

# 1 Einleitung

## 1.1 Lernen und neuronale Plastizität

Die wechselnden Zustände der Umwelt und die unterschiedlichen Bedürfnisse eines Tieres erfordern eine ständige Anpassung. Tiere besitzen daher die Fähigkeit zu lernen, d.h. ihr Verhalten aufgrund vorhergehender Erfahrungen zu ändern. Die beim Lernen gewonnenen Informationen stehen auch nach einem langem Zeitintervall als Gedächtnis für die Verhaltenssteuerung zur Verfügung. Lernen und Gedächtnis beruhen auf Veränderungen von Nervenzellen und ihren Verbindungen. Dabei werden unter anderem Ionenkanäle moduliert, Enzymkaskaden aktiviert bzw. inaktiviert oder die Struktur von Neuronen verändert. Diese neuronale Plastizität scheint sowohl in Vertebraten als auch bei Invertebraten funktionelle Homologien zu besitzen (Menzel, 1990; Menzel und Müller 1996).

Die Fähigkeit zu lernen und das Gelernte im Gedächtnis zu behalten ist bei allen Tieren ausgebildet und läuft bei Wirbellosen und Wirbeltieren häufig gleich ab. Bei einem Lernprozess unterscheidet man den Lernvorgang selbst, der die Akquisition von Gedächtnis beinhaltet, sowie darauffolgende unterschiedliche Phasen der Gedächtnisbildung. Obwohl es große Unterschiede gibt in dem, was ein Tier lernen kann, wurde ein Begriffssystem entwickelt, mit dem verschiedene Lernformen beschrieben und auch verglichen werden können. Grundsätzlich wird zwischen assoziativen und nicht-assoziativen Lernformen unterschieden.

### 1.1.1 Nicht-assoziative und assoziative Lernformen

Zu den nicht-assoziativen Lernformen gehören die Habituation und die Sensibilisierung. Die Fähigkeit eines Tieres, sich an einen wiederholt auftretenden Reiz, der weder mit positiven noch mit negativen Folgen verbunden ist, zu gewöhnen und nicht mehr darauf zu reagieren, wird als Habituation bezeichnet. Sensibilisierung beschreibt die Verstärkung einer Reflexantwort aufgrund eines zusätzlichen starken Reizes.

Während bei den nicht-assoziativen Lernformen etwas über einen einzelnen Stimulus gelernt wird, kommt es bei dem assoziativen Lernen zur Verknüpfung eines neutralen Reizes mit einem Belohnungs- oder Strafreiz. Im Jahre 1927 untersuchte Pawlow die klassische Konditionierung an Hunden. Diese beginnen normalerweise beim Anblick eines Fleischstückes (unkonditionierter Stimulus, US) Speichel abzusondern (unkon-

ditionierte Reaktion, UR). Nachdem eine Zeitlang kurz vor der Darbietung des Futters ein Glockenton als neutraler Reiz (zu konditionierender Stimulus, CS) gegeben wurde, fängt der Hund bereits beim Ertönen dieser Glocke an zu speicheln (konditionierte Reaktion, CR).

CS und US müssen dabei innerhalb eines kritischen Zeitfensters und in der richtigen Reihenfolge auftreten (Kontiguität). Außerdem hängt der Erfolg der Konditionierung von der Zuverlässigkeit ab, mit der US dem CS folgt (Kontingenz). Die klassische Konditionierung ist für die experimentelle Analyse geeignet, weil unspezifische Effekte der Stimulation leicht ausgeschlossen werden können. In Versuchen erhalten Tiere der Kontrollgruppe, die nicht konditioniert wurden, gleich viele Stimulationen mit dem CS und dem US wie die konditionierten Tiere, CS und US werden aber nicht gepaart.

Eine andere Form des assoziativen Lernens ist die operante Konditionierung. Sie setzt eine aktive Beteiligung des Versuchstieres voraus. Dabei wird die Assoziation zwischen einer Aktion des Tieres und einem bedeutungsvollen Stimulus gelernt. Wie bei der klassischen Konditionierung kann dieser Stimulus sowohl appetitiv als auch aversiv sein. Das Tier lernt durch Ausführung der Aktion das Auftreten des Stimulus herbeizuführen oder zu vermeiden. Daneben gibt es noch höhere Formen des assoziativen Lernens wie das Prägungslernen oder das einsichtige Lernen. Diesen höheren Formen des assoziativen Lernens ist gemeinsam, dass der Antrieb nicht äußere Stimuli, sondern innere Zustände wie z.B. Neugierde, Harmonieempfinden oder Erwartung sind. Dies ist einer der Gründe, warum solche Lernvorgänge einer neuronalen und zellulären Analyse nur schwer zugänglich sind.

Das beim assoziativen Lernen erworbene Verhalten wird im Gedächtnis gespeichert. Dabei handelt es sich um einen dynamischen Prozess, in dessen Verlauf die Information in unterschiedlicher Weise und unter Beteiligung verschiedener neuronaler Strukturen gespeichert wird. Die Dynamik des Gedächtnisses lässt sich in mindestens zwei zeitliche Phasen einteilen: Kurzzeit- und Langzeitgedächtnis.

Das Kurzzeitgedächtnis, das durch seine begrenzte Speicherkapazität und seine Störanfälligkeit gegenüber neuen Ereignissen und amnestischen Einwirkungen charakterisiert ist, bildet sich kurz nach dem Lernvorgang aus. Dabei kommt es in vielen Systemen zu Modifikationen bereits vorhandener Proteine und Signalkaskaden. Durch einen als Konsolidierung bekannten Vorgang wird das Kurzzeitgedächtnis in eine späte Periode, das Langzeitgedächtnis, überführt. Das Langzeitgedächtnis ist

Proteinsynthese abhängig, weil die Konsolidierung des Langzeitgedächtnisses durch strukturellen Umbau gekennzeichnet ist: Bestehende Synapsen werden umstrukturiert, neue Synapsen aufgebaut (Bailey und Kandel, 1993).

### 1.1.2 Modellsysteme für die Untersuchung von Lern- und Gedächtnisphasen

Bei der Auswahl eines Organismus und eines Lernparadigmas für die Untersuchung von Gedächtnis müssen verschiedene Kriterien beachtet werden: Zum einen sollte der gewählte Organismus ein stabiles, im Labor reproduzierbares Lernverhalten zeigen und für experimentelle Eingriffe, wie etwa die lokale Injektion von Pharmaka, gut zugänglich sein. Zum anderen sollte die anatomische Struktur und möglichst auch die zellulären Schaltkreise, die für das Lernparadigma von Bedeutung sind, bekannt und geeignet für elektrophysiologische und biochemische Untersuchungen sein.

Bei der Meeresschnecke *Aplysia* sind aufgrund ihrer großen Neurone und einfachen Schaltkreise die Grundlagen der Habituation und der Sensitisierung weitgehend aufgeklärt. Die meisten Erkenntnisse wurden dabei durch die Untersuchungen des Kiemenrückziehreflexes gewonnen: Bei Berührung der Atemröhre zieht die Schnecke ihre Kiemen in die Mantelhöhle zurück. Dieser Reflex kann durch repetetive Stimulation habituiert oder durch Applikation eines starken Stimulus z.B. am Schwanz sensitisiert werden. Der an diesen Lernformen beteiligte Schaltkreis aus sensorischen Neuronen, Motor- und Interneuronen wurde identifiziert und *in vitro* Experimenten in zellulären Studien untersucht. Die an diesem Präparat beobachteten Verbesserungen der synaptischen Übertragung werden bei *Aplysia* auch als synaptische Faszilitierungen bezeichnet und treten sowohl in einer kurzzeitigen als auch in einer langzeitigen Form auf (Carew et. al., 1972; Pinsker et al., 1970; Frost et al., 1985). Ob es zu einer kurzzeitigen oder zu einer langzeitigen Faszilitierung kommt, ist abhängig von der Anzahl der Stimuli, die eine synaptische Faszilitierung auslösen. Außerdem wurde eine dritte Phase der Veränderung beschrieben, die als intermediäre Phase der synaptischen Faszilitierung bezeichnet wurde (Ghirardi et al., 1995).

Beim Modellsystem *Drosophila* wurde für Untersuchungen zum Lernen und der Gedächtnisbildung vor allem genetischen Methoden, wie die Analyse von Lern-Mutanten, verwendet. Die einfache Handhabung und Haltung der Tiere, das relativ kleine Genom sowie die Möglichkeit, unter Laborbedingungen innerhalb von 14 Ta-

gen eine neue Generation zu produzieren, führten dazu, dass *Drosophila* in den letzten Jahrzehnten zu einem weit verbreiteten Versuchstier für genetische Analysen wurde. Abgesehen von nicht-assoziativen Lernprozessen ist *Drosophila* ebenfalls zu assoziativem Lernen in der Lage. Bei der Balz-Konditionierung (courtship conditioning) lernen Fliegen-Männchen ihr Balzverhalten gegenüber einem kurz zuvor gepaarten Weibchen zu reduzieren (Siegel und Hall, 1979). Neben der Balz-Konditionierung ist vor allem das olfaktorische Vermeidungslernen etabliert (Quinn et al., 1974). Dabei werden Fliegen nacheinander zwei Düfte (CS+/CS-) präsentiert, wobei die Präsentation des ersten Dufts (CS+) mit mehreren elektrischen Schocks (US) gepaart wird. Die gelernte Assoziation zwischen Duft und elektrischem Schock wird getestet, indem anschließend den Tieren in einem T-Labyrinth beide Düfte zur Wahl gestellt werden. Tiere, die eine Assoziation zwischen Duft und elektrischem Schock gebildet haben, vermeiden den CS+ signifikant gegenüber den Kontrolltieren. Die Entwicklung von derartigen Lernparadigmen ermöglichte die Identifizierung von Genprodukten, die an Lern- und Gedächtnisprozessen entscheidend beteiligt sind (Dubnau und Tully et al., 1998). So konnten für *Drosophila* fünf verschiedene zeitliche Phasen bei der Gedächtnisbildung gezeigt werden: die Akquisition oder das Lernen (LRN), das Kurzzeitgedächtnis (STM), das Mittelzeitgedächtnis, das anästhesieresistente Gedächtnis und das Langzeitgedächtnis (LTM) (Dubnau und Tully, 1998).

Die Langzeitpotenzierung (LTP) im Hippokampus stellt eine langanhaltende Veränderung der synaptischen Übertragung zwischen einzelnen Neuronen dar. Kurze Serien von präsynaptischen Aktionspotentialen können zu einer verstärkten postsynaptischen Übertragung führen, die über Tage andauert. Da der Hippokampus, eine Struktur des limbischen Systems, eine wichtige Rolle bei bestimmten Lernformen spielt, nimmt man an, dass die LTP ein zelluläres Substrat für Lernvorgänge im Säugerhirn darstellt (Bliss und Lomo, 1973). Die Langzeitpotenzierung kann in drei Phasen unterteilt werden: die initiale Induktionsphase, frühes LTP (E-LTP) und spätes LTP (L-LTP) (zusammengefasst in Sweatt, 1999). Für die initiale Induktion der LTP spielt in den meisten Fällen die Aktivierung postsynaptischer N-Methyl-D-Aspartat (NMDA) Rezeptoren eine entscheidende Rolle, da sie die Erregungskoinzidenz detektieren. Die LTP wird wahrscheinlich durch Prozesse aufrechterhalten, die die präsynaptische Seite einbeziehen. Dabei spielen retrograde Transmitter eine Rolle. Zwar war es möglich, für einige Lernformen eine Korrelation zwischen dem

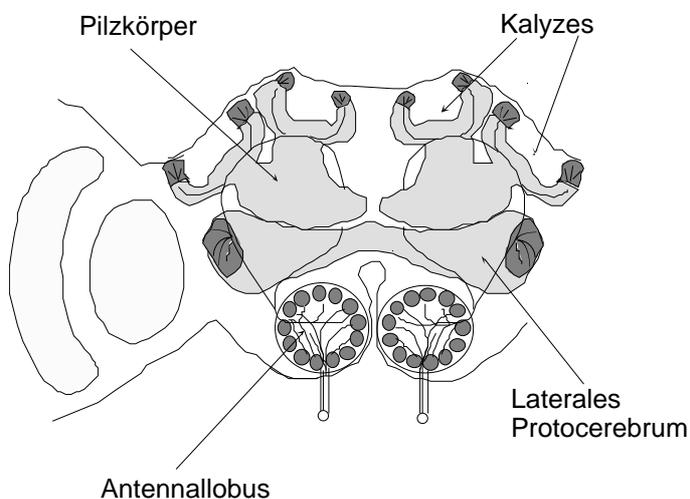
eigentlichen Lernmechanismus und der LTP herzustellen (Martin et al., 2000; Izquierdo und Medina, 1995), über einen Zusammenhang wird aber bis heute ausführlich diskutiert (Stevens, 1998; Martin et al., 2000).

Die Honigbiene besitzt trotz ihres relativ einfach gebauten Nervensystems ein sehr komplexes Verhaltensrepertoire. Neben einfachen nicht-assoziativen Lernformen wie der Habituation oder der Sensitisierung sind Bienen ebenfalls zu komplexen Lernleistungen in der Lage, wozu unter anderem die Fähigkeit gehört, Konzepte und Regeln zu bilden (Giurfa und Menzel, 1997; Giurfa et al., 2001). Für Untersuchungen von Prozessen des Lernens und der Gedächtnisbildung ist das olfaktorische Lernen besonders geeignet, da es sowohl mit freifliegenden Bienen als auch im Labor unter definierten Bedingungen durchgeführt werden kann. Die olfaktorische Konditionierung der Biene ist eine Form des assoziativen Lernens und gleicht in vielen Merkmalen der klassischen Konditionierung bei Säugetieren (Bitterman et al., 1983; Menzel, 1990; Menzel et al., 1999). Einem Duftreiz als zu konditionierendem Stimulus folgt ein unkonditionierter Stimulus in Form eines Tropfen Zuckerwassers, der an eine Antenne der Biene und die reflektorisch herausgestreckte Proboscis appliziert wird. Nach erfolgreicher Konditionierung kann die Präsentation des CS alleine einen Rüsselstreckreflex (PER = proboscis extension response) als konditionierte Reaktion auslösen (Takeda, 1961; Menzel et al., 1974). Die sich daran anschließende Gedächtnisbildung ist abhängig von der Anzahl der CS/US Präsentationen. Nach einem Trainingsdurchgang der olfaktorischen Konditionierung bildet die Biene ein Kurzzeitgedächtnis aus, das innerhalb weniger Tage wieder abklingt (Hammer und Menzel 1995). Mehrfache Konditionierung dagegen führt zur Ausbildung eines stabilen, lang anhaltenden (> 4 Tage), transkriptions- und translationsabhängigen Langzeitgedächtnisses (Wüstenberg et al., 1998; Grünbaum und Müller, 1998).

Die an der olfaktorischen Konditionierung beteiligten Neurone und Projektionsbahnen sind weitgehend beschrieben. Ein Duft wird von den Rezeptorneuronen perzipiert und über die Antennalnerven in die Antennalloben (AL = paarige, glomeruläre Neuropile) überführt. Der Antennalloben sind die primären olfaktorischen Neuropile der Insekten, in dem die Verarbeitung der olfaktorischen Information stattfindet (Arnold et al., 1985; Mobbs, 1985). Die Projektionsneurone der Antennalloben leiten die Duftinformation über drei verschiedene Trakte an andere Hirnregionen, wie das laterale Protocerebrum und die Pilzkörper (PK), weiter (Arnold et al., 1985). Die paarigen

Pilzkörper nehmen mit ihrer pilzförmigen Struktur einen großen Teil der Kopfkapsel ein. Sie bestehen aus zwei Bechern (Kalyzes), an die sich ein Stil (Pedunculus) anschließt. Dieser teilt sich in zwei Loben, den  $\alpha$ - und den  $\beta$ -Lobus.

Jeder Kalyx ist in drei Bereiche gegliedert. Außen befindet sich die Lippe, die Eingänge von olfaktorischen Bahnen erhält. Dann folgt der Kragen mit Eingängen vom optischen System. Das innerste Segment stellt der basale Ring dar, der vermutlich Eingänge sowohl aus dem olfaktorischen System als auch aus dem optischen System bezieht (Arnold, et al., 1985; Mobbs, 1985; Rybak und Menzel, 1993). Die Somata der pilzkörper-intrinsischen Zellen, den Kenyonzellen, sind innerhalb und rund um die Kalyzes angeordnet. Ihre Axone ziehen durch die Pedunkel in die Ausgangsregionen der Pilzkörper, die  $\alpha$ - und  $\beta$ -Loben. Aufgrund der multimodalen Eingänge und den Reaktionen von extrinsischen Neuronen auf sensorische Stimuli im Ausgangsbereich der Pilzkörper wird dem Pilzkörper eine wichtige Funktion bei der Integration und der Verarbeitung verschiedener Modalitäten zugesprochen (Gronenberg, 1987; Erber et al., 1987).



**Abbildung 1: Schematische Darstellung des Bienenhirns**

Dargestellt sind die Neuropile, die an der olfaktorischen Konditionierung beteiligt sind. Rezeptorneurone ziehen über die Antennalnerven in die Antennalloben und verbinden sich dort mit Interneurone und Projektionsneurone. Die Projektionsneurone der Antennalloben leiten die Duftinformation weiter an das laterale Protocerebrum und die Pilzkörper.

Der Zuckerwasserreiz wird über Rezeptorneurone wahrgenommen, welche auf der Antenne und der Proboscis lokalisiert sind. Die Axone dieser Neurone projizieren in das Unterschlundganglion (Rehder, 1989), und verschalten dort unter anderem auf eine Gruppe ventraler, nicht paariger Neurone (VUM). Die elektrische Stimulation eines dieser VUM-Neurone, des  $VUM_{mx1}$ , kann bei der olfaktorischen Konditionierung den US ersetzen (Hammer, 1993). Die Projektionsbahnen des  $VUM_{mx1}$  kreuzen sich

mit Neuronen, die an der Verarbeitung der olfaktorischen Informationen beteiligt sind, in verschiedenen Hirnbereichen: in den Antennalloben, dem lateralen Protocerebrum und in den Pilzkörpern. Die Bedeutung von AL und PK für die olfaktorische Konditionierung konnte bereits gezeigt werden. So führt eine direkt auf die Konditionierung folgende lokale Kühlung des Pilzkörpers oder der Antennalloben zu einer retrograden Amnesie (Menzel et al., 1974; Erber et al., 1980).

### 1.1.3 Molekulare Mechanismen von Lernen und Gedächtnis

Unabhängig vom Versuchstier konnte bei den Untersuchungen zu Lernen und Gedächtnis zwischen mindestens zwei verschiedenen Gedächtnisphasen unterschieden werden: Kurzzeitgedächtnis und Langzeitgedächtnis. Die molekularen Mechanismen der verschiedenen Gedächtnisphasen konnten bisher nur teilweise aufgeklärt werden.

Bei der Sensitisierung von *Aplysia* aktiviert die Stimulation am Schwanz bestimmte faszilitatorische Neurone, die daraufhin Serotonin als Transmitter freisetzen. Diese Neurotransmitterausschüttung verstärkt die synaptischen Verbindungen zwischen sensorischen Neuronen und Motorneuronen des Kiemenrückziehreflexes (Kandel und Schwartz, 1982; Klein und Kandel, 1980). Dabei bindet Serotonin an einen Rezeptor, der über ein G-Protein die Aktivität der Adenylatzyklase erhöht. Dadurch kommt es zu einem Anstieg von zyklischem AMP (cAMP) in den Synapsen der sensorischen Neurone (Bernier et al., 1982). Das zyklische AMP aktiviert die Proteinkinase A (PKA) (Castellucci et al., 1980), welche ihrerseits verschiedene Substrate phosphoryliert. Hierbei wird der Kaliumkanal, der notwendig ist für die Repolarisation des Aktionspotentials, phosphoryliert, der Kalium-Auswärtsstrom damit reduziert und das Aktionspotential in den sensorischen Neuronen verlängert (Castellucci et al., 1980; Siegelbaum et al., 1982). Durch die Verlängerung des Aktionspotentials gelangt mehr  $\text{Ca}^{2+}$  in die sensorischen Synapsen, was eine erhöhte Freisetzung von Transmitter zur Folge hat. Die gesteigerte Transmitterausschüttung führt zu einem erhöhten exzitatorischen postsynaptischen Potential in den Motorneuronen, das zu der im Verhalten beobachteten gesteigerten Reaktion beiträgt.

Bei der langzeitigen Sensitisierung von *Aplysia* kommt es zur Modifikation der Genexpression. Dabei transloziert die PKA in den Somata der beteiligten Neurone vom Zytoplasma in den Zellkern und vermittelt über die Phosphorylierung des Transkriptionsfaktors CREB (cAMP Responsive Element Binding Protein) die Induktion

von Genexpression (Dash et al., 1990; Bacskai et al., 1993; Kaang et al., 1993). Das CREB Protein, das spezifisch für langanhaltende Gedächtnisse und plastische Prozesse notwendig ist, konnte bereits in verschiedenen Systemen nachgewiesen werden.

Bei *Drosophila* gaben die selektiven Gedächtnisdefizite verschiedener Mutanten darüber Aufschluss, welche molekularen Mechanismen für die verschiedenen Gedächtnisphasen notwendig sind. Die Mutanten *dunce* und die Mutante *rutabaga* weisen Defekte im cAMP-Stoffwechsel auf und sind in der Bildung von Kurzzeitgedächtnis gestört (Tempel et al., 1983; Beyers et al., 1981; Levin et al., 1992). Eine Mutation in einem Neuropeptidgen reduziert bei der Mutante *amnesiac* hingegen selektiv das Mittelzeitgedächtnis im Bereich der ersten Stunden nach dem Training (Quinn et al., 1979; Feany und Quinn, 1995). Transgene Fliegen, in denen die Aktivität der Proteinkinase C (PKC) reduziert wurde, zeigen bei der Balz-Konditionierung kein Lernverhalten, entwickeln aber ein normales Gedächtnis (Kane et al., 1997).

Die Genprodukte von *dunce* und *rutabaga*, die entscheidend an der Gedächtnisbildung beteiligt sind, werden bevorzugt im Pilzkörper exprimiert (Nighorn et al., 1991; Han et al., 1992). Die Bedeutung der Pilzkörper für das olfaktorische Lernen von *Drosophila* wurde auch in anderen Studien gezeigt: Durch Mutationen, welche die Struktur der Pilzkörper verändern, oder durch chemisches Ausschalten von Neuroblasten, aus denen während der Entwicklung die Pilzkörper hervorgehen, werden Fliegen erzeugt, die Defekte im olfaktorischen Lernen aufweisen (Heisenberg et al., 1985; deBelle und Heisenberg, 1994). Für das Langzeitgedächtnis von *Drosophila melanogaster* ist wie bei *Aplysia* der Transkriptionsfaktor CREB essentiell notwendig. So verhindert die Überexpression einer CREB-Inhibitor Isoform vollständig die Bildung von Langzeitgedächtnis nach assoziativem Lernen (Yin et al., 1994). Dagegen führt die Expression eines CREB-Aktivators nach nur einer Trainingseinheit zur Bildung von Langzeitgedächtnis (Yin et al., 1995).

Bei der Induktionsphase der Langzeitpotenzierung nehmen die N-Methyl-D-Aspartat Rezeptoren (NMDA) als Koinzidenzdetektoren eine wichtige Funktion ein. Nur wenn Glutamat an den NMDA-Rezeptor bindet und gleichzeitig der spannungsabhängige Magnesiumblock durch Depolarisation der postsynaptischen Membran aufgehoben wird, kann der NMDA-Kanal für  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen permeabel werden (Bliss und Collingridge, 1993). Durch den Einstrom von  $\text{Ca}^{2+}$  durch aktivierte NMDA-Rezeptoren in die postsynaptische Zelle erfolgt die transiente Aktivierung verschiedener Kinasen,

insbesondere der PKC und der Ca<sup>2+</sup>-Calmodulin-abhängiger Proteinkinase (CaMK) (Malinow et al., 1989; Silva et al., 1992). In der langanhaltenden Phase der Langzeitpotenzierung kommt es zur Bildung der anhaltend aktiven PKM (Sacktor et al., 1993; Powell et al., 1994). Das sogenannte späte LTP ist ähnlich wie die Langzeitfaszilitierung bei *Aplysia* abhängig von Genexpression (Nguyen et al., 1994; Frey et al., 1988). Vermutlich wird durch den erhöhten Einstrom von Ca<sup>2+</sup> neben der CaMK auch die PKA über cAMP aktiviert. Die PKA alleine oder in Kombination mit der CaMK aktivieren durch Phosphorylierung des CREB-Proteins und möglicherweise noch andere Transkriptionsfaktoren (Sheng et al., 1990; Frey et al., 1993).

Bei der Honigbiene *Apis mellifera* ist die Gedächtnisbildung nach einer einfacher olfaktorischen Konditionierung empfindlich gegenüber amnesie-auslösende Behandlungen (Gehirnerschütterung, Drogen, elektrischer Schock) (Menzel et al., 1974; Erber et al., 1980). Dieses Gedächtnis ist transkriptions- und translations-unabhängig (Grünbaum und Müller 1998) und wird nicht beeinflusst durch die Inhibition von Stickstoffmonoxyd (NO) (Müller, 1996). Dagegen ist die Gedächtnisbildung nach mehrfacher Konditionierung, die zur Ausbildung eines stabilen Langzeitgedächtnisses führt, abhängig von Proteinsynthese und NO (Wüstenberg et al., 1998; Grünbaum und Müller, 1998; Müller, 1996). Durch die Injektion von Inhibitoren und Antisenseoligonukleotiden wurde gezeigt, dass PKA-Aktivität während des Lernens für die Bildung des Langzeitgedächtnisses (24 Stunden später) notwendig ist (Fiala et al., 1999; Müller, 2000).

Im Antennallobus von *Apis mellifera* kommt es nach der mehrfachen Konditionierung zu einem Anstieg der PKC-Aktivität, der ca. 1 Stunde nach der Konditionierung beginnt und länger als 3 Tage anhält (Grünbaum und Müller, 1998). Dieser Anstieg ist auf die erhöhte Aktivität einer konstitutiv aktiven PKC zurückzuführen und kann in zwei Phasen unterteilt werden: Die frühe Phase im Bereich von Stunden ist abhängig von proteolytischen Prozessen. Die späte Phase beginnend nach ca. 18 Stunden ist dagegen abhängig von RNA- und Proteinsynthese (Grünbaum und Müller, 1998). Wird die Bildung der konstitutiv aktiven PKC während der Konditionierung gehemmt, kommt es zu einer verminderten Gedächtnisbildung im Bereich von Stunden nach der Konditionierung. Grünbaum und Müller (1998) folgerten, dass die erhöhte PKC-Aktivität notwendig für die Bildung von Mittelzeitgedächtnis ist.

Die Aktivität verschiedener Proteinkinasen ist somit erforderlich für Prozesse des Lernens und der Gedächtnisbildung. Dabei unterscheiden sich die Aktivitäten der

einzelnen Kinasen im Zeitpunkt und in der Dauer ihres Auftretens. Die Aktivität einer oder mehrerer spezifischer Kinasen zu einem bestimmten Zeitpunkt scheint somit für die Bildung einer bestimmten Gedächtnisphase notwendig zu sein. Welche Proteinkinasen für welche Gedächtnisphasen benötigt werden und welche molekulare Mechanismen dabei eine Rolle spielen, muss im Einzelnen noch untersucht werden.

## 1.2 Proteinkinase C

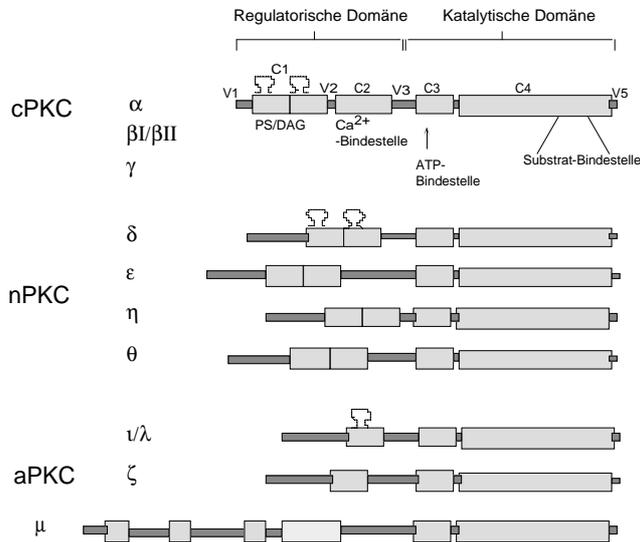
Eines der Proteine, das beim Lernen und der Bildung von Gedächtnis eine Rolle spielt, ist die Proteinkinase C (PKC). Eine Beteiligung der PKC an synaptischer Plastizität wurde in *Aplysia*, *Drosophila*, und *Apis mellifera* beschrieben (Grünbaum und Müller, 1998; Kane et al., 1997; Sossin et al., 1994). In Verhaltenversuchen konnte sowohl bei Vertebraten als auch bei Invertebraten die Notwendigkeit der PKC-Aktivität für verschiedene Lernformen und verschiedene Gedächtnisphasen nachgewiesen werden (Stemmelin et al., 1999; Sacchetti und Bielavska, 1998; Grünbaum und Müller, 1998; Kane et al. 1997).

### 1.2.1 Die PKC-Familie: Einteilung und Aktivatoren

Aus den Untersuchungen an Vertebraten sind inzwischen 12 verschiedene PKC-Isoformen bekannt, die aufgrund ihrer Primärstruktur und ihrem unterschiedlichen Bedarf an Aktivatoren in drei Klassen unterteilt werden können: konventionelle PKC (cPKC), novel PKC (nPKC) und atypische PKC (aPKC). Jede Isoform besteht aus einer regulatorischen und einer katalytischen Domäne, die sich aus homologen (C) und isoenzym-spezifischen Regionen (V) zusammensetzen (Nishizuka, 1992). Zu den homologen und konservierten Regionen der regulatorischen Domäne gehören die C 1 Region, die notwendig ist für die Bindung von Phorbolestern und Diacylglycerol (DAG), und die C 2 Region, die für die Bindung von  $Ca^{2+}$  verantwortlich ist. Die in allen Isoformen konservierte, katalytische Domäne umfasst die C 3 Region, in der die ATP Bindungsregion liegt und die C 4 Region, die die spezifische Substratbindung vermittelt.

Die Isoformen der cPKC ( $\alpha$ ,  $\beta$ I,  $\beta$ II und  $\gamma$ ) besitzen vier homologe Regionen (C 1-C4), die unterbrochen sind durch die isoenzym-spezifischen Domänen (V1-V5). Diese vier Isoformen werden durch Phosphatidylserin (PS), DAG und  $Ca^{2+}$  aktiviert (Nishizuka, 1992).

Den Isoformen der nPKC ( $\delta$ ,  $\epsilon$ ,  $\eta$  und  $\theta$ ) fehlt die C 2 Region. Sie benötigen kein  $\text{Ca}^{2+}$  und zeigen ihre volle enzymatische Aktivität in Anwesenheit von Phosphatidylserin und DAG (Nishizuka, 1992).



**Abbildung 2: Aufbau und Einteilung der PKC-Isoformen**

Nach dem Aufbau von der regulatorischen Domäne unterscheidet man drei Gruppen von Isoenzymen: Konventionelle PKC besitzen zwei Zinkfingerregionen in der C1 und eine  $\text{Ca}^{2+}$  bindende C2 Region. Nichtkonventioneller PKC fehlt die C2 Region, die für die  $\text{Ca}^{2+}$ -Bindung notwendig ist. Atypischer PKC enthalten ebenfalls keine C2 Region und verfügen nur über eine Zinkfingerregion in der C1 Region. Allen Isoformen gemeinsam ist die katalytische Domäne. Sie umfaßt die C3 Region mit der ATP Bindungsstelle sowie die C4 Region, die die spezifische Substratbindung vermittelt.

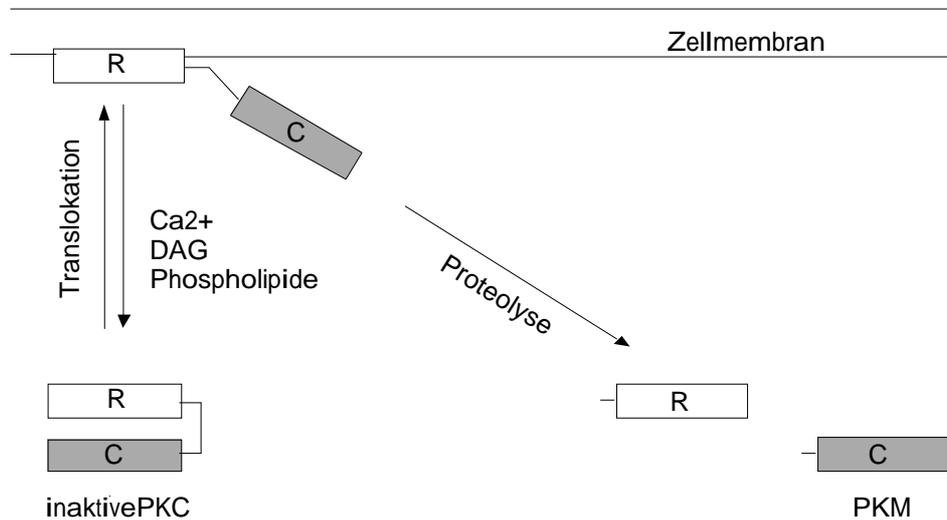
Den Isoformen der atypischen PKC ( $\iota$ ,  $\lambda$  und  $\zeta$ ) fehlen neben der C 2 Region auch Teile der C 1 Region, die statt zwei cystein-reiche Zinkfinger-Sequenzen hier nur eine aufweist. Sie benötigen lediglich Phosphatidylserine zur Aktivierung (zusammengefasst von Nishizuka, 1995). Eine weitere PKC-Isoform ist  $\mu$ PKC, welche eine neue Isoform der atypischen PKC Unterfamilie bildet (Johannes et al., 1994). Sie spielt vermutlich eine Rolle beim Zellwachstum und bei der Zelldifferenzierung (Johannes et al., 1994).

### 1.2.2 Aktivierungsmechanismen der PKC

Nach bisherigem Kenntnisstand liegt die PKC im inaktiven Zustand im Zytosol in einer gefalteten Form so vor, dass die regulatorische Domäne die katalytische maskiert (House und Kemp, 1987). Die Aktivierung der PKC ist verbunden mit einer Konformationsänderung und der Translokation an eine Membran (Abb. 3) (Wolf et al., 1985; Nishizuka, 1986; Huang, 1989).

Die Translokation der verschiedenen PKC-Isoformen kann in derselben Zelle an unterschiedlichen Stellen lokalisiert sein (Shoji et al., 1986; Papadopoulos und Hall, 1989; Mochly-Rosen et al., 1990; Cambier et al., 1987). In Krebszellen konnte gezeigt werden, dass die Stimulation des  $\alpha$ -adrenergen Rezeptors zu einer Translokati-

on der  $\beta$ IPKC vom Zytosol in den Nucleus führt. Dagegen transloziert die  $\beta$ IIPKC von fibrillären Strukturen außerhalb des Nucleus in den Perinucleus sowie an die Zellmembran und die  $\epsilon$ PKC vom Inneren des Nucleus an das Zytoskelett im Zytosol.



**Abbildung 3: Schematische Darstellung der Aktivierungsmechanismen von PKC**

Inaktive PKC liegt im Zytosol in gefalteter Form vor. Die Aktivierung durch Phospholipide, DAG und  $\text{Ca}^{2+}$  führt zur Konformationsänderung und zu einer transienten Translokation der PKC an eine Membran der Zelle, die rückgängig gemacht wird, sobald die PKC-Aktivatoren nicht mehr zur Verfügung stehen. Durch Proteolyse der transient aktivierten PKC kommt es zur Bildung des konstitutiv aktiven Fragments PKM.

PKC kann langanhaltend und von sekundären Botenstoffen unabhängig aktiviert werden, indem die regulatorische Domäne von der katalytischen Domäne abgespalten wird. Diese Proteolyse führt zur Entstehung eines konstitutiv aktiven Fragmentes, der PKM (Abbildung 3). Diese Proteolyse der PKC wird durch das  $\text{Ca}^{2+}$  abhängige Enzym Calpain vermittelt. Die membrangebundene PKC ist für diese Proteinspaltung empfindlicher als die im Zytosol freie PKC (Kishimoto et al., 1983). PKM kann nicht an eine Membran binden und kommt daher nur im Zytosol vor (Kishimoto et al., 1983).

### 1.2.3 Substrate und Funktionen von neuronaler PKC

Die unterschiedlichen Expressionen und die unterschiedlichen Aktivierungsmechanismen der verschiedenen Isoformen sowie die vielen verschiedenen Funktionen, bei denen PKC eine Rolle spielt, deuten darauf hin, dass jede Isoform spezifische zelluläre Funktionen besitzt. Auch die große Anzahl der Substrate, die von der PKC beeinflusst werden, deutet darauf hin. Chen und Huang (1992) konnten zeigen, dass

die Öffnungswahrscheinlichkeit des NMDA-Rezeptors durch PKC erhöht wird. Aus anderen Arbeiten ist bereits bekannt, dass die PKC durch Phosphorylierung an der Regulation von spannungsabhängigen Kalium-Kanälen beteiligt ist (Li et al., 1993), und dass die Aktivität präsynaptischer spannungsabhängiger  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanäle im Hippokampus ebenfalls durch PKC-Phosphorylierung kontrolliert werden (Bartschat et al., 1995). GAP-43 (B-50) und Neurogranin/RC3 sind spezifische PKC-Substrate mit unterschiedlicher synaptischer Lokalisation. Während GAP-43 (B-50) ein präsynaptisches Protein ist, findet man Neurogranin/RC3 in postsynaptischen Bereichen. Die Induktion von LTP in der CA1 Region des Hippokampus ist verbunden mit einem Anstieg der Phosphorylierung beider Substrate (Ramakers et al., 1997).

Eine weitere Funktion von PKC besteht in der Beeinflussung der Signaltransduktion in den Zellkern (zusammengefasst in Buchner, 1995). Verschiedene PKC-Isoformen wurden in verschiedenen Kompartimenten des Zellkerns nachgewiesen (Beckmann et al., 1994; Buchner, 1995). Diese PKC-Isoformen sind indirekt an der Replikation und der Reparatur von DNA beteiligt.

Für Vertebraten als auch für Invertebraten konnte somit gezeigt werden, dass PKC eine Rolle beim Lernen und der Bildung von Gedächtnis spielt. Des Weiteren weisen die verschiedenen Substrate jeder Isoform sowie die unterschiedlichen Aktivierungsmechanismen auf spezifische Funktionen der einzelnen PKC-Isoformen hin.

### 1.3 Ziel dieser Arbeit

Ziel dieser Arbeit ist es, die Rolle der PKC beim olfaktorischen Lernen und der Bildung von Gedächtnis in der Biene zu untersuchen. Die bisherigen Untersuchungen zur Rolle der PKC wurden sowohl bei *Aplysia* als auch bei der LTP in Säugetieren vornehmlich an zellulären Studien durchgeführt. Eine direkte Korrelation zwischen den im Präparat gemachten Beobachtungen und dem gezeigten Verhalten war in diesen Untersuchungen daher nicht möglich. Auch bei *Drosophila* konnte noch keine Mutante isoliert werden, bei der das Gen für eine PKC-Isoform in seiner Funktion gestört ist, um die daraus resultierenden Veränderungen im Verhalten direkt beobachten zu können.

Da die Biene über einfache und komplexe Lernformen verfügt, die neuronalen Strukturen der olfaktorischen Konditionierung auf anatomischer und elektrophysiologischer Ebene gut charakterisiert sind, habe ich sie als Modellsystem für meine Un-

tersuchung gewählt. In Verhaltensversuchen soll zunächst die Funktion der PKC durch geeignete Inhibitoren gestört werden, um die daraus resultierenden Verhaltensänderungen direkt, *in vivo*, zu beobachten. Mit Hilfe verschiedener Inhibitoren ist es vielleicht auch möglich, zwischen den einzelnen Isoformen der Proteinkinase C zu differenzieren.

Im Anschluss daran sollen mit Hilfe verschiedener biochemischer Methoden die molekularen Mechanismen der PKC untersucht werden, die notwendig für das Lernen und die Bildung von Gedächtnis sind. Aufbauend auf diesen Untersuchungen sollen dann verschiedene Fragen zur Funktion von PKC bei Lern- und Gedächtnisprozessen beantwortet werden:

Werden nicht-assoziative bzw. assoziative Lernformen durch die Inhibition der PKC-Aktivität beeinflusst?

Zu welchem Zeitpunkt ist die Aktivität der PKC notwendig für das Lernen und die Gedächtnisbildung?

Welche Isoformen der PKC sind erforderlich für Lernen und Gedächtnis?

Wird die PKC bei der olfaktorischen Konditionierung nur in den Antennalloben moduliert (Grünbaum und Müller, 1998) oder wird sie auch in anderen Neuropilen durch das Lernen beeinflusst?

Auf welche Art und Weise wird die PKC durch das Lernen und die Gedächtnisbildung moduliert (Änderung der Aktivität, Translokation der PKC)?