

### 3 Ergebnisse

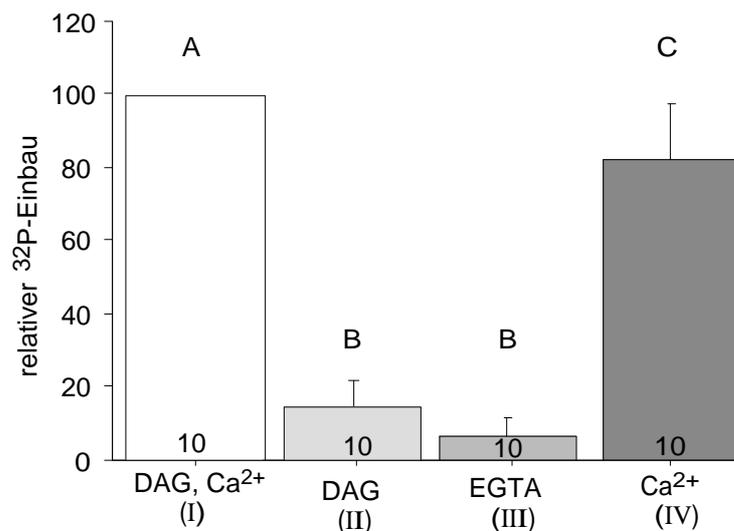
#### 3.1 Etablierung von Methoden zur Messung und Inhibition von PKC- und PKM-Aktivität

In dieser Arbeit wurde die Rolle der PKC bei Lern- und Gedächtnisprozessen der Honigbiene untersucht. Es ist bekannt, dass second messenger Kaskaden bei der Modulation von neuronaler Aktivität und bei Prozessen wie dem Lernen oder der Bildung von Gedächtnis eine zentrale Rolle spielen. Um mehr über die Funktion der PKC bei Lern- und Gedächtnisprozessen zu erfahren, ist es nötig, geeignete Substanzen zu finden, die in der Lage sind, PKC spezifisch zu beeinflussen. Mit einem geeigneten Inhibitor ist es möglich, PKC in ihrer Funktion zu stören und die daraus resultierenden Veränderungen im Verhalten *in vivo* zu beobachten. Die Ursache für auftretende Veränderungen können dann auf molekularer Ebene untersucht werden. Daher habe ich zunächst verschiedene Inhibitoren für die PKC auf Effizienz und Spezifität hin getestet. Die Anzahl der im Handel erhältlichen und in der Literatur beschriebenen PKC Inhibitoren ist sehr groß, wobei die meisten an Säugern getestet wurden. Mit Hilfe von Inhibitoren, die sich im Wirkungsmechanismus unterscheiden, war auch die Hoffnung verbunden, zwischen einzelnen PKC-Isoformen differenzieren zu können.

##### 3.1.1 Die PKC-Gesamtaktivität kann nicht auf die PKC-Isoformen unterteilt werden

Bei der Auswahl von Inhibitoren für verschiedene PKC-Isoformen muss zunächst untersucht werden, ob es bei der Bestimmung der PKC-Aktivität möglich ist, zwischen den einzelnen Isoformen zu differenzieren. Nur dann wäre es in einem weiteren Versuch möglich zu untersuchen, ob ein Inhibitor einzelne PKC-Isoformen in ihrer Aktivität beeinflusst. Alle Isoformen benötigen zur Aktivierung Phosphatidylserine (PS), unterscheiden sich aber hinsichtlich ihrer Abhängigkeit von anderen Aktivatoren. Um zwischen den einzelnen PKC-Isoformen unterscheiden zu können, wurde daher die PKC-Aktivität in An- bzw. Abwesenheit der einzelnen PKC Aktivatoren gemessen. Die Zugabe von  $\text{Ca}^{2+}$ , Diacylglycerol (DAG) und Phosphatidylserine führt zur Aktivierung aller Isoformen. Die Zugabe von DAG und PS sollte nur die nPKC- und aPKC-Isoformen aktivieren. Mit PS alleine im Phosphorylierungsansatz sollten

nur atypische PKC-Isoformen aktiviert werden. Um zu prüfen, ob die Veränderungen der PKC-Aktivität allein darauf zurückzuführen sind, dass durch die Zugabe der einzelnen PKC-Aktivatoren tatsächlich nur bestimmte PKC Isoformen aktiviert werden wurde die Aktivität der atypischen PKC in An- und Abwesenheit von  $\text{Ca}^{2+}$  gemessen. Da  $\text{Ca}^{2+}$  allein keine weiteren PKC-Isoformen aktiviert, sollte die gemessene PKC-Aktivität in diesen beiden Ansätzen gleich sein.



**Abbildung 5: Bestimmung der PKC-Aktivität in An- und Abwesenheit verschiedener PKC-Aktivatoren**

Die gleichen Proteinmengen aus Hirnhomogenaten wurden in Anwesenheit des MARCKS Protein aus Rinderhirn mit verschiedenen Zusätzen 50 Sekunden lang phosphoryliert, anschließend im SDS-Gel aufgetrennt und der  $^{32}\text{P}$ -Einbau in MARCKS densitometrisch quantifiziert. Zugewetzt wurde (I) 2 mM  $\text{Ca}^{2+}$  und 0,02  $\mu\text{g}$  Diolein, (II) 0,02  $\mu\text{g}$  Diolein, (III) 2 mM EGTA, (IV) 2 mM  $\text{Ca}^{2+}$ . Jeder Ansatz enthielten 0,8  $\mu\text{g}$  Phosphatidylserin. Alle Werte wurden auf den  $^{32}\text{P}$ -Einbau der maximalen Phosphorylierung (DAG,  $\text{Ca}^{2+}$ ) normiert. Als Negativkontrolle diente ein Ansatz ohne das MARCKS Protein. Dargestellt sind Mittelwerte  $\pm$  S.D., in den Balken ist die Zahl der Proben für die jeweilige Gruppe angegeben. Mit unterschiedlichen Buchstaben gekennzeichnete Mittelwerte sind signifikant verschieden (ANOVA-factorial,  $p < 0,05$ ,  $t$ -test).

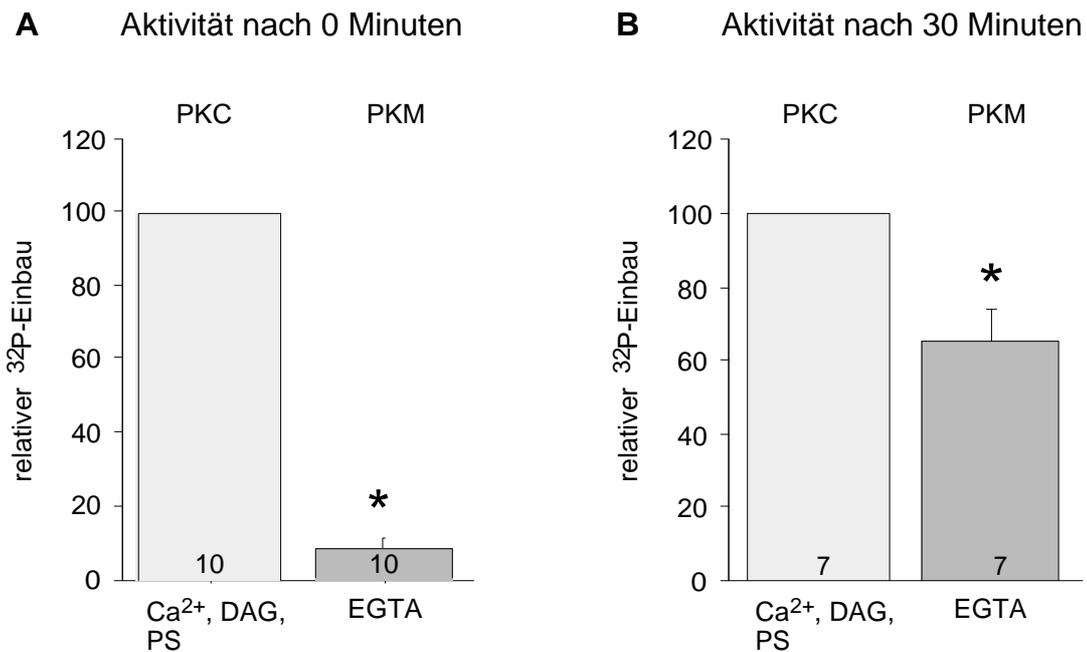
Wenn alle PKC-Aktivatoren im Phosphorylierungsansatz enthalten sind, erhält man die maximale PKC-Aktivität (Abb. 1 (I)). Die Aktivität der nPKCs in dem Ansatz mit DAG (II) und die Aktivität der aPKC-Isoformen im Versuchsansatz mit EGTA (III) liegen bei 14% bzw. 7% der maximalen PKC-Aktivität und unterscheiden sich signifikant von Ansatz (I). Bei der Bestimmung der PKC-Aktivität bewirkte allein die Zugabe von  $\text{Ca}^{2+}$  eine deutliche Phosphorylierung von ca. 80% (IV). Da  $\text{Ca}^{2+}$  alleine nicht ausreicht, um eine cPKC- oder nPKC-Isoform zu aktivieren, wurde hier die gleiche PKC-Aktivität erwartet wie in dem Ansatz mit EGTA: Nur die atypischen PKC-Isoformen sollten in diesen Ansätzen eine Aktivität zeigen. Der gemessene Unterschied in der PKC-Aktivität der Ansätze (III) und (IV) ist daher nicht eindeutig zu er-

klären. Möglicherweise waren die übrigen Aktivatoren im Homogenat in ausreichender Menge enthalten, so dass allein der Zusatz von  $\text{Ca}^{2+}$  ausreichend war, um eine fast maximale Phosphorylierung zu erhalten. Sollte dies der Fall sein, so kann man nicht eindeutig bestimmen, ob es sich in dem Ansatz mit EGTA um die Aktivität von atypischen PKC-Isoformen oder um die Aktivität von novel PKC-Isoformen handelt, die mit dem im Homogenat noch vorhandenem DAG aktiv sind. Aus diesem Grund war eine Differenzierung zwischen den verschiedenen PKC-Isoformen bei der Bestimmung der PKC-Aktivität durch die MARCKS-Phosphorylierung nicht möglich.

### 3.1.2 Eine Methode zur Differenzierung von PKC- und PKM-Aktivität

Im nächsten Versuch sollte untersucht werden, ob zwischen der PKC- und der PKM-Aktivität unterschieden werden kann. Die proteolytische Spaltung der transient aktiven PKC führt zur Entstehung des konstitutiv aktiven Fragments PKM. Damit die Bildung der PKM gewährleistet ist, wurde wie in der Arbeit von Sessoms und Mitarbeiter (1993) verfahren. Hirnhomogenat wurde zunächst mit 1 mM  $\text{Ca}^{2+}$  versetzt und für 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Im Anschluss daran wurde eine Phosphorylierung sowohl mit Phosphatidylserin, DAG und  $\text{Ca}^{2+}$  durchgeführt, um die PKC-Aktivität zu bestimmen, als auch eine Phosphorylierung mit EGTA, um die Aktivität der PKM zu messen.

Tatsächlich konnte nach Inkubation des Homogenates für 30 min eine MARCKS Phosphorylierung beobachtet werden, die mit und ohne PKC-aktivierende Substanzen ablief (Abb. 6 B). Da diese PKC-Aktivität somit "second-messenger" unabhängig ist, handelt es sich um das katalytische Fragment PKM, das sich während der Inkubationszeit gebildet hat. Dafür spricht auch, dass das MARCKS-Protein nur von der PKC und der PKM phosphoryliert wird (Grünbaum und Müller, 1998). Somit war es mir mit Hilfe von zwei unterschiedlichen Phosphorylierungsansätzen möglich, zwischen der PKC und dem katalytischen Fragment PKM zu unterscheiden: Die Aktivität der PKC wird durch die MARCKS Phosphorylierung in Anwesenheit aller PKC-Aktivatoren bestimmt. Die Aktivität der PKM wird, nach einer 30-minütigen Inkubation des Homogenates mit 1 mM  $\text{Ca}^{2+}$ , durch die MARCKS Phosphorylierung ohne PKC-Aktivatoren ermittelt. Diese zwei Phosphorylierungsprotokolle wurden verwendet, um zwischen PKC- und PKM-Aktivität zu unterscheiden.



**Abbildung 6: Bestimmung der PKM-Aktivität**

Direkt im Anschluss an die Präparation (A) bzw. nach 30 min Inkubation mit 1 mM Ca<sup>2+</sup> (B) wurden Hirnhomogenate mit verschiedenen Zusätzen 3 min lang phosphoryliert. Mittels Zugabe von Probenpuffer wurde die Reaktion gestoppt und die Proben im SDS-Gel aufgetrennt. Der <sup>32</sup>P-Einbau in MARCKS wurde densitometrisch quantifiziert. Die MARCKS-Phosphorylierung wurde in An- und Abwesenheit von PKC-Aktivatoren (Ca<sup>2+</sup>, DAG, PS) gemessen. Dargestellt sind die Mittelwerte ± S.E. sowie die Anzahl der jeweiligen Gruppen (\* p < 0,05, t-test).

### 3.1.3 Bestimmung eines spezifischen PKC-Inhibitors

Verschiedene kommerziell erworbene PKC-Inhibitoren wie Gö 7874 Hydrochlorid, Ro-31-8425, PKC Inhibitor Peptid 19-31, Bisindolylmaleimid Hydrochlorid und Chelethrin wurden im Phosphorylierungstest auf Effizienz und Spezifität getestet. Die Effizienz der Inhibitoren wurde durch Konzentrationsreihen ermittelt. Um die Spezifität eines Inhibitors zu testen, wurde neben der PKC-Aktivität auch die Aktivität der PKA bestimmt (Bestimmung der PKA-Aktivität nach Hildebrandt und Müller, 1995). Dazu wurde Homogenat aus dem Pilzkörper 2 min mit einem Inhibitor in verschiedenen Konzentrationen vorinkubiert und anschließend die relative PKC- bzw. PKA-Aktivität im Vergleich zu einer unbehandelten Kontrolle bestimmt. Aus Tabelle 1 wird ersichtlich, dass sich die einzelnen Inhibitoren in ihrer Wirkungseffizienz deutlich voneinander unterscheiden. Die besten Ergebnisse wurden mit dem PKC Inhibitor Bisindolylmaleimid Hydrochlorid erzielt (siehe auch Abb. 7). Bereits die niedrigste Konzentration von Bisindolylmaleimid Hydrochlorid bewirkte eine Reduktion der PKC-Aktivität auf ca. 35%, die mit zunehmender Inhibitorkonzentration weiter abnahm. Bei einer Konzentration von 1 µM Bisindolylmaleimid Hydrochlorid betrug die PKC-

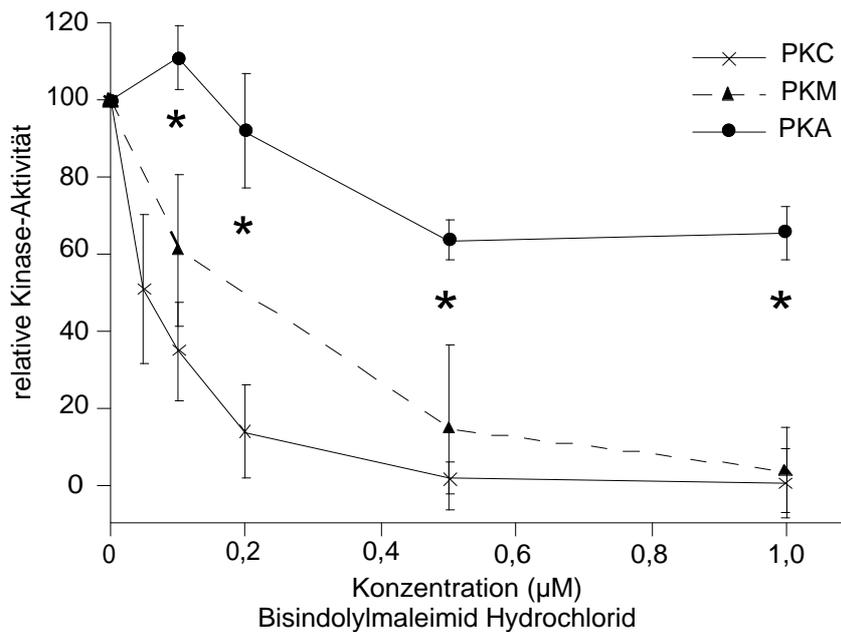
Aktivität nur noch 0,8% (Tab. 1). Hingegen wurde die Aktivität der Proteinkinase A nur wenig beeinflusst. Bei der höchsten Konzentration von Bisindolylmaleimid Hydrochlorid zeigte die PKA immer noch eine Aktivität von fast 70%. Der Inhibitor Gö 7874 Hydrochlorid war zwar genauso spezifisch wie Bisindolylmaleimid Hydrochlorid, in seiner Wirkungseffizienz jedoch deutlich schlechter (Tab. 1). Der Inhibitor Ro-31-8425 hemmte neben der PKC-Aktivität auch die PKA-Aktivität. Das PKC Inhibitor Peptid 19-31 hatte keine inhibitorischen Wirkung auf die Aktivität der PKC aus dem Gehirn der Biene (Tab. 1). Aufgrund dieser Befunde wurde in den Verhaltensexperimente Bisindolylmaleimid Hydrochlorid als PKC-Inhibitor verwendet.

Inhibitor	Konz. ( $\mu\text{M}$ )	PKC-Aktivität(%)	PKA-Aktivität(%)
Bisindolylmaleimide 1	0,1	35 $\pm$ 13 (8)	111 $\pm$ 9 (4)
	0,2	15 $\pm$ 12 (8)	92 $\pm$ 14 (4)
	0,5	1,8 $\pm$ 4 (5)	64 $\pm$ 5 (4)
	1	0,8 $\pm$ 9 (4)	66 $\pm$ 7 (3)
Gö 7874, Hydrochlorid	0,1	103 $\pm$ 17 (6)	115 $\pm$ 4 (4)
	0,2	103 $\pm$ 8 (6)	94 $\pm$ 7 (4)
	0,5	70 $\pm$ 11 (5)	72 $\pm$ 11 (4)
	1	27 $\pm$ 6 (2)	72 $\pm$ 11 (4)
Ro -31-8425	0,1	109 $\pm$ 16 (6)	86 $\pm$ 6 (4)
	0,2	73 $\pm$ 16 (6)	71 $\pm$ 5 (4)
	0,5	61 $\pm$ 15 (5)	48 $\pm$ 3 (4)
	1	25 $\pm$ 2 (2)	34 $\pm$ 9 (3)
PKC Inhibitor Peptide 19-31	0,1	111 (1)	123 (1)
	0,5	92 (1)	146 (1)
	1	105 $\pm$ 28 (2)	118 $\pm$ 13 (2)

**Tabelle 1:** Die Aktivität der PKC wurde in Anwesenheit von  $\text{Ca}^{2+}$  (2 mM), Phosphatidylserin(0,8 $\mu\text{g}$ ) und DAG (0,02 $\mu\text{g}$ ) durch die MARCKS-Phosphorylierung bestimmt. Die Aktivität der PKA wurde durch die Phosphorylierung des Phosphatase-Inhibitors 1 gemessen. Alle Werte eines Versuchsansatzes wurden auf die PKC- bzw. PKA-Aktivität normiert, die ohne Zusatz der Inhibitoren gemessen wurde. Dargestellt sind die Mittelwerte  $\pm$  S.E., in den Klammern ist die Zahl der Proben für die jeweilige Gruppe angegeben.

Um zu prüfen, ob Bisindolylmaleimid Hydrochlorid auch das katalytische Fragment PKM beeinflusst, wurde zunächst die Bildung der PKM durch Inkubation des Homogenats mit 1 mM  $\text{Ca}^{2+}$  induziert. Anschließend erfolgte die Bestimmung der PKM-Aktivität in Anwesenheit von 2 mM EGTA und verschiedenen Konzentrationen des PKC-Inhibitors. Abbildung 7 zeigt, dass die Aktivität der PKM durch Bisindolylmaleimide Hydrochlorid ebenfalls konzentrationsabhängig inhibiert wird. Dies entspricht

den Befunden von Toullec und Mitarbeitern (1991), die in ihrer Arbeit zeigten, dass Bisindolylmaleimid Hydrochlorid die Aktivität der PKC inhibiert, indem es sich an die ATP-Bindungsregion der katalytischen Domäne des Moleküls anlagert. Damit habe ich für die Honigbiene einen Inhibitor gefunden, der die PKC Aktivität spezifisch gegenüber der PKA-Aktivität inhibiert. Allerdings unterscheidet dieser Inhibitor nicht zwischen PKC- und PKM-Aktivität (Abb. 7).



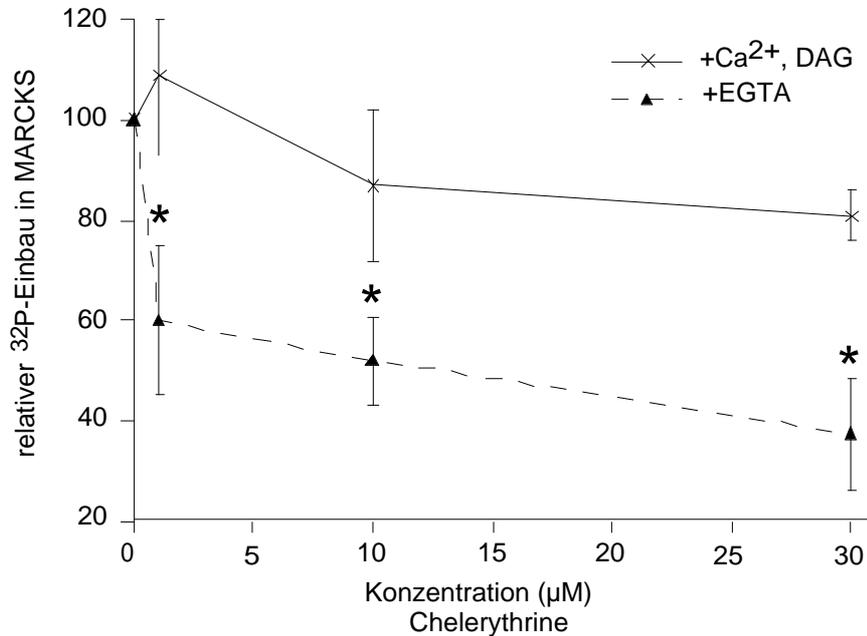
**Abbildung 7: Inhibition der PKC-, PKA- sowie der PKM-Aktivität durch Bisindolylmaleimid Hydrochlorid 1**

Für die Bestimmung der Aktivität von PKC und PKA wurden Hirnhomogenate mit dem Inhibitor für 2 min in den angegebenen finalen Konzentrationen vorinkubiert und anschließend 50 s lang phosphoryliert. Für die Bestimmung der PKM-Aktivität wurden Hirnhomogenate 30 min mit 1 mM  $\text{Ca}^{2+}$  inkubiert, der Inhibitor für 2 min in verschiedenen Konzentrationen zugegeben und anschließend die Aktivität in Anwesenheit von 2 mM EGTA durch eine MARCKS-Phosphorylierung von 3 min bestimmt. Durch die Zugabe von Probenpuffer wurden die Reaktionen gestoppt und die Proben im SDS-Gel aufgetrennt. Der  $^{32}\text{P}$ -Einbau in MARCKS bzw. Inhibitor Peptid 1 wurde densitometrisch quantifiziert. Dargestellt sind die Mittelwerte  $\pm$  S.E. Mit einem Stern gekennzeichnet sind Mittelwerte von PKC- und PKM-Aktivitätsmessungen, die sich bei derselben Inhibitorkonzentration signifikant von den Mittelwerten der PKA-Aktivität unterscheiden (ANOVA,  $p < 0,05$ ,  $t$ -test).

### 3.1.4 Bestimmung eines PKM-Inhibitors

Um zwischen der Inhibition der PKC- und der PKM-Aktivität unterscheiden zu können, wird neben Bisindolylmaleimid Hydrochlorid ein zweiter Inhibitor benötigt, der spezifisch nur die PKC oder nur die PKM inhibiert. Nur so ist es möglich die Veränderungen die durch die Behandlung mit Bisindolylmaleimid Hydrochlorid entstehen, eindeutig zuzuordnen. Durch die MARCKS-Phosphorylierung konnte neben der PKC-

Aktivität auch die Aktivität der konstitutiv aktiven PKM bestimmt werden. Dadurch war es möglich, die Wirkung eines Inhibitors auf PKC bzw. PKM getrennt voneinander zu untersuchen.



**Abbildung 8: Relative PKC- bzw. PKM-Aktivität nach Inkubation mit dem Inhibitor Chelerythrin.**

Direkt nach der Präparation wurden Pilzkörperhomogenate mit verschiedenen Konzentrationen des Inhibitors inkubiert und die relative PKC-Aktivität in Anwesenheit von Ca<sup>2+</sup>, DAG sowie PS durch die Phosphorylierung von MARCKS gemessen. Nach Inkubation des Homogenates mit 1 mM Ca<sup>2+</sup> wurde in Anwesenheit von EGTA die relative PKM-Aktivität bestimmt. Dargestellt sind Mittelwerte + S.E., mit einem Stern gekennzeichnet sind Mittelwerte, die sich bei gleichen Konzentrationen signifikant voneinander unterscheiden (ANOVA, \* p < 0,05, t-test).

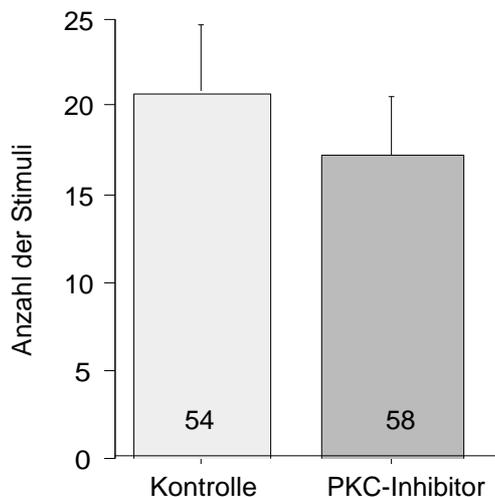
Abbildung 8 zeigt, dass der Inhibitor Chelerythrin die Aktivität der konstitutiv aktiven PKM blockiert, während die Aktivität der PKC nur wenig beeinflusst wird. Bereits bei einer Konzentration von 10 µM Chelerythrin im Phosphorylierungsansatz liegt die relative PKM-Aktivität nur noch bei ca. 50 % und sinkt mit zunehmender Konzentration weiter ab. Die relative PKC-Aktivität wird durch Chelerythrin nur wenig beeinflusst und weist auch bei einer Konzentration von 30 µM des Inhibitors noch eine relative Aktivität von ca. 85% auf. Im Vergleich zur PKC-Aktivität wurde die Aktivität der PKM durch Chelerythrin bei allen getesteten Konzentrationen signifikant reduziert.

Neben einem Inhibitor, der die PKC-Aktivität aller Isoformen inhibiert, stand somit ein weiterer zur Verfügung, der spezifisch gegen die PKM-Aktivität gerichtet ist. Damit war es möglich, in den folgenden Versuchen die PKC-Aktivität spezifisch zu inhibieren und in Verhaltensversuchen die Rolle der PKC bzw. der PKM zu untersuchen.

### 3.2 Inhibition der PKC-Aktivität während nicht-assoziativer Lernprozesse

#### 3.2.1 Habituation

Zunächst wurde untersucht, ob die Habituation des Rüsselstreckreflexes durch Inhibition der PKC beeinflusst wird. Ausgewertet wurde die Anzahl der Stimuli, die benötigt wurden, um eine vollständige Habituation herbeizuführen. In gleichmäßigem Verhältnis wurden entweder nur die linke oder nur die rechte Antenne stimuliert.



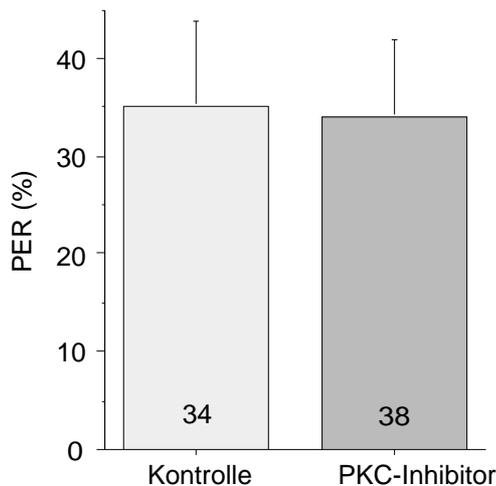
**Abbildung 9: Einfluss der PKC-Inhibition auf die Habituation**

20 min vor der Habituation wurde der Kontrollgruppe 1  $\mu$ l PBS und der experimentellen Gruppe 1  $\mu$ l Bisindolylmaleimid Hydrochlorid (1 mM), gelöst in PBS, in den Thorax injiziert. Die Bienen wurden im Abstand von 1 s an jeweils derselben Antenne mit Zuckerwasser stimuliert. Dargestellt sind die Mittelwerte der benötigten Stimuli bis zur Habituation  $\pm$  S.E.

Aus Abbildung 9 geht hervor, dass die Inhibition der PKC-Aktivität zu keiner Veränderung bei der Habituation führt. Die mit dem PKC-Inhibitor injizierten Tiere habituierten durchschnittlich ein wenig schneller als die Kontrollgruppe. Beide Gruppen unterscheiden sich trotz der hohen Anzahl an Versuchstieren nicht signifikant voneinander ( $p = 0,22$ ,  $U = 1353$ , Mann-Whitney-U-Test). Bei der Dishabituation traten bei der Inhibition der PKC-Aktivität ebenfalls keine Veränderungen im Verhalten auf.

#### 3.2.2 Sensibilisierung

Bei der Sensibilisierung handelt es sich um die Erhöhung bzw. Verstärkung einer Reflexantwort aufgrund eines vorangegangenen Reizes. Wird eine Biene mit Zuckerwasser an einer Antenne gereizt und erfährt einige Sekunden später einen Duftstimulus, so antwortet die Biene signifikant häufiger auf diesen mit einer PER (Hammer et al., 1994). Im Experiment wurden die Bienen an einer Antenne mit Zuckerwasser stimuliert und erhielten 30 s später einen Duftstimulus an beiden Antennen.



**Abbildung 10: Einfluss der PKC-Inhibition auf die Sensitisierung**

30 s nach Stimulation der Biene durch einen Zuckerwasserreiz an einer Antenne erfolgte ein Duftstimulus an beiden Antennen. Den Tieren wurde 20 min vor der Sensitisierung 1 µl Bisindolylmaleimid Hydrochlorid (1 mM) in den Thorax injiziert, die Kontrollgruppe erhielt 1 µl PBS. Dargestellt ist der prozentuale Anteil der Tiere, die mit einer PER auf den Duftstimulus reagiert haben.

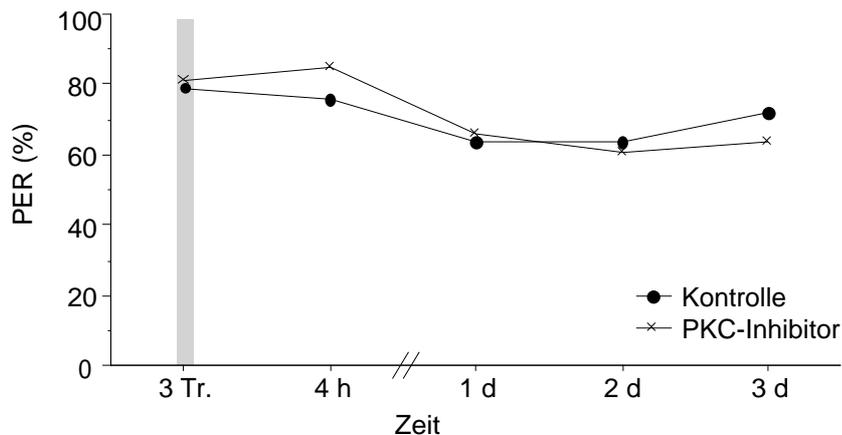
Dabei zeigte die Inhibition der PKC-Aktivität keinen Einfluss auf die Sensitisierung der Biene (Abb. 10). Der prozentuale Anteil der Tiere, die nach einer Sensitisierung auf einen Duft mit der PER reagierten, unterscheidet sich bei den beiden Gruppen kaum voneinander ( $p = 0,92$ ,  $DF = 1$ ,  $\chi^2 = 0,0092$ ,  $\chi^2$ -Test). Da weder die Sensitisierung noch die Habituation durch die Inhibition der PKC-Aktivität verändert wurden, ist anzunehmen, dass die Proteinkinase C bei den untersuchten, nicht-assoziativen Lernprozessen keine oder nur eine untergeordnete Rolle spielt.

### 3.3 Inhibition der PKC-Aktivität während und nach assoziativen Lernprozessen

Die olfaktorische Konditionierung der Biene ist eine Form des assoziativen Lernens und gleicht in vielen Merkmalen der klassischen Konditionierung bei Säugern (Bitterman et al., 1983; Menzel, 1990; Menzel et al., 1999). Einem Duftreiz, als konditionierten Stimulus (CS), folgt ein unkonditionierter Stimulus (US) in Form eines Tropfen Zuckerwassers, der an eine Antenne und die reflektorisch herausgestreckte Proboscis appliziert wird. Wie bereits erwähnt, führt die mehrfache Konditionierung zur Ausbildung eines stabilen, langanhaltenden Gedächtnisses (> 4 Tage) (Menzel 1999).

### 3.3.1 Inhibition der PKC-Aktivität während der olfaktorischen Konditionierung

Um die Rolle der PKC beim Lernen und der Bildung von Gedächtnis zu untersuchen, wurde die PKC-Aktivität während und zu verschiedenen Zeitpunkten nach der dreifachen Konditionierung durch Bisindolylmaleimid Hydrochlorid inhibiert. Dazu erfolgte eine Mikroinjektion von 1  $\mu$ l des Inhibitors (1 mM) in den Thorax der Tiere. Als Kontrollgruppe dienten Tiere, die mit PBS injiziert wurden. Mit Hilfe des CS wurde immer 4, 24, 48, 72 und 96 Stunden nach dem Lernen die konditionierte PER getestet um die Bildung von Gedächtnis zu kontrollieren. Zunächst wurde die PKC-Aktivität während der Konditionierung inhibiert. Abbildung 11 zeigt, dass die mit dem PKC-Inhibitor Bisindolylmaleimid Hydrochlorid injizierten Tiere sich zu keinem Zeitpunkt signifikant von den PBS-injizierten Kontrolltieren unterscheiden (4 h:  $p > 0,19$ ,  $\chi^2$ -Test; 24 h:  $p > 0,81$ ,  $\chi^2$ -Test; 48 h:  $p > 0,72$ ,  $\chi^2$ -Test; 72 h:  $p > 0,52$ ,  $\chi^2$ -Test). Die Inhibition der PKC-Aktivität während der Konditionierung beeinträchtigt somit den assoziativen Lernprozess der Biene nicht.



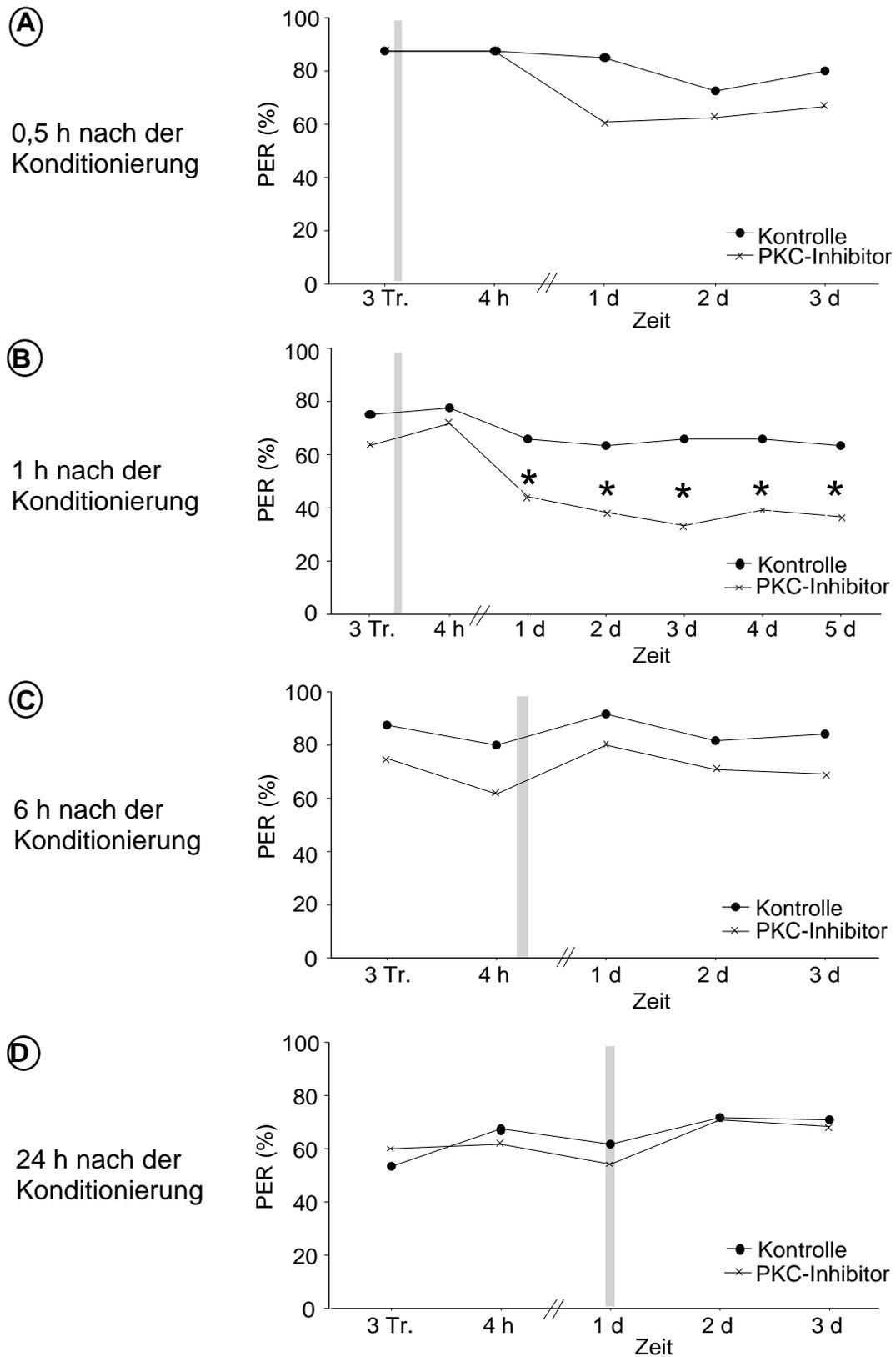
**Abbildung 11: Inhibition der PKC-Aktivität während der olfaktorischen Konditionierung**

1  $\mu$ l Bisindolylmaleimide Hydrochloride (1 mM) wurde 20 min vor der Konditionierung in den Thorax injiziert. Bei der Kontrollgruppe wurde 1  $\mu$ l PBS injiziert. Nach einer Dreifach-Konditionierung mit einem Inter-Trial-Intervall von 2 min wurde das Gedächtnis der Versuchstiere zu unterschiedlichen Zeiten nach dem Training durch Applikation des CS getestet. Dargestellt ist der prozentuale Anteil der Tiere, die auf den CS mit dem Rüsselreflex reagiert haben. Der schraffierte Balken kennzeichnet den Zeitpunkt der PKC-Inhibition.

### 3.3.2 Inhibition der PKC-Aktivität bei der Gedächtnisbildung

In weiteren Versuchen wurde untersucht, inwieweit die Aktivität der PKC für die Gedächtnisbildung notwendig ist. Durch Inhibition der PKC-Aktivität zu verschiedenen Zeitpunkten (0,5 h, 1 h, 6 h, 24 h) nach einer mehrfachen Konditionierung sind Rückschlüsse auf die Notwendigkeit der PKC-Aktivität für die verschiedenen Gedächtnisphasen möglich. Zunächst wurde die Inhibition der PKC-Aktivität 0,5 h nach dem Training untersucht. Aus Abbildung 12A wird ersichtlich, dass zu den Kontrolltieren kein signifikanter Unterschied besteht. Dementsprechend ist die Aktivität der PKC eine halbe Stunde nach der Konditionierung nicht notwendig für die Gedächtnisbildung.

Im Gegensatz dazu führt die Inhibition der PKC-Aktivität eine Stunde nach der Konditionierung zu einer signifikanten Reduktion bei der Gedächtnisbildung (Abb. 12B). Diese Reduktion beginnt 24 h nach der olfaktorischen Konditionierung und hält über die gesamte Messperiode (120 h) an. Die Gedächtnisbildung 4 h Stunden nach der Konditionierung zeigt keine Veränderung.



**Abbildung 12: Inhibition der PKC-Aktivität bei der Gedächtnisbildung**

Zu verschiedenen Zeitpunkten nach der Dreifach-Konditionierung wurde den Bienen 1 µl Bisindolylmaleimide Hydrochloride (1 mM) bzw. 1 µl PBS (Kontrolle) in den Thorax injiziert. Zu unterschiedlichen Zeiten nach dem Training wurde durch Applikation des CS das Gedächtnis getestet. Dargestellt ist der prozentuale Anteil der Tiere, die auf den CS mit einer PER reagiert haben. Mit einem Stern gekennzeichnet sind Werte der Experimentalgruppe, die sich signifikant von den entsprechenden Werten der Kontrollgruppe unterscheiden ( $p < 0,05$ ,  $\chi^2$ -Test). Der schraffierte Balken zeigt den Zeitpunkt der PKC-Inhibition.

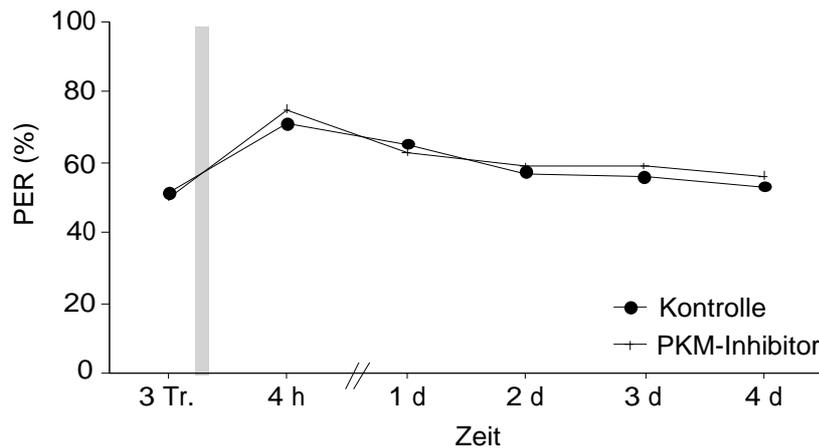
In den folgenden Versuchen sollte untersucht werden, ob die Inhibition der PKC-Aktivität auch zu einem späteren Zeitpunkt Einfluss auf das Gedächtnis hat.

Sowohl die Inhibition der PKC-Aktivität nach 6 als auch nach 24 Stunden erzeugte keinen signifikanten Unterschied zwischen den Tieren mit PKC-Inhibitor und den Kontrolltieren. Die Blockierung der PKC-Aktivität 6 bzw. 24 Stunden nach der Konditionierung hatte also ebenfalls keine Auswirkung auf die Gedächtnisbildung (Abb. 12C+D). Damit habe ich zum ersten Mal gezeigt, dass die Inhibition der PKC-Aktivität einen direkten Einfluss auf die Bildung von Langzeitgedächtnis bei der Honigbiene hat. Die Bedeutung der PKC-Aktivität für die Gedächtnisbildung wurde zu vier verschiedenen Zeitpunkten nach der olfaktorischen Konditionierung untersucht. Nur zu einem Zeitpunkt, nämlich eine Stunde nach dem Training, führte die Inhibition der PKC-Aktivität zu einer Reduktion bei der Gedächtnisbildung.

### **3.4 Wird die Reduktion im Gedächtnis durch die Inhibition der PKC- oder der PKM-Aktivität verursacht?**

Der in den bisher durchgeführten Verhaltensversuchen verwendete Inhibitor war Bisindolylmaleimid Hydrochlorid. Dieser Inhibitor beeinflusst neben der PKC-Aktivität auch die Aktivität der konstitutiv aktiven PKM (Abb. 7). Es ist daher nicht klar, ob die gezeigte Reduktion der Gedächtnisbildung (Abb. 12B) auf fehlende PKC-Aktivität oder fehlende PKM-Aktivität zurückzuführen ist. Möglicherweise ist für die Etablierung eines stabilen Langzeitgedächtnisses auch die Aktivität beider Kinasen notwendig. Wenn die Aktivität der PKM für die Gedächtnisbildung notwendig ist, sollte die Inhibition allein der PKM ebenfalls zu einer Reduktion bei der Gedächtnisbildung führen. Um dies zu überprüfen, habe ich mit Hilfe des Inhibitors Chelerythrin die Aktivität der PKM zum kritischen Zeitpunkt (1 h nach der Konditionierung) blockiert.

Die Inhibition der PKM alleine führte jedoch zu keinen Veränderungen im Verhalten (Abb 13, für alle getesteten Zeitpunkten gilt  $p > 0,71$ ;  $\chi^2$ -Test). Somit handelt es sich nicht um die Aktivität der PKM, sondern um die der PKC, die eine Stunde nach der olfaktorischen Konditionierung notwendig ist für die Bildung von Langzeitgedächtnis.



**Abbildung 13 Inhibition der PKM-Aktivität 1 h nach der Konditionierung**

Den Bienen wurde 1  $\mu$ l Chelerythrin (1 mM) bzw. 1  $\mu$ l PBS (Kontrolle) in den Thorax injiziert. Zu unterschiedlichen Zeiten nach dem Training wurde durch Applikation des CS das Gedächtnis getestet. Dargestellt ist der prozentuale Anteil der Tiere, die auf den CS mit dem Rüsselreflex reagiert haben. Der schraffierte Balken zeigt den Zeitpunkt der PKC-Inhibition.

### 3.5 Quantifizierung der PKC nach assoziativen Lernprozessen

Nach dem bisherigen Kenntnisstand ist die aktive PKC membrangebunden, während die inaktive Form im Zytosol vorliegt (Wolf et al., 1985; Nishizuka, 1986; Huang, 1989). Der Übergang zwischen diesen beiden physiologischen Zuständen wird als Translokation der PKC bezeichnet. Um mehr über die Rolle der PKC bei den molekularen Mechanismen von Lernen und Gedächtnis zu erfahren, wurde in den folgenden Versuchen die PKC der Pilzkörper untersucht. Die Pilzkörper wurden gewählt, da sie entscheidend an der olfaktorischen Gedächtnisbildung beteiligt sind (Erber et al., 1980; Müller, 1996) und da die Proteinkinase C in den Antennalloben, aber vor allem in den Pilzkörpern exprimiert wird.

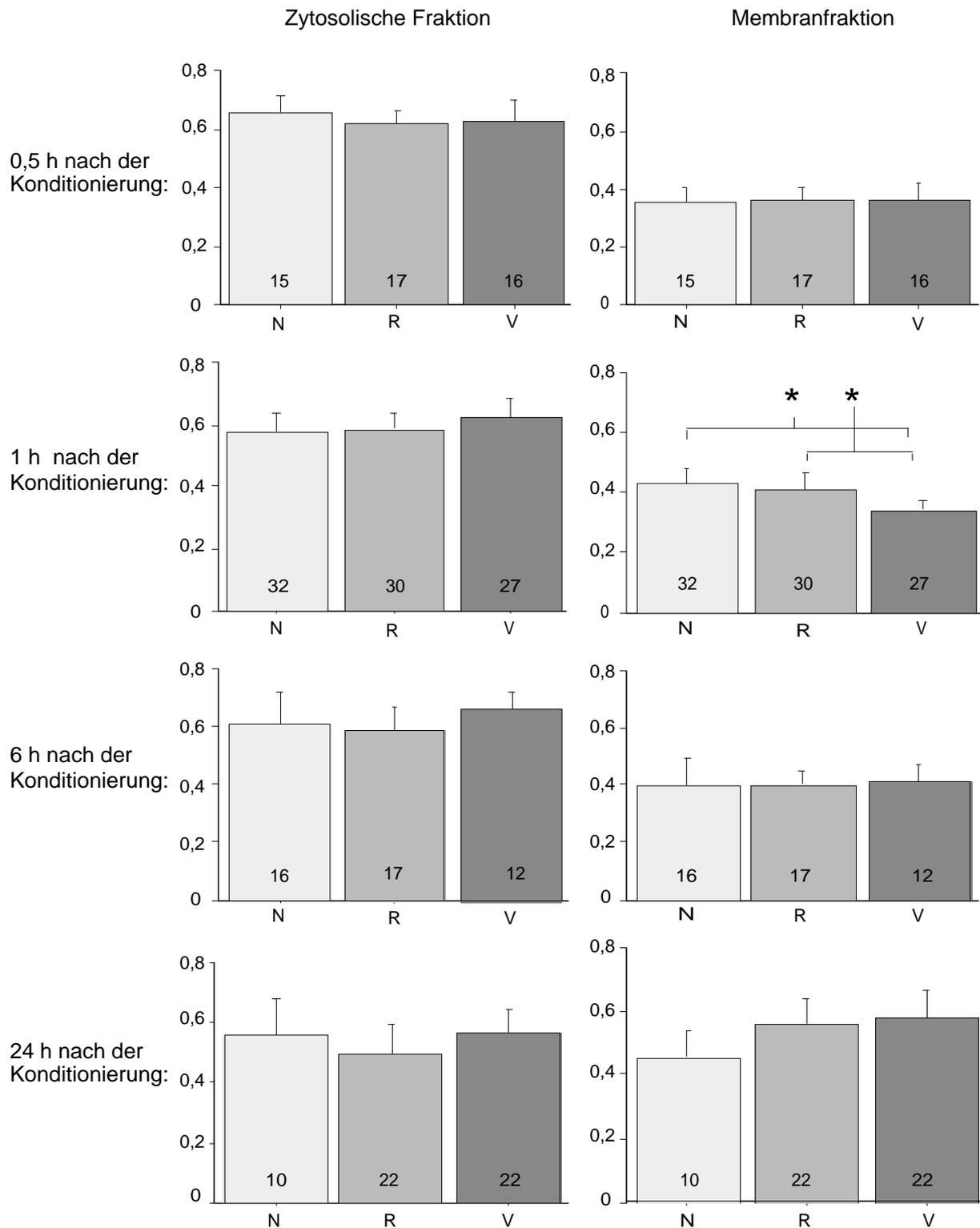
#### 3.5.1. Eine Stunde nach dem Training wird weniger membrangebundene PKC detektiert

Zunächst wurde mit Hilfe der ELISA Technik die relative Menge der PKC zu verschiedenen Zeitpunkten nach der olfaktorischen Konditionierung bestimmt. Um erste Hinweise auf lern-induzierte Veränderungen der PKC zu erhalten, wurden vorwärts- und rückwärtskonditionierte sowie unstimulierte Tiere untersucht. Rückwärtskonditionierte Tiere bieten sich als Kontrollgruppe an, weil sie mit den gleichen Reizen behandelt werden wie die Experimentalgruppe. Der Unterschied besteht nur in der Reihenfolge von CS und US, wobei eine Rückwärts Paarung von CS und US nicht zu

assoziativem Lernen führt. Auftretende Veränderungen der PKC, die sich nur bei konditionierten Tieren zeigen, müssen daher auf das Lernen und die Bildung von Gedächtnis zurückgeführt werden. Allen Versuchstieren wurde in maximal 2 min die Pilzkörper herauspräpariert, in PBS homogenisiert und anschließend Proteinkinase C quantifiziert. Um eine mögliche Translokation der PKC nachzuweisen, wurde zunächst das Gesamthomogenat eines Pilzkörpers durch Zentrifugation in zwei Fraktionen, eine mit den löslichen Bestandteilen des Zytosols und eine mit den festen membranösen und Zellkernbestandteilen, getrennt. Anschließend wurde die PKC Menge aus beiden Fraktionen bestimmt. Im Folgenden werden die beiden Fraktionen der Pilzkörperhomogenate als „Membranfraktion“ und „zytosolische Fraktion“ bezeichnet. Der in den ELISA Untersuchungen verwendete Antikörper zur Detektion der PKC war 2A6. Dieser monoklonale Antikörper ist spezifisch gegen PKC aus der Biene (Grünbaum 1997).

Abbildung 14 zeigt die Mittelwerte der PKC Mengen aus den Membranfraktionen und den cytosolischen Fraktionen der einzelnen Proben. Die relative Verteilung zwischen der Membranfraktion und der zytosolischen Fraktion zeigt, dass sich ca. 60% der PKC Gesamtmenge in der zytosolischen Fraktion befinden, während die übrigen 40% in der Membranfraktion lokalisiert sind. Dies entspricht den bereits bekannten Ergebnissen (Grünbaum und Müller, 1998).

In der Membranfraktion kommt es eine Stunde nach der 3-Trail-Konditionierung zu einer signifikanten Reduktion der PKC Menge. In der zytosolischen Fraktion der gleichen Gruppe kommt es zum gleichen Zeitpunkt zu einem leichten Anstieg der PKC Menge. Diese Beobachtung ist möglicherweise auf eine Translokation der PKC von der Membran ins Zytosol zurückzuführen. Da es sich aber in der zytosolischen Fraktion nur um einen nicht signifikanten Anstieg handelt, der nur halb so groß ist wie die Reduktion in der Membranfraktion, wird eine Translokation der PKC ausgeschlossen. Auch ein Abbau der PKC kann ausgeschlossen werden, denn bereits eine Stunde später weisen dreifach konditionierte Bienen keinen signifikanten Unterschied in der PKC-Menge im Vergleich zu den Kontrolltieren auf (nicht gezeigt).



**Abbildung 14: Verteilung von PKC in den Kenyonzellen zu verschiedenen Zeitpunkten nach der olfaktorischen Konditionierung**

Die Pilzkörper wurden 0,5 h, 1 h, 6 h, und 24 h nach der dreifachen Vorwärts- (V) bzw. Rückwärtskonditionierung (R) präpariert und durch Zentrifugation in eine zytosolische Fraktion und eine Membranfraktion getrennt. Parallel wurden die Pilzkörper nicht trainierter Bienen (N) präpariert. Mit Hilfe der ELISA-Technik wurde die PKC Menge in beiden Fraktionen bestimmt. Dargestellt sind die Mittelwerte  $\pm$  S.E.; in den Balken ist die Anzahl der Proben für die jeweilige Gruppe von Tieren angegeben. Die Mittelwerte, die sich signifikant voneinander unterscheiden sind mit einem Stern gekennzeichnet (ANOVA,  $p < 0,05$ ,  $t$ -test).

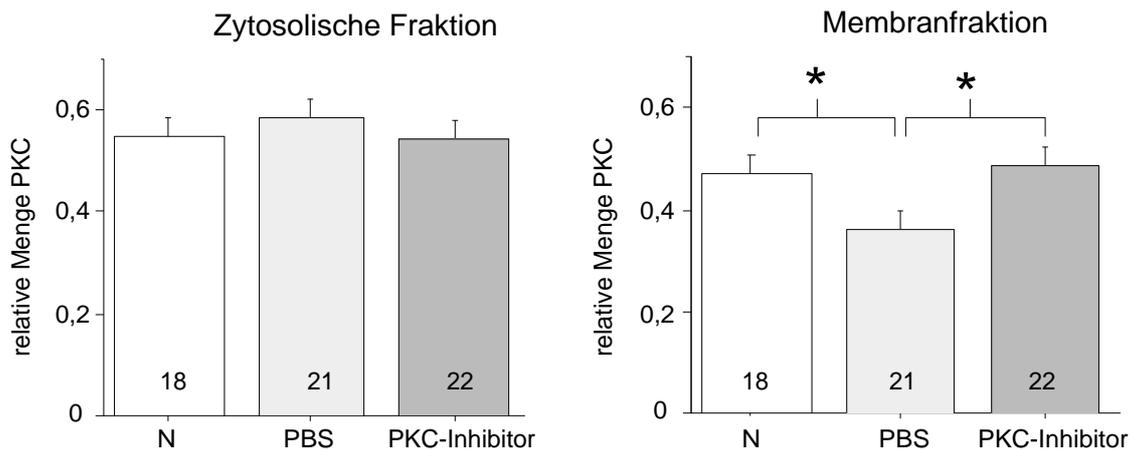
Die Rückwärts Paarung von CS und US führte eine Stunde nach der Konditionierung zu keiner Veränderung der PKC Menge in der Membranfraktion. Die beobachtete Reduktion wird somit nur durch die CS/US-Vorwärts Paarung ausgelöst, die auch ein Langzeitgedächtnis induziert. Zu den anderen gemessenen Zeitpunkten konnte in der Membranfraktion kein Unterschied zwischen der PKC Menge der verschiedenen Gruppen beobachtet werden. Die PKC Menge in den zytosolischen Fraktionen wies zu den gemessenen Zeitpunkte keinen signifikanten Unterschied zwischen den verschiedenen Gruppen auf.

Die Ergebnisse der Verhaltensversuche zeigten, dass für die Gedächtnisbildung die Aktivität der Proteinkinase C eine Stunde nach der olfaktorischen Konditionierung notwendig ist (Abb. 12B). In diesem Versuch konnte zum gleichen Zeitpunkt nach der olfaktorischen Konditionierung eine Reduktion der PKC Menge in der Membranfraktion der Pilzkörper beobachtet werden. Beide Beobachtungen wurden also zum gleichen Zeitpunkt gemacht. Daher besteht möglicherweise ein direkter Zusammenhang, was in den folgenden Versuchen geprüft werden sollte.

### **3.5.2 Die Inhibition der PKC-Aktivität verhindert die Reduktion der membran- gebundenen PKC**

Im nächsten Versuch wurde geprüft, ob die lern-induzierten Veränderungen der PKC Menge in der Membranfraktion und die Inhibition der PKC-Aktivität, die zu einer Reduktion bei der Gedächtnisbildung führt, voneinander abhängig sind. Genauso wie in den Verhaltensversuchen wurde die PKC-Aktivität eine Stunde nach der dreifachen Konditionierung inhibiert und anschließend der PKC-Gehalt der Membranfraktion und der zytosolischen Fraktion aus den Pilzkörpern jeder Biene bestimmt. Als Kontrolle wurde die PKC-Menge von Bienen gemessen, die konditioniert und statt des PKC-Inhibitors, mit PBS injiziert wurden. Außerdem wurde die PKC-Menge einer weiteren Kontrollgruppe bestimmt, die nicht konditioniert und mit PBS injiziert wurden.

Auch in diesem Versuch wurde eine signifikante Reduktion der PKC Menge bei den Bienen, die eine Stunde zuvor konditioniert wurden, beobachtet (Abb 15). Die Tiere, die nach der Konditionierung zusätzlich mit dem PKC Inhibitor injiziert wurden, zeigen im Vergleich zu den unbehandelten Bienen keine Reduktion im PKC-Gehalt der Membranfraktion.



**Abbildung 15: Quantifizierung der PKC aus dem Pilzkörper 1 h nach der olfaktorischen Konditionierung bei gleichzeitiger Inhibition der PKC-Aktivität**

30 min nach der dreifachen Vorwärtskonditionierung erfolgte die Injektion von 1 µl Bisindolylmaleimide Hydrochloride (1 mM) bzw. PBS in den Thorax. Eine weitere halbe Stunde später wurden die Pilzkörper präpariert und durch Zentrifugation in die zytosolische Fraktion und die Membranfraktion getrennt. Die PKC-Menge in beiden Fraktionen wurde mit Hilfe der ELISA-Technik mit dem monoklonalen Antikörper 2A6 bestimmt. Als zusätzliche Kontrolle wurden nicht konditionierte Bienen verwendet (N). Dargestellt sind die Mittelwerte ± S.E.. In den Balken ist die Zahl der Proben für die jeweilige Gruppe angegeben. Mit einem Stern gekennzeichnete Mittelwerte einer Gruppe unterscheiden sich signifikant voneinander (ANOVA,  $p < 0,05$ ,  $t$ -test).

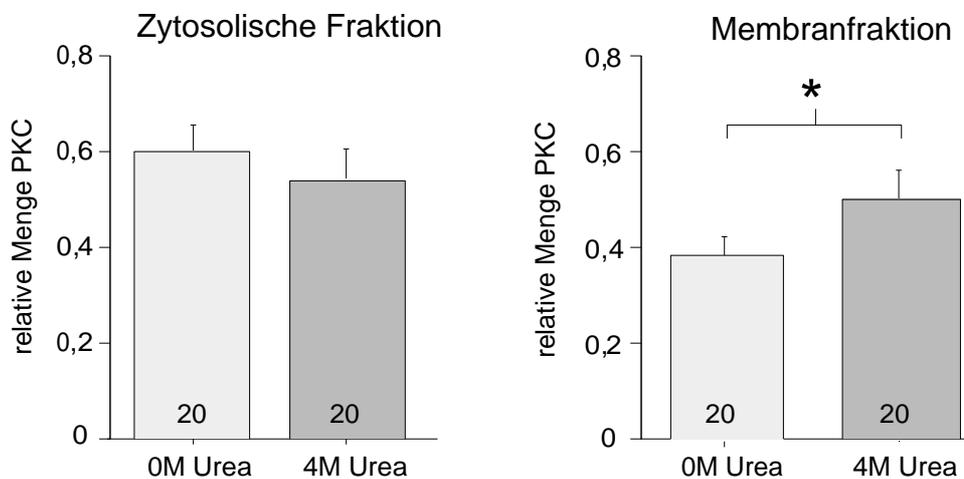
Die Inhibition der PKC-Aktivität, die nach der Konditionierung zu einer Verminderung im Gedächtnis führt, verhindert eine lern-induzierte Reduktion in der Membranfraktion. Somit konnte ich zeigen, dass ein direkter Zusammenhang zwischen der Inhibition der PKC-Aktivität und der beobachteten Veränderung der PKC-Menge in der Membranfraktion besteht.

### 3.5.3. Hinweise auf Komplexbildung durch Aufarbeitung mit Harnstoff und Trypsin

In den folgenden Versuchen wurde die Veränderung der PKC Menge eine Stunde nach der Konditionierung weiter untersucht. Da die beobachtete Reduktion der PKC in der Membranfraktion weder durch Translokation noch durch Abbau der PKC erklärt werden kann, muss es sich um eine andere Veränderung der PKC handeln, die mit den bisher angewendeten Methoden nicht detektiert wurden. In bisherigen Untersuchungen wurde PKC mit Hilfe des monoklonalen Antikörpers 2A6 nachgewiesen. Ein monoklonaler Antikörper bindet an ein bestimmtes Epitop des Proteins. Ob dieses Epitop im nativen Protein frei zugänglich ist, kann nicht vorhergesagt werden. Wenn durch die Bildung von Proteinkomplexen oder durch eine verstärkte Verankerung an die Membran das Epitop unzugänglich ist, verringert sich die Menge der

PKC, die durch den Antikörper nachgewiesen werden kann. Um zu testen, ob möglicherweise Proteinkomplexe die Stärke des Signals beeinflussen, wurden Pilzkörperhomogenate mit Harnstoff (Urea) behandelt. Dieser ersetzt Wasser in Proteinen und Proteinkomplexen, wodurch Protein-Verbindungen durch hydrophobe Wechselwirkungen aufgebrochen werden. Wenn Proteinkomplexe einen Einfluss auf die Signalstärke des Antikörpers haben, sollte nach einer Behandlung mit Harnstoff die vom Antikörper nachgewiesene PKC-Menge erhöht sein.

Jede Membran- bzw. zytosolische Fraktion wurde in zwei gleich große Teile aufgetrennt und entweder Harnstoff oder Puffer (Kontrolle) hinzugefügt. Anschließend wurde mit Hilfe der ELISA-Technik die relative PKC-Menge gemessen.

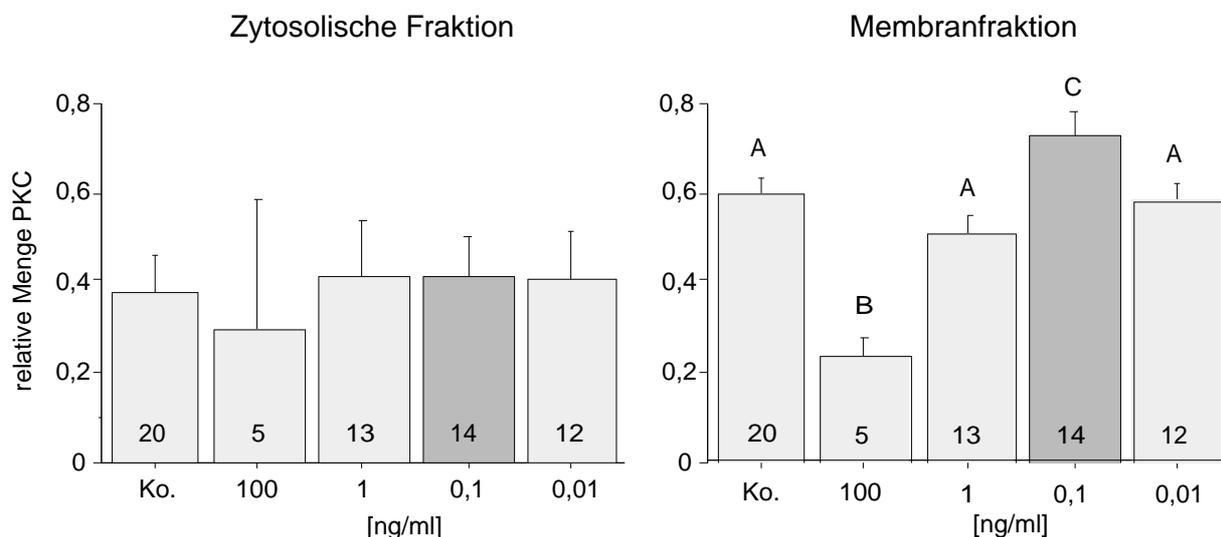


**Abbildung 16: Aufarbeitung von Homogenaten mit Harnstoff**

Pilzkörper wurden homogenisiert und durch Zentrifugation in eine zytosolische Fraktion und eine Membranfraktion getrennt. Jede Fraktion wurde geteilt und mit der gleichen Menge Harnstoff (Endkonzentration 4M) bzw. PBS aufgefüllt. Anschließend wurde die PKC-Menge jeder Probe mit Hilfe der ELISA-Technik bestimmt. Dargestellt sind die Mittelwerte  $\pm$  S.E.. In den Balken ist die Zahl der Proben für die jeweilige Gruppe angegeben. Mit einem Stern gekennzeichnet sind Mittelwerte, die sich signifikant voneinander unterscheiden (t-test  $p < 0,05$ ).

Aus den Diagrammen in Abbildung 16 geht hervor, dass sich nach einer Aufarbeitung mit Harnstoff die nachweisbare PKC Menge der Membranfraktion signifikant erhöht. Die zytosolische Fraktion zeigt keinen signifikanten Unterschied zwischen den verschiedenen Gruppen. Diese Beobachtungen sind ein erster Hinweis darauf, dass die Antikörper-Domäne bei einem Teil der PKC der Membranfraktion maskiert ist. Ein gewisser Anteil der an der Membran gebundenen PKC ist somit für den verwendeten Antikörper nicht zugänglich. Ob die Maskierung durch andere Proteine oder durch eine Konformationsänderung der PKC zustande kommt, kann durch die Behandlung mit Harnstoff nicht geklärt werden.

Um die Ergebnisse zu bestätigen, wurde die limitierte Proteolyse, eine weitere Methode um Proteinkomplexe nachzuweisen, durchgeführt. Während durch die Behandlung mit Urea Verbindungen gelöst werden, ist Trypsin als proteolytisches Enzym in der Lage, Proteine zu spalten. Eine hohe Konzentration von Trypsin oder eine lange Inkubationszeit führen zu einem völligen Proteinverdau, so dass das vom Antikörper detektierte Signal kleiner wird. Kleinere Konzentrationen von Trypsin führen zu einem begrenzten Verdau der Proteine, bei dem die Antikörperbindestellen freigelegt werden. Nach einer Behandlung des Homogenats mit Trypsin in einer relativ hohen Konzentration (100 ng/ml) kommt es zu einem deutlichen Abbau der PKC. Dies wurde sowohl in der zytosolischen Fraktion als auch in der Membranfraktion beobachtet (Abb.17). Bei niedrigeren Trypsinkonzentrationen ( ab 1 ng/ml) sind in der zytosolischen Fraktion keine Veränderungen im Vergleich zur Kontrollgruppe erkennbar. Dagegen kommt es in der Membranfraktion bei einer Trypsinkonzentration von 0,1 ng/ml zu einer signifikanten Erhöhung der relativen Menge PKC. Dieses Ergebnis deutet ebenfalls darauf hin, dass ein limitierter Abbau durch das Auftrennen von Proteinkomplexen die detektierbare Menge PKC erhöht. Ein Teil der PKC interagiert somit mit anderen Proteinen. Die Ergebnisse bestätigen also die Interpretation der Versuche mit Harnstoff.



**Abbildung 17: Aufarbeitung von Homogenaten mit Trypsin**

Pilzkörper wurden homogenisiert und durch Zentrifugation in eine zytosolische Fraktion und eine Membranfraktion getrennt. Jede Fraktion wurde geteilt und Trypsin in den angegebenen Konzentrationen hinzugefügt. Die PKC-Menge jeder Probe wurde mit Hilfe der ELISA-Technik quantifiziert. Dargestellt sind die Mittelwerte  $\pm$  S.E. In den Balken ist die Zahl der Proben für die jeweilige Gruppe von Tieren angegeben. Mit verschiedenen Buchstaben gekennzeichnete Mittelwerte unterscheiden sich signifikant voneinander (ANOVA.  $p < 0,05$ , t-test).

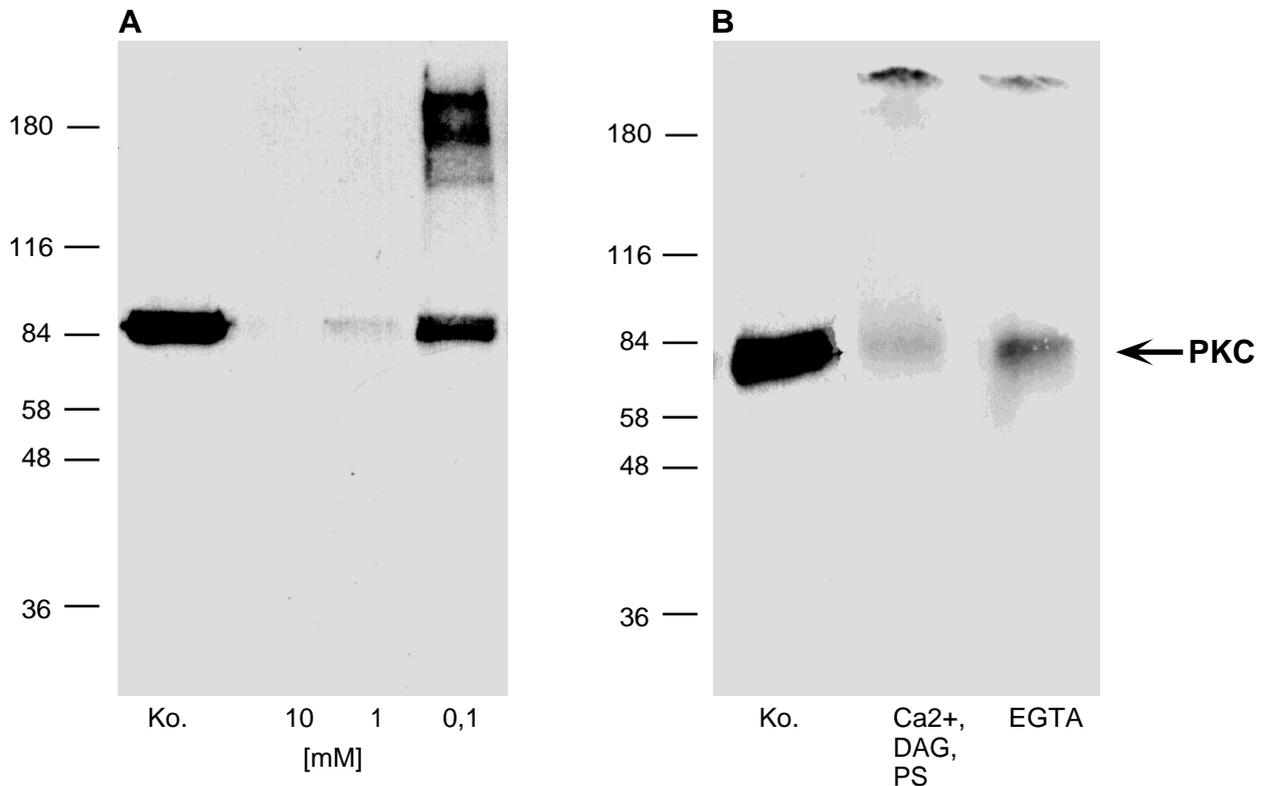
Neben der Bedeutung der PKC-Aktivität für das Langzeitgedächtnis eine Stunde nach der Akquisition wurde zum gleichen Zeitpunkt eine Veränderung der PKC-Menge in der Membranfraktion beobachtet. Ein direkter Zusammenhang zwischen beiden Beobachtungen wurde ebenfalls nachgewiesen (Abb. 15). Die letzten *in vitro* Versuche deuten darauf hin, dass PKC an andere Proteinen bindet und mit diesen Proteinkomplexe bildet. Auch in anderen Systemen konnte bereits gezeigt werden, dass PKC mit anderen Proteinen interagiert und dass diese Protein-Verbindungen spezifische Funktionen besitzen (Mochly-Rosen et al., 1991; Daw et al., 2000). Was für Proteine und wie viel verschiedene mit PKC im Pilzkörper interagieren, muss in weiteren Versuchen geklärt werden.

### 3.6 Direkter Nachweis von PKC-Proteinkomplexen

Mit Hilfe von Westernblots wurde anschließend versucht, die Proteinkomplexbildung direkt nachzuweisen und erste Informationen über die Proteine, die mit PKC interagieren, zu gewinnen. Um diese Komplexe *in vitro* nachzuweisen, müssen sie fixiert werden. Dies ist durch eine Behandlung mit Glutaraldehyd möglich, das Proteine kovalent vernetzt. Bei einer hohen Konzentration von Glutaraldehyd kommt es zu unspezifischen Verknüpfungen der Proteine, die so große Komplexe bilden, dass sie im SDS-Gel nicht aufgetrennt werden. Daher wurde in Vorversuchen eine geeignete Glutaraldehyd Konzentration ausgewählt, damit nur Proteine verknüpft werden, die sehr nahe beieinander lokalisiert sind oder bereits miteinander interagieren. Hierfür wurden Bienen der Pilzkörper herauspräpariert, homogenisiert und mit verschiedenen Konzentrationen Glutaraldehyd für 30 min inkubiert. Darauf erfolgte die Auftrennung der Proteine und der Nachweis der PKC im Westernblot mit dem monoklonalen Antikörper 2A6. Wenn eine Behandlung mit Glutaraldehyd vorhandene Proteinkomplexe so stabilisiert, dass sie im Westernblot nachweisbar sind und diese Proteinkomplexe unterschiedliche Molekulargewichte aufweisen, sollte im Blot mehr als eine Bande detektiert werden.

Im darauffolgenden Versuch sollte untersucht werden, ob ein Unterschied zwischen aktivierter und inaktivierter PKC bei der Bindung an andere Proteine besteht. Die bisherigen Untersuchungen haben gezeigt, dass die Proteinkomplexbildung vor allem in der Membranfraktion stattfindet. Dies lässt darauf schließen, dass nur die an der Membran gebundene, aktive PKC mit anderen Proteinen interagiert. Daher wurde die

Vernetzung durch Glutaraldehyd unter PKC-aktivierenden bzw. nicht-aktivierenden Bedingungen getestet. Für diese Untersuchung wurden Pilzkörperhomogenate mit Glutaraldehyd und PKC aktivierenden ( $\text{Ca}^{2+}$ , DAG, PS) bzw. nicht-aktivierenden (EGTA) Substanzen für 30 min inkubiert und PKC daraufhin nachgewiesen.



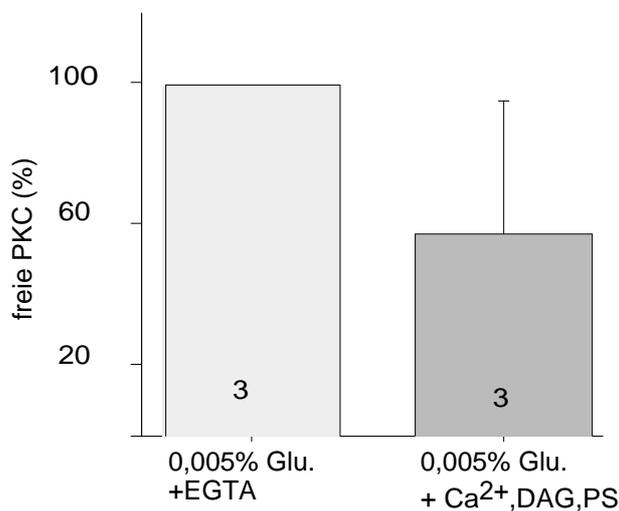
**Abbildung 18: Detektion von PKC-Proteinkomplexen unter aktivierenden bzw. nicht-aktivierenden Bedingungen**

**A:** Pilzkörperhomogenat wurde mit verschiedenen Konzentrationen Glutaraldehyd für 30 min bei RT inkubiert. Anschließend erfolgte der Nachweis von PKC im Westernblot. **B:** Das Homogenat eines Pilzkörpers wurde zunächst in drei gleiche Teile aufgetrennt. Ein Anteil wurde mit Glutaraldehyd (0,005%) + EGTA versetzt, ein weiterer mit Glutaraldehyd (0,005%) +  $\text{Ca}^{2+}$ , DAG und PS. Als Kontrolle diente ein Teil des Homogenat, zu dem nur PBS zugefügt wurde. Nach einer Inkubation der Proben von 30 min erfolgte die Auftrennung der Proben im SDS-Gel und der Nachweis von PKC im Westernblot. Die Zahlenangaben auf der linken Seite sind Molekulargewichte (kDa) von Proteinen bekannter Größe eines im SDS-Gel mitgeführten Standards.

Aus Abbildung 18A wird ersichtlich, dass der monoklonale Antikörper in der Kontrollspur nur eine einzige Proteinbande mit einem Molekulargewicht von ca. 80 kDa, das dem von PKC entspricht, detektiert. Dagegen zeigt die mit 0,001% Glutaraldehyd behandelte Probe neben der PKC-Proteinbande noch mindestens drei weitere Banden mit deutlich größerem Molekulargewicht. Die von dem Antikörper detektierte PKC liegt hier in Proteinkomplexen vor, die aufgrund ihrer Größe nur eine geringe Wanderung im Gel aufweisen. Da es sich um drei Banden von unterschiedlicher Größe handelt, sind wahrscheinlich verschiedene Proteine in der Lage, mit PKC Komplexe zu bilden. Proben, die mit einer höheren Konzentration Glutaraldehyd be-

handelt wurden, zeigten kein Signal im Westernblot. Bei diesen hohen Konzentrationen werden Proteine so stark vernetzt, dass ein Auftrennen im SDS-Gel nicht möglich ist.

In Abbildung 18B zeigt sich, dass es sowohl unter aktivierenden ( $\text{Ca}^{2+}$ , DAG, PS) als auch unter nicht-aktivierenden (EGTA) Bedingungen zu einer Verknüpfung von Proteinen mit Beteiligung der PKC kommt. Allerdings weist die aktivierte PKC eine intensiver gefärbte Bande im oberen kDa-Bereich auf, während die freie PKC nur ein sehr schwaches Signal erzeugt. Die Interaktion mit anderen Proteinen ist unter aktivierenden Bedingungen somit stärker als unter nicht-aktivierenden Bedingungen. Abb. 19 zeigt die quantitative Analyse nicht-vernetzter PKC.



**Abbildung 19: Quantitativer Vergleich der unvernnetzten PKC nach einer Behandlung mit Glutaraldehyd unter PKC-aktivierenden bzw. nicht-aktivierenden Bedingungen**

Nach der Behandlung von Pilzkörperhomogenaten mit Glutaraldehyd unter aktivierenden- bzw. inaktivierenden Bedingungen erfolgte der Nachweis der PKC im Westernblot (Abb. 18B). Anschließend wurden diese Blots auf einem UMAX-Scanner gescannt und die Schwärzung der freien PKC densitometrisch ausgewertet. Dabei wurde auf die freie PKC aus dem Ansatz mit EGTA normiert. Dargestellt sind Mittelwerte  $\pm$  S.D., in den Balken ist die Zahl der Proben angegeben.

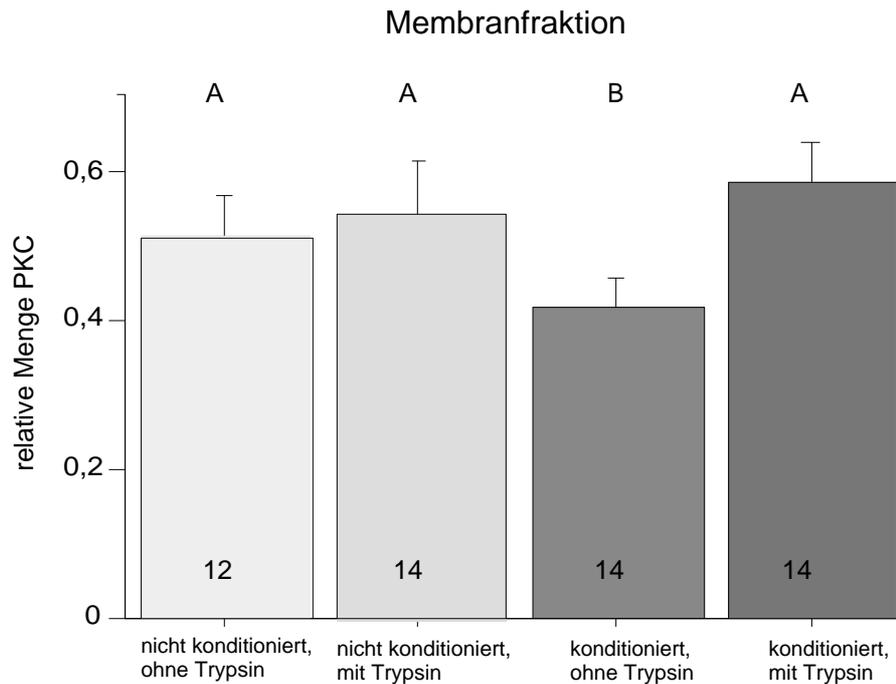
Der quantitative Vergleich zeigt deutlich, dass der Anteil der freien, nicht vernetzten PKC nach einer Behandlung mit Glutaraldehyd unter nicht-aktivierenden Bedingungen wesentlich größer ist als unter aktivierenden Bedingungen. Also bindet PKC abhängig vom Aktivitätszustand an andere Proteine.

Die *in vitro* Versuche mit Harnstoff, Trypsin und Glutaraldehyd zeigen zum ersten Mal, dass die PKC im Pilzkörper mit anderen Proteinen interagiert. Diese Interaktion der PKC war ausschließlich in der Membranfraktion zu beobachten und unter PKC-aktivierenden Bedingungen am stärksten.

### 3.7 Nachweis der PKC-Komplexbildung nach der olfaktorischen Konditionierung

Wie bereits gezeigt, bewirkt die Inhibition der PKC-Aktivität eine Stunde nach der dreifachen Konditionierung eine signifikante Reduktion bei der Gedächtnisbildung. Damit verbunden war eine Veränderung der PKC Menge in der Membranfraktion. Die letzten *in vitro* Versuche zeigten, dass PKC mit anderen Proteinen interagiert und Proteinkomplexe bildet. Ob es sich bei den lern-induzierten Veränderungen der PKC Menge in der Membranfraktion (Bild 12) tatsächlich um eine Maskierung der PKC handelt, wurde im folgenden Versuch geprüft. Wie in den *in vitro* Versuchen sollte die Komplexbildung der PKC durch Trypsin oder Urea nachweisbar sein. Um dies zu untersuchen, wurde eine Gruppe von Bienen dreifach konditioniert. Nach einer Stunde erfolgte die Präparation, das Homogenisieren und das Zentrifugieren der Pilzkörper. Die eine Hälfte der Pilzkörper wurde dabei in PBS, die andere Hälfte in PBS mit Trypsin ( $10^{-8}$ ) homogenisiert. Mit einer weiteren Gruppe unbehandelter, also nicht konditionierter Bienen wurden genauso verfahren. Anschließend erfolgte die Bestimmung der PKC-Menge der zytosolischen Fraktion sowie der Membranfraktion mittels ELISA.

Die PKC-Menge der Membranfraktion konditionierter Tiere war auch in diesem Versuch signifikant kleiner als bei der Kontrollgruppe (Abb. 20). In beiden Gruppen kam es durch die Behandlung mit Trypsin zu einem Anstieg der detektierbaren PKC-Menge. Dieser Anstieg der PKC-Menge war bei den unbehandelten Bienen nur sehr gering, während bei den konditionierten Bienen die Behandlung mit Trypsin einen signifikanten Anstieg der detektierbaren PKC-Menge zur Folge hatte. Durch diesen unterschiedlichen Anstieg war nach der Inkubation mit Trypsin kein signifikanter Unterschied mehr hinsichtlich der PKC-Mengen zwischen den unbehandelten und den konditionierten Tieren zu beobachten.



**Abbildung 20: Quantifizierung von PKC aus dem Pilzkörper eine Stunde nach der olfaktorischen Konditionierung und einer anschließenden Behandlung mit Trypsin**

Die Pilzkörper wurden 1 h nach der dreifachen Vorwärtsparung präpariert und durch Zentrifugation in eine zytosolische Fraktion und eine Membranfraktion getrennt. Parallel wurden die Pilzkörper nicht trainierter Bienen präpariert (Kontrolle). Jede Fraktion wurde in zwei Teile geteilt und Trypsin in einer Endkonzentrationen von  $10^{-8}$  bzw. PBS hinzugefügt. Mit Hilfe der ELISA-Technik wurde die PKC-Menge in beiden Fraktionen quantifiziert. Dargestellt sind die Mittelwerte  $\pm$  S.E.; in den Balken ist die Zahl der Proben für die jeweilige Gruppe von Tieren angegeben. Mit verschiedenen Buchstaben gekennzeichnete Mittelwerte unterscheiden sich signifikant voneinander (ANOVA,  $p < 0,05$ ,  $t$ -test).

Die PKC-Menge der Membranfraktion konditionierter Tiere war auch in diesem Versuch signifikant kleiner als bei der Kontrollgruppe (Abb. 20). In beiden Gruppen kam es durch die Behandlung mit Trypsin zu einem Anstieg der detektierbaren PKC-Menge. Dieser Anstieg der PKC-Menge war bei den unbehandelten Bienen nur sehr gering, während bei den konditionierten Bienen die Behandlung mit Trypsin einen signifikanten Anstieg der detektierbaren PKC-Menge zur Folge hatte. Durch diesen unterschiedlichen Anstieg war nach der Inkubation mit Trypsin kein signifikanter Unterschied mehr hinsichtlich der PKC-Mengen zwischen den unbehandelten und den konditionierten Tieren zu beobachten. Die lern-induzierten Veränderungen der PKC in der Membranfraktion können also durch Trypsin aufgehoben werden. Bei den lern-induzierten Veränderungen der PKC-Menge in der Membranfraktion handelt es sich somit nicht um eine Reduktion der PKC-Menge, sondern um eine Maskierung der detektierbaren PKC durch Komplexbildung.

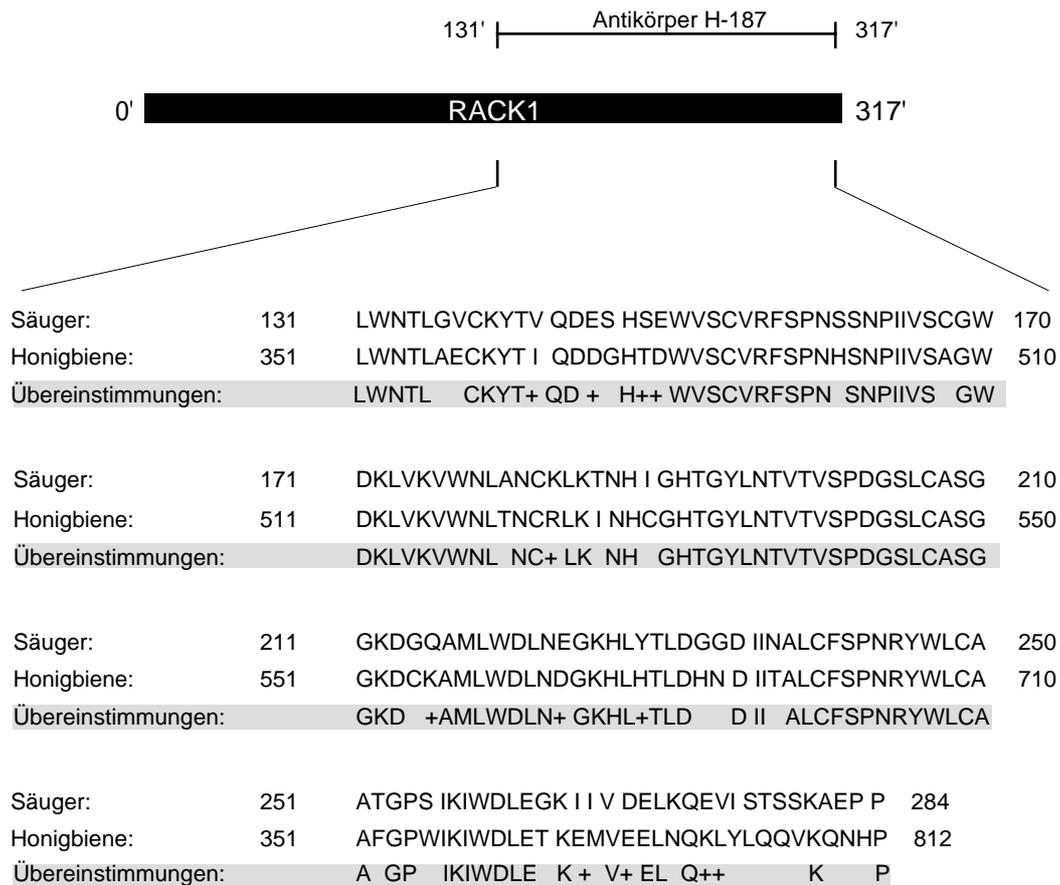
### 3.8 Identifikation eines PKC Bindeproteins

#### 3.8.1 Charakterisierung eines RACK1-Antikörpers

In anderen Arbeiten konnte bereits gezeigt werden, dass aktivierte bzw. inaktivierte PKC von unterschiedlichen Proteinen gebunden wird. Die Ankerproteine für aktivierte PKC-Isoformen werden RACKs (receptor for activated C-kinase) genannt (Mochly-Rosen et al., 1991), während Proteine, die inaktive PKC-Isoformen binden, als RICKs (receptor for inactivated C-kinase) bezeichnet werden (Mochly-Rosen und Gorden, 1998). RACKs sind Proteine, die in der Membranfraktion vorkommen, PKC abhängig von Phosphatidylserine, DAG und  $Ca^{2+}$  binden und deren Bindungen Isoform spezifisch ist (Mochly-Rosen, 1991). RICKs sind Proteine, die ebenfalls spezifisch binden, dabei aber bevorzugt an inaktive PKC. Die Anwesenheit von PKC Aktivatoren sollte zum Lösen der PKC von RICKs führen (Mochly-Rosen und Gorden, 1998).

In den vorhergehenden Experimenten wurde nur in der Membranfraktion eine lerninduzierte Komplexbildung beobachtet. Außerdem zeigen die Verhaltensexperimente, dass im Zeitfenster von einer Stunde nach der mehrfachen Konditionierung aktive PKC notwendig ist für die Bildung von Gedächtnis. Somit bindet im Pilzkörper der Biene nur die aktive, an der Membran lokalisierten PKC an andere Proteine. Daher sollte untersucht werden, ob RACK1 bei der PKC-Komplexbildung eine Rolle spielt.

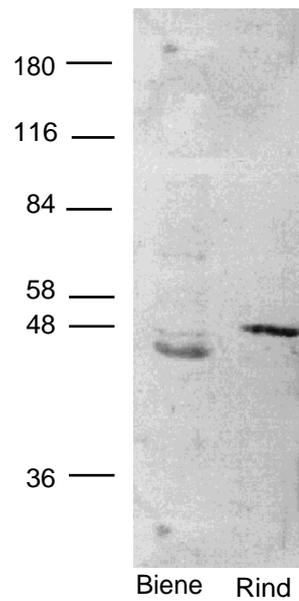
Mit Hilfe einer Proteindatenbank (NBC) wurde geprüft, ob RACK1 ähnliche Proteine auch in der Biene vorhanden sind. Die Analyse wurde dabei auf den Aminosäurebereich beschränkt, gegen die kommerziell erhältliche Antikörper gerichtet sind. Dabei handelt es sich um die Aminosäuren 131-317 von menschlichem RACK1. Bei einem Sequenzvergleich zwischen diesen Aminosäuren und einer EST-Bank (expressed sequences tag) für das Bienenhirn zeigten sich signifikante Gemeinsamkeiten. Der Klon Contig 568 hatte 75% identische Aminosäuren gegenüber den Aminosäuren von menschlichem RACK1 (Abb. 21). Von 154 Aminosäuren waren 117 identisch. Also wird im Gehirn der Biene RACK1 oder ein RACK1-ähnliches Protein exprimiert.



**Abbildung 21: Sequenzvergleich zwischen den Aminosäuresequenzen von menschlichem RACK1 und einer EST-Bank für das Bienenhirn**

Der Klons Contig 568 aus einer EST-Bank des Bienenhirns wurde mit der Aminosäuresequenz 131-317 von *Homo sapiens* RACK1 (Guillemot et al., 1989) verglichen (tblastn). Identische Aminosäuresequenzen von *Apis mellifera* und *Homo sapiens* sind extra aufgeführt und grau unterlegt. Der obere Bildbereich zeigt eine schematische Darstellung von RACK1 sowie den Bereich der Aminosäuresequenzen, die für die Generierung des Antikörpers H-187 und für den Sequenzvergleich verwendet wurden.

Um die Spezifität des Antikörpers H-187 zu testen, wurde der Antikörper im Westernblot untersucht. Da der Antikörper primär gegen Vertebraten RACK1 gerichtet ist, wurde neben Bienenhirnhomogenat auch Rindergehirnhomogenat untersucht. Aus der Anzahl der Banden kann man ersehen, wie viele Proteine erkannt werden. Durch Vergleich der Banden mit einem Standard kann das apparente Molekulargewicht der Antigene berechnet werden.



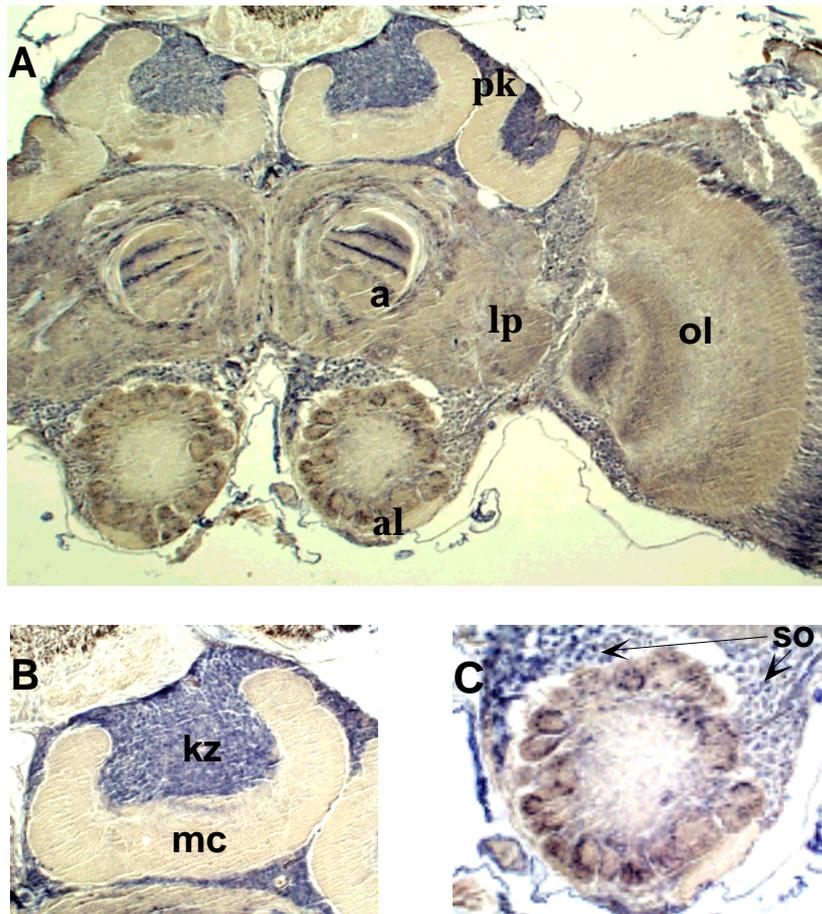
**Abbildung 22: Detektion von RACK 1 aus Bienen- und Rindergehirn**

Pilzkörperhomogenat wurde im SDS-Gel aufgetrennt und RACK1 im Westernblot nachgewiesen. In die erste Spur wurde Homogenat von der Biene aufgetragen, in die zweite Rindergehirnhomogenat. Die Zahlenangaben auf der linken Seite sind Molekulargewichte (in kDa) von Proteinen bekannter Größe eines im SDS-Gel mitgeführten Standards.

Der Antikörper RACK 1 (H-187) detektiert sowohl im Bienenhirn als auch im Vertebratengehirn (Rind) nur eine Bande (Abb. 22). Diese Bande weist bei der Biene und dem Rind mit den verwendeten Markerproteinen ein Molekulargewicht von ca. 48 kDa auf. Das aus anderen Arbeiten bekannte Molekulargewicht von RACK1 beträgt 36 kDa. Das scheinbar zu große apparente Molekulargewicht (48 kDa statt 36 kDa) kann auf Glykosylierung oder Bindung kleinerer Kofaktoren zurückgeführt werden. Aufgrund der hohen Übereinstimmung in den Aminosäuresequenzen und der Detektion von nur einer Bande im Westernblot nehme ich daher an, dass der getestete Antikörper im Bienenhirn RACK1 bzw. ein RACK1-ähnliches Protein spezifisch erkennt.

### 3.8.2 Immunhistologische Untersuchung der RACK1-Verteilung im Bienenhirn

Um nähere Informationen über die lokale Verteilung von RACK1 zu erhalten, wurden Frontalschnitte des Bienenhirns angefertigt und die RACK1 Immunoreaktivität über eine enzymatische Farbreaktion sichtbar gemacht. Dabei wurden NBT und BCIP als Färbesubstanzen verwendet, welche zu einer bläulichen Färbung der vom Antikörper markierten Bereiche führen. Neben der Verteilung von RACK1 in den verschiedenen Gehirnbereichen ist auch die subzelluläre Verteilung von Interesse.



**Abbildung 23: Immunhistologische Untersuchung der Verteilung von RACK 1 im Bienen Gehirn**

Frontale Paraffinschnitte von adultem Bienen Gehirn wurde mit dem polyklonalem RACK1-Antikörper inkubiert und die RACK 1 Immunoreaktivität wurde mit Hilfe von alkalischer Phosphatase in einer enzymatischen Farbreaktion (blau) nachgewiesen. **A:** Übersicht, pk: Pilzkörper,  $\alpha$ :  $\alpha$ -Lobus, ol: optischer Lobus, lp: laterales Protozerebrum, al: Antennallobus. **B:** Kalyze, kz: Kenyonzellen, mc: medianer Kalyx. **C:** Antennallobus; so: Somata

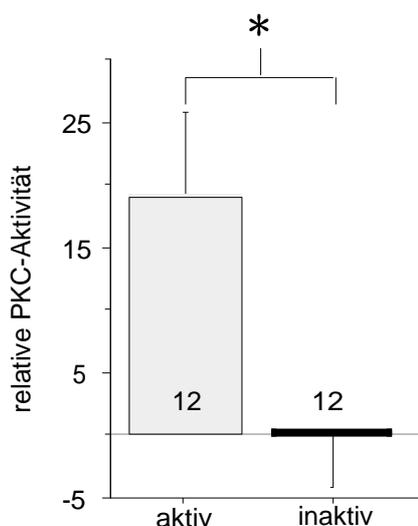
Abbildung 23 A zeigt, dass im gesamten Gehirn vor allem die Zellkörper gefärbt sind, während in dem umgebenden Neuropil nur eine sehr schwache Färbung erkennbar ist. Die Kenyonzellen der Pilzkörper weisen eine deutliche Färbung auf. Gefärbte Somata sind inner- und außerhalb der Kalyzes sichtbar (Abb. 23B). Innerhalb der Kalyzes konnte bei stärkeren Vergrößerungen zwischen dem Zytosol und dem Zellkern unterschieden werden. Dabei zeigte sich eine deutlich höhere Immunoreaktivität im Kern gegenüber dem Zytosol. Die Kalyzes der Pilzkörper, die aus den dendritischen Verzweigungen der Kenyonzellen gebildet werden, sind nicht gefärbt. Dagegen lassen sich in den  $\alpha$ -Loben, in denen die Kenyonzellaxone terminieren, mehrere distinkte Banden unterscheiden. Die Somata der Antennallobuszellen sind ebenfalls

gefärbt. Das Neuropil zeigt im zentralen Bereich der Glomeruli hingegen keine Färbung. Nur im Kortex der Glomeruli tritt eine Färbung auf (Abb. 23C). In diesem Bereich innervieren vor allem sensorische Neurone (Galizia et al., 1999). Bis auf die äußere Schicht der Medulla sind von den optischen Loben keine weiteren Strukturen angefärbt. Auch das laterale Protozerebrum zeigt keine Immunreaktivität.

Die Immunhistologie zeigt ein Vorkommen von RACK1 in den Zellsomata der Pilzkörper und der Antennalloben. Beide Neuropile sind notwendig für die Gedächtnisbildung. Eine Beteiligung von RACK1 in Verbindung mit PKC an neuronalen Prozessen ist somit möglich.

### 3.7.3 RACK 1 bindet in den Kenyonzellen der Biene nur an aktive PKC

Im nächsten Versuch sollte geprüft werden, ob im Pilzkörper der Honigbiene PKC an RACK1 bzw. das RACK1-ähnliche Protein bindet. Dazu wurde mit Hilfe des Antikörpers H-187 eine Immunpräzipitation von RACK1 durchgeführt. Neben RACK1 sollten dabei auch die Proteine, die an RACK1 binden, präzipitiert werden. Um zu testen, ob es sich bei einem der Proteine um PKC handelt, wurde nach der Immunpräzipitation die PKC Aktivität dieser Präzipitate gemessen. Da aus anderen Arbeiten bekannt ist, dass nur aktivierte PKC an RACK 1 bindet, wurde die Immunpräzipitation unter PKC-aktivierenden bzw. PKC-inaktivierenden Bedingungen durchgeführt.



**Abbildung 24: RACK1-präzipitierte PKC-Aktivität aus Pilzkörperhomogenaten**

Jede Probe wurde unter aktivierenden bzw. nicht-aktivierenden PKC-Bedingungen mit dem RACK1-Antikörper H-187 versetzt und inkubiert. Anschließend erfolgte die Zugabe von Protein A zur Fällung von Antigen-Antikörper Komplexen. Durch Waschung und Zentrifugation wurde der RACK1-Komplex eluiert. Zum Nachweis der PKC im RACK1 präzipitiertem Komplex wurde die PKC-Aktivität unter aktivierenden Bedingungen gemessen. Dargestellt sind die Mittelwerte ± S.D. der PKC-Aktivität nach der Immunpräzipitation unter aktivierenden Bedingungen ( $\text{Ca}^{2+}$ , DAG, PS) und inaktivierenden Bedingungen (EGTA).

Abbildung 24 zeigt, dass PKC-Aktivität im immunpräzipitiertem RACK1-Komplex gemessen werden konnte. Dabei ist die PKC-Aktivität, die nach der Immunpräzipitation unter aktivierenden Bedingungen beobachtet wurde, signifikant erhöht gegenüber der PKC-Aktivität, die nach der Immunpräzipitation unter nicht-aktivierenden Bedingungen detektiert wurde. Somit wurde gezeigt, dass PKC an RACK1 bzw. ein RACK1-ähnliches Protein bindet und dass die spezifische Bindung der PKC an RACK1, wie auch in anderen Arbeiten gezeigt wurde (Mochly-Rosen, D. et al., 1991), nur unter aktivierenden Bedingungen gebildet wird. Außerdem stützen diese Ergebnisse den Befund, dass es sich bei dem Protein, welches der Antikörper erkennt, tatsächlich um RACK1 handelt.

Ein RACK1 ähnliches Protein wird somit im Pilzkörper expremiert und bindet nur die aktive Proteinkinase C. Damit ist dieses RACK1 ähnliche Protein möglicherweise das PKC-Ankerprotein, welches nach der dreifachen Vorwärtspaarung mit der membranständigen PKC interagiert und Komplexe bildet, die für die Gedächtnisbildung notwendig sind.