beschrieben:

1.: Der cAMP-Signalweg ist entscheidend an der normalen olfaktorischen Konditionierung beteiligt. Tiere, denen das Gen für die Ca²⁺/Calmodulin abhängige Adenylatzyklase (*rut*, Livingstone et al., 1984), die Phosphodiesterase (*dnc*, Dudai et al., 1976) oder die katalytische Untereinheit der Proteinkinase A (*DCO*, Kalderon und Rubin, 1988) fehlt, zeigen Lerndefekte

(Davis et al., 1995, Meller und Davis, 1996, Dubnau und Tully, 1998). Es konnte kürzlich gezeigt werden, daß die Lerndefekte der *rutabaga* (*rut*)-Mutante durch das Einbringen des Wildtyp-Gens, nahezu vollständig behoben werden konnten (Zars et al., 2000).

Die große Bedeutung des cAMP-Signalweges wurde auch für das olfaktorische Lernen der Honigbiene gezeigt (Hildebrandt und Müller, 1995, Menzel und Müller, 1996).

2.: Die Pilzkörper sind für das olfaktorische Lernen, sowohl bei *Drosophila* als auch bei *Apis*, von entscheidender Bedeutung (Erber et al., 1980, Davis, 1993, Menzel und Müller, 1996). *Drosophila*-Mutanten, die Abberationen der Pilzkörper aufweisen, zeigen Defizite beim olfaktorischen Lernen (Heisenberg et al., 1985, Dubnau und Tully, 1998).

Der im Rahmen dieser Arbeit klonierte Octopamin-Rezeptor wird in allen Gehirnregionen exprimiert. Eine besonders starke Expression des Rezeptorproteins wurde für die Somata intrinsischer Pilzkörperzellen gefunden. Das Rezeptorprotein wurde in allen Gehirnregionen lokalisiert. In einem heterologen Expressionssystem bewirkt AmOCT1 den Anstieg von $[Ca^{2+}]_i$ und $[cAMP]_i$. Vorangegangene Untersuchungen haben gezeigt, daß die Injektion von Octopamin in die Pilzkörper den US bei einer olfaktorischen Konditionierung ersetzen kann (Menzel et al., 1994). Eine jüngere Untersuchung zeigte, daß Octopamin-Injektionen in das Gehirn Reserpin-behandelter Tiere (Reserpin entfernt biogene Amine aus intrazellulären Speichern), die Defekte beim appetitiven Lernen zeigen, diese Lerndefizite aufheben können (Menzel et al., 1999). Weithin konnte gezeigt werden, daß Octopamin die Aquisition, nicht aber die Abrufbarkeit der gelernten Information, verbessern kann. Dieses Ergebnis wurde so interpretiert, daß Octopamin selektiv an der Verstärkung des Belohnungsreizes (Zuckerwasser) beteiligt ist (Menzel et al., 1999). Für den *Drosophila* Octopamin-Rezeptor wurde vorgeschlagen, daß er an der Modulation der synaptischen Plastizität der Pilzkörper-Neurone beteiligt sein könnte (Han et al., 1998).

Octopamin-Injektionen in die optischen Loben der Honigbiene bewirken eine Verstärkung des visuellen Antennen-Reflexes (Erber und Pribbenow, 1996). Es ist daher denkbar, daß AmOCT1 eine Rolle bei der Verarbeitung höherer sensorischer Informationen im olfaktorischen und visuellen System spielt.

Untersuchungen an Fliegen, die mit Formamidinen gefüttert wurden, stützen die vielfach postulierte wichtige Rolle von Octopamin für die Verhaltensplastizität in *Drosophila* und anderen Insekten: Formamidine binden an Octopamin-Rezeptoren und haben eine antagonistische Wirkung auf die Octopamin-induzierte cAMP-Produktion (Dudai et al., 1987). Fliegen, die mit diesen Substanzen gefüttert wurden, zeigen Lerndefizite bei der olfaktorischen Konditionierung (Dudai et al., 1987).

Demgegenüber stellt die Untersuchung der *Drosophila*-Mutante *tβh*, der das Gen für die Tyramin β-Hydroxylase fehlt (Monastirioti et al., 1996), die Bedeutung des octopaminergen Systems bei *Drosophila* allgemein in Frage. Mutanten, denen das Gen fehlt, können kein

Octopamin synthetisieren. Die Tiere weisen aber überraschenderweise einen fast völlig normalen Phänotyp auf. Die Weibchen können jedoch keine Eier ablegen. Wird den Fliegen Octopamin verfüttert, sind die Weibchen normal fortpflanzungsfähig (Monastirioti et al., 1996). Die Mutanten weisen gegenüber Wildtypfliegen einen erhöhten Tyramin-Titer auf. Es kann vermutet werden, daß es aufgrund dieses erhöhten Tyramin-Titers zur Bindung von Tyramin an Octopamin-Rezeptoren kommt, was möglicherweise die Auswirkungen der Mutation abschwächt. Es ist jedoch nicht bekannt, ob die Bindung von Tyramin an Octopamin-Rezeptoren die Auswirkungen der Mutation tatsächlich beeinflussen kann. Ebenso ist die Auswirkung der *tβh*-Mutation auf Lern- und Gedächtnisprozesse bislang noch nicht untersucht worden.

5. Zusammenfassung

Mit der vorliegenden Arbeit wird das erste Octopamin-Rezeptorgen (*Amoct1*) aus *Apis mellifera* beschrieben. Die rezeptorkodierende cDNA wurde funktionell in Ammenzellen (HEK 293) exprimiert und der Rezeptor auf seine funktionelle Kopplung an intrazelluläre Botenstoff-Wege untersucht. Die Aktivierung des Rezeptors mit spezifischen Liganden bewirkt in HEK 293 Zellen eine konzentrationsabhängige Erhöhung der $[Ca^{2+}]_i$ und der $[cAMP]_i$. Die Ca^{2+} -Antwort der Zellen erfolgt bereits bei submikromolaren Konzentrationen Octopamin. Die cAMP-Akkumulation setzt erst bei mikromolaren Octopamin-Konzentrationen ein.

Das Expressionsmuster der *Amoct1*-mRNA im Gehirn der Biene wurde durch *in situ*-Hybridisierungen aufgeklärt. *Amoct1*-mRNA wurde in den Somata aller Gehirnbereiche nachgewiesen. Besonders starke Markierungen wurden in den Somata der intrinsischen Pilzkörperzellen gefunden.

Die zelluläre Lokalisation des Octopamin-Rezeptors, AmOCT1, wurde mit spezifischen polyklonalen Antikörpern an Gehirnschnitten adulter Arbeiterinnen bestimmt. Das Rezeptorprotein ist in den meisten Gehirnregionen vorhanden.

Neben den bereits aus *Apis mellifera* klonierten Tyramin- und Dopamin-Rezeptoren ist mit der Klonierung und funktionellen Charakterisierung des Octopamin-Rezeptors, AmOCT1, nun eine weitere wichtige Grundlage für die Untersuchung der molekularen Mechanismen von Lern- und Gedächtnisprozessen geschaffen worden.

6. Literaturverzeichnis

- Axelrod J, Saavedra JM (1977): Octopamine. *Nature* 265: 501-505.
- Baumann A (1999): Molekulare und funktionelle Charakterisierung von Komponenten der Signaltransduktion im Zentralnervensystem von Wirbellosen. Habilitationsschrift; vorgelegt an der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät zu Köln.
- Berridge M, Lipp P, Bootman M (2000) Calcium signaling. *Current Biology* 9 (5) 157-159.
- Beye M, Poch A, Burgdorf C, Moritz RFA, Lehrach H (1998): A gridded genomic library of the honeybee (*Apis mellifera*): A reference library system for basic and comparative genetic studies of a hymenopteran genome. *Genomics* 49: 317-320.
- Bicker G, Menzel R (1989): Chemical codes for the control of behaviour in arthropods. *Nature* 337: 33-39.
- Blenau W, Erber J (1998): Behavioural pharmacology of dopamine, serotonin and putative aminergic ligands in the mushroom bodies of the honeybee (*Apis mellifera*). *Behav Brain Res* 96: 115-124.
- Blenau W, Erber J, Baumann A (1998): Characterization of a dopamine D1 receptor from *Apis mellifera*: Cloning, functional expression, pharmacology, and mRNA localization in the brain. *J Neurochem* 70: 15-23.
- Blenau W, Balfanz S, Baumann A (2000): *Amyr1*: characterization of a gene from honeybee (*Apis mellifera*) brain encoding a functional tyramine receptor. *J Neurochem* 74: 900-908.
- Bockaert J, Pin JP (1999) Molecular tinkering of G protein-coupled receptors: an evolutionary success. *The EMBO Journal* 18 (7):1723-1729.
- Bradford MM (1976): A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72: 248-254.
- Braun G, Bicker G (1992): Habituation of an appetitive reflex in the honeybee. *J Neurophysiol* 67: 588-598.
- Burrell BD, Smith BH (1995): Modulation of the honey bee (*Apis mellifera*) sting response by octopamine. *J Insect Physiol* 41: 671-680.
- Carman CV, Benovic JL (1998) G-protein-coupled receptors: turn-ons and turn-offs. *Curr Opin Neurobiol* 8: 335-344.
- Cavener DR, Ray SC (1991): Eucaryotic start and stop translation sites. *Nucl Acids Res* 19: 3185-3192.
- Chen C, Okayama H (1987): High-efficiency transformation of mammalian cells by plasmid DNA. *Mol Cell Biol* 7: 2745-2752.

- Choi D, Toledo-Aral JJ, Segal R, Halegoua S (2001): Sustained signaling by phospholipase C- γ mediates nerve growth factor-triggered gene expression. *Mol. Cell. Biol.* 21: 2695-2705.
- Chuang TT, Iacovelli L, Sallese M, De Blasi A (1996): G protein-coupled receptors: heterologous regulation of homologous desensitization and its implications. *Trends Pharmacol Sci* 17: 416-421.
- Clagett-Dame M, McKelvy JK (1989): N-linked oligosaccharides are responsible for rat striatal dopamine D2 receptor heterogeneity. *Arch Biochem Biophys* 274: 145-154.
- D'Arcangelo G, Paradiso K, Shepherd D, Brehm P, Halegoua S, Mandel G (1993): Neuronal growth factor regulation of two different sodium channel types through distinct signal transduction pathways. *J Cell Biol* 122: 915-921.
- Davenport AP, Evans PD (1984) Stress-induced changes in the octopamine levels of insect haemolymph. *Insect Biochem* 14: 135-143.
- Davis RL (1993): Mushroom bodies and *Drosophila* learning. *Neuron* 11: 1-14.
- Davis RL (1996) Physiology and biochemistry of *Drosophila* learning mutants. *Physiol Rev* 76: 299-317.
- De Belle JS, Heisenberg M (1994): Associative odor learning in *Drosophila* abolished by chemical ablation of mushroom bodies. *Science* 263: 692-695.
- Dolmetsch RE, Xu K, Lewis RS (1998): Calcium oscillations increase the efficiency and specificity of gene expression. *Nature* 392: 933-936.
- Dubnau J, Tully T (1998): Gene discovery in *Drosophila*: New insights for learning and memory. *Annu Rev Neurosci* 21: 407-444.
- Dudai Y, Jan Y-N, Byers D, Quinn W, Benzer S (1976): *Dunce*, a mutant of *Drosophila melanogaster* deficient in learning. *Proc Natl Acad Sci USA* 73: 1684-1688.
- Dudai Y, Buxbaum J, Corfas G, Ofarim M (1987): Formamidines interact with *Drosophila* octopamine receptors, alter the flies' behavior and reduce their learning ability. *J Comp Physiol* 161A: 739-746.
- Ebert PR, Rowland JE, Toma DP (1998): Isolation of seven unique biogenic amine receptor clones from the honey bee by library scanning. *Insect Mol Biol* 7: 151-162.
- Erber J, Masuhr T, Menzel R (1980): Localization of short-term memory in the brain of the bee, *Apis mellifera*. *Physiol Entomol* 5: 343-358.
- Erber J, Kloppenburg P, Scheidler A (1991) Neuromodulation in the honeybee: autoradiography, electrophysiology and behaviour. in: Goodman LJ and Fisher RC (EDS.) *The behaviour and physiology of bees*. CAB International, Wallingford, pp. 273-287.

- Erber J, Kloppenburg P, Scheidler A (1993): Neuromodulation by serotonin and octopamine in the honeybee: behaviour, neuroanatomy and electrophysiology. *Experientia* 49: 1073-1083.
- Erspamer V, Boretti G (1951) Identification and characterization by paper chromatography of enteramine, octopamine, tyramine, histamine and allied substances in extracts of posterior salivary glands of octopoda and in other tissue extracts of vertebrates and invertebrates. *Arch Int Pharmacodyn* 88: 296-332.
- Gerhardt CC, Bakker RA, Piek GJ, Planta RJ, Vreugdenhil E, Leysen JE, van Heerikhuizen, H (1997a): Molecular cloning and pharmacological characterization of a molluscan octopamine receptor. *Mol Pharmacol* 51: 293-300.
- Gerhardt CC, Lodder HC, Vincent M, Bakker RA, Planta RJ, Vreugdenhil E, Kits KS, van Heerikhuizen H (1997b): Cloning and expression of a complementary DNA encoding a molluscan octopamine receptor that couples to chloride channels in HEK 293 cells. *J Biol Chem* 272: 6201-6207.
- Gotzes F, Balfanz S, Baumann A (1994): Primary structure and functional characterisation of a *Drosophila* dopamine receptor with high homology to human D_{1/5} receptors. *Receptor and Channels* 2: 131-141.
- Gotzes F, Baumann A (1996): Functional properties of *Drosophila* dopamine D₁-receptors are not altered by the size of the N-Terminus. *Biochem Biophys Res Commun* 222: 121-126.
- Gould HJ, Gould TN, England JD, Paul D, Liu ZP, Levinson SR (2000): A possible role for nerve growth factor in the augmentation of sodium channels in models of chronic pains. *Brain Res* 854: 19-29.
- Gudermann T, Schöneberg T, Schultz G (1997): Functional and structural complexity of signal transduction via G-protein-coupled receptors. *Annu Rev Neurosci* 20: 399-427.
- Hall RA, Premont RT, Lefkowitz RJ (1999) Heptahelical receptor signaling: beyond the G protein paradigm. *J Cell Biol* 145 (5) 31: 927-932.
- Hammer M (1993): An identified neuron mediates the unconditioned stimulus in associative olfactory learning in honeybees. *Nature* 366: 59-63.
- Hammer M (1997): The neuronal basis of associative reward learning in honeybees. *Trends Neurosci* 20: 245-252.
- Hammer M, Menzel R (1998): Multiple sites of associative odor learning as revealed by local brain microinjections of octopamine in honeybees. *Learn Mem* 5: 146-156.
- Han K-A, Millar NS, Davis RL (1998): A novel octopamine receptor with preferential expression in *Drosophila* mushroom bodies. *J Neurosci* 18: 3650-3658.

- Harris JW, Woodring J (1992): Effects of stress, age, season, and source colony on levels of octopamine, dopamine and serotonin in the honey bee (*Apis mellifera* L.) brain. *J Insect Physiol* 38: 29-35.
- Heisenberg M, Borst A, Wagner S Byers D (1985): *Drosophila* mushroom body mutants are deficient in olfactory learning. *J Neurogenet* 2: 1-30.
- Henderson R, Baldwin JM, Ceska TA, Zemlin F, Beckmann E, Downing, KH (1990): Model for the structure of bacteriorhodopsin based on high-resolution electron cryo-microscopy. *J Mol Biol* 213:899-929.
- Hildebrandt H, Müller U (1995): Octopamine mediates rapid stimulation of protein kinase A in the antennal lobes of honeybees. *J Neurobiol* 27: 44-50.
- Homberg U (1994): Distribution of neurotransmitters in the insect brain. *Progress in Zoology* 40: 63-75
- Ivens AC, Little PFR (1995): Cosmid clones and their application to genome studies. In: Glover, Hames, (Eds): *DNA-cloning 3 – complex genomes*. Oxford University Press, the practical approach series, 1-47.
- Ji TH, Grossmann M, Ji I (1998) G protein-coupled receptors. *J Biol Chem* 273 (28) 17299-17302.
- Jin H, Xie Z, George SR, O'Dowd BF (1999): Palmitoylation occurs at cysteine 347 and cysteine 351 of the dopamine D₁ receptor. *Eur J Pharmac* 386: 305-312.
- Jin H, George SR, Bouvier M, O'Dowd BF (2000): Palmitoylation of G protein-coupled receptors. In: Benovic JL, editor: *Regulation of G Protein-Coupled Receptor Function and Expression*. New York: Wiley-Liss. p 93-117.
- Kaatz H, Eichmüller S, Kreissl S (1994): Stimulatory effect of octopamine on juvenile hormone biosynthesis in honey bee (*Apis mellifera*): Physiological and immunocytochemical evidence. *J Insect Physiol* 40: 865-872.
- Kalderon D, Rubin GM (1988): Isolation and characterization of *Drosophila* cAMP-dependent protein kinase genes. *Genes Dev* 2:1539-1556.
- Kawabata S, Tsutsumi R, Kohara A, Yamaguchi T, Nakanishi S, Okada M (1996): Control of calcium oscillations by phosphorylation of metabotropic glutamate receptors. *Nature* 383: 89-92.
- Kloppenburg P, Erber J (1995): The modulatory effects of serotonin and octopamine in the visual system of the honey bee (*Apis mellifera* L.) - II. Electrophysiological analysis of motion-sensitive neurons in the lobula. *J Comp Physiol* 176A: 119-129.
- Kozak M (1984) Compilation and analysis of sequences upstream from the translational start site in eukaryotic mRNAs. *Nucl Acids Res* 12:857-872.

- Kreissl S, Eichmüller S, Bicker G, Rapus J, Eckert M (1994): Octopamine-like immunoreactivity in the brain and suboesophageal ganglion of the honeybee. *J Comp Neurol* 348: 583-595.
- Kyte J, Doolittle RF (1982): A simple method for displaying the hydropathic Charakter of a protein. *J Mol Biol* 157:105-132.
- Li X-C, Giot J-F, Hen R, Weiss KR, Kandel ER (1994): Molecular cloning and charakterization of serotonin and octopamine receptors of *Aplysia*. *Soc Neurosci Abstr* 20:1160.
- Livingstone MS, Sziber PP, Quinn WG (1984): Loss of calcium/calmodulin responsiveness in adenylate cyclase of *rutabaga*, a *Drosophila* learning mutant. *Cell* 37:205-215.
- Maleszka R (2000): Molecules to behaviour in the honeybee - the emergence of comparative neurogenomics. *Trends Neurosci* 23: 513-514.
- Mauelshagen J (1993) Neural correlates of olfactory learning in an identified neuron in the honeybee brain. *J Neurophysiol* 69:609-625.
- Meller VH, Davis RL (1996): Biochemistry of insect learning: Lessons from bees and flies. *Insect Biochem Molec Biol* 26: 327-335.
- Menzel R (2001): Searching for the memory trace in a mini-brain, the honeybee. *Learn Mem* 8(2): 53-62.
- Menzel R, Müller U (1996): Learning and memory in honeybees: From behavior to neural substrates. *Annu Rev Neurosci* 19: 379-404.
- Menzel R, Durst C, Erber J, Eichmüller S, Hammer M, Hildebrandt H, Mauelshagen J, Müller U, Rosenboom H, Rybak J, Schäfer S, Scheidler A (1994): The mushroom bodies in the honeybee: From molecules to behaviour. In: Schildberger K and Elsner N, editors: *Neural Basis of Behavioural Adaptations*. Stuttgart: Fischer. p 81-102.
- Menzel R, Heyne A, Kinzel C, Gerber B, Fiala A (1999): Pharmacological dissociation between the reinforcing, sensitizing, and response-releasing functions of reward in honeybee classical conditioning. *Behav Neurosci* 113: 744-754.
- Monastirioti M, Linn CE, White K (1996): Characterization of *Drosophila* tyramine β -hydroxylase gene and isolation of mutant flies lacking octopamine. *J Neurosci* 16: 3900-3911.
- Monastirioti M (1999): Biogenic amine systems in the fruit fly *Drosophila melanogaster*. *Microsc Res Tech* 45: 106-121.
- Nathanson JA (1979) Octopamine receptors, adenosine 3', 5'- monophosphate, and neural control of firefly flashing. *Science* 203: 65-68.

- O'Dell KM (1994): The inactive mutation leads to abnormal experience-dependent courtship modification in male *Drosophila melanogaster*. *Behav Genet* 24: 381-388.
- Orchard I, Ramirez RJ, Lange AB (1993): A multifunctional role for octopamine in locust flight. *A Rev Entomol* 38: 227-249.
- Osborne RH (1996) Insect neurotransmission: Neurotransmitters and their receptors. *Pharmacol Ther* 69 (2) 117-142.
- Palczewski K (1997): GTP-binding-protein-coupled receptor kinases--two mechanistic models. *Eur J Biochem* 248: 261-269.
- Palczewski K, Kumasaka T, Hori T, Behnke CA, Motoshima H, Fox BA, Le Trong I, Teller DC, Okada T, Stenkamp RE, Yamamoto M, Miyano M (2000): Crystal structure of rhodopsin: a G protein-coupled receptor. *Science* 289: 739-745.
- Penn RB, Pronin AN, Benovic JL (2000): Regulation of G protein-coupled receptor kinases. *Trends in Cardiovascular Medicine* 10 (2) 81-89.
- Perez D, DeYoung MB, Graham R (1993): Coupling of expressed α_{1B} - and α_{1D} adrenergic receptors to multiple signaling pathways is both G protein and cell type specific. *Mol. Pharmacol.* 44: 784-795.
- Pribbenow B, Erber J (1996): Modulation of antennal scanning in the honeybee by sucrose stimuli, serotonin, and octopamine: Behavior and electrophysiology. *Neurobiol Learn Mem* 66: 109-120.
- Probst WC, Snyder LA, Schuster DI, Brosius J, Sealfon SC (1992): Sequence alignment of the G-protein coupled receptor superfamily. *DNA Cell Biol* 11: 1-20.
- Rachinsky A (1994): Octopamine and serotonin influence on corpora allata activity in honey bee (*Apis mellifera*) larvae. *J Insect Physiol* 40: 549-554.
- Reale V, Hannan F, Midgley JM, Evans PD (1997): The expression of a cloned *Drosophila* octopamine/tyramine receptor in *Xenopus* oocytes. *Brain Res* 769: 309-320.
- Robinson GE, Heuser LM, LeConte Y, Lenquette F, Hollingworth RM (1999): Neurochemicals aid bee nestmate recognition. *Nature* 399: 534-535.
- Roeder T (1999): Octopamine in invertebrates. *Prog Neurobiol* 59: 1-31.
- Sambrook J, Fritsch EF; Maniatis T (1989): *Molecular cloning: a laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
- Schäfer S, Rehder V (1989) Dopamine-like immunoreactivity in the brain and suboesophageal ganglion of the honeybee. *J Comp Neurol* 280: 43-58.
- Scheidler A (1991): Autoradiographische Darstellung von Bindungsstellen für verschiedene Neurotransmitter-Kandidaten im Gehirn der Honigbiene (*Apis mellifera*). Dissertation, Fachbereich 14 der Technischen Universität Berlin.

- Schulz DJ, Robinson GE (2001): Octopamine influences division of labour in honey bee colonies. *J Comp Physiol A* 187: 53-61.
- Schürmann FW, Klemm N (1984): Serotonin-immunoreactive neurons in the brain of the honeybee. *J Comp Neurol* 225: 570-580.
- Schürmann FW, Elekes K, Geffard M (1989): Dopamine-like immunoreactivity in the bee brain. *Cell Tissue Res* 256: 399-410.
- Strader CD, Fong TM, Graziano MP, Tota MR (1995): The family of G-protein-coupled receptors. *FASEB J* 9: 745-754.
- Thomas AP, Bird GSJ, Hajnóczky G, Robb-Gaspers LD, Putney JW, Jr (1996): Spatial and temporal aspects of cellular calcium signaling. *FASEB J* 10: 1505-1517.
- Uzzan A, Dudai Y (1982): Aminergic receptors in *Drosophila melanogaster*: responsiveness of adenylate cyclase to putative neurotransmitters. *J Neurochem* 38: 1542-1550.
- Valdenaire O, Vernier, P (1997): G protein coupled receptors as modules of interacting proteins: A family meeting. *Prog Drug Res* 49: 173-218.
- von Nickisch-Roseneck E, Krieger J, Kubick S, Laage R, Strobel J, Strotmann J, Breer H (1996): Cloning of biogenic amine receptors from moth (*Bombyx mori* and *Heliothis virescens*). *Insect Biochem Molec Biol* 26: 817-827.
- Vernier P, Cardinaud B, Valdenaire O, Philippe H, Vincent J-D (1995): An evolutionary view of drug-receptor interaction: the bioamine receptor family. *Trends Pharmacol Sci* 16: 375-381.
- Zars T, Fischer M, Schulz R, Heisenberg M (2000): Localization of a short-term memory in *Drosophila*. *Science* 288: 672-675.
- Zehetner G, Lehrach H (1994) The reference library system – sharing biological material and experimental data. *Nature* 367: 489-491.
- Zhu X, Gilbert S, Birnbaumer M (1994): Dual signaling potential is common among G_s-coupled receptors and dependent on receptor density. *Mol Pharmacol* 46: 460-469.

7. Abkürzungsverzeichnis

α -	anti, Präfix bei Antikörpern
Abb.	Abbildung
AC	Adenylatzyklase
Ach	Acetylcholin
AK	Antikörper
AmDOP1	<i>Apis mellifera</i> Dopamin-Rezeptor 1
<i>Amdop1</i>	Gen des <i>Apis mellifera</i> Dopamin-Rezeptors 1
AmOCT1	<i>Apis mellifera</i> Octopamin-Rezeptor 1
<i>Amoct1</i>	Gen des <i>Apis mellifera</i> Octopamin-Rezeptors 1
AmTYR1	<i>Apis mellifera</i> Tyramin-Rezeptor 1
<i>Amtyr1</i>	Gen des <i>Apis mellifera</i> Tyramin-Rezeptors 1
ApOCT1	<i>Aplysia</i> Octopamin-Rezeptor 1
AS	Aminosäure
ATP	Adenosin-5'-triphosphat
BalOCT1	<i>Balanus amphitrite</i> Octopamin-Rezeptor 1
bp	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin
bspw.	beispielsweise
°C	Temperatur in Grad Celsius
Ca ²⁺	Calciumion
[Ca ²⁺] _i	intrazelluläre Calcium-Konzentration
cAMP	3', 5'-zyklisches Adenosinmonophosphat
[cAMP] _i	intrazelluläre cAMP-Konzentration
cDNA	komplementäre DNA (doppelsträngige DNA-Kopie einer mRNA)
cpm	Zerfallsereignisse pro Minute (counts per minute)
CS	bedingter Reiz (conditioned stimulus)
C-Terminus	Carboxyterminus einer Polypeptidkette
DA	Dopamin
DAB	Diaminobenzidin

DAG	Diacylglycerin
DmOCT1A	<i>Drosophila melanogaster</i> Octopamin-Rezeptor1A (Spleißvariante 1A)
DmOCT1A	Gen des <i>Drosophila melanogaster</i> Octopamin-Rezeptor1A
DmOCT1B	<i>Drosophila melanogaster</i> Octopamin-Rezeptor1B (Spleißvariante 1B)
DmOCT1B	Gen des <i>Drosophila melanogaster</i> Octopamin-Rezeptor1B
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleotidtriphosphat
EDTA	Ethylendiamin-tetraessigsäure
EL	extrazelluläre Schleife (extracellular loop)
G-Protein	GTP / GDP-bindendes Protein
GABA	γ -Aminobuttersäure
GDP	Guanosin-5'-diphosphat
GPCR	G Protein-gekoppelte Rezeptoren
GTP	Guanosin-5'-triphosphat
HEK 293	embryonale Nierenzelllinie des Menschen
5-HT	5-Hydroxy Tryptamin, Serotonin
IBMX	3-Isobutyl-1-methylxanthin
IL	intrazelluläre Schleife (intracellular loop)
IP ₃	Inositol-1,4,5-triphosphat
IR	Immunreaktivität, immunreaktiv
kb	1000 Basen (paare)
kD	1000 Dalton (Molekulargewicht von Proteinen)
LymOA1	<i>Lymnea stagnalis</i> Octopamin-Rezeptor1
M	molar
mRNA	Boten-RNA (messenger RNA)
N-Terminus	Aminoterminus einer Polypeptidkette
OA	Octopamin
OA-R	Octopamin-Rezeptor
PAA	Polyacrylamid
PCR	Polymerase Kettenreaktion (polymerase chain reaction)

PKA	cAMP-abhängige Proteinkinase
PKC	Proteinkinase C
PLC	Phospholipase C
Poly(A) ⁺ -RNA	Polyadenylierte RNA
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	Umdrehungen pro Minute (rounds per minute)
RT	Raumtemperatur
Tab.	Tabelle
T _m	Schmelztemperatur von Nukleinsäuren
TM	Transmembranregion
Tris	2-Amino-2-(hydroxymethyl) 1,3-propandiol
Tyr	Tyramin
UpM	Umdrehungen pro Minute
US	unbedingter Reiz (unconditioned stimulus)
VUM _{mx1}	identifiziertes Neuron (ventral unpaired medium cell of maxillary neuromere 1)
z.B.	zum Beispiel
ZNS	Zentrales Nervensystem

8. Danksagung

Ich danke Herrn Professor J. Erber für die Bereitstellung des Arbeitsthemas, die Übernahme der Betreuung dieser Arbeit, die Integration in seine Arbeitsgruppe und auch für die erstklassige Hilfe bei der photographischen Dokumentation der Gehirnschnitte.

Mein besonderer Dank gilt PD Dr. Arnd Baumann vom Forschungszentrum Jülich, in dessen unmittelbaren Forschungsbereich auch mein Thema fiel. Er war meinen Fragen gegenüber immer offen und hat mich sowohl in praktischen als auch in theoretischen Belangen großzügig und enthusiastisch betreut. Unter seiner Ägide habe ich große Teile der molekularbiologischen Arbeiten in Jülich durchgeführt, wobei er mich auch in jeder erdenklichen Hinsicht unterstützt, gefordert und gefördert hat.

In diesem Zusammenhang möchte ich auch Dr. Wolfgang Blenau danken, der mich für das Thema „biogene Amin-Rezeptoren bei Wirbellosen“ begeistert hat und mich besonders im ersten Jahr meiner Arbeit hervorragend betreut und unterstützt hat und mir schließlich bei der Manuskriptkritik ein wichtiger Partner war.

Weiterer Dank gilt Dr. Uli Müller, der mich als mein Zweitbetreuer im Rahmen des Graduiertenkollegs unterstützt hat, vor allem bei dem Versuch, monoklonale Antikörper herzustellen.

Ich danke Anke Friedrich. Sie hat mit ihren profunden Kenntnisse der Proteinbiochemie diesen Teil meiner Arbeit sowohl in theoretischer als auch praktischer Hinsicht beflügelt.

Bei allen das Bienengehirn betreffenden Präparationsarbeiten war mir Karin Grandy von unschätzbarem Nutzen. Dafür danke ich ihr.

Desgleichen hat mich Joachim Buchholz bei der bildtechnischen Bearbeitung mit Ruhe und Sachverstand unterstützt. Auch ihm gilt mein aufrichtiger Dank.

Auch Sabine Balfanz möchte ich danken. Sie hat mir bei den labortechnischen Arbeiten in Jülich sehr geholfen.

Allen Mitarbeitern der AG Erber möchte ich für die angenehme Arbeitsatmosphäre danken.

Für die freundschaftliche Unterstützung während all der Durststrecken im Verlauf dieser Arbeit bedanke ich mich herzlich bei meinen Kollegen Celia Möbius und Johannes Kisch, aber auch allen andern lieben Menschen, die mich immer wieder mit Kraft und Zuspruch versorgt haben.

Diese Arbeit wurde gefördert durch die Deutsche Forschungsgemeinschaft (Graduiertenkolleg 120/ „Signalketten in lebenden Systemen“).

9. Lebenslauf

- 1972** Geburt in Recklinghausen
- 1978 - 87** Grundschule, anschließend Gustav Heinemann Gesamtschule in Berlin
- 1987 - 91** Friedrich-Schiller-Gymnasium in Berlin
- 1991** Abitur
- 1991 - 94** Biologie Grundstudium an der FU-Berlin
- 1994** Vordiplom – Note „sehr gut“
- 1994 - 95** Hauptstudium an der FU-Berlin
Tutorin am Institut für Genetik, AG Prof. Korge
- 1995** Erhalt eines DAAD- Stipendiums für das europäische Ausland
- 1995 - 96** Studienaufenthalt in Frankreich (Bordeaux)
- 1996- 97** Fortsetzung des Hauptstudiums an der FU-Berlin
- 1997** Freie Mitarbeit am Institut für angewandte Genetik
Beginn der Diplomarbeit an der TU-Berlin, Thema „Genetische und physikalische Kartierung des Sexlocus in der Honigbiene“
- 1998** Diplom – Note „sehr gut“
Im Dezember Aufnahme in das Graduiertenkolleg „Signalketten in lebenden Systemen“ und Beginn der Doktorarbeit am Institut für Ökologie und Biologie in der AG Prof. Erber, Thema: „Molekulare Klonierung und funktionelle Charakterisierung biogener Aminrezeptoren der Honigbiene“