

Diskussion zu den Sensitisierungsexperimenten

Das Sensitisierungsexperiment bei gleichzeitigem optischen Ableiten, diente dazu, Ergebnisse aus Verhaltensversuchen auf neuronaler Basis zu verstehen und eine Erklärung für das gezeigte Verhalten zu finden. Wie sich im Verhaltensversuch zeigte, reagieren mehr Bienen nach einer Sensitisierung mit Zuckerwasser auf einen nachfolgenden Duft als Tiere, die nicht sensitisiert wurden. Um dieses Phänomen auf zellulärer Ebene zu untersuchen, wurde der Antennallobus ausgesucht. Er ist die erste Verschaltungsstation für Düfte im Bienenhirn und gleichzeitig terminieren hier auch Axone des Neurons VUMmx1, welches durch Zuckerwasser aktiviert wird und vermutlich über die Ausschüttung von Oktopamin und die daraus folgende Aktivierung intrazellulärer Signalkaskaden über die Adenylatzyklase Synapsen verändern kann. Somit könnten sich eventuelle Veränderungen, die im Verhalten gefunden wurden, möglicherweise im Antennallobus widerspiegeln.

Dies ist auch der Fall wie Abbildung 6 zeigt. Wie die erste Messung nach der Sensitisierung beziehungsweise der zweite Messpunkt bei den Kontrolltieren zeigt, wird der Duft von sensitisierten Tieren stärker beantwortet als von nicht sensitisierten Bienen. Somit ist eine mögliche Erklärung für die Ergebnisse aus den Verhaltensexperimenten, dass ein Duft bei sensitisierten Tieren auf ein höheres Kalziumniveau in Projektionsneuronen des Antennallobus trifft (beziehungsweise einen größeren Kalziumeinstrom hervorruft) als bei nicht sensitisierte Tiere. Dadurch wiederum könnte durch einen nun wahrgenommenen Duft und die somit aktivierten Projektionsneurone, Prozesse in Gang gesetzt werden, die eine höhere Kalziumkonzentration erfordern. Diese Prozesse würden schließlich zum Auslösen einer im Verhalten sichtbaren Reaktion führen, in diesem Fall den Rüsselreflex. Um

welche Prozesse es sich hier im Genauen handelt, konnte in dieser Arbeit nicht geklärt werden. Auch bleibt unklar über welche nachgeschalteten Neurone ein solcher Weg vermittelt werden könnte. Wahrscheinlich ist, dass dieser Weg über die Pilzkörper führt, da diese eines der Zielgebiete der Projektionsneurone sind und gleichzeitig von hier Neurone zu den Motorzentren führen, welche wiederum die Muskeln für den Rüssel innervieren. Somit müssten zur weiteren Aufklärung des Phänomens der Sensitisierung ähnliche Untersuchungen wie am Antennallobus auch am Pilzkörper durchgeführt werden. Denn auch der Pilzkörper und hier genauer im Lippenneuropil werden Düfte verarbeitet und auch hier finden sich Axone des Neurons VUMmx1. Daher gilt es zu klären, wie das nach der Sensitisierung verstärkte Signal der Projektionsneurone im Pilzkörper verarbeitet beziehungsweise repräsentiert wird. Dabei wäre die einfachste Erklärung, dass auch hier ein Duft nach einer Sensitisierung einen größeren Kalziumeinstrom in die Zelle hervorruft beziehungsweise auf ein erhöhtes Kalziumniveau trifft. Welchen Mechanismus nun genau das verstärkte Signal auslöst bleibt vorerst ungeklärt. Dennoch führt dieser Mechanismus dazu, dass ein Duft bei einer sensitisierten Biene ein stärkeres Kalziumsignal hervorruft als in nicht sensitisierten Tieren.

Vergleich Imaging- <-> Verhaltensexperimenten

Der signifikante Unterschied zwischen den sensitisierten und nicht sensitisierten Tieren bleibt auch im weiteren Verlauf des Experimentes bestehen. Er wird sogar größer zum Ende hin. Dieser Effekt steht im Widerspruch mit den Verhaltensexperimenten, in denen sich die beiden Gruppen in Laufe der Zeit, was die Häufigkeit des Rüsselreflexes angeht, wieder annähern. Eine mögliche Erklärung wäre, dass eine erhöhte Kalziumantwort auf den Duft in einem Glomerulus nicht notwendigerweise den Rüsselreflex nach

sich zieht beziehungsweise auch gar nicht dafür verantwortlich ist. Der Rüsselreflex würde möglicherweise ebenso nach einer Sensitisierung ausgelöst werden, wenn kein erhöhtes Kalziumniveau in den Projektionsneuronen vorhanden wäre. Es würde dieselben Kalziumkonzentrationen genügen wie in nicht sensitisierten Tieren. Der den Rüsselreflex auslösende Mechanismus würde dann über andere Neurone vermittelt werden. Diese müssten dann allerdings zwingend eine Veränderung, etwa in Form von erhöhtem Kalzium, nach der Sensitisierung aufweisen.

Möglicherweise könnte ein gemeinsamer erhöhter Kalziumspiegel ausschlaggebend für das Verhalten sein, das heißt sowohl in den Projektionsneuronen als auch in den nachgeschalteten Neuronen müsste eine erhöhte Kalziumkonzentration vorhanden sein, um den Rüsselreflex auszulösen. Das wiederum würde bedeuten, dass die Bienen in dem Fall dieser Arbeit PER gezeigt hätten, wenn dieser gleichzeitig beobachtet beziehungsweise über den PER-Muskel (M17) gemessen worden wäre. Da dies nicht der Fall war und die Verhaltensdaten dagegen sprechen, kann nicht gesagt werden, was ein Ausbleiben des Rüsselreflexes bedeutet hätte.

Eine weitere mögliche Erklärung wäre, dass das Kalzium für den zweiten und dritten Messpunkt nach der Sensitisierung in den Projektionsneuronen noch hoch ist, in den nachgeschalteten Neuronen nicht mehr. Daher würde dann kein Rüsselreflex sichtbar werden.

Allerdings wäre der im Antennallobus beziehungsweise in den Projektionsneuronen gemessene Kalziumanstieg für den zweiten und dritten Messpunkt nach der Sensitisierung ein Effekt, der auf dem ersten Blick biologisch gesehen recht unsinnig ist, denn warum sollten Neurone unnötig Kalzium regulieren. Auf der anderen Seite ist die Kalziumkonzentration nicht dauerhaft erhöht, sondern nur in dem Moment, in dem der Duft präsentiert wird. Möglicherweise erschließt sich der Sinn für den Anstieg im Kalzium durch die

Zuckerwasserstimulation erst, wenn man diesen Effekt im Zusammenhang mit Lernexperimenten betrachtet. Möglicherweise hängt der Lernerfolg davon ab, dass durch die Zuckerwasserstimulation (zusätzlich zum durch den Duft hervorgerufenen Kalziueinstrom) ein verstärkter Einstrom von Kalzium in die Projektionsneurone erfolgt. Diese Wirkung könnte durch das VUMmx1 (siehe oben) vermittelt sein. Da dieses Neuron auf Zuckerwasser reagiert, unabhängig in welchem Zusammenhang (Sensitisierung oder Lernen), wird es durch seine Aktivierung immer zu Veränderungen in den betroffenen Neuronen kommen. Daher könnte die verstärkte Aktivierung bei dem zweiten und dritten Messpunkt, die Art von Aktivierung widerspiegeln, die man auch nach einem Lernexperiment findet. Auch hier findet man bis zu 15 Minuten nach einer mehrfachen differentiellen Konditionierung erhöhte Kalziumkonzentrationen. Aus Verhaltensexperimenten weiß man, dass die Biene in diesem Fall mit dem Rüsselreflex auf den Duft reagieren würde, etwas, das sie bereits 6,5 Minuten nach einer Sensitisierung nicht tun würde. Selbstverständlich muss hierbei auf die unterschiedlichen Versuchsabläufe hingewiesen werden. Bei den Lernexperimenten wird der Zuckerwasserstimulus mit einem Duft gepaart, bei der Sensitisierung nicht. Somit könnte das Schema zur Erklärung für die erhöhte Kalziumkonzentration 6,5 Minuten nach der Sensitisierung so aussehen:

Zuckerwasser → erhöhtes Kalzium noch nach 6,5' → kein Verhalten (kein PER), bezüglich der Sensitisierung

Zuckerwasser+Duft → erhöhtes Kalzium noch nach 6,5' → Verhalten (PER), bezüglich des Lernens

Es wird notwendig sein für die weitere genauere Aufklärung der Sensitisierung, dass man auch die nachgeschalteten Neurone im Auge behält. Des Weiteren wäre eine Kontrolle über das Verhalten wünschenswert, sei es über eine Ableitung des Rüsselreflexmuskels oder einfach eine visuelle Kontrolle des Rüsselreflexes.

Ein weitere Aspekt bei der Bewertung der Daten ist, dass für die Bestimmung der Maxima jeweils nur ein Glomerulus ausgewählt wurde. Es handelte sich dabei zwar um den laut Antennallobusatlas wichtigsten (der am stärksten auf den Duft antwortet) Glomerulus, jedoch musste in einigen wenigen Fälle auf den zweitwichtigsten ausgewichen werden, da der wichtigste nicht identifiziert werden konnte. Somit wurde bei der Duftantwort ein großer Teil der Gesamtantwort vernachlässigt. Zwar trägt der Hauptglomerulus eine Menge zum Duftmuster bei, jedoch befindet er sich einem Netzwerk mit anderen Glomeruli. Somit variieren möglicherweise auch andere Glomeruli ihre Antwort auf den Duft in Folge einer Veränderung des Hauptglomerulus, besser gesagt, das gesamte Netzwerk verändert sein Verhalten auf den Duft. Daher sollten für weitere Analysen mehr Glomeruli in die Auswertung miteinbezogen werden.

Sensitisierung und Trace-Konditionierung

Abschließend soll noch ein Punkt diskutiert werden, der ebenfalls als mögliche Erklärung für die lang anhaltende Erhöhung der Kalziumkonzentration dienen kann. Anders als bei den ursprünglichen Verhaltensversuchen, bei denen die Bienen als ersten Reiz mit Zuckerwasser stimuliert wurde, musste den Bienen zum Vergleich bei den Imagingversuchen vor dem Zuckerwasserstimulus, der Duft präsentiert werden, der auch nach der Sensitisierung verwendet wurde. Dies war notwendig, um einen Referenzwert für die Kalziumkonzentrationen nach der Sensitisierung zu erhalten. In den Verhaltensversuchen, die parallel zu den Imagingversuchen durchgeführt wurden, musste somit auch ein Duft vor der Sensitisierung gegeben werden. Ein Vergleich dieser Verhaltensversuche mit den ursprünglichen Sensitisierungsversuchen (ohne Duft vor der Sensitisierung) zeigt

(Abbildung 3), dass mehr Tiere PER im Verlaufe der Zeit nach der Sensitisierung zeigen, wenn sie vorher den Duft präsentiert bekamen. Wenn man nun noch die Ergebnisse der Spontanaktivitätsversuche berücksichtigt, in denen gezeigt wurde, dass ein Duft über zwei Minuten (vielleicht bis zu drei Minuten) lang als erhöhte Korrelation zwischen Duftglomeruli im Antennallobus repräsentiert bleibt, könnte hierin eine Erklärung für diese Diskrepanz liegen. Eventuell bildet sich ein Kurzzeitgedächtnis allein schon auf grund der Tatsache, dass das Zuckerwassersignal zwar nicht mit dem Duft selbst, aber mit dem Eindruck (oder dem sensorischem Gedächtnis oder dem Kontext), den er im Antennallobus hinterlassen hat (erhöhte Korrelation zwischen Duftglomeruli im Antennallobus), gepaart wird. Diese Art von Gedächtnis ist zwar nicht so lang anhaltend wie diejenige, die man nach einer echten Duft-Zuckerwasserpaarung erhält, aber stabiler als der ursprüngliche Sensitisierungseffekt. Möglicherweise führt es somit auch zu einer erhöhte Kalziumkonzentration in den Projektionsneuronen des für das Duftmuster wichtigsten Glomerulus.

Dass der Duft nicht notwendigerweise mit Zuckerwasser überlappend gepaart werden muss, um ein Gedächtnis auszubilden, konnte Menzel zeigen (Menzel 1990). Bei dieser Art der Konditionierung (Trace Konditionierung) kann der Duft bis zu 5 Sekunden vor dem Zuckerwasserstimulus kommen, bevor die Biene keine Assoziation mehr bilden kann. Der Test zur Überprüfung des Gedächtnisses erfolgte 20 Minuten später. Dabei zeigten noch 50% der Tiere eine konditionierte Reaktion. Sicherlich sind drei Minuten zwischen Duft und Zuckerwasserstimulus wie bei dem hier durchgeführten Sensitisierungsexperiment ein wesentlich längerer Zeitraum, aber es ist auch unwahrscheinlich, dass in diesem Fall nach 20 Minuten noch eine Verhaltensreaktion zu beobachten gewesen wäre.

Diskussion zur Untersuchung der Spontanaktivität

Um Aussagen über die Veränderung in der Spontanaktivität im Antennallobus machen zu können, bedurfte es sehr langer Messungen. Zwar konnte nicht bestimmt werden welche Länge am geeignetsten ist, was auch nicht Absicht dieser Arbeit war, dennoch wurde mindestens zwei Minuten vor und nach der Duftstimulation gemessen. Eine sichere Aussage über die weiteren Messungen war für eine angemessene Anzahl von Tieren nicht möglich, da es Ausfälle in vielerlei Hinsicht gab. Zum einen starben einige Tiere während der ersten beziehungsweise der zweiten Messung, zum anderen schwächten sich die Kalziumsignale deutlich ab, da durch die starke und andauernde Bestrahlung der Farbstoff gebleicht wurde.

Die erste Idee zur Untersuchung der Spontanaktivität war, sich das Ratio der bei 340nm und 380nm angeregten Fluoreszenz in jedem Frame anzuschauen ($\Delta(F_{340nm}/F_{380nm} = \text{Ratio})$). Bei der Betrachtung dieses Films sollte festgestellt werden, ob nach der Duftpräsentation das Muster des Duftes irgendwann wieder in der spontanen Kalziumfluktuation auftaucht. Wie sich sofort herausstellte, war dies nicht der Fall und so mussten bei der Analyse andere Wege gefunden werden, um die dennoch sichtbaren Veränderungen zu erklären und mit dem Duft in Verbindung zu bringen. Da nie das gesamte Muster erkennbar wurde, wurde die Korrelation zwischen den Glomeruli ausgewertet. Hier konnte man sehen, dass diese insgesamt gesehen signifikant abnahm. Im nächsten Schritt wurde auf glomerulärer Ebene untersucht, ob etwa ein Duftglomerulus nach dem Duft häufiger aktiv ist. Hier konnte gezeigt werden, dass, obwohl die Gesamtaktivität sich nicht verändert, einzelne Glomeruli nach der Duftpräsentation häufiger aktiviert werden. Allerdings gilt dies nicht nur für den Duftglomerulus und auch für unterschiedliche Düfte fällt die

Auswahl der häufiger aktivierten Glomeruli unterschiedlich aus. Zwar finden sich einzelne Duftglomeruli (neben dem Hauptglomerulus, die durch den Duft am zweit- beziehungsweise drittstärksten aktivierten Glomeruli) unter denen, die häufiger aktiviert wurden, aber es sind nie alle. Bei der Betrachtung von Glomerulipaaren findet man ein ähnliches Ergebnis. Zwar wurde dabei nicht auf die Partner geachtet, das heißt es mussten nicht zwangsläufig andere Duftglomeruli beteiligt sein, dennoch fiel auch hier auf, dass erneut Glomeruli, die Hauptträger des Duftmusters sind, häufig, aber nicht ausschließlich, in „Zweier“- beziehungsweise „Dreier“-Paaren auftraten. Somit kann man sagen, dass wenn ein „Muster“ (in Sinne einer Aktivierung von mehr als einem Glomeruli) nach der Duftstimulation auftritt, dieses häufig von Duftglomeruli getragen wird. Auch hier gilt allerdings, dass dies nicht nur für Duftglomeruli zutrifft und für unterschiedliche Düfte die Auswahl der häufiger aktivierten Glomeruli unterschiedlich ausfällt.

Korrelationen zwischen einzelnen Glomerulipaaren

Ein wesentlich eindeutigeres Ergebnis brachte die genauere Betrachtung der Korrelationen zwischen einzelnen Glomerulipaaren. Dabei wurden nun nicht mehr nur die Mittelwerte der Matrizen untersucht, sondern die einzelnen Beziehungen zwischen Glomerulipaaren. Hier zeigte sich, dass es vor allem Duftglomeruli sind, die ihre Korrelation untereinander verstärken. Außerdem sind stark aktivierte Glomeruli nach dem Duft deutlicher in der Spontanaktivität zu erkennen. Wie die Daten zeigen, lässt sich mit einer recht hohen Wahrscheinlichkeit (immer weit über 50%) der Duft aus der Spontanaktivität nach dem Stimulus ermitteln.

Es bleibt festzuhalten, dass der Duft nach seiner Perzeption für eine Zeit von mindestens 2 Minuten im Antennallobus in Form einer höheren Korrelation zwischen Duftglomeruli bestehen bleibt. Diese

Erhöhung in der Korrelation zwischen durch den Duft aktivierten Glomeruli folgt in gewisser Weise der Hebb'schen Lernregel (Verbindungen zwischen Neuronen werden verstärkt, wenn diese gleichzeitig aktiv sind (Hebb 1949)). Glomeruli (die postsynaptischen Elemente) werden durch den Duft gleichzeitig aktiviert und dadurch verstärkt sich ihre Verbindung, das heißt, wenn ein Duftglomerulus aktiviert wird, wird auch ein anderer Duftglomerulus aktiviert (möglicherweise fällt durch die gleichzeitige Aktivierung die vor der Duftstimulation bestehende Inhibition (niedrige Korrelation) zwischen zwei Duftglomeruli weg/ oder sie wird erhöht und synchronisiert dadurch die Duftglomeruli (letzte Möglichkeit nach Laurent Review 2002)). Das kann durch die erhöhte Korrelation durchaus erklärt werden. Je höher die Korrelation ist, desto höher ist auch die Wahrscheinlichkeit, dass beide Glomeruli gleichzeitig aktiviert werden. Und da eine erhöhte Korrelation vor allem zwischen Duftglomeruli gefunden wurde und somit das Duftmuster unterschwellig aktiviert wird, kann man in diesem Zusammenhang durchaus auch von sensorischem Gedächtnis sprechen. Die Biene behält für einen gewissen Zeitraum den gerade erlebten Stimulus in einer Art Arbeitsgedächtnis. Ähnliche Befunden erzielten Supér et al. (2001) im primären visuellen Kortex bei Affen. Sie zeigten, dass Neurone verlängert verstärkt feuerten, nachdem sie durch einen visuellen Stimulus erregt worden waren (Supér et al. 2001).

In den Spontanaktivitätsexperimenten wurde die erhöhte Korrelation zwischen Duftglomeruli während der ersten zwei Minuten nach der Duftstimulation beobachtet. Etwa zwei Minuten sind auch der kritische Zeitraum, in dem nach einer Konditionierung der AL wichtig für eine Etablierung eines Gedächtnisses ist. Mit ihren Experimenten zeigten Menzel (1974) und Erber (1980), in denen das erste olfaktorische Neuropil zu verschiedenen Zeitpunkten nach der Konditionierung gekühlt wurde, dass eine Kühlung während der

ersten zwei Minuten die Bildung eines Gedächtnisses unterband. In diesem Zusammenhang sei auf die Ergebnisse in Abbildung 19 (siehe auch Abbildung 20) hingewiesen. Hier zeigt sich für zwei Tiere, dass nach der Konditionierung der Mittelwert der Korrelationsmatrix wieder auf das Niveau steigt, welches er vor der ersten Duftpräsentation hatte. Das heißt, man findet eine sehr hohe Korrelation zwischen allen Glomerulipaaaren. Diese Erhöhung des Mittelwertes beginnt schon während der Konditionierung (Daten nicht gezeigt). Unterbindet man diesen Vorgang in einer bestimmten Phase auf oben beschriebene Weise, kommt es zu keiner Bildung von Gedächtnis. Dieser Effekt legt die Vermutung nahe, dass eine erhöhte Korrelation zwischen Glomeruli im Netzwerk „AL“ wichtig für die Etablierung eines Gedächtnisses ist. Die hohe Korrelation vor der ersten Duftpräsentation könnte möglicherweise ein „Ruhezustand“ des Systems (AL) sein, in dem alle Glomeruli praktisch harmonisch schwingen. Durch die Duftpräsentation wird dieser „Schwingung“ das Duftmuster aufgedrückt und man findet eine Abnahme in der Gesamtkorrelation, aber eine Erhöhung beziehungsweise eine Beibehaltung des Zustandes für Duftglomeruli. Ob die Qualität des hohen Korrelationsniveaus vor der ersten Duftpräsentation und nach der Präsentation des gelernten Duftes dieselbe ist, ist schwer zu sagen. Dazu müsste man das System vermutlich noch länger beobachten und schauen, ob die Korrelation nach dem Lernen irgendwann wieder abnimmt und später ohne weitere Stimuli wieder ansteigt. Dieser Zustand könnte dann vielleicht Ausdruck der Situation des Tieres sein, welches sich schließlich nie derart lange in einem duftleeren beziehungsweise duftarmen Raum wie es ein Labor darstellt, befindet. Ein wichtiger Unterschied zwischen beiden Zuständen (hohe Korrelation nach Lernen <-> hohe Korrelation in stimulusarmer Umgebung) sind natürlich die vorhergehenden Ereignisse. Die erhöhte Korrelation nach dem Lernen (die ja schon

während der Konditionierung auftritt) könnte möglicherweise aufgrund der Aktivität des VUMmx1 eintreten, welches ja vermutlich viele Synapsen im AL erreicht. Dadurch könnten es zu einer Synchronisierung im Netzwerk kommen, was sich wiederum in einer erhöhten Korrelation auf glomerulärer Ebene ausdrücken könnte. Die erhöhte Korrelation, die nach einer Weile in einem stimulusarmen Raum auftritt, könnte Ausdruck des Zustandes sein, der für das System am Besten (energiesparsam) ist, also zeitlich gleichmäßige Aktivität von Neuronengruppen.

Erhöhte Korrelation und Lernen

Eine eingangs gestellte Frage war die, ob nach der Duftpräsentation das Duftmusters wieder auftritt. Die Beobachtungen zeigen, dass das Duftmuster nie in seiner gesamten Form wiederzuerkennen ist. Das könnte daran liegen, dass die Biene den Duft auch gar nicht erneut wahrnimmt. Er bleibt eher als eine Art „Ahnung“ zurück. Ein erneut auftretendes gesamtes Muster des gerade perzipierten Duftes während der Spontanaktivität käme einer „olfaktorischen“ Täuschung gleich. Daher ist es nicht verwunderlich, dass dies in den optischen Ableitungen nie beobachtet werden konnte. Lediglich einzelne Glomeruli wurden aktiv. Dass durch das Wahrnehmen eines Duftes spezielle Glomeruli aneinander gekoppelt werden (beziehungsweise die Korrelation zwischen diesen verstärkt wird) und diese Kopplung für eine bestimmte Zeit anhält könnte ein allgemeines Phänomen sein, das dem Antennallobus überhaupt erst die Möglichkeit gibt, einen Duft auch zu lernen. Um dies zu überprüfen wären weiterführende Experimente nötig, in denen die Kopplung aufgehoben beziehungsweise beeinflusst werden könnte. Hier könnten Substanzen wie GABA und Picrotoxin verwendet werden. Beide Substanzen würden eine Erhöhung in der Korrelation zwischen Duftglomeruli empfindlich stören. GABA durch verstärkte

inhibitorische Wirkung auf die Projektionsneurone, Picrotoxin durch Aufhebung der inhibitorischen Wirkung der lokalen Interneurone auf die Projektionsneurone. Somit würde die für einen gelernten Duft erforderliche hohe Korrelation im Antennallobus nicht auftreten können. Über einen geeigneten Weg (M17-Ableitung oder visuell kontrolliert) müsste der tatsächliche Lernerfolg überprüft werden, das heißt es müsste gezeigt werden, dass die Biene kein PER zeigt. Wichtig bei der Anwendung der beiden Substanzen wäre ein präzises Einspülen kurz nach der Duft- beziehungsweise der Zuckerwasserpräsentation während der Trainingsphase. Auf diese Weise würde es zu keiner erhöhten Korrelation während des Lernprozesses kommen und die Biene würde kein Gedächtnis ausbilden. Das würde sich in der Testphase zeigen, wenn die Biene auf den Trainingsduft nicht mit dem Rüsselreflex antwortet.

Ursprung der Spontanaktivität

Eine weitere wichtige Frage, die es noch intensiver zu untersuchen gilt, ist, ob die Spontanaktivität (und ihre Veränderung) ein postsynaptisches (Projektionsneuronebene) oder ein präsynaptisches (Rezeptorneuronebene) Phänomen ist. Hierfür müssten man die Spontanaktivität nach Doppelfärbungen mit Calcium-Green (Rezeptorneurone) und FURA (Projektionsneurone) messen. Dadurch könnte überprüft werden, ob die Rezeptorneurone die Spontanaktivität nur treiben und die Erhöhung der Korrelation nach einer Duftpräsentation nur in den Projektionsneurone zu finden ist. Ein Problem, das sich hierbei allerdings ergibt ist, dass mit CalciumGreen-Färbungen wohl keine Spontanaktivität messbar ist, da in diesen Färbungen das Signal-Rausch-Verhältnis schlecht ist und spontane Aktivitäten, die ja kleiner sind als die Duftantworten, kaum vom Rauschen zu unterscheiden wären (persönliche Mitteilung von Silke Sachse). Intrazelluläre Ableitungen von

Rezeptorneuronen sind bei der Biene sehr selten gelungen (Müller, Dissertation). Eine Untersuchung der spontanen Aktivität erfolgte in dieser Arbeit nicht, so dass es keine Anhaltspunkte zur Spontanaktivität von Rezeptorneuronen bei der Biene gibt.

Ein Hinweis, dass die Spontanaktivität von den Rezeptorneuronen getrieben wird und keine Eigenschaft der Projektionsneurone ist, wurde gefunden, als in einigen Experimenten bei einigen Tieren die Antenne abgeschnitten und bei anderen Bienen der Antennalnerv durchtrennt wurde. In allen Fällen konnte daraufhin keine Spontanaktivität mehr gemessen werden (Daten nicht gezeigt). Hierbei ist jedoch zu beachten, dass sowohl das Abschneiden der Antenne als auch das Durchtrennen des Antennalnervs die Rezeptorneurone verletzt. Diese Art der Verletzung führt natürlich dazu, dass die Neurone keine Information mehr weiterleiten können und somit keine Erregung mehr bei den Projektionsneurone ankommt (außer der im lokalen Netzwerk des Antennallobus generierten). Andererseits kann ein Verstummen der Projektionsneurone auch daherrühren, dass in die verletzten Rezeptorneurone aus dem extrazellulären Raum positive Ladungen fließen und die Neurone daraufhin sehr stark feuern und dies auf die Projektionsneurone übertragen. Diese würde dadurch ebenfalls geschädigt, was sich in einem Verstummen ausdrücken könnte. Ob sich die Projektionsneurone wieder erholen, wurde nicht untersucht. Es müsste daher ein Weg gefunden werden, die Antennen reversibel auszuschalten (möglicherweise durch lokale Kühlung), derart, dass die Rezeptorneurone keinen Schaden davontragen. Es ist allerdings wichtig zu bedenken, dass selbst wenn die Spontanaktivität von den Rezeptorneuronen getrieben wird, die Erhaltung des Duftmusters in den Projektionsneuronen nach der Duftwahrnehmung ein rein postsynaptisches Phänomen sein kann.

Diskussion zu den Verhaltensexperimenten

Die Veränderung im Verhalten einer Biene nach einer mehrfachen differentiellen Konditionierung findet sich als Veränderung der Aktivitätsmuster im Antennallobus wieder. Während die Veränderung auf Verhaltensebene darin liegt, dass die Tiere den belohnten Duft häufiger mit dem Rüsselreflex beantworten als den unbelohnten, zeichnet sich die Veränderung auf neuronaler Ebene dadurch aus, dass das Muster des belohnten Duftes nach der differentiellen Konditionierung stärker aktiviert wird als das des unbelohnten Duftes. Ob ein direkter Zusammenhang zwischen diesen beiden Veränderungen besteht, konnte im Rahmen dieser Arbeit nicht geklärt werden. Zum einen wurde das Verhalten (Rüsselreflex) nicht beobachtet und zum anderen wurden „nur“ die Projektionsneurone untersucht. Sicherlich erscheint es plausibel, dass das stärkere Signal aus dem Antennallobus nachgeschaltete Neurone entsprechend stärker aktiviert und letzten Endes, die den Rüsselreflex auslösenden (Motor-)Neurone ebenso. Allerdings kann über die Weiterleitung der verstärkten Aktivierung nur spekuliert werden.

Als ersten wichtigen Punkt gilt es anzumerken, dass die Erkenntnis, dass nach der mehrfachen differentiellen Konditionierung für den belohnten Duft eine verstärkte Aktivierung sichtbar wurde, nur für die Auswertung auf glomerulärer Ebene zutrifft. Für den gesamten Antennallobus ist nur eine deutliche Tendenz zu erkennen. Außerdem gilt diese Beobachtung nur für Tiere, die bereits 5 Minuten nach dem Training getestet wurden. Für Bienen, die 15 Minuten nach dem Training getestet wurden gilt dies nicht. Diese Beobachtung deckt sich nicht mit Verhaltensexperimenten, aus denen hervorgeht, dass Bienen durchaus in der Lage sind, einen gelernten Duft von einem nicht belohnten Duft über einen Zeitraum von mehreren Tagen zu unterscheiden. Es kann allerdings nicht

ausgeschlossen werden, dass auch die 15'-Tiere die Unterscheidung gelernt haben, eine Überprüfung war in diesen Experimenten nicht möglich. Das heißt, es kann durchaus sein, dass die Tiere den Rüsselreflex auf den belohnten Duft auch nach 15 Minuten gezeigt hätten. Somit wäre ein verstärktes Kalziumsignal im Antennallobus nicht zwingend nötig für den konditionierten PER. Sicherlich ist es unerlässlich, dass während der Akquisition intrazelluläre Signalwege aktiviert werden, welche zu einer Gedächtnisbildung führen. Die vorliegende Arbeit zeigt jedoch, dass zu späteren Zeitpunkten (ab 15 Minuten nach dem Training) im Antennallobus eine erhöhte Kalziumkonzentration nicht mehr messbar ist. In diesem Fall müssten andere Signalwege die Funktion übernehmen, den Zellen beziehungsweise der Biene einen gelernten Duft anzuzeigen. Ein Kandidat wäre die PKA, welche sich noch bis zu drei Tage nach einer mehrfachen Konditionierung verstärkt in den Neuronen des Antennallobus messen lässt (Müller 2000).

Vergleich Faber/Weidert

Ein Vergleich zwischen der vorliegenden Arbeit mit den Ergebnissen von Faber (1999) weist einen deutlichen Unterschied auf. Während die vorliegenden Resultate nahe legen, dass die Kalziumkonzentration 15 Minuten nach dem Training wieder auf ein Normalniveau gesunken ist, findet Faber, dass die Kalziumkonzentration noch bis zu 30 Minuten nach der Konditionierung erhöht ist. Hier sei nun auf einige Unterschiede zwischen den beiden Studien hingewiesen. Der wichtigste ist sicherlich der Einsatz zweier unterschiedlicher Methoden. Während Faber sämtliche Zellen des Antennallobus' mit einem membrangängigen Farbstoff (CalciumGreen) färbte, wurden für die vorliegende Arbeit nur die Projektionsneurone gefärbt (FURA). Mit

CalciumGreen werden vor allem Rezeptorneurone gefärbt, da diese am häufigsten im Antennallobus vertreten sind (ca. 60.000 Rezeptorneurone gegenüber 800 Projektionsneurone). Somit können die unterschiedlichen Ergebnisse daher rühren, dass die verschiedenen Zellen unterschiedlich auf eine differentielle Konditionierung reagieren. Schließlich handelt es sich hier um die prä- (Rezeptorneurone) und postsynaptischen (Projektionsneurone) Elemente in der olfaktorischen Bahn, also zwei sehr unterschiedliche Kompartimente. Es sind die Input- beziehungsweise Outputregionen des Antennallobus und der Einfluss des modulatorischen Neurons (VUMmx1) fällt sicherlich unterschiedlich aus. Es sollte an dieser Stelle noch angeführt werden, dass das CalciumGreen-Signal möglicherweise auch von Gliazellen stammen kann.

Des Weiteren handelt es sich bei den Daten von Faber ausschließlich um gemittelte Daten von drei verschiedene Messungen (10, 20, 30 Minuten nach dem Training). Auch in der vorliegenden Arbeit wurden drei Messungen gemittelt, allerdings fand ebenso eine Einzelbetrachtung statt. Dabei wurde die Kalziumkonzentration zwischen bestimmten Glomeruli verglichen. Hier zeigt sich, dass das Ergebnis aus den gemittelten Daten deutlich bestätigt wird, das heißt, dass 15 Minuten nach dem Training tatsächlich keine erhöhte Kalziumkonzentration mehr messbar ist. Somit rührt der Unterschied zwischen den hier vorliegenden Daten und den Daten von Faber womöglich daher, dass verschiedene Neurone gemessen wurden und/oder dass unterschiedlich ausgewertet wurde. Vielleicht findet sich in den Daten von Faber ebenso ein Unterschied in den verschiedenen Messpunkten, also in den ungemittelten Werten. Es könnte durchaus sein, dass die erhöhte Kalziumkonzentration nur für den ersten Messpunkt (10 Minuten nach dem Training) gefunden wurde und sie dann langsam abnimmt.

Somit wäre der Antennallobus nur eine Art Kurzzeitspeicher und die Speicherform beziehungsweise die Abrufform wäre das verstärkte

Signal des gelernten Duftmusters, welches dann zu einer Verhaltensreaktion führt. Gleichzeitig würden jedoch innerhalb der Projektionsneurone und in den nachgeschalteten Zellen Prozesse ablaufen, die das Gedächtnis in eine länger anhaltende Form transferieren. Daher könnte nach 15 Minuten das verstärkte Kalziumsignal in den Projektionsneuronen bereits abgeklungen sein, jedoch in den nachgeschalteten Neuronen höherer Zentren, wie dem Pilzkörper, immer noch messbar sein. Somit würde das Signal des gelernten Duftes den Antennallobus unverstärkt passieren, in nachgeschalteten Neuronen jedoch auf Zellen treffen, die die Signatur „gelernter Duft“ tragen, welche allerdings nicht notwendigerweise aus einem Kalziumsignal bestehen muss.

Ein wichtiger Aspekt ist allerdings, warum der gelernte Duft noch bis zu 15 Minuten das Duftmuster derart stark aktiviert. Kühlexperimente (Menzel 1974; Erber 1980) haben gezeigt, dass bereits nach weniger als drei Minuten der Antennallobus für die Etablierung eines Langzeitgedächtnisses nicht mehr nötig ist. Daher bräuchte die Information darüber, dass es sich bei einem nach dem Training perzipierten Duft um den gelernten Duft handelt, nicht mehr aus dem Antennallobus kommen. Dass das Muster dennoch derart stark aktiviert wird, könnte am VUMmx1 liegen. Dieses Neuron reagiert auf einen gelernten Duft mit einer erhöhten Feuerrate. Diese verstärkte Aktivierung des VUMmx1 könnte daher auch das Duftmuster im Antennallobus verstärken, ein Effekt, der während der Konditionierung beobachtet werden kann. Dass dieses Phänomen nach 15 Minuten nicht beobachtet werden kann, könnte daran liegen, dass im Laufe der Zeit das VUMmx1 wieder in seinen Ausgangszustand kommt.

Zuckerwasser und Oktopamin

Unabdingbar für einen Lernerfolg ist die Paarung des Duftes mit Zuckerwasser. Während des Trainings lässt sich beobachten wie das Zuckerwasser das Muster des Duftes verändert. Bei der Analyse der Kalziumkonzentrationen während dieser Lernphase, kann man beobachten, dass zusätzlich zum Anstieg beim Einsetzen der Duftantwort ein weiterer Anstieg beim Einsetzen der Zuckerwasserstimulation erfolgt. Die Abbildungen 24, 27, 28 und 29 zeigen diese deutlich erhöhte Kalziumkonzentrationen während der Lernphase. Dieser Effekt ist vermutlich darauf zurückzuführen, dass während der Konditionierung nicht nur die olfaktorische Bahn aktiviert wird, sondern auch das modulatorische VUMmx1. Möglicherweise strömt durch die Aktivierung des US-Signalweges und die daraus folgende Ausschüttung von Oktopamin, vermutlich vermittelt durch intrazelluläre Signalwege, noch mehr Kalzium in die Projektionsneuronen ein. Eine andere Erklärung für die höhere Kalziumkonzentration könnte die Freisetzung von Kalzium aus intrazellulären Reservoirs sein, welche in dem Moment einsetzt, nachdem das erste Mal Oktopamin als Folge einer Zuckerwasserstimulation freigesetzt wurde. Dadurch werden andere intrazelluläre Signalwege aktiv, als bei einer einfachen olfaktorischen Stimulation. Wichtig ist auch, dass in dem Fall der vorliegenden Arbeit mehrfach konditioniert wurde. Die erhöhte Kalziumkonzentration während des Trainings weist auf eine erhöhte Aktivität innerhalb des Neurons hin. Dies wird durch Arbeiten von Hildebrandt und Müller (1995) unterstützt. Sie zeigten, dass durch die Zuckerwasserstimulation der Antenne die PKA-Aktivität ansteigt und dass diese Aktivierung über Oktopamin vermittelt wird. Somit findet während des Trainings durch die Aktivierung des VUMmx1-

Neurons eine Erhöhung des PKA-Levels und der Kalziumkonzentration statt. Die PKA kann eine Vielzahl von Signalkaskaden beeinflussen, unter anderem auch Transkriptionsfaktoren im Zellkern. Kalzium wiederum ist notwendig für die Aktivierung etwa der PKC und der NO-Synthase. Über das gebildete NO kann ein Signal von der Postsynapse (Projektionsneuron) in die Präsynapse (Rezeptor- oder Interneuron) vermittelt werden. Esteban et al. (2003) konnten an Schnitten von Rattenhippocampi zeigen, dass die PKA direkt an synaptischer Plastizität beteiligt ist, in dem sie die Eingliederung von AMPA-Rezeptoren in die Synapse kontrolliert, wodurch die Stärke der Synapse modifiziert wird. Dieser Vorgang scheint keine neuronale Aktivität zu benötigen (Esteban et al. 2003). Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass für eine Langzeitpotenzierung (LTP; lang anhaltende Verstärkung einer Synapse) die Modifizierung des postsynaptischen Neurons notwendig ist und dass LTP-Induktion von dem Level an freien Kalzium abhängt (Lisman 1989). Anhand dieser Beispiele wird deutlich, wie wichtig Kalzium und die PKA für eine Veränderung eines Neurons sind. Wie sich diese Veränderungen auf die nachgeschalteten Neurone auswirken und ob sie tatsächlich die Ursache für die Auslösung des Rüsselreflexes und somit für ein sichtbares Verhalten sind, konnte nicht geklärt werden.

Generalisierung

Ein weiteres Phänomen, welches vereinzelt beobachtet werden konnte, ist das der Generalisierung, das heißt, die Biene überträgt die Bedeutung des CS+ auf einen anderen Duft. Hierbei antworten Glomeruli, welche sowohl zum Muster des belohnten Duftes als auch eines Kontrollduftes gehörten, verstärkt auf eine Stimulation durch den Kontrollduft (dieser Effekt war statistisch nicht signifikant).

Dabei spielt es offensichtlich keine Rolle, wie stark die Duftmuster überlappen. Teilweise traten Fälle auf, in denen ein Glomerulus nach der differentiellen Konditionierung zur CS--Präsentation aktiviert wurde, der nicht zum CS--Muster sondern zum CS+Muster gehörte. Dabei wurde dieser Glomerulus nach dem Training stärker aktiviert. Auf der Ebene des Antennallobus' geht dadurch die Identität des gelernten Duftes verloren, denn offensichtlich reagieren die besagten Glomeruli nicht mehr spezifisch nur auf den gelernten Duft verstärkt. In diesem Fall wäre es interessant gewesen zu beobachten, ob die Stimulation durch den Kontrollduft zu einer Verhaltensantwort geführt hätte. Auf der anderen Seite ist es denkbar, dass bei der Übertragung des Duftmusters in höhere Zentren das gesamte Muster übertragen wird. Dadurch könnte die Biene den gelernten von einem Duft unterscheiden, welcher ein überlappendes Muster hat. Aus dem Verhalten weiß man allerdings, dass Bienen nach einer einfachen Konditionierung durchaus auch auf einen nicht gelernten Duft mit dem Rüsselreflex antworten. Dieser wird umso häufiger gezeigt, je ähnlicher der neue Duft dem trainierten Duft ist (Smith, 1991). Hierbei spielt auch die sensitivierende Wirkung der Zuckerwasserstimulation während des Trainings eine Rolle. Da durch einen Kontrollduft nach dem Training das VUMmx1-Neuron nicht aktiviert wird, ist es schwierig eine Erklärung für das verstärkte Antwortmuster des Kontrollduftes zu finden. Die einzige Möglichkeit wäre, dass die Biene den Duft wirklich verwechselt. Die Abspeicherung des gelernten Duftes wäre der Repräsentation eines Kontrollduftes so ähnlich, dass auch dieser VUMmx1 aktiviert. Es bleibt allerdings zu bedenken, dass im Falle der vorliegenden Arbeit mehrfach differentiell konditioniert wurde und in diesem Fall Generalisierung seltener auftritt und für diese Arbeit auch ein deutlicher Unterschied zwischen gelerntem Duft und den Kontrolldüften festgestellt wurde.

Mustervergleich

Bei der Betrachtung des Musters des belohnten Duftes fällt auf, dass das gesamte Muster erhalten bleibt und dass vor allem die Hauptglomeruli verstärkt werden. Das Muster des unbelohnten Duftes wird schwächer. Der Unterschied zwischen den Muster (CS+ und CS-) wird dadurch augenscheinlich größer (eine Berechnung eines Korrelationskoeffizienten erfolgte nicht). Das wiederum erleichtert der Biene möglicherweise die Unterscheidung zwischen zwei Düften. Dies gilt, wenn man sich die Tiere, der 5'-Gruppe anschaut. Die Duftmuster der Tiere, die 15 Minuten nach dem Training getestet wurden, sind untereinander ausgeglichener. Das heißt, der Unterschied zwischen dem CS+- und dem CS--Muster ist augenscheinlich nicht so deutlich wie bei den 5'-Tieren.

Dass der Unterschied zwischen den Muster (CS+ und CS-) im Laufe des Trainings größer wird (Abbildung 25), legt die Vermutung nahe, dass die Bienen auch tatsächlich in einem ersten Schritt, das gesamte Duftmuster abspeichern. Dies ist sicherlich ein sinnvoller Schritt, da erst das gesamte Muster die genaue Identität des Duftes beinhaltet. Die Speicherung etwa nur der Hauptglomeruli würde wesentlich leichter zu Verwechslungen führen.

In diesem Zusammenhang sei die Arbeit von Brennan et al. (1998) angeführt. Er konnte zeigen, dass im olfaktorischen Bulbus (das Analogon zum Antennallobus bei Insekten) von Mäusen die Präsentation des konditionierten Duftes, nicht aber des unkonditionierten Duftes, zu einer signifikanten Erhöhung bestimmter Neurotransmitter führt. Dieser Effekt verschiebt für den belohnten Duft das Verhältnis von excitatorischer und inhibitorischer Erregung durch die Transmitter zugunsten der inhibitorischen (Brennan et al. 1998). Das würde bedeuten, dass das Muster des belohnten Duftes schärfer wird, dass des unbelohnten Duftes würde sich nicht ändern. In Falle des Antennallobus könnten durch die

erhöhte Ausschüttung inhibitorischer Transmitter einzelne, das Duftmuster tragende Glomeruli verstärkt werden. Diese Verstärkung ist offensichtlich größer als die Abschwächung von Glomeruli, die nicht zum Duftmuster gehören, schließlich findet sich in der Auswertung aller Glomeruli, dass 5 Minuten nach der Konditionierung insgesamt mehr Kalzium gemessen wird als vorher. Wäre die Abschwächung genauso stark wie die Verstärkung, würde sich kein Unterschied in der Kalziumkonzentration messen lassen. Die Regulation über eine erhöhte Ausschüttung inhibitorischer Transmitter nach der Konditionierung muss in jedem Fall nachgeschalteten Neurone obliegen, da nur hier die Information liegt, dass der soeben perzipierte Duft der gelernte ist. Sicherlich könnte etwa über Stickstoffmonoxid schnell eine Synapse verstärkt werden, allerdings würde diese Synapse auch verstärkt sein, wenn der unbelohnte Duft sie aktiviert, etwas das durchaus passiert (Düfte mit überlappenden Mustern). Daher muss zusätzlich eine Information darüber bestehen, welcher Duft gerade wahrgenommen wird.

Ein weitere interessanter Punkt im Zusammenhang mit den Mustern für den CS+ und den CS- ist die Beobachtung, dass während der Luftmessung nach dem Training einzelne Glomeruli verstärkt spontan aktiv sind. Ähnlich wie in den Experimenten zur Spontanaktivität tritt zwar nie das gesamte Muster eines Duftes auf, dennoch hat es den Anschein als würde vor allem derjenige Glomerulus aktiviert, der für den CS+ den Hauptglomerulus darstellt. Ob eine erhöhte Korrelation zwischen Duftglomeruli auftritt, ließ sich aufgrund der kurzen Messdauer nicht feststellen. Dennoch kann man vermuten, dass man in dieser frühen Phase nach dem Training, dem AL beim Einspeichern des CS+-Musters beobachtet. Die Luftmessung stellt ja praktisch einen Zeitraum dar, in dem man solche Vorgänge vermuten würde. Somit wird eventuell durch das wiederholte Aktivieren von Duftglomeruli das Duftmuster

eingespeichert. Dieser Vorgang wäre gut vorstellbar während des Rückfluges zum Stock. Dies folgt in etwa der hippocampalen Reaktivierung von sogenannten „place cells“ während des Schlafes. Wilson und McNaughton konnten an Ratten zeigen, dass Hippokampuszellen, die in einer neuen räumlichen Umgebung aktiviert wurden und somit diesen Ort repräsentieren, während des Schlafens erneut verstärkt feuern (Wilson und McNaughton 1994).

Vergleich hochkonzentrierter Duft <-> gelernter Duft

Zum Abschluss soll ein weiterer Vergleich betrachtet werden. In diesem Fall geht es darum, wie eine Biene einen gelernten Duft von einem stark konzentrierten Duft unterscheiden kann. Sachse stellte in ihrer Arbeit vor, wie verschieden starke Konzentrationen im Antennallobus repräsentiert werden (Dissertation, Kapitel 4). Sie konnte zeigen, dass je höher die Konzentration der Düfte war, desto besser konnten sie auf Ebene der Projektionsneurone unterschieden werden. Wichtig für den Zusammenhang mit der vorliegenden Arbeit ist jedoch, dass bei hohen Konzentrationen mehr Glomeruli stärker aktiviert wurden. Die stärkere Aktivierung einzelner Glomeruli findet sich ebenso bei der Präsentation des gelernten Duftes. Somit wäre das Muster für etwa Octanol in beiden Fällen (gelernter Duft <-> konzentrierter Duft) gleich zumindest jedoch sehr ähnlich. Bis jetzt liegen noch keine statistischen Untersuchungen zwischen den beiden Kategorien vor. Allerdings gibt es einige Anhaltspunkte, die mögliche Unterschiede erklären würden. Der wichtigste Aspekt ist, dass durch die Wahrnehmung des gelernten Duftes nicht nur die Projektionsneurone im Antennallobus verstärkt aktiviert werden, sondern auch nachgeschaltete Neurone (verstärkt?) reagieren. Dies ist der Fall, da während des Trainings der Duft mit Zuckerwasser gepaart wurde. Diese Assoziation findet auch in nachgeschalteten Neuronen statt,

da auch hierher das den Zuckerwasserstimulus vermittelnde Neuron, VUMmx1, projiziert. Das VUMmx1 wird durch stark konzentrierte Düfte nicht aktiviert, somit werden durch das Wahrnehmen eines solchen Duftes lediglich die Projektionsneurone stärker aktiviert. Diese Aktivierung trifft jedoch auf keine nachgeschalteten Neurone, die die Signatur „gelernter Duft“ tragen; es kommt daher auch zu keiner Verhaltensreaktion, das heißt die Biene würde in so einem Fall nicht „denken“, dass dies ein von ihr gelernter Duft war.

Es sei noch erwähnt, dass die in der vorliegenden Arbeit verwendete Konzentration in etwa der stärksten Konzentration in der Arbeit von Sachse entspricht. Das bedeutet, dass sich die Muster in den beiden Kategorien ähneln; jedoch führt das Training zu einer verstärkten Aktivierung der Projektionsneurone über das ursprüngliche Niveau hinaus. Wie bereits erwähnt ist dies aber nicht das Kriterium für die Biene, mit dem sie einen gelernten Duft wiedererkennt. Dies legen auch die Überlegungen zu den Ergebnissen der Tiere der 15´ Gruppe nahe. Hier findet sich kein verstärktes Signal in den Projektionsneuronen. Allerdings ist davon auszugehen, dass auch diese Tiere den CS+ vom CS- unterscheiden können. Daher scheint eher ein Signal in nachgeschalteten Neuronen für die Wiedererkennung eines gelernten Duftes verantwortlich zu sein. Dieses wird durch einen stark konzentrierten Duft jedoch nicht aktiviert. Somit kann eine Biene solch einen Duft von einem gelernten Duft unterscheiden.

5. Abschließende Bemerkungen

Die hier vorgestellte Arbeit untersuchte die Arbeitsweise des Antennallobus in verschiedenen Situationen. Dabei wurden sowohl assoziative als auch nicht-assoziative Phänomene beobachtet.

Die Untersuchung der Sensibilisierung zeigte, dass im Vergleich zu nicht sensibilisierten Tieren sensibilisierte Bienen bis zu 6,5 Minuten eine höhere Kalziumkonzentration in Projektionsneuronen des wichtigsten Glomerulus für ein Duftmuster aufwiesen. Dabei spielt die vermutete Freisetzung von Oktopamin über das durch die Sensibilisierung aktivierte VUMmx1 eine wichtige Rolle. Die erhöhte Kalziumkonzentration führt vermutlich nur kurz nach der Sensibilisierung (erster Messpunkt nach 30 Sekunden) zu einer deutlichen Verhaltensreaktion (mehr als 50% duft-induzierter PER).

Außerdem zeigen die vorliegenden Daten, dass die Spontanaktivität ihre Eigenschaften auf Grund eines Duftstimulus ändert. Es sind durchaus Spuren des Duftes nach dessen Wahrnehmung im Netzwerk „AL“ in Form einer erhöhten Korrelation zwischen Duftglomeruli sichtbar. Wahrscheinlich sind diese Veränderungen wichtig für andere Prozesse, wie dem Lernen.

Die Suche nach dem neuronalen Korrelat für Verhalten bleibt weiterhin ausgesprochen schwierig. Obschon in dieser Arbeit einige Ansätze zum besseren Verständnis gefunden wurden, bleiben viele Fragen offen. Für weitere Experimente ist es sicherlich unerlässlich gleichzeitig zu den Messungen neuronaler Aktivität, das Verhalten zu beobachten beziehungsweise zu messen (PER-Muskel M17). Auf diese Weise würde eindeutig festgestellt werden können, ob eine irgendwie geartete Veränderung in der olfaktorischen Bahn auch wirklich den Rüsselreflex auslöst oder nicht und somit Auskunft darüber gibt, ob die Biene gelernt hat oder nicht. Auch hier können

durchaus Zweifel aufkommen, etwa bei einem Ausbleiben des Rüsselreflexes. Schließlich sind die Versuchsbedingungen alles andere als natürlich; nicht nur die Präparation könnte Einfluss auf das Lernverhalten nehmen, auch das experimentelle Design entspricht wohl nie genau den natürlichen Gegebenheiten. Solche Probleme (vor allem ersteres) sind allerdings bis jetzt wohl kaum zu beheben. Dennoch hätte es für diese Arbeit die Interpretation der Ergebnisse erleichtert. Grundlage der Diskussion waren im Falle der vorliegenden Arbeit immer die Verhaltensdaten. Somit fällt die Interpretation für die Unterschiede zwischen den beiden Lerngruppen (5' und 15') so aus, dass auf jeden Fall alle Tiere aus beiden Gruppen den PER gezeigt hätten. Im 5'-Fall ist der Transfer des Gedächtnisses in höhere Zentren noch nicht abgeschlossen, daher wird noch ein erhöhtes Kalziumsignal in den Projektionsneuronen bei Präsentation des gelernten Duftes gemessen. Dieses ist notwendig, um zur Auslösung des PER zu führen. Nach der Etablierung des Langzeitgedächtnisses (15'-Gruppe) reicht für die Auslösung des PER schon eine „normale“ (ohne erhöhtes Kalzium in den Projektionsneuronen) Aktivierung eines veränderten nachgeschalteten Neurons (oder mehrerer). Diese Vermutung wird durch die Beobachtung bestätigt, dass nach 15 Minuten kein erhöhtes Kalziumsignal mehr in den Projektionsneuronen zu messen ist, die Tiere aber dennoch PER zeigen (müssten).

Die erhöhte Kalziumkonzentration in einigen Glomeruli nach dem Training bei der Präsentation eines Kontrollduftes beziehungsweise des CS-, lässt darauf schließen, dass die Biene in diesem Fall generalisiert. Ob jedoch in diesen Fällen tatsächlich der Duft verwechselt wurde, konnte nicht geklärt werden, da eine Überprüfung einer Verhaltensreaktion nicht möglich war. Das heißt, es kann durchaus möglich sein, dass der Kontrollduft beziehungsweise der CS- eine verstärkte Aktivierung von Glomeruli

hervorriefen, ob dies allerdings auch ein Verhalten nach sich zog, bleibt unklar. Wenn dies der Fall gewesen wäre, wäre eine mögliche neuronale Grundlage der Generalisierung nach einer Konditionierung, die erhöhte Kalziumkonzentration in Projektionsneuronen.

Die stärkere Aktivierung einzelner Glomeruli nach dem Training während der Luftmessung, folgt in gewisser Weise den Beobachtungen aus den Spontanaktivitätsexperimenten. Im Falle der Verhaltensexperimente wird möglicherweise nach dem Training in den Phasen spontaner Aktivität durch erneutes Aktivieren der Duftmusterglomeruli das Gedächtnis zu diesem Muster auf diese Weise konsolidiert.

Ausblick

Die von Silke Sachse entwickelte und in dieser Arbeit angewandte Methode der optischen Messung von Projektionsneuronen, stellt einen Fortschritt bei der Untersuchung neuronaler Vorgänge im Antennallobus der Biene dar. Es ist nun möglich, ganz gezielt eine Population von Neuronen zu untersuchen. Mit dieser Methode war es in dieser Arbeit möglich, einige Fragen nach dem assoziativen und nicht-assoziativen olfaktorischen Lernen bei der Biene ansatzweise zu klären beziehungsweise besser zu verstehen. Weitere Experimente sollten nach Möglichkeit eine Kontrolle des Verhaltens beinhalten. Vor allem bei den Verhaltens- und Sensibilisierungsexperimenten hätte dies einige Unsicherheiten bei der Auslegung der Daten beseitigt. Des Weiteren wären höhere Abstraten beim Imaging wünschenswert, um so mögliche Veränderungen auch im zeitlichen Verhalten der Projektionsneurone feststellen zu können. Hierzu müssten spannungsabhängige Farbstoffe verwendet werden. Außerdem wird es für die Klärung von Gedächtnisbildung und -abruf nötig sein, nachgeschaltete Neuropile

(zum Beispiel Pilzkörper) in die Experimente einzubeziehen. Dabei wäre eine gleichzeitige Messung beider Neuropile (Antennallobus und Pilzkörper) sicherlich am effektivsten.

Des Weiteren wären genetische Werkzeuge, wie sie etwa für *Drosophila* zur Verfügung stehen, auch für die Biene wünschenswert. So könnte es etwa Bienenmutanten geben, in denen die Projektionsneurone einen kalziumsensitiven Farbstoff exprimieren. Dadurch könnten Tiere geimaged werden, ohne einen Eingriff vorher durchführen zu müssen.

6. Zusammenfassung

In dieser Arbeit wurde mit Hilfe eines kalziumsensitiven Farbstoffes (FURA) an Bienen die Aktivität der Ausgangsneurone des Antennallobus, den Projektionsneuronen, in drei verschiedenen Versuchssituationen gemessen.

Im Sensitisierungsexperiment wurde untersucht, wie ein mögliches neuronales Korrelat für die im Verhalten gefundenen Reaktionen aussehen könnte. Es konnte gezeigt werden, dass sensitivierte Bienen bis zu 6,5 Minuten eine höhere duftinduzierte Kalziumkonzentration in Projektionsneuronen des wichtigsten Glomerulus für ein Duftmuster aufweisen als nicht sensitivierte Tiere. Die Ergebnisse lassen vermuten, dass zumindest für den ersten Messpunkt 30 Sekunden nach der Sensitisierung die erhöhte Kalziumkonzentration in den Projektionsneuronen eine Verhaltensreaktion (PER) nach sich zieht.

Im zweiten Experiment wurde untersucht, ob und wie eine Duftpräsentation die stetig vorhandenen spontanen Kalziumfluktuationen in den Projektionsneuronen verändert. Die Spontanaktivitätsexperimente zeigten, dass eine Duftstimulation die Korrelation zwischen Glomeruli im Mittel senkt. Die Korrelation zwischen Duftglomeruli steigt jedoch. Dieses Ergebnis lässt darauf schließen, dass Spuren des Duftes nach dessen Wahrnehmung im Netzwerk „AL“ in Form einer erhöhten Korrelation zwischen Duftglomeruli vorhanden sind.

Die Verhaltensexperimente wurden durchgeführt, um zu untersuchen, wie Veränderungen im Verhalten neuronal repräsentiert sind. Es konnte gezeigt werden, dass die duftinduzierte Erhöhung der Kalziumkonzentration in den Projektionsneuronen 5 Minuten nach einer differentiellen Konditionierung für den CS+ und die Kontrolldüfte verstärkt ist, nicht aber für den CS-. Bei Tieren, die 15 Minuten nach dem

Training getestet wurden, wurde dieser Effekt nicht gefunden. Es kann somit vermutet werden, dass für eine Verhaltensreaktion eine erhöhte duftinduzierte Kalziumkonzentration in den Projektionsneuronen nur 5 Minuten nach dem Training nötig ist.