

1. Einleitung

Die Veränderung des Verhaltens ist essentiell für die Anpassung eines Organismus an die sich ändernden Umweltbedingungen. Im Falle der Honigbiene, *Apis mellifera*, wird aus einer Amme, die die Eier und die Brut pflegt, eine Sammlerin, die Nektar für die Kolonie einholt. Dabei werden an die Biene nun neue Anforderungen gestellt. Nicht nur, dass sie als Sammlerin erst einmal einen Weg vom Stock zu Nektar tragenden Blüten finden muss, sie muss sich den Weg einprägen, den Rückweg finden und im Stock den Flugvektor des Hinweges wieder abrufen und den anderen Sammlerinnen mitteilen. Außerdem muss sie sich merken, welche Blüte Nektar trägt, also zum Beispiel den Geruch des Blütenduftes behalten und beim erneuten Anflug erinnern.

Somit ist auf neuronaler Ebene nicht nur die Repräsentation der Umwelt interessant, sondern auch wie sich dieses Abbild verändert, wenn der Organismus lernt, sich an neue Gegebenheiten anzupassen.

1.1. Lernen und Gedächtnis

Ein gut untersuchtes Verhalten im Zusammenhang mit Lernen bei Honigbienen ist die Konditionierung des Proboscis Extension Reflexes, kurz PER. In zahlreichen Lern- und Verhaltensexperimenten (Kuwabara 1957, Bittermann et al. 1983) wurde der PER als Kriterium dafür verwendet, ob die Biene einen Duft assoziativ gelernt hat.

Der Reflex wird ausgelöst, wenn man die Antennen der Biene kurz mit Zuckerwasser berührt. Daraufhin wird die Proboscis (Rüssel) ausgestreckt, um das Zuckerwasser aufzulecken. Wird nun ein Duft mit einer Zuckerwasserstimulation (unbedingter Stimulus = US) im Sinne einer klassischen Konditionierung gepaart, reagiert die Biene

mit dem PER bald auf den Duft (konditionierter Stimulus = CS) alleine. Die Biene hat eine Assoziation zwischen einem ursprünglich neutralen Reiz (Duft) und dem unbedingte Reiz (Zuckerwasser) gebildet. Bei der Paarung der beiden Stimuli ist es wichtig, dass der Duft zeitlich vor der Zuckerwasserstimulation präsentiert wird; eine Rückwärts Paarung führt nicht zu exzitatorischem Lernen, sondern zu inhibitorischem Lernen.

Es ist auch möglich, eine differentielle Konditionierung durchzuführen. Hierbei wird ein Duft (CS+) mit Zuckerwasser belohnt, ein zweiter Duft (CS-) dagegen nicht. Wiederum wird die Biene nach einigen abwechselnden Wiederholungen (CS+, CS-, CS+, CS- ...) nur auf den belohnten Duft mit dem Rüsselreflex reagieren, was beweist, dass die Biene zwischen den beiden Düften differenzieren kann.

Im Gegensatz zu dieser assoziativen Form des Lernens, stellt die Sensitisierung eine nicht-assoziative Form dar. Hierbei kommt der Zuckerwasserstimulus vor dem Duft, so dass die Biene keine Assoziation zwischen beiden bildet. Dennoch reagiert das Tier nach einer Sensitisierung häufiger auf einen Duft als nicht sensitisierte Tiere. Allerdings sind diese Reaktionen nicht so lang anhaltend wie bei einer Assoziation und außerdem ist die Reaktion auf viele Stimuli verstärkt. Hiermit kann auch gezeigt werden, dass unterschiedliche Formen des Lernens zu unterschiedlichen Gedächtnissen führen. Während einfaches und mehrfaches assoziatives Lernen zur Etablierung eines mittelfristigen beziehungsweise langfristigen Gedächtnis führen, wird durch nicht-assoziative Formen des Lernens kein stimulus-spezifisches Gedächtnis gebildet. Dabei sind für die Konsolidierung beziehungsweise den Abruf der Lerninhalte zu verschiedenen Zeitpunkten verschiedene molekulare Mechanismen in verschiedenen Gehirnbereichen verantwortlich (siehe unten). Dies belegen zum ersten Mal für die Biene Experimente von Menzel (1974) und Erber (1980). Sie unterbrachen den Prozess der

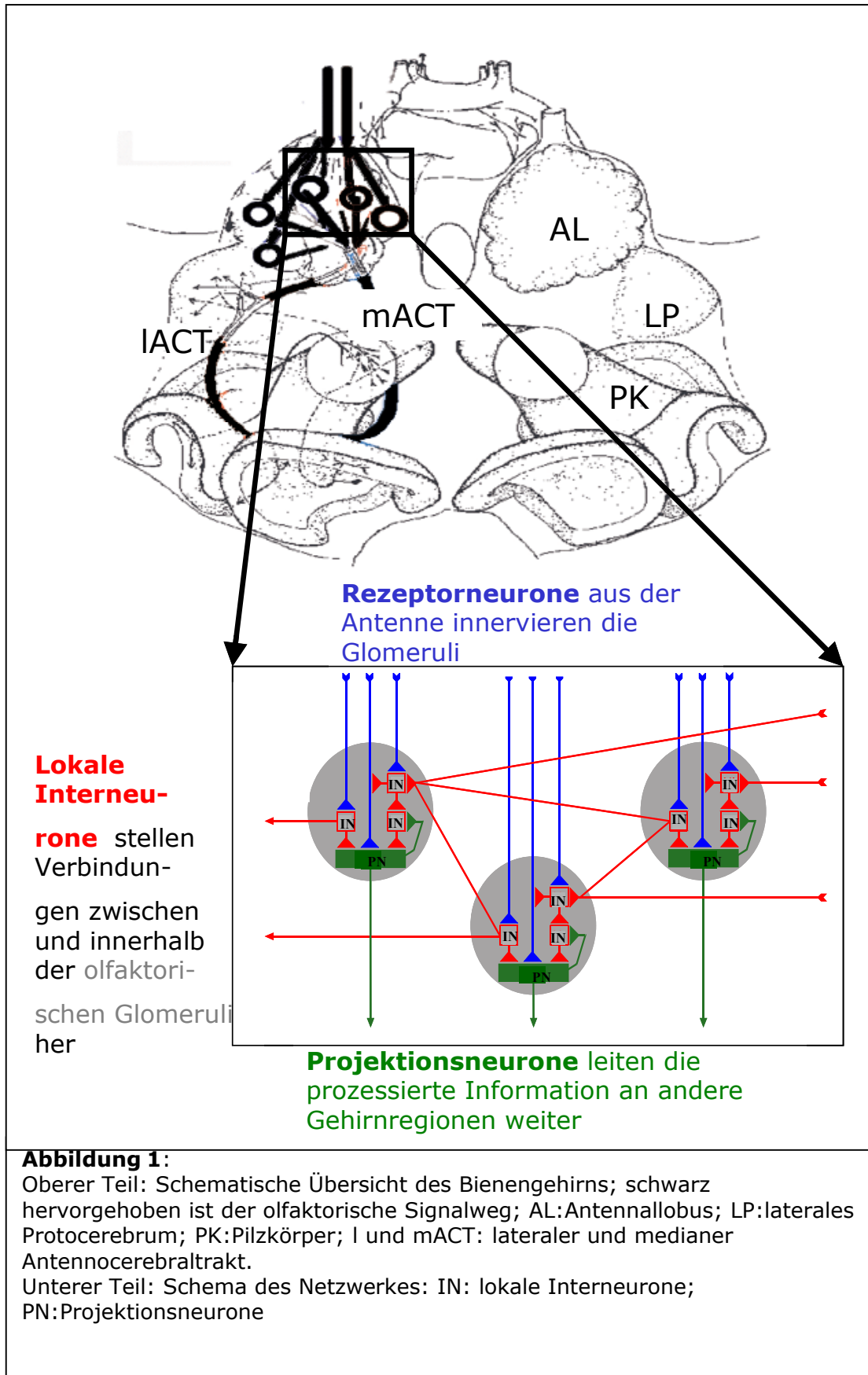
Gedächtnisbildung an verschiedenen Orten zu verschiedenen Zeitpunkten mittels Kühlung des Gewebes. Dabei wurde deutlich, dass zur Etablierung eines Gedächtnisses in der frühen Phase nach dem Lernen vor allem die erste Verarbeitungsstation für Düfte im Bienenhirn (Antennallobus) nötig ist. Die Kühlung führte in diesem Fall zu einer retrograden Amnesie während 1 Minute nach dem Lernen. Die Kühlung nachgeschalteter Neuropile (Pilzkörper) induzierte eine über mehrere Minuten verlaufende retrograde Amnesie. Des Weiteren konnten Grünbaum und Müller (1998) und Müller (2000) Reaktionswege finden, welche in unterschiedlichen Phasen der Gedächtnisbildung aktiv sind (siehe unten). Die Gedächtnisbildung ist somit ein sehr dynamischer Prozess.

Die parallel zu den Lernexperimenten durchführbaren elektrophysiologischen Ableitungen oder optischen Messungen am Gehirn bieten die Möglichkeit, die neuronalen Grundlagen des olfaktorischen, assoziativen und nicht-assoziativen Lernvermögens zu untersuchen (Mauelshagen 1993, Hammer et al. 1993, Faber et al. 1999; Grünewald et al. 1999). Auch die vorliegende Arbeit soll weiteren Aufschluss über diese neuronalen Grundlagen geben. Im Folgenden soll ein kleiner Überblick über das untersuchte Netzwerk und seine Arbeitsweise gegeben werden.

1.2. Das Netzwerk „Antennallobus“

Eine Übersicht des Bienenhirns und des Netzwerks „Antennallobus“ befindet sich in Abbildung 1.

Die Duftwahrnehmung beginnt bei der Biene in den Sensillen ihrer Antennen. Die Duftmoleküle binden dort an die Rezeptorproteine der olfaktorischen Rezeptorneurone (60.000 RN's in der Honigbiene, Esslen und Kaissling 1976), wodurch das Duftsignal in ein elektrisches Signal konvertiert wird. Dieses Signal wird über die vier Trakte (T1-T4, Suzuki 1975) des Antennalnervs in das erste



duftverarbeitende Zentrum im Bienenhirn, dem Antennallobus (AL), weitergeleitet. Hier wird die eingehende Information über lokale Interneurone (ca. 4000 IN's, Witthöft 1967) auf Projektionsneurone (ca. 800 PN's, Bicker et al. 1993) oder direkt auf Projektionsneurone übertragen. Die PN's stellen die Output-Region des AL's dar. Die Synapsen der drei verschiedenen Neuronentypen liegen in sphärischen Kompartimenten, den Glomeruli (Gascuel und Masson 1991). Sie liegen in einer Zahl von 160 am Rande des Antennallobus' und stellen die morphologischen und funktionellen Untereinheiten des Antennallobus' dar (Arnold et al. 1985, Flanagan und Mercer 1989b). Man kann anhand ihrer Größe und relativen Lage Glomeruli identifizieren (Flanagan und Mercer 1989a, Galizia et al. 1999a). Dies ist zum Teil auch über ihr Antwortverhalten auf Düfte möglich (Galizia et al. 1999, Sachse et al. 1999).

Die PN's leiten die prozessierte Information über drei verschiedene Antennen-Cerebral-Trakte (ACT, Mobbs 1982) weiter an die Pilzkörper (Lippenneuropil) und das laterale Protocerebrum. Es sind der mlACT (medio-laterale ACT), der mACT (mediane ACT) und der lACT (laterale ACT). Der mlACT enthält PN's, welche mehrere Glomeruli innervieren. Der lACT und der mACT enthalten PN's, welche nur je einen Glomerulus innervieren (Abel et al. 2001). Diese uniglomeruläre Innervierung erfolgt in den Regionen T1 (lACT) und T2/3 (mACT) (Abel et al. 2001, Bicker et al. 1993). Elektrophysiologische und morphologische Beschreibung der verschiedenen PN's der verschiedenen Trakte und auch von Interneuronen finden sich in verschiedenen Arbeiten (für Insekten: z.B. Vareschi 1971, Christensen et al. 1993, Sun et al. 1993, Abel 1997, Müller 1999, deBruyne et al. 2001). Wichtig für diese Arbeit sind die PN's des lACT's, da diese, in einer Zahl von drei bis fünf, sich in jenen Glomeruli finden, welche zu der T1-Region gehören,

welche wiederum an der Oberfläche des AL's liegt und somit für Kalzium-Imaging zugänglich ist.

Im Unterschlundganglion wird der Eingang der den Zuckerwasserstimulus (US) leitenden Neurone vermutet. Auch die für die Rüsselausstreckung verantwortlichen Motorneurone liegen hier. Von Bedeutung ist die Entdeckung des ventralen unpaarigen medianen Neurons, VUMmx1 (Hammer 1993). Das Soma und die Dendriten dieses identifizierte Neuron liegen im Unterschlundganglion und Projektionen von VUMmx1 verschalten dann weiter in die Glomeruli des AL, das laterale Protocerebrum und in die Lippenregion und die Basalringe der Pilzkörpercalyces. Induzierte Aktivität des VUMmx1 kann die Belohnung während der klassischen Konditionierung ersetzen, diese ist also hinreichend für die Belohnungsfunktion der Zuckerlösung. Wird nämlich dieses Neuron anstelle der Zuckerwasserbelohnung (US) unmittelbar nach der Duftstimulation (CS) intrazellulär gereizt, dann verhält sich das Tier so, als ob es den CS mit Belohnung assoziiert hat und reagiert später auf den CS genauso wie nach einer Paarung von Duft und Zuckerlösung (Hammer 1993). Betrachtet man die Verschaltungsorte von VUMmx1 im Gehirn, kann die CS/US-Assoziation an drei Orten erfolgen: in den Glomeruli des AL, im laterale Protocerebrum und in den Lippen und Basalringen der Pilzkörpercalyces. Als Transmitter wird Oktopamin vermutet (Kreissl et al. 1994). Hammer und Menzel (1998) konnten außerdem zeigen, dass Oktopamininjektionen in den Antennallobus oder dem Pilzkörper gepaart mit einem Duftstimulus zu einer Gedächtnisbildung führen. Während der Akquisition zeigen allerdings nur die Bienen den PER, welche eine Paarung von Duft und Oktopamininjektion im Antennallobus erfahren. Tiere, bei denen die Oktopamininjektion im Pilzkörper erfolgte, zeigten keine Erhöhung an duft-induzierten PER's während der Akquisition, aber später beim Retentionstest (Hammer und Menzel 1998). Weitere

Klarheit über die Wichtigkeit von Oktopamin beim assoziativen Lernen erbrachten Farooqui et al. (2003). Sie zeigten, dass mit Antagonisten gegen den Oktopaminrezeptor oder durch die Unterdrückung der Oktopaminrezeptorexpression, die Akquisition und auch der Abruf des Gedächtnisses inhibiert wurden (Farooqui et al. (2003).

1.3. Die Transmitter im AL

Es sind bereits einige zelluläre Mechanismen der Duftwahrnehmung und des Dufterlernens bekannt. Bei der Duftwahrnehmung beziehungsweise bei der Signalleitung des olfaktorischen Stimulus sind verschiedene Transmitter involviert.

Düfte werden im AL als Ensembles aktivierter beziehungsweise inhibierter Glomeruli repräsentiert. Diese Aktivierung drückt sich im Kalzium-Imaging durch eine erhöhte Kalziumkonzentration aus. Bei dem Vergleich der Aktivierung gemessen mit CalciumGreen beziehungsweise mit FURA fällt ein wesentlicher Unterschied auf, der den Antennallobus als ein gutes Beispiel für ein neuronales Netzwerk auszeichnet, welches einen enormen sensorischen Input (60.000 RN) auf vergleichsweise wenige Output-Neurone (800 PN) überträgt (Hildebrand und Shepherd 1997, Schild 1988). Es zeigt sich, dass das FURA-Signal (PN's) begrenzter (schärfer) ist als das der CalciumGreen-Messungen (hauptsächlich RN's), was darauf schließen lässt, dass die inhibitorischen Verbindungen (IN's) den Kontrast zwischen den Glomeruli erhöhen (Sachse 2002).

Die cholinerge Neurotransmission scheint eine Hauptrolle im sensorischen Teil des zentralen Nervensystem der Biene zu spielen. Im Antennalnerv der Biene konnte zum einen eine starke Immunoreaktivität für den nikotinischen Acetylcholinrezeptor (nAChR-IR), zum anderen eine schwache Acetylcholinesterase(AChE)-Aktivität detektiert werden (Kreissl und

Bicker 1989). Im Antennallobus ist die AChE-Aktivität auf die äußeren Glomeruli beschränkt, die zentralen Neuropile sind nicht gefärbt (Bicker 1999). Auch antennale sensorische Projektionen in das Unterschlundganglion (Arnold et al. 1985, Mobbs 1985, Pareto 1972, Suzuki 1975) zeigen AChE-Aktivität. Ebenfalls im Antennallobus konnte eine hohe Dichte an nAChR-IR (Kreissl und Bicker 1989) und außerdem alpha-Bungarotoxin-Bindungsstellen (Scheidler et al. 1990) festgestellt werden. Nimmt man diese Ergebnisse zusammen, ist eine cholinerge Neurotransmission im Antennallobus von den sensorischen Neuronen auf die Interneurone bzw. Projektionsneurone sehr wahrscheinlich. Eine Differenzierung zwischen der Verschaltung von Rezeptorneuronen auf Projektionsneuronen und Interneuronen ist allerdings nicht möglich. In den Pilzkörpern zeigt vor allem der Lippenbereich hohe AChE-Aktivität (Bicker 1999), die der Innervierung dieser Region durch den mACT zugeschrieben werden kann. Auch die IR mit Antikörpern gegen nikotinische AChR von Insekten (Breer et al., 1985) zeigt, dass alle Pilzkörperregionen und vor allem die Inputregionen im Lippenbereich gefärbt sind. Scheidler et al. (1990) beschreiben außerdem alpha-Bungarotoxin-Bindungsstellen in den Calyces der Pilzkörper. Die Überlappung der Ergebnisse der ACh-IR und der alpha-Bungarotoxin-Bindungen zusammen mit der AChE-Aktivität in den Pilzkörpern und der Tatsache, dass Kenyonzellen funktionelle nikotinische AChR exprimieren (Goldberg et al., 1999) deutet auf einen cholinergen Pfad von den Antennalloben zu den Pilzkörpern via den Projektionsneuronen im mACT hin (Bicker et al., 1999). Der IACT dagegen weist eine starke Taurin-IR auf, eine Substanz, der vermutlich eine neuromodulatorische Wirkung zukommt (Schäfer et al. 1988, Review: Bicker 1993).

Die Mehrheit der IN's wirkt inhibitorisch, allerdings zeigen nur etwa 20% eine GABA-IR (Witthöft 1967, Schäfer und Bicker 1986). Es wurde jedoch ein weiterer inhibitorischer Transmitter in den IN's

gefunden, namentlich Histamin (Bornhauser und Meyer 1997). In den AL's lassen sich zwei unterschiedliche inhibitorische Netzwerke finden (Sachse und Galizia 2002). Eines ist Pikrotoxin (PTX = GABA-Rezeptorantagonist) sensitiv, somit wohl GABAerg und stellt einen globalen Verstärkungs-Kontrollmechanismus dar. Das zweite inhibitorische Netzwerk ist Glomerulus-spezifisch und erhöht den Kontrast bei überlappenden Antwortmustern. Es ist nicht PTX sensitiv. Entweder verfügt das zweite Netzwerk über metabotrope GABA-Rezeptoren, die sich nicht durch PTX blocken lassen oder einen anderen Transmitter. Dieser könnte Histamin sein (Sachse Dissertation Chapter 2 2002).

1.4. Second-Messenger im AL

Neben den verschiedenen Transmittern sind auch „second-messenger“ Signalkaskaden bekannt, welche unter anderem beim Duftlernen eine wichtige Rolle spielen. Recht gut verstanden sind die cAMP-abhängige Proteinkinase A (PKA) und Ca^{2+} /phospholipid-abhängige Proteinkinase C (PKC).

Beim Duftlernen aktiviert der Zuckerwasserstimulus das VUMmx1, welches über eine Oktopaminausschüttung die Adenylatzyklase aktiviert, wodurch wiederum aus ATP cAMP gebildet wird. Das gebildete cAMP kann nun die PKA anregen, welche ihrerseits in vielfältiger Weise zelluläre Veränderungen, bis hin zur Phosphorylierung von Transkriptionsfaktoren, hervorrufen kann. Müller (2000) konnte zeigen, dass für die Etablierung eines Langzeitgedächtnisses die PKA während des assoziativen Lernaktes notwendig ist. In diesem Zusammenhang soll auch noch kurz auf die Wichtigkeit der Transkriptionsfaktoren beziehungsweise die Proteinsynthese eingegangen werden. In einigen Arbeiten konnte gezeigt werden, dass die Inhibition der Proteinsynthese die

Erinnerung bis zu 24 Stunden nicht beeinträchtigt (Menzel et al. 1993; Wittstock et al. 1993; Wittstock und Menzel 1994). Für Zeitabstände von über 3 Tagen ist die Proteinsynthese allerdings notwendig für ein Erinnern (Grünbaum und Müller 1998; Wüstenberg et al. 1998).

Die PKC wird über die gemeinsame Wirkung von Ca^{2+} und Diacylglycerin aktiviert. Grünbaum und Müller (1998) konnten zeigen, dass die PKC-Menge im AL nach einem einmaligen Lernversuch beziehungsweise einer Stimulierung mit Zuckerwasser kurz ansteigt. Nach mehrmaliger Konditionierung allerdings finden sie die PKC noch bis zu 3 Tagen erhöht, wobei in der frühen Phasen nach dem Lernen (30 Minuten) eine vorübergehende Abnahme festzustellen ist. Auch die PKC erzeugt vielfältige zelluläre Wirkungen.

Ein weiterer wichtiger Botenstoff im Zusammenhang mit Lernen ist Stickstoffmonoxid (NO). Als Gas ist es ihm möglich, als retrogrades Signal zu wirken. Ein denkbare synaptisches Model über die Auswirkung einer mehrfachen Konditionierung und einer NO-abhängigen Langzeitgedächtnisbildung im Antennallobus wurde von Menzel (1999, nach Lechner und Byrne 1998) aufgestellt. Es geht davon aus, dass der US-Weg (VUMmx1) gleichzeitig auf die Prä- (Rezeptorneurone) und Postsynapse (Projektionsneurone) konvergiert. Mehrfache assoziative Paarungen von Duft und Zuckerwasser führen zu einer Erhöhung der intrazellulären Kalziumkonzentration. Dadurch wird die NO-Synthase in den Projektionsneuronen aktiviert. NO verstärkt postsynaptisch die PKA-Aktivierung, was zu einem Zellkernsignal führen kann. In der Präsynapse führt NO über eine Aktivierung der Guanylatzyklase ebenso zu einer PKA-Hochregulierung. Auf diese Weise sind prä- und postsynaptische Ereignisse über NO aneinander gekoppelt.

Auch wenn, wie gerade beschrieben, einiges über die Verschaltung und die Botenstoffe im Bienenhirn bereits bekannt ist, so gibt es doch einige Phänomene auf Verhaltensebene deren neuronale Grundlage bislang unbekannt ist. Da ist zum einen die Sensitisierung (nicht-assoziatives Lernen). Neben diesem nicht-assoziativen Phänomen, sind zum anderen auch lernbedingte Veränderungen (assoziatives Lernen) neuronal noch nicht vollständig verstanden. Ein weiterer Aspekt, welcher bislang außer Acht gelassen wurde, ist, was im Bienenhirn vor sich geht, wenn das Tier nicht stimuliert wird und keine offensichtliche Reaktion zeigt und sozusagen in einem Ruhezustand ist (Spontanaktivität). Mit der vorliegenden Arbeit sollten deshalb diese drei Aspekte eingehender untersucht werden.

1.5. Ziele der Arbeit

Eine der Fragestellungen dieser Arbeit beschäftigte sich mit der Sensitisierung. Die Sensitisierung ist eine nicht-assoziative Form des Lernens, bei der ein Tier verstärkt auf eine Vielzahl von Reizen reagiert, nachdem es einen starken und bedeutungsvollen Stimulus erfahren hat (aus Kandel, Schwartz, Jessell). Im Fall der Honigbiene handelt es sich bei dem bedeutungsvollen Stimulus um Zuckerwasser und der darauffolgende Reiz ist (in der vorliegenden Arbeit) ein Duft. In Arbeiten von Menzel et al. (1989) und Hammer et al. (1994) wurde bereits auf Verhaltensebene untersucht, wie sich der Zuckerwasserstimulus auf nachfolgend präsentierte Düfte auswirkt beziehungsweise wie die Sensitisierung von dem Stimulierungsort und der Stimulierungsdauer abhängt. In der vorliegenden Arbeit sollte eine Region im Bienenhirn untersucht werden, in der möglicherweise die im Verhalten gefundenen Veränderungen auf neuronaler Ebene repräsentiert sind. Der

Antennallobus ist hierfür ein geeignetes Substrat, da hier sowohl Düfte das erstmal verarbeitet werden als auch Axone des den Zuckerwasserstimulus leitenden Neurons, VUMmx1, terminieren.

Mit einer anderen Art der Beobachtung sollte bei den Spontanaktivitätsexperimenten untersucht werden, wie sich die spontanen Kalziumfluktuationen in den und zwischen den Glomeruli des Antennallobus' aufgrund einer Duftstimulation ändern. Hierfür war es nötig, längere Zeiträume zu beobachten. Es wurde nun nicht mehr nur die Duftstimulation an sich (+/- einiger Sekunden davor und danach) gemessen, sondern mehrere Minuten davor und danach. Dadurch sollte festgestellt werden, ob das Duftmuster nach der Duftstimulation in der Spontanaktivität sichtbar wird beziehungsweise ob Glomeruli, die zum Duftmuster gehören, nach dem Stimulus aktiver werden.

Im letzten Teil der vorliegenden Arbeit ging es wieder um das Kalziumsignal während der Duftpräsentation. Es sollte geklärt werden, inwiefern eine mehrfache Konditionierung die Kalziumkonzentration in den Projektionsneuronen verändert. Auch für diesen Teil der Arbeit standen Verhaltensdaten zur Verfügung und somit sollte wie für die Sensitisierung ein neuronales Korrelat für die Veränderungen gefunden werden. Aus denselben Gründen wie schon bei der Sensitisierung wurde der Antennallobus untersucht. Ähnliche Experimente wurden bereits von Faber (1999) durchgeführt. Allerdings gibt es wesentliche Unterschiede zu dieser Arbeit. Faber beobachtete nach badappliziertem CaGreen das gesamte Neuropil des Antennallobus, während in der vorliegenden Arbeit nur die Projektionsneurone gemessen wurden. Außerdem wurde in der vorliegenden Arbeit auch die Trainingsphase selbst beobachtet.