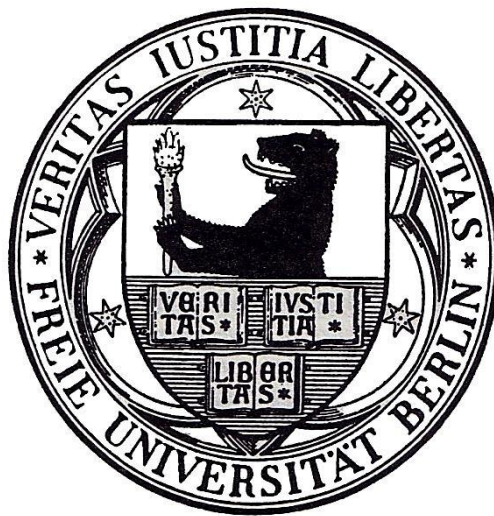


Über den Einfluss biogener Amine auf unkonditionierten und konditionierten Stimulus: Analyse der Beteiligung biogener Amine am Überleben, der Rüsselantwort, dem Stoffwechsel und dem Lernverhalten der Honigbiene, *Apis mellifera*



Dissertation

Zur Erlangung des akademischen Grades des Doktor der Naturwissenschaften des Fachbereichs Biologie, Chemie, Pharmazie der Freien Universität Berlin.

Vorgelegt von

Christina Buckemüller

aus Essen

Berlin 2014

1. Gutachter: Prof. Dorothea Eisenhardt
2. Gutachter: Prof. Hans-Joachim Pflüger

Disputation am: 14.05.2014

Die Arbeit wurde am Institut für systemische Neurobiologie in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Dorothea Eisenhardt von Frühjahr 2011 bis Frühjahr 2014 angefertigt.

*Für die 16.874 Bienen, die in drei Jahren  
für diese Arbeit ihr Leben gegeben haben.*

# 1 INHALT

1	Inhalt .....	2
2	Zusammenfassung.....	4
	Abkürzungsverzeichnis .....	6
3	Einleitung .....	8
3.1	Assoziatives Lernen in Honigbienen .....	8
3.2	Oktopamin: Der Transmitter der Belohnung? .....	9
3.3	Welche Rolle spielt Tyramin?.....	13
3.4	Fragestellung .....	14
4	Material und Methoden.....	15
4.1	Ermittlung geeigneter Arbeitskonzentrationen .....	15
4.2	Quantifizierung der Zuckersensitivität.....	18
4.3	Überprüfung der Notwendigkeit von Oktopamin für die Modulation der Rüsselantwort in hungrigen Bienen .....	20
4.4	Bestimmung der Sterberate .....	22
4.5	Quantifizierung der gefressenen Futtermenge .....	23
4.6	Quantifizierung des Oktopamin- und Tyramingehalts im Gehirn .....	24
4.7	Bestimmung des Einflusses von Oktopamin und Tyramin auf das drei Stunden Gedächtnis.....	27
4.8	Bestimmung des Einflusses von Oktopamin und Tyramin auf die Konditionierung .....	29
4.9	Bestimmung des Einflusses von Oktopamin und Tyramin auf das Extinktionslernen .....	30
4.10	Bestimmung des Einflusses von Oktopamin auf Lernen und Gedächtnis mit zwei Düften.....	32
5	Ergebnisse .....	33
5.1	Ermittlung geeigneter Arbeitskonzentrationen .....	33
5.2	Oktopamin und Tyramin modulieren die Rüssel-antwort in Abhängigkeit von dem Futterzustandes.....	38
5.3	Oktopamin ist notwendig und hinreichend für die Modulation der Rüsselantwort in hungrigen Bienen .....	46
5.4	Oktopamin beeinflusst das Überleben .....	51
5.5	Oktopamin beeinflusst die aufgenommene Nahrungsmenge.....	56
5.6	Der Futterzustand hat einen Einfluss auf den Oktopamin- und Tyramingehalt im Gehirn.....	58

---

5.7	Oktopamin und Tyramin haben einen Einfluss auf das drei-Stunden Gedächtnis.....	65
5.8	Oktopamin und Tyramin haben keinen Einfluss auf die Akquisition.....	69
5.9	Oktopamin, aber nicht Tyramin, hat einen Einfluss auf die Extinktion .....	72
5.10	Oktopamin beeinflusst die Duftwahrnehmung .....	80
6	Diskussion.....	86
6.1	Die Antwort auf Zucker ist reduziert, weil die Metabolismus-Rate reduziert ist.....	87
6.2	Spielen Neurone im Bienenhirn eine Rolle bei der Modulation des Metabolismus? .....	90
6.3	In Abhängigkeit vom Hungerzustand moduliert Tyramin oder Oktopamin die Zuckersensitivität .....	91
6.4	Oktopamin beeinflusst möglicherweise die Metabolismus-Rate und daraus resultierend kommt es beim Gedächtnisabruf zu einer verringerten Antwort auf den erlernten Duft.....	93
6.5	Oktopamin moduliert Lernen duftspezifisch .....	96
6.6	Durch Änderungen des Oktopaminspiegels über das Jahr hat Epinastin einen schwankenden Effekt .....	98
7	Abbildungsverzeichnis.....	100
8	Tabellenverzeichnis .....	102
9	Literaturverzeichnis .....	103
10	Anhang.....	117

## 2 ZUSAMMENFASSUNG

Biogene Amine spielen eine wichtige Rolle in der Modulation verschiedener Verhaltensweisen in Vertebraten und Invertebraten. Oktopamin ist ein wichtiger Neurotransmitter aber auch ein Neuromodulator in Invertebraten, welcher beinahe jeden sensorische Eingang moduliert. Neben der Wirkung als Neurotransmitter und -modulator hat Oktopamin auch eine wichtige neurohormonale Rolle als Stresshormon.

Eine zentrale Rolle besitzt Oktopamin in Invertebraten beim Lernen. Welchen genauen Beitrag Oktopamin am Lernen leistet, wurde in den letzten Jahren häufiger diskutiert. Die Signalwege von Oktopamin, Tyramin und Dopamin interagieren und erschweren so eine eindeutige Zuordnung der einzelnen Funktionen dieser Neurotransmitter bei Lern- und Gedächtnisprozessen.

Ich habe in dieser Arbeit den Einfluss biogener Amine auf die Zuckersensitivität, den Metabolismus und Lernen und Gedächtnis in der Honigbiene untersucht. Ich habe gezeigt, dass Oktopamin und Tyramin die Beantwortung einer Zuckerstimulation an den Antennen mit dem Herausstrecken des Rüssels in Abhängigkeit des Hungerzustandes der Tiere modulieren. Ich habe gezeigt, dass Dopamin an der Modulation der Zuckersensitivität nicht beteiligt ist. Oktopamin beeinflusst, in Abhängigkeit von dem zu lernenden Duft, das Lernen. Oktopamin beeinflusst das Gedächtnis von Bienen. Die Effekte auf das Gedächtnis, entsprechen denen der Zuckersensitivität: Die Hemmung der Oktopaminwirkung durch Injektion eines Oktopaminrezeptorantagonisten verringert die Antwort auf Zucker (Zuckersensitivitätsexperimente) und auf den erlernten Duft (Lernexperimente). Ebenso hat Oktopamin einen Einfluss auf Extinktionslernen und den Abruf des Extinktionsgedächtnisses. Ich habe gezeigt, dass sich Oktopamin- und Tyraminspiegel im Bienenhirn in Abhängigkeit vom Futterzustand verändern und dass ein die Hemmung der Oktopaminwirkung Einflüsse auf den Metabolismus der Tiere hat. Außerdem wurden mögliche Modulationsorte im Bienenhirn gefunden.

## ABSTRACT

Biogenic amines play an important role in the modulation of behavior in vertebrates and invertebrates. Octopamine, a biogenic amine, exclusively for invertebrates is an important neurotransmitter and neuromodulator and has a considerable role as stress hormone.

Octopamine plays a central role in learning and behavior in insects. The precise role in such behavior has been discussed over the last years. The signaling pathways of octopamine, tyramine and dopamine interact. Therefore, it is difficult to assign the role of these neurotransmitters in the process of learning and memory.

In this thesis, I tested the influence of biogenic amines on the sucrose sensitivity, the metabolism and learning and memory in the honeybee, *Apis mellifera*. If you touch the bees' antennae with sucrose they extend their proboscis (PER). I show that octopamine and tyramine modulate this behavior depending on the bees' feeding state. Dopamine is not involved in the modulation of the PER behavior. Octopamine affects learning, depending on the odor and influences memory. Consistently, with the effect on sucrose sensitivity is the effect on memory: Inhibition of octopamine action by injection of an octopamine receptor antagonist leads to a decrease in sucrose response (experiments on sucrose sensitivity), and to the learned odor (learning experiments). Also, octopamine has an effect on extinction-learning and extinction-memory. I show a change in the amount of octopamine and tyramine in the brain of honeybees depending on their feeding state. A decreased octopamine level leads to a decrease metabolism. Possible locations in the brain where found.

## ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

AmDop2	<i>Apis mellifera</i> Dopamin Rezeptor 2
AmOa1	<i>Apis mellifera</i> Oktopamin Rezeptor 1
AMT	$\alpha$ -Methyl-p-Tyrosin
AmTyr	<i>Apis mellifera</i> Tyramin Rezeptor
ANOVA	<i>Analysis of Variance</i>
Ant Lob	Antennalloben
cAMP	cyclisches Adenosinmonophosphat
CDM	Chlordimeform
CS	Konditionierter Stimulus
CR	Konditionierte Reaktion
DA	Dopamin
DMSO	Dimethylsulfoxid
EB	<i>ellipsoid body</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EPI	Epinastin
FB	<i>fan-shaped body</i>
Fisher LSD Test	Fishers <i>Least Significance Difference</i> Test
HPLC	<i>High Pressure Liquid Chromatography</i>
HVA	Homovanillylalkohol
ITI	<i>Inter-Trial-Interval</i>
L Ho	Laterales Horn
La	Lamina
Lo	Lobula
LV	<i>Lateral ventral cell bodies</i>
M	Medialer Lobus
Me	Medulla



---

OA	Oktopamin
PAM	<i>protocerebral anterior medial</i>
PB	<i>protocerebral bridge</i>
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung
Ped	Pedunkel
PER	<i>Proboscis Extension Response</i>
PKA	Proteinkinase A
rm ANOVA	ANOVA mit Messwiederholung ( <i>repeated measures ANOVA</i> )
SMBS	Natriumdisulfit
TA	Tyramin
Unequal N HSD Test	<i>Unequal N honestly significant differencet Test</i>
US	Unkonditionierter Stimulus
VUM	<i>Ventral unpaired median neuron</i>
VUMmx1	<i>Ventral unpaired median of maxillary neuromere 1</i>
YOH	Yohimbin

## 3 EINLEITUNG

### 3.1 ASSOZIATIVES LERNEN IN HONIGBIENEN

Berührt man die Antennen von Honigbienen mit Zucker, so strecken sie ihren *Proboscis* heraus, um den Zucker aufzunehmen. Diese reflexartige Reaktion wird als *Proboscis extension response* (PER) bezeichnet. Wird nun ein Duft mit einer Zuckerbelohnung gepaart, lernt die Biene, dass auf einen zuvor neutralen Duft eine Belohnung folgt und reagiert dann bereits auf den Duft mit dem Herausstrecken des *Proboscis* (Kuwabara 1957; Bittermann et al. 1983). Diese Form des Lernens wird als klassische Konditionierung bezeichnet (Pavlov 1927). Bei der olfaktorischen Konditionierung von Bienen stellt die Zuckerbelohnung den unkontingierten Stimulus (US) dar und der Duft den konditionierten Stimulus (CS). Die konditionierte Reaktion (CR) ist das Herausstrecken des *Proboscis* auf den Duft.

Bekommt das Tier nach der klassischen Konditionierung nun den CS alleine mehrfach präsentiert, nimmt die Reaktion auf die Präsentation des CS ab. Diese Abnahme der Verhaltensantwort wird als Extinktion bezeichnet. Während der Extinktion wird das zuvor gelernte allerdings nicht verlernt. Vielmehr findet ein neuer Lernprozess statt: Das Extinktionslernen (Bouton und Moody 2004; Stollhoff et al. 2005; Sandoz und Pham-Delègue 2004). Während des Extinktionslernens, lernt ein Tier, dass der zuvor belohnte Duft nun nicht mehr belohnt wird. Dies ist der Grund für die Abnahme der CR während der Extinktion. Wichtige Verhaltensphänomene, die zeigen, dass das extinguierte Gedächtnis noch vorhanden ist sind die Spontanerholung (*spontaneous recovery*), Erneuerung (*renewal*) und Wiederinkraftsetzung (*reinstatement*) (Bouton und Moody 2004; Rescorla 2004).

## 3.2 OKTOPAMIN: DER TRANSMITTER DER BELOHNUNG?

Das biogene Amin Oktopamin, 1951 von Erspamer und Boretti in den Speicheldrüsen des *Octopus* entdeckt, übernimmt eine zentrale Rolle bei Lernprozessen. Die Gedächtnisleistung von Bienen nach einer Reserpinbehandlung, die zu einer Ausschüttung biogener Amine führt, ist stark verschlechtert. Die anschließende Behandlung mit Oktopamin verbessert das Lernen der Bienen (Menzel et al. 1999). Das VUMmx1, ein Neuron im subösophagealen Ganglion des Bienenhirns, ist oktopaminerg (Hammer und Menzel 1995). Dieses Neuron spielt eine Rolle bei der Assoziation des CS (hier ein Duft) und US (hier Saccharose). Wird Oktopamin in den Projektionsbereich des VUMs injiziert und gleichzeitig ein Duft präsentiert, lernen Bienen den Duft auch ohne die sonst nötige Belohnung mit Zucker. Aus diesen Ergebnissen schlossen Hammer und Menzel, dass das VUMmx1-Neuron beim Belohnungslernen eine Rolle spielt und Oktopamin dabei als Transmitter dienen könnte (Hammer und Menzel 1998).

Einige Jahre später wurde gezeigt, dass Oktopamin wichtig für das appetitive und Dopamin für das aversive olfaktorische Lernen in Fruchtfliegen (*Drosophila melanogaster*) und in Grillen (*Gryllus bimaculatus*) ist (Mizunami et al. 2009; Schwärzel et al. 2003; Unoki et al. 2005; Vergoz et al. 2007). Des Weiteren spielt Oktopamin beim visuellen Lernen von Grillen eine Rolle (Mizunami et al. 2009; Unoki et al. 2006). Auch in Krabben (*Chasmagnatus granulatus*) konnte Oktopamin als wichtiger Modulator für appetitives kontextabhängiges Lernen identifiziert werden (Kaczer und Maldonado 2009). Die sich daraus ergebene Hypothese wurde im Weiteren etwas erweitert, als eine Arbeitsgruppe in Fruchtfliegen herausfand, dass für die appetitive Duftkonditionierung sogenannten PAM-Dopaminneuronen notwendig sind (Liu et al. 2012). Es wurde gezeigt, dass die Signalwege von Oktopamin und Dopamin interagieren, wobei die PAM-Dopaminneurone den Oktopaminneuronen nachgeschaltet sind. Durch die Stimulation von Oktopamin konnte ein appetitives Gedächtnis geformt werden, aber nur dann, wenn das Dopaminsystem funktionstüchtig war (Liu et al. 2012; Burke et al. 2012).

Hunger wird durch ein internes metabolisches Defizit gebildet und führt zu einer erhöhten Wahrscheinlichkeit, dass ein Tier verstärkt nach Nahrung sucht (Dethier 1976; Abizaid und Horvath 2008; Saper et al. 2002). Hungernde *Drosophila* Larven steigern ihre

Bewegungsgeschwindigkeit (Koon et al. 2011). Oktopamin ist nicht nur in den Anstieg der Bewegungsgeschwindigkeit involviert, sondern auch in die Antwort auf Futtermangel (Koon et al. 2011; Horvitz et al. 1982; Suo et al. 2006). Eine Oktopamininjektion in den Antennallobus des Gehirns von Honigbienen oder Fliegen führt zu einer Stimulation der Futteraufnahme, wodurch die Tiere mehr Nahrung zu sich nehmen (Bicker und Menzel 1989; Long und Murdock 1983). Ausgehungerte Fliegen reagieren deutlich schneller mit dem PER, auch bei niedrigen gustatorischen Stimuli (Brookhart et al. 1987; Farhadian et al. 2012; Hergarden et al. 2012; Keene und Waddell 2007; Barton Brown 1980; Inagaki et al. 2012; Scheiner 2004). Bei der Zuckeraufnahme kommt es zu erhöhten Kalziumausschüttung in den PAM-Dopaminneuronen im Gehirn. Diese Kalziumausschüttung ist in satten Tieren stark verringert (Liu et al. 2012). Satte Tiere reagieren zudem erst bei sehr hohen gustatorischen Stimuli, d.h. hoch konzentrierten Zuckerlösungen (Brookhart et al. 1987).

Der Hungerzustand der Tiere hat einen Einfluss auf das Lernen und die Gedächtnisbildung und beeinflusst die cAMP-abhängige PKA, die eine wichtige Rolle bei der Bildung des Langzeitgedächtnisses spielt (Friedrich et al. 2004; Müller 2000). *Drosophila* und Honigbienen müssen hungrig sein, um, nach appetitiver Konditionierung zu lernen und Langzeitgedächtnisse auszubilden (Friedrich et al. 2004; Krashes und Waddell 2008). Das lässt darauf schließen, dass Hungersignale Lernen und Gedächtnis beeinflussen und in Abhängigkeit des Futterzustandes und damit der Motivation die Nahrungssuche reguliert wird (Krashes et al. 2009). Dabei wird zwischen der Süße eines Zuckers und seiner Nahrhaftigkeit unterschieden. Fliegen bevorzugen zunächst süße Zucker, auch wenn sie nicht nahrhaft sind, und somit keine Energie liefern. Mit der Zeit und damit verbundenem Anstieg im Hunger, wechseln Fliegen auf ein Medium mit nahrhaftem Zucker, auch wenn er nicht süß ist (Stafford et al. 2012). Fliegen die aufgrund einer Mutation nicht süß schmecken können, sind trotzdem in der Lage, ein Gedächtnis auszubilden, wenn sie mit einem nahrhaften Zucker belohnt werden (Burke und Waddell 2011; Fujita und Tanimura 2011).

Die Paarung von Duft und aktivierten PAM-Dopaminneuronen führt zu einem langanhaltenden appetitiven Gedächtnis, auch wenn kein Oktopamin vorhanden ist. Das Blocken der PAM-Dopaminneurone verhindert appetitives Lernen mit süßen Zuckern die keinen Nährwert haben (Burke et al. 2012), jedoch nicht das appetitive Lernen mit Zuckern, die einen Nährwert aufweisen (Burke et al. 2012; Liu et al. 2012). Um ein erhöhtes

Kalziumsignal in den PAM-Neuronen zu erhalten muss der Zucker jedoch aufgenommen werden. Eine Stimulation der Tarsen allein reicht nicht aus (Liu et al. 2012). Die PAM Dopaminneurone scheinen das Kurz- und Langzeitgedächtnis mit nahrhaften Zuckern zu modulieren, wohingegen Oktopamin eher eine wichtige Rolle bei der Wahrnehmung der Süße des Zuckers spielt. Oktopamin scheint die Wahrnehmung der Süße des Zuckers und nicht den kalorischen Wert zu modulieren und dadurch als Belohnung zu dienen. (Koon et al. 2011). Oktopamin ist in die Antwort auf Futtermangel involviert (Koon et al. 2011; Horvitz et al. 1982; Suo et al. 2006) und moduliert den Hungerzustand der Tiere. Dadurch wird das Level an Belohnung verändert (Burke et al. 2012; Liu et al. 2012).

In den letzten Jahren hat sich das Verständnis der Rolle des Oktopamins beim Lernen und der Gedächtnisbildung in Invertebraten stark verändert. Zunächst wurde angenommen, dass Oktopamin direkt am appetitiven Lernen beteiligt ist. Im Verlauf der Zeit stellte sich jedoch heraus, dass Dopamin der Neurotransmitter ist, der sowohl für das appetitive, als auch das aversive Lernen zuständig ist. Oktopamin hingegen, könnte eher die Motivation der Tiere zu verändern und somit das Lernen zu beeinflussen.

Die Funktionen von Oktopamin in Insekten sind jedoch vielseitig. Es ist in Invertebraten ein wichtiger Neurotransmitter, wirkt aber auch als Neurohormon und Neuromodulator (Evans 1985; Neckameyer und Leal 2009) und moduliert beinahe jeden sensorischen Eingang (Roeder 2005). Oktopamin hat einen wichtigen Einfluss auf die Motorik. Es erhöht den Anteil der Bewegung, das Laufen und den Flug (O'Shea und Evans 1979; Ramirez und Pearson 1991; Saraswati et al. 2004; Sombati und Hoyle 1984). In Honigbienen moduliert Oktopamin Elemente des Tanzverhaltens, dass der Kommunikation über die Lage und Profitabilität von Futterquellen dient und der Motivation zur Futtersuche zugrunde liegt (Barron et al. 2007; Farina et al. 2012; Couvillon 2012). Oktopamin spielt eine Rolle bei der Entwicklung. Es moduliert bei vielen Insekten die Eiablage (Abdoun et al. 1995; Lee et al. 2003; Sombati und Hoyle 1984) und ist an der Auslösung der Puppenbildung durch die Regulation des Juvenilhormons (Hirashima et al. 1999). Das Verhältnis von Oktopamin und Juvenilhormon bestimmt in Bienen die Arbeitsteilung (Schulz und Robinson 2001; Schulz et al. 2002; Pankiw und Page 2000). Sammlerbienen haben einen höheren Oktopamingehalt als die Arbeiterinnen im Stock. Die Behandlung von Stockarbeiterinnen mit Oktopamin führt zu einem verfrühten Beginn der Sammelleistung (Schulz und Robinson 2001).

Neben der Wirkung als Neurotransmitter und -modulator hat Oktopamin auch eine wichtige neurohormonelle Rolle als Stresshormon. Die Ausschüttung von Oktopamin bereitet den Organismus auf energiefordernde Situationen (*fight or flight*) vor (Roeder 2005; Evans 1980). Ein starker Anstieg des Oktopaminspiegels in der Hämolymphe wurde als Antwort auf verschiedene Stressfaktoren, wie Hitze, mechanischen Stress oder Hunger in verschiedenen Insektenpezies, wie Honigbienen (*Apis mellifera*), Wüstenheuschrecken (*Schistocerca gregaria*), amerikanischen Großschaben (*Periplaneta americana*) und rotbraunen Reismehlkäfern (*Tribolium castaneum*) gezeigt (Harris und Woodring 1992; Hirashima et al. 1992, Davenport und Evans 1984a, 1984b, Chen et al. 2008; Hirashima und Eto 1993). Oktopamin führt des Weiteren zu einer erhöhten Herzfrequenz (Papaefthimiou und Theophilidis 2011), steuert die Aggression (Stevenson et al. 2005; Stevenson et al. 2000) und aktiviert den Metabolismus des Fettkörpers, um Energie zu Verfügung zu stellen (Downer 1979; Orchard et al. 1982). Die Modulation dieser Funktionen ähnelt den charakteristischen physiologischen Reaktionen auf Stress in Wirbeltieren (Even et al. 2012; Neckameyer und Leal 2009; Wehner et al. 1995). Aus diesem Grund und aufgrund der strukturellen Ähnlichkeit, wird Oktopamin häufig mit Noradrenalin und Adrenalin in Wirbeltieren gleichgesetzt (Roeder 1999, 2005; Farooqui 2012; Neckameyer und Leal 2009).

Die Honigbiene eignet sich besonders, oktopaminabhängiges Lernen zu untersuchen. Zum einen sind gut beschrieben, stabile Versuche verschiedener Lernparadigma durchführbar (Menzel 2012; Giurfa und Sandoz 2012; Menzel 1990) und zum anderen können verschiedene Effekte des Oktopamins von vornherein ausgeschlossen werden: (1) Arbeiterinnen legen in der Regel keine Eier. (2) Für die Versuche werden ausschließlich Sammlerinnen abgefangen um Effekte des Oktopamins auf die Arbeitsteilung zu minimieren. (3) Durch das Arbeiten mit, in Röhrrchen eingespannten Tieren, die nur noch den Kopf bewegen können, werden Effekte des Oktopamins auf das Laufen, den Flug und das Tanzen ausgeschlossen.

### 3.3 WELCHE ROLLE SPIELT TYRAMIN?

Die Synthesewege der biogenen Amine Oktopamin, Dopamin und Tyramin sind sehr ähnlich. Alle werden aus der Aminosäure Tyrosin synthetisiert. Tyramin, lange lediglich als nicht-funktionale Vorstufe von Oktopamin betrachtet, hat ebenfalls Neurotransmitterfunktion (Blenau und Baumann 2003; Lange 2009; Roeder 2005). Ein Neurotransmitter muss in Neuronen synthetisiert werden, in ihnen präsent sein, von Neuronen abgegeben werden, durch Plasmamembrantransporter entfernt werden, an spezifischen Rezeptoren wirken und durch Antagonisten geblockt werden können (Osborne 1996; Cowan et al. 2001). Da Oktopamin aus Tyramin gebildet wird, können oktopaminerge Neurone immer auch Tyramin freisetzen. Es gibt jedoch auch Neurone im Gehirn die ausschließlich tyraminerg sind (Hiripi et al. 1994; Downer et al. 1993; Nagaya et al. 2002). Tyramin wird aus Vesikeln freigesetzt und es ist ein eigenes System zur Wiederaufnahme von Tyramin in die Präsynapse vorhanden (Hiripi et al. 1994; Downer et al. 1993). Einer der ersten gut definierten Effekte von Tyramin im Gewebe von Insekten ist der Anstieg der Chloridleitfähigkeit in den Malphigischen Gefäßen von *Drosophila* (Blumenthal 2002). Tyramin hat eine gegenläufige Wirkung zum Oktopamin auf den zentralen Muskelgenerator, der den Beginn und die Aufrechterhaltung des Fluges reguliert (Brembs et al. 2007). Oktopamin führt zu mehr und Tyramin zu weniger Flug (Fussnecker et al. 2006). Ebenso haben Tyramin und Oktopamin einen gegenläufigen Effekt auf die Muskelkontraktion; Oktopamin induziert eine erhöhte Aktivität und Tyramin führt zu einem Herabsetzen (Downer 1979; Uzzan und Dudai 1982). Die cAMP- und Kalziummenge wird durch Oktopamin erhöht und durch Tyramin verringert. Dadurch kommt es zu einer verminderten Aktivität (Uzzan und Dudai 1982).

Es gibt Hinweise aus Ableitungen der Rezeptorpotentiale an den Antennen der Fruchtfliegen, dass Tyramin die Rezeptorpotentiale der peripheren olfaktorischen Rezeptoren auf Düfte moduliert (Schwarz 2006). Eine Tyraminrezeptormutante in *Drosophila* zeigt Defizite in der Antwort auf Düfte (Kutsukake et al. 2000) und Tyramin erhöht die Rate der Habituation des PERs auf Zuckerlösungen bei Bienen (Braun und Bicker 1992). Daher soll in dieser Arbeit, neben Oktopamin, auch die Wirkung von Tyramin untersucht werden.

### 3.4 FRAGESTELLUNG

In dieser Arbeit wurde die Rolle von Oktopamin beim Lernen, aber auch in anderen physiologischen Zusammenhängen untersucht: (1) Mögliche Einflüsse auf die Zuckerwahrnehmung wurden getestet. Da der Hungerzustand den PER moduliert (Keene und Waddell 2007; Brookhart et al. 1987), wurde untersucht, ob Oktopamin den Zusammenhang zwischen der Zuckerwahrnehmung und dem Hungerzustand vermittelt. (2) Der Einfluss von Oktopamin auf den Stoffwechsel wurde untersucht. Bienen wurden mit Oktopamin, einem Oktopaminrezeptorantagonisten oder Oktopaminrezeptoragonisten behandelt und ihre Überlebensrate ohne erneute Nahrungszufuhr wurde beobachtet. Unter der Annahme, dass Oktopamin, wie oben beschrieben, den Stoffwechsel erhöht um Energie bereitzustellen, sollten Tiere, die mit dem Oktopaminrezeptoragonisten behandelt wurden ohne erneute Nahrungszufuhr eher sterben, da sie, aufgrund eines erhöhten Energieumsatzes, die vorhandene Energie eher verbrauchen. (3) Oktopamin wurde in histologischen Schnitten im Bienenhirn nachgewiesen und untersucht, ob sich die Verteilung von Oktopamin in Abhängigkeit vom Futter- und Stresszustand der Tiere verändert. (4) Mit Hilfe von Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (*high performance liquid chromatography*, HPLC) wurde der Oktopaminspiegel in Abhängigkeit vom Futter- und Stresszustand der Tiere untersucht. (5) Durch klassische Lernexperimente wurden der Einfluss von Oktopamin auf Konditionierung, Extinktion und Gedächtnisabruf untersucht.



## 4 MATERIAL UND METHODEN

### 4.1 ERMITTLUNG GEEIGNETER ARBEITSKONZENTRATIONEN

Zur Ermittlung geeigneter Konzentrationen der biogenen Amine, ihrer Agonisten oder Antagonisten für weiterführende Experimente, wurde der Einfluss der Substanzen auf das Überleben der Bienen getestet.

Ausfliegende Sammlerbienen wurden mit Hilfe einer UV-Licht durchlässigen Plexiglaspyramide einen Tag vor Beginn des Experiments gegen 14 Uhr an institutseigenen Bienenstock gefangen. Anschließend wurden die Bienen in kleine Glasfläschchen überführt und auf Eis gelegt, um die Bienen zu betäuben. Als die Bienen bewegungsunfähig waren, wurden sie in Plastikröhrchen gesetzt. Dabei wurden die Bienen mit Klebeband fixiert, sodass sie ihre Antennen und ihren Proboscis frei bewegen konnten. Gegen 16 Uhr wurden die Tiere mit einer 30 %igen Zuckerlösung satt gefüttert und über Nacht bei Raumtemperatur in eine dunkle, feuchte Box gestellt. (Eine detaillierte Beschreibung der Behandlung der Bienen gibt Felsenberg et al. 2011).

Nach einer 18-stündigen Hungerphase wurde mit dem Experiment begonnen. Die Tiere wurden 30 Minuten vor Beginn der Experimente an den Versuchsplatz gestellt, damit sie sich akklimatisieren konnten. Die Tiere wurden anschließend mit unterschiedlichen Konzentrationen der Drogen und der jeweiligen Kontrolllösung injiziert. Die getesteten Drogen und Konzentrationen, sowie deren Kontrollen sind in Tabelle 1 zu entnehmen. Zunächst wurde mit einer Nadel ein kleines Loch in die Kutikula, nahe des Flugmuskels gestochen und 1  $\mu$ l der jeweiligen Lösungen mit Hilfe einer Glaskapillare injiziert. Die Tiere wurden nach 30 Minuten, einer Stunde, zwei, drei, sechs und 24 Stunden auf ihr Überleben überprüft und die Todesrate in Prozent wurde berechnet.

Dargestellt und ausgewertet wurde das Überleben der Tiere nach 24 Stunden. Zur statistischen Auswertung wurde eine ANOVA mit Messwiederholungen (rm ANOVA) durchgeführt. Eine Voraussetzung für eine ANOVA sind normalverteilte Daten. Die hier generierten Daten sind jedoch dichotom und nicht normalverteilt. Bei großen Stichproben

( $n > 30$ ), kann eine ANOVA jedoch auch bei nicht normalverteilten, dichotomen Daten verwendet werden (Genschel und Becker 2005; Lunney 1970). Zur genaueren Untersuchung des Signifikanzniveaus wurde nach der ANOVA ein Fisher LSD Post-hoc Test bei gleichgroßen Stichprobenumfängen und bei ungleichgroßen Stichproben ein unequal N Post hoc Test angewendet.

Die Experimente wurden von Christina Buckemüller geplant und ausgewertet und von Christina Buckemüller, Isabell Groß, Anja Ölschläger, Oliver Siehler und Richard Zeumer durchgeführt. Die Versuchszeiträume, die eingesetzten Konzentrationen und die Anzahl der Bienen pro Experimentiergruppe sind Tabelle 1 zu entnehmen.

Tabelle 1: Genutzte Pharmaka, Konzentrationen und Versuchszeitraum

Injizierte Substanz	Konzentrationen in mM	Wirkung	Kontrolle	Versuchszeitraum	n pro Gruppe
Oktopamin (Sigma Aldrich)	0,1; 0,2; 1; 2; 10; 20; 100; 200; 263	-	PBS	12.08. - 31.08.2011	62-63
Chlordimeform (Sigma Aldrich)	1; 10; 20; 30; 40; 50; 100	Oktopamin- agonist	10 % DMSO	03.09. - 11.10.2012 und 26.04. - 04.05.2013	54-114
Epinastin (Sigma Aldrich)	0,1; 0,2; 1; 2; 10; 20; 40; 60; 80; 100; 132	Oktopamin- antagonist	PBS	22.06. - 08.07.2011 und 06.09. - 14.09.2011	61-130
Yohimbin (Sigma Aldrich)	0,1; 1; 10	Tyramin- antagonist	10 % DMSO	06.06. - 19.06.2012	51-62
Dopamin (Alfa Aeser)	1; 10; 50; 100	-	PBS	03.09. - 11.10.2012	60-62
Homo- vanillyl- alkohol (Sigma Aldrich)	1; 10; 50; 100	Dopamin- agonist	PBS	03.09. - 11.10.2012	54-62
Fluphe- nazin (Sigma Aldrich)	0,1; 1; 10; 20; 40; 80	Dopamin- antagonist	PBS	18.04. – 14.05.2012	63-71

## 4.2 QUANTIFIZIERUNG DER ZUCKERSENSITIVITÄT

Bienen wurden, wie in Punkt 4.1 beschrieben, behandelt. Am Experimentiertag, 30 Minuten vor Beginn eines Experiments, wurden die Bienen zunächst aus der Box auf den Experimentiertisch gestellt, um eine Akklimation zu gewährleisten. Dann wurde ein Teil der Tiere mit 30 %iger Zuckerlösung satt gefüttert und ein Teil nicht behandelt. Die Tiere, die nicht gefüttert wurden, wurden hier und in weiteren Experimenten als „hungrig“ bezeichnet. Die Tiere, die 30 Minuten vor Beginn der Experimente mit Zucker satt gefüttert wurden, wurden hier und später als „satt“ bezeichnet.

15 Minuten nach dem Sattfüttern oder dem Nichtfüttern der Bienen, wurde 1 µl der Droge oder der Kontrolle, wie in 4.1 beschrieben, injiziert. Nach weiteren 15 Minuten wurde der Zuckertest absolviert. Dafür wurden die Antennen der Bienen zunächst mit Wasser, dann mit 0,1 %iger Zuckerlösung und zum Schluss mit 43 %iger Zuckerlösung berührt. Die Pause zwischen den Stimulationen betrug zwei Minuten. Das Herausstrecken des Rüssels der Bienen (*Proboscis extension response*, PER) wurde dabei notiert und die prozentuale Menge der Tiere, die mit dem PER reagiert haben, graphisch aufgetragen. Es wurde während der Versuchsdurchführung darauf geachtet, die Bienen nicht zu füttern.

Folgende Experimente wurden durchgeführt:

1. Habituation: Bevor die Experimente mit den pharmakologischen Substanzen durchgeführt wurden, wurde zunächst ein Vorexperiment durchgeführt, um eine mögliche Habituation durch das vorherige Sattfüttern der Tiere auszuschließen. Ein Drittel der Tiere wurde 30 Minuten vor dem Zuckertest satt gefüttert, ein Drittel der Tiere wurde nicht gefüttert und ein Drittel der Tiere wurde mehrfach mit Fütterzucker an den Antennen stimuliert.
2. Oktopamin: Dieses Experiment wurde mit 10 mM Oktopamin (in PBS) und PBS durchgeführt.
3. Chlordimeform: Dieses Experiment wurde mit 1 mM Chlordimeform (in 10 % DMSO in PBS) und 10 % DMSO in PBS durchgeführt.
4. Epinastin: Dieses Experiment wurde mit 40 mM Epinastin (in PBS) und PBS durchgeführt.

5. Wirkungsdauer Epinastin, Oktopamin: Dieses Experiment wurde mit 40 mM Epinastin (in PBS), 10 mM Oktopamin (in PBS) und PBS und drei Zuckertests (15 Minuten, 24 Stunden und 48 Stunden) durchgeführt.
6. Fluphenazin: Dieses Experiment wurde mit 10 mM Fluphenazin (in PBS) und PBS durchgeführt.
7. Yohimbin: Dieses Experiment wurde mit 10 mM Yohimbin (in 10 % DMSO in PBS) und 10 % DMSO in PBS durchgeführt.

Alle Experimente wurden von Christina Buckemüller geplant und ausgewertet. An der Durchführung beteiligte Personen und die Versuchszeiträume sind in Tabelle 2 angegeben.

**Tabelle 2: An den Experimenten beteiligte Personen und Versuchszeiträume**

Experiment	An der Durchführung beteiligten Personen	Versuchszeitraum
1	Oliver Siehler, Richard Zeumer	11.07. - 30.08.2012
2	Christina Buckemüller	22.07. - 01.08.2013
3	Christina Buckemüller	08.08. - 15.08.2013
4	Christina Buckemüller	07.11. - 13.12.2011 (Hummelhausbienen)
5	Anja Ölschläger	23.07. – 12.08.2013
6	Christina Buckemüller, Richard Zeumer	30.05. - 10.07.2012
7	Christina Buckemüller, Richard Zeumer	26.06. - 05.07.2012

Zur Statistischen Auswertung wurde eine ANOVA mit Messwiederholung (rm ANOVA) verwendet und zur genauen Bestimmung des Signifikanzniveaus der Fisher LSD Post hoc Test.

### 4.3 ÜBERPRÜFUNG DER NOTWENDIGKEIT VON OKTOPAMIN FÜR DIE MODULATION DER RÜSSELANTWORT IN HUNGRIGEN BIENEN

Um zu überprüfen, ob Oktopamin ausreichend ist in Bienen ohne Oktopamin die Rüsselantwort zurückzubringen, wurden Experimente mit  $\alpha$ -Methyl-p-Tyrosin (AMT) durchgeführt.

Zunächst wurde getestet, welchen Effekt AMT auf die Rüsselantwort in hungrigen Bienen hat. Dafür wurden Bienen einen Tag vor dem Experiment, wie in Kapitel 4.1 beschrieben, gefangen, eingetütet und satt gefüttert. Am Versuchstag wurden eine Hälfte der Tiere mit 30,5 mM  $\alpha$ -Methyl-p-Tyrosin (Sigma) gelöst in PBS und die andere mit PBS injiziert. Um 16 Uhr wurden die Bienen mit maximal vier 4  $\mu$ l Tropfen einer 30 %igen Zuckerlösung gefüttert und über Nacht in eine dunkle, feuchte Box gestellt. 24 Stunden nach der Injektion wurde der *Zuckertest* durchgeführt.

Für das zweite Experiment wurde eine Hälfte der Bienen mit 1  $\mu$ l 30,5 mM AMT und die andere Hälfte mit PBS injiziert. Um 16 Uhr wurden die Bienen mit maximal vier 4  $\mu$ l Tropfen einer 30 %igen Zuckerlösung gefüttert und über Nacht in eine dunkle, feuchte Box gestellt. 24 Stunden nach der ersten Injektion wurde der erste Zuckertest, wie in Kapitel 4.2 beschrieben, durchgeführt. Anschließend wurden die PBS- und AMT-Bienen in je vier Gruppen aufgeteilt und die Pharmaka, die eine mögliche Rettung des Effekts erzeugen sollen, wurden injiziert:

1. Oktopamin: Die Bienen wurden mit 10 mM Oktopamin (in PBS) und PBS injiziert.
2. Chlordimeform: Die Bienen wurden mit 1 mM Chlordimeform (in 10 % DMSO in PBS) und 10 % DMSO in PBS injiziert.
3. Dopamin: Die Bienen wurden mit 10 mM Dopamin (in PBS) und PBS injiziert.
4. Homovanillylalkohol: Die Bienen wurden mit 50 mM Homovanillylalkohol (in PBS) und PBS injiziert.

Dopamin wurde dabei jeden Tag vor der Injektion direkt frisch angesetzt, da es mit der Zeit oxidiert und möglicherweise seine Wirkung verliert bzw. für die Bienen schädlich ist.

Um 16 Uhr wurden die Bienen wieder mit maximal vier 4 µl Tropfen einer 30 % igen Zuckerlösung gefüttert und über Nacht in eine dunkle feuchte Box gestellt. 24 Stunden nach der zweiten Injektion wurde der zweite Zuckertest durchgeführt.

Diese Experimente wurden von Christina Buckemüller geplant und ausgewertet. An der Durchführung war, neben Christina Buckemüller auch Elena Riel beteiligt. Der Versuchszeitraum war von 06.05. - 21.05.2013 und 26.08. - 22.09.2013.

Zur statistischen Auswertung der Experimente wurde eine ANOVA mit Messwiederholung (rm ANOVA) durchgeführt. Zur genaueren Bestimmung des Signifikanzniveaus wurde ein Fisher LSD Post hoc Test durchgeführt.

## 4.4 BESTIMMUNG DER STERBERATE

In dem ersten Experiment dieses Kapitels, wurden Bienen, wie in Punkt 4.1 beschrieben, am Vortag gefangen, betäubt und in die Röhren überführt. Am Nachmittag wurden die Bienen satt gefüttert und 18 Stunden danach wurde mit dem Experiment begonnen. Die Tiere wurden in fünf Gruppen aufgeteilt und mit 1 µl 10 mM Oktopamin (in PBS), 40 mM Epinastin (in PBS), PBS, 1 mM Chlordimeform (in 10 % DMSO in PBS) oder 10 % DMSO (in PBS) injiziert. Sechs, zwölf, 24, 30, 36, 48, 54, 60, 72, 78, 84, 96, 102, 108 und 120 Stunden nach der Injektion wurden die Tiere auf ihr Überleben überprüft. Es wurde die Summe der Zeitpunkte, aus der Anzahl der Zeitpunkten die eine jede Biene gelebt hat, gebildet und der Mittelwert aus diesen Zeitpunkten graphisch dargestellt (mittlere Überlebensrate).

In dem zweiten Experiment wurden Bienen zwei Stunden nach der Injektion mit einer 30 %igen Zuckerlösung satt gefüttert. Es wurde die Summe der Zeitpunkte, aus der Anzahl der Zeitpunkte, die eine jede Biene gelebt hat, gebildet, und der Mittelwert aus diesen Zeitpunkten graphisch dargestellt (mittlere Überlebenszahl).

Die Experimente wurden von Christina Buckemüller geplant und ausgewertet und von Christina Buckemüller, Johannes Kühnemund, Anja Ölschläger und Patrick Werner durchgeführt. Der Versuchszeitraum des ersten Experiments war vom 15.07. - 19.07.2013. Das zweite Experiment wurde vom 03.09. - 11.10.2012 und 15.07. - 19.07.2013 durchgeführt.

Zur statistischen Auswertung der Überlebenskurven wurde eine ANOVA mit Messwiederholung durchgeführt. Die mittlere Überlebensrate wurde mit einer einfaktoriellen ANOVA untersucht. Als Post hoc Test wurde ein Fisher LSD Post hoc Test durchgeführt.



## 4.5 QUANTIFIZIERUNG DER GEFRESSENEN FUTTERMENGE

In diesem Experiment wurden Tiere, wie in 4.1 beschrieben, gefangen, in die Röhren überführt und satt gefüttert. Um 10 Uhr am Folgetag wurden die Tiere in drei Gruppen aufgeteilt und mit 1 µl 10 mM Oktopamin (in PBS), 40 mM Epinastin (in PBS) oder PBS injiziert und anschließend 24, 48 und 72 Stunden nach dem ersten Füttern erneut satt gefüttert. Dafür erhielten sie 2 µl Tropfen einer 30 % igen Zuckerlösung und die Menge der Tropfen wurde notiert.

Dieses Experiment wurde von Christina Buckemüller geplant und ausgewertet und von Anja Ölschläger vom 17.07. - 23.08.2012 durchgeführt.

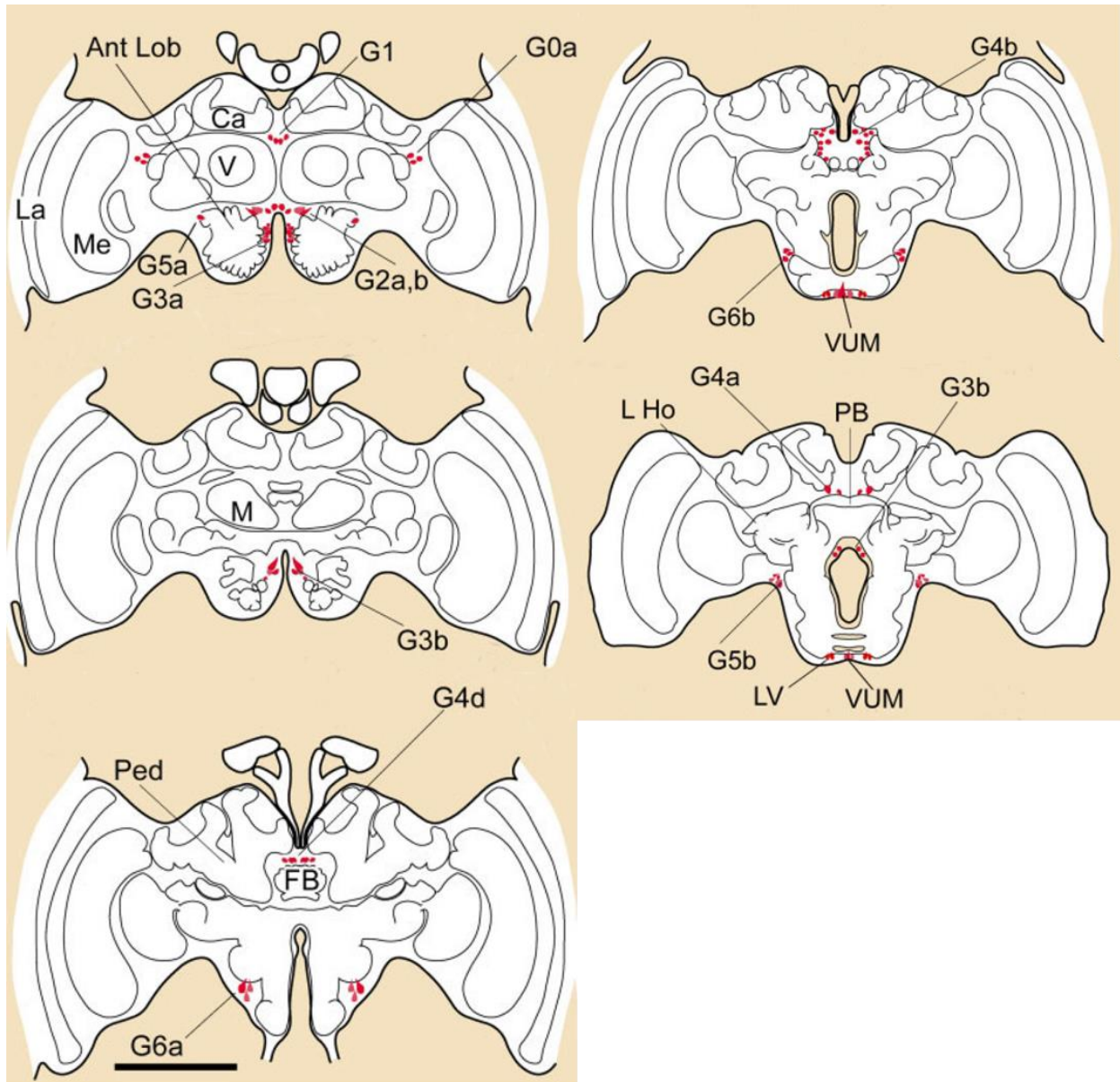
Zur statistischen Auswertung wurde eine ANOVA mit Messwiederholungen und ein Fisher LSD Post hoc Test durchgeführt.

## 4.6 QUANTIFIZIERUNG DES OKTOPAMIN- UND TYRAMINGEHALTS IM GEHIRN

Bienen wurden einen Tag vor Beginn der Präparation gefangen und, wie in Punkt 4.1 beschrieben, in die Röhrchen überführt und satt gefüttert. Am Folgetag wurden die Bienen zunächst satt gefüttert, nicht gefüttert oder mechanisch gereizt. Dazu wurde den Bienen mit einer Pinzette an den Beinen gezogen und sie wurden mit dieser im Röhrchen eingeklemmt. 30 Minuten später wurden die Tiere kurz auf Eis gegeben und die Kopfkapsel geöffnet. Die Drüsen wurden entfernt, der Kopf abgeschnitten und kurz in eine Lösung aus 2,5 ml 25 % Glutaraldehyd, 7,5 ml Pikrinsäure, 0,05 % Eisessig und 0,101 g SMBS gegeben. Anschließend wurden die Gehirne aus der Kopfkapsel entfernt, von Drüsengewebe gereinigt und in einer Lösung aus Pikrinsäure für ein bis zwei Stunden fixiert. Dann wurden die Gehirne über eine Alkoholreihe entwässert und mehrmals gewaschen bevor sie in 5 - 6 %iger Agarose eingebettet wurden. Nun konnten die Gehirne am Vibratom in 70 µm Schnitte geschnitten werden. Nach weiteren Waschvorgängen konnten der primären Antikörper aufgetragen werden. Dafür wurde ein polyklonaler Anti-Tyramin (Rabbit, Chemicon Millipore) 1:500 und ein monoklonaler Anti-Oktopamin Antikörper (Mouse Jena Bioscience) 1:1000 für vier bis fünf Tage inkubiert. Als sekundärer Fluoreszenz Antikörper wurde 1:100 Dylight488 Goat-anti Mouse und 1:100 Cy5 Goat-anti Rabbit auf die Schnitte gegeben, inkubiert und die Schnitte auf einem Objektträger eingebettet. Das genaue Färbeprotokoll ist im Anhang zu finden.

Zur Auswertung wurden Schnittebenen herausgesucht, die in etwa denen entsprechen, die in Abbildung 2 dargestellt sind. Die Oktopamincluster, die in Abbildung 2 dargestellt sind (Sinakevitch et al. 2005) wurden als Vorlage verwendet. Es wurde versucht, die von Sinakevitch beschriebenen Oktopamincluster in den experimentellen Schnitten zu identifizieren.

Die Experimente wurden von Christina Buckemüller geplant, vom 29.01. - 05.03.2013 mit Hummelhausbienen durchgeführt und ausgewertet.



**Abbildung 1:** Darstellung der Oktopamincluster im Bienenhirn, nach Sinakevitch et al. 2005. Dargestellt sind fünf verschiedene Schnittebenen des Bienenhirns. Links oben ist der anteriorste Schnitt. Gelesen werden die Schnitte von links oben nach unten und dann von rechts oben nach unten. Die cluster sind als G0-6 bezeichnet. Weitere Abkürzungen sind: Ant Lob: Antennalloben, M: Medialer Lobus, EB: *ellipsoid body*, Ped: Pedunkel, FB: *fan-shaped body*, L Ho: Laterales Horn, PB: *protocerebral bridge*, Lo: Lobula, La: Lamina, Me: Medulla, VUM: *ventral unpaired median neurons*, LV: *Lateral ventral cell bodies*.

In einem zweiten Experiment wurden Bienen, wie in Punkt 4.1 beschrieben, gefangen, eingetütet und satt gefüttert. Am Folgetag wurden die Tiere entweder mit 30 %iger Zuckerlösung satt gefüttert oder nicht behandelt und dann für einige Sekunden mit Hilfe von Trockeneis betäubt. Das Gehirn wurde aus dem Kopf herauspräpariert. Dabei wurden die Ozellen und die optischen Loben entfernt und zehn Gehirne in 140 µl eiskalten 2 %igen EDTAs gegeben. Die Gehirne wurden mit einem kleinen Stößel per Hand (120-mal) zerkleinert und anschließend für zehn bis 15 Minuten in ein Ultraschallbad gegeben. Dann wurden die Proben bei 4 °C bei 15.000 g für zehn Minuten zentrifugiert und anschließend der Überstand durch einen 0,22 µm Nylon Membran Filter gegeben. Die Proben wurden bei -80 °C eingefroren, bis die Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (*high performance liquid chromatography*, HPLC), zur Bestimmung des Oktopamin- und Tyramingehalts, durchgeführt wurde (Chen et al. 2008).

Die HPLC wurde in Kooperation mit Frau Prof. Irene Nehls, Dr. Roland Becker und Dipl. Ing. Christian Jung von der Bundesanstalt für Materialforschung, Fachbereich 1.2 Organische Spurenanalytik durchgeführt. Die HPLC wurde nach dem Protokoll von Wood und Hall (2000) durchgeführt. Die anschließende Detektion der Substanzen erfolgte durch einen elektrochemischen Detektor.

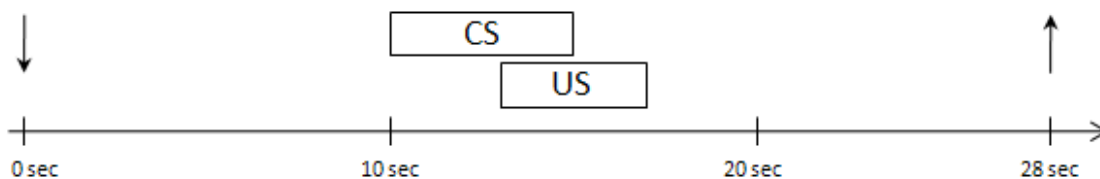
Die Planung der Experimente erfolgte durch Prof. Irene Nehls, Dr. Roland Becker, Christian Jung und Christina Buckemüller. Die Proben wurden von Christina Buckemüller vom 12.06. - 14.06.2013 hergestellt und die HPLC von Christian Jung durchgeführt. Die statistische Auswertung erfolgte durch Christina Buckemüller.

Zur statistischen Auswertung wurde der Gehalt von Oktopamin und Tyramin in pg pro Bienengehirn ausgerechnet und der Mittelwert von drei Proben bestimmt. Mit Hilfe eines Mann-Whitney-U Tests wurden die Unterschiede zwischen den Gruppen auf Signifikanzen untersucht.

## 4.7 BESTIMMUNG DES EINFLUSSES VON OKTOPAMIN UND TYRAMIN AUF DAS DREI STUNDEN GEDÄCHTNIS

Bienen wurden am Tag vor Beginn des Experiments, wie in Kapitel 4.1 beschrieben, gefangen, eingetütet und mit 30 %iger Zuckerlösung satt gefüttert. Am Folgetag wurden die Tiere 30 Minuten vor Beginn des Experiments zur Akklimatisation an den Experimentierplatz gestellt.

Die Konditionierung wurde mit drei Durchgängen durchgeführt. Dabei wurde Nelkenöl als Duft (CS) und 43 % (1,25 M) Zuckerlösung als Belohnung (US) genutzt. Das Interval zwischen den Konditionierungsdurchgängen (*Inter-Trial-Interval* (ITI)) betrug zehn Minuten. Zehn Sekunden bevor die Duftpräsentation begann, wurde die Biene vor einen Abzug gestellt. Der Duft wurde fünf Sekunden präsentiert. Dafür wurde ein mit 4 µl Duftöl getränktes Filterpapier in eine 20 ml Spritze gegeben und die Luft aus dieser herausgedrückt. Nach drei Sekunden wurden die Bienen mit einem Zahnstocher, der mit der Zuckerlösung benetzt war, zunächst an den Antennen berührt, sodass der Rüssel der Bienen herausgestreckt wurde. Sie konnte dann die Zuckerlösung von dem Zahnstocher lecken. Die Zuckergabe war dabei vier Sekunden lang. Die zeitliche Abfolge eines Konditionierungsdurchgangs ist in Abbildung 2 dargestellt. Die genaue Konditionierungsprozedur wird in Felsenberg et al. (2011) beschrieben.



**Abbildung 2: Zeitliche Abfolge eines Konditionierungsdurchgangs.** Ein Konditionierungsdurchgang dauert 28 Sekunden. Eine Biene wird dabei vor einen Abzug gestellt (Pfeil nach unten) und zehn Sekunden vor diesem stehen gelassen. Anschließend wird der Duft für fünf Sekunden präsentiert und nach drei Sekunden die Zuckerbelohnung von vier Sekunden gegeben. Nach insgesamt 28 Sekunden wird die Biene zurück in ihr Rack gestellt (Pfeil nach oben) und anschließend die nächste Biene vor den Abzug gestellt.

Es wurden zwei Versuche durchgeführt:

1. Epinastin: Nach der Konditionierung wurden die Bienen in zwei Gruppen aufgeteilt und mit 1  $\mu$ l 40 mM Epinastin (in PBS) und PBS injiziert.
2. Yohimbin: Vor der Konditionierung wurden die Bienen in zwei Gruppen aufgeteilt. Die eine Hälfte wurde mit 30 %iger Zuckerlösung satt gefüttert und die zweite Hälfte nicht gefüttert. Nach der Konditionierung wurden diese zwei Gruppen je in zwei weitere Gruppen aufgeteilt und mit 10 mM Yohimbin (in 10 % DMSO in PBS) und 10 % DMSO in PBS injiziert.

Drei Stunden nach Beginn der Konditionierung wurde der Gedächtnisabruf durchgeführt. Dabei wurde den Bienen für fünf Sekunden der Nelkenduft präsentiert und die Reaktion (Herausstrecken der Rüssels oder nicht) notiert und in Prozent graphisch aufgetragen. Am Ende des Experiments wurde der Zuckerwassertest durchgeführt. Dafür wurde 1,25 M Zucker (43 %) an die Antennen der Bienen gegeben. Bienen die den Rüssel nicht herausstreckten, wurden von dem Experiment ausgeschlossen (siehe Felsenberg et al. 2011).

Zur statistischen Auswertung der Konditionierung wurde eine ANOVA mit Messwiederholung (rm ANOVA) durchgeführt. Der Test wurde mit einer einfaktoriellen ANOVA getestet.

Die Experimente wurden von Christina Buckemüller geplant und ausgewertet. Das Epinastin-Experiment wurde von Patrick Werner vom 19.06. - 21.06.2013 und das Yohimbin-Experiment von Johannes Kühnemund vom 24.07. - 22.08.2013 durchgeführt.

## 4.8 BESTIMMUNG DES EINFLUSSES VON OKTOPAMIN UND TYRAMIN AUF DIE KONDITIONIERUNG

In diesem Experiment wurden Bienen, wie in Punkt 4.1 beschrieben, gefangen, eingetütet und mit einer 30 %igen Zuckerlösung satt gefüttert. Vor der Akquisition wurden die Bienen in zwei Gruppen aufgeteilt. Eine Hälfte der Tiere wurde mit einer 30 %igen Zuckerlösung satt gefüttert und die andere Hälfte wurde nicht gefüttert. 15 Minuten vor Beginn der Konditionierung wurden diese Gruppen dann wiederum in zwei Gruppen aufgeteilt. Eine Hälfte der Tiere wurde mit 40 mM Epinastin (in PBS) und die andere mit PBS injiziert. In einem zweiten Experimente wurde eine Hälfte der Tiere mit 10 mM Yohimbin (in 10 % DMSO in PBS) und 10 % DMSO in PBS injiziert.

Die Konditionierung wurde, wie in Kapitel 4.7 beschrieben, mit 3 Durchgängen durchgeführt. Um 16 Uhr wurden die Bienen mit vier 4 µl Tropfen einer 30 %igen Zuckerlösung gefüttert und über Nacht in eine dunkle Box gestellt. 24 Stunden nach der Konditionierung wurde der Gedächtnisabruf, wie in Kapitel 4.7 beschrieben, durchgeführt.

Die Daten des Epinastinexperiments sind ein Teil der Daten aus dem Experiment 4.6 und wurden vom 06.05. - 12.07.2013 von Christina Buckemüller, Johannes Kühnemund und Patrick Werner durchgeführt. Es wurden hier nur die hungrigen und satten Tiere, die mit Nelke konditioniert wurden, ausgewertet. Die Abfrage der Akquisition mit dem neuen Duft wurde nicht berücksichtigt, sondern erst in 4.6 ausgewertet. Die Daten des Yohimbinexperiments wurden vom 27.08. - 27.09.2013 von Christina Buckemüller und Johannes Kühnemund durchgeführt. Beide Experimente wurden von Christina Buckemüller geplant und durchgeführt.

Zur statistischen Auswertung der Konditionierung wurde eine ANOVA mit Messwiederholung (rm ANOVA) durchgeführt und zur Auswertung des Tests eine einfaktoriellen ANOVA.

## 4.9 BESTIMMUNG DES EINFLUSSES VON OKTOPAMIN UND TYRAMIN AUF DAS EXTINKTIONSLERNEN

Bienen, wurden am Tag vor dem Experiment, wie in Punkt 4.1 gefangen und behandelt. Am Folgetag fand die Konditionierung statt. Anschließend wurden die Tiere bis zum nächsten Tag in eine abgedunkelte Box gestellt und nur um 16 Uhr zum Füttern noch einmal herausgeholt. Dabei wurde jeder Biene maximal vier 4  $\mu$ l Tropfen Zuckerlösung gefüttert. 24 Stunden nach der Konditionierung fand eine Extinktion mit fünf Duftpräsentationen statt (ITI = 10 min). Die zeitliche Abfolge eines Extinktionsdurchgangs ist wie in Abbildung 2, nur dass die Tiere keinen US bekamen. Nach der Extinktion wurden die Bienen wieder in eine Box gestellt und um 16 Uhr für das Füttern von maximal vier 4  $\mu$ l Tropfen herausgeholt. 48 Stunden nach der Konditionierung wurden der Gedächtnisabruf und der Zuckerwassertest, wie oben beschrieben, durchgeführt.

Insgesamt wurden drei Experimente durchgeführt:

1. Epinastin mit hungrigen Tieren: Die Bienen wurden 15 Minuten vor Beginn der Extinktion mit 1  $\mu$ l 40 mM Epinastin (in PBS) oder PBS injiziert.
2. Epinastin mit hungrigen und satten Tieren: Eine Hälfte der Bienen wurde 30 Minuten vor Beginn der Extinktion mit 30 %iger Zuckerlösung satt gefüttert (satt) und die andere Hälfte wurde nicht gefüttert (hungrig). 15 Minuten vor der Extinktion wurden diese Gruppen in zwei weitere Gruppen aufgeteilt und sie wurden mit 1  $\mu$ l 40 mM Epinastin (in PBS) oder PBS injiziert.
3. Yohimbin mit hungrigen und satten Tieren: Eine Hälfte der Tiere wurde 30 Minuten vor Beginn der Extinktion mit 30 %iger Zuckerlösung satt gefüttert, die andere wurde nicht behandelt. Die zwei Gruppen wurden in zwei weitere Gruppen aufgeteilt und mit 10 mM Yohimbin (in 10 % DMSO in PBS) oder 10 % DMSO in PBS injiziert.

Alle Experimente wurden von Christina Buckemüller geplant und ausgewertet. Das erste Experiment wurde vom 06.05. - 05.07.2012 von Christina Buckemüller und Isabell Groß, das zweite vom 03.07. - 07.10.2012 von Christina Buckemüller, Isabell Groß und Oliver Siehler und das dritte vom 16.07. - 14.09.2013 von Christina Buckemüller, Johannes Kühnemund und Patrick Werner durchgeführt.



Zur statistischen Auswertung der Konditionierung und Extinktion wurde eine ANOVA mit Messwiederholung (rm ANOVA) und für den Test eine einfaktorielle ANOVA durchgeführt. Zur weiteren Auswertung wurde ein Fisher LSD Post hoc Test genutzt.

#### **4.10 BESTIMMUNG DES EINFLUSSES VON OKTOPAMIN AUF LERNEN UND GEDÄCHTNIS MIT ZWEI DÜFTEN**

In diesem Experiment wurden, wie in Punkt 4.1 beschrieben, Arbeiterbienen gefangen, eingetütet und satt gefüttert. 30 Minuten vor der Konditionierung wurde eine Hälfte der Tiere satt gefüttert und 15 Minuten später wurden die Tiere mit 1  $\mu$ l 40 mM Epinastin oder PBS injiziert. Anschließend fand die Konditionierung mit drei Durchgängen statt.

Die Konditionierung wurde, wie zuvor beschrieben, mit drei Durchgängen (ITI = 10 min) durchgeführt. Eine Hälfte der Bienen wurde mit Nelkenduft als CS und die andere Hälfte mit Hexanol als CS konditioniert. Nach der Konditionierung kamen die Bienen in eine dunkle Box. Um 16 Uhr wurden sie wieder herausgeholt, um ihnen maximal vier 4  $\mu$ l Tropfen 30 % Zuckerlösung zu verfüttern.

Vierundzwanzig Stunden nach der Konditionierung wurde der Gedächtnisabruf durchgeführt. Einer Gruppe der Tiere wurde erst Hexanol und zehn Minuten später Nelkenöl präsentiert, der anderen Gruppe erst Hexanol und dann Nelkenöl.

Die Planung und Auswertung der Experimente erfolgte durch Christina Buckemüller. Die Experimente wurden vom 06.05. - 12.07.2013 von Christina Buckemüller, und Patrick Werner durchgeführt.

Zur statistischen Auswertung der Konditionierung wurde eine ANOVA mit Messwiederholung durchgeführt. Die Reihenfolge der Abfrage während des Tests wurde ebenfalls statistisch untersucht. Als Post hoc Test wurde ein Fisher LSD Post hoc Test verwendet.

## 5 ERGEBNISSE

### 5.1 ERMITTLUNG GEEIGNETER ARBEITSKONZENTRATIONEN

In dieser Arbeit wurde der Einfluss der biogenen Amine Oktopamin und Tyramin auf Lernen und Gedächtnis in der Honigbiene untersucht. Dafür mussten zunächst geeignete Arbeitskonzentrationen der biogenen Amine, ihrer Rezeptoragonisten und -antagonisten gefunden werden. Zur Ermittlung geeigneter Konzentrationen, wurde der Einfluss von Oktopamin, des Oktopaminrezeptorantagonisten Epinastin, des Oktopaminrezeptoragonisten Chlordimeform, der des Tyraminrezeptorantagonisten Yohimbin, der Einfluss von Dopamin, des Dopaminrezeptorantagonisten Fluphenazin und der des Dopaminrezeptoragonisten Homovanillylalkohol auf das Überleben der Bienen getestet. Verschiedene Konzentrationen der Drogen oder der jeweiligen Kontrolle wurde den Bienen in den Flugmuskel injiziert und das Überleben wurde nach 30 Minuten, einer Stunde, zwei, drei, sechs und 24 Stunden dokumentiert. Die Sterberate in Prozent wurde berechnet. Mittels ANOVA mit Messwiederholung (rm ANOVA) wurde für jede Drogenkonzentration der Zeitpunkt bestimmt, für den sich die Sterberate der Drogen-injizierten Tiere von der der Kontrolle unterscheiden. In den folgenden Abbildungen ist für alle Drogen und getesteten Drogenkonzentrationen der 24 Stunden Zeitpunkt gezeigt. Die Konzentration, bei der das Überleben mit Droge 24 Stunden nach der Injektion gerade nicht signifikant unterschiedlich ist, vom Überleben der mit dem jeweiligen Lösungsmittel injizierten Kontrolle, wurde in Folgeversuchen als Arbeitskonzentration verwendet.

Bienen wurden mit dem Oktopaminrezeptorantagonisten Epinastin in den Konzentrationen von 0,1; 0,2; 1; 2; 10; 20; 40; 60; 80; 100 oder 132 mM injiziert und das Überleben nach 24 Stunden in Abbildung 3A dargestellt. Das Überleben von Bienen 24 Stunden nach der Injektion von 60 mM (rm ANOVA, Faktor Zeit x Injektion:  $F_{12; 1019} = 8,126$ ;  $p < 0,001$ ; unequal N HSD Post hoc Test:  $p = 0,0098$ ), 80 mM ( $p < 0,001$ ), 100 mM ( $p < 0,001$ ) und 132 mM ( $p < 0,001$ ) unterscheidet sich signifikant vom Überleben von PBS-injizierten Bienen.

Die Sterberate von Bienen, denen der Oktopaminrezeptorantagonist Epinastin injiziert wurde, ist 24 Stunden nach der Injektion ab einer Konzentration von 60 mM signifikant höher als die

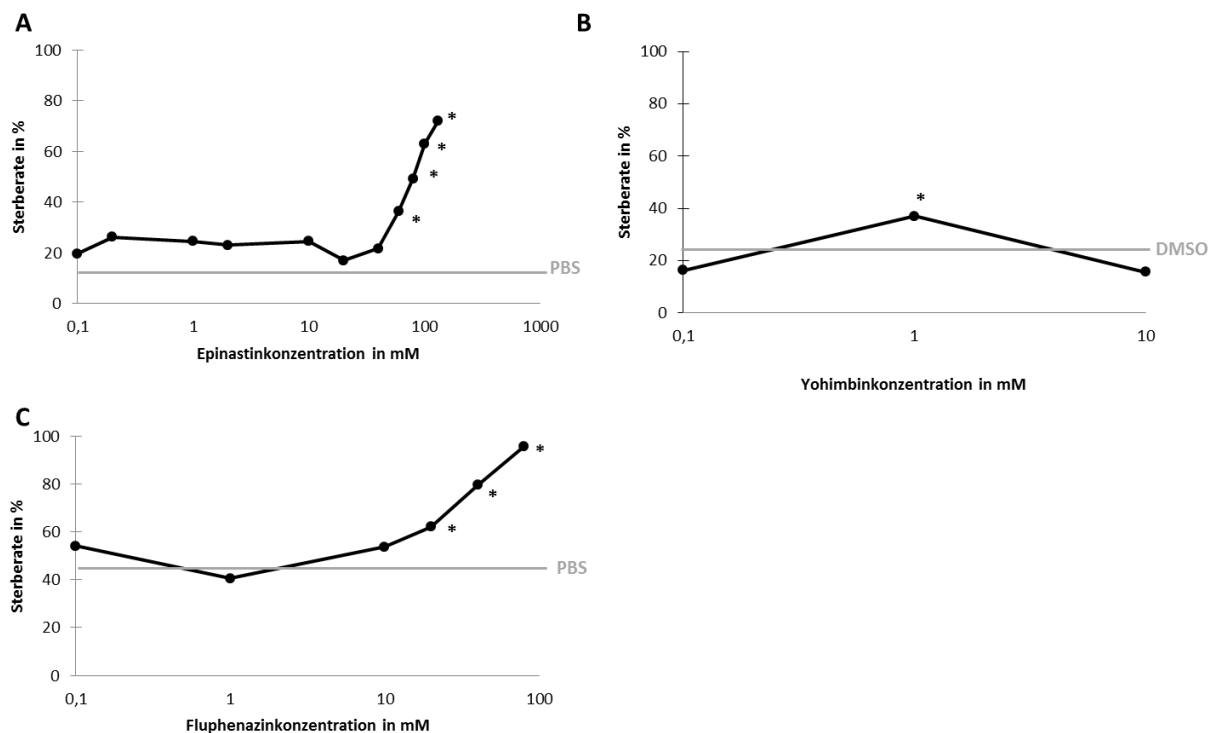
von PBS-Kontrolltieren. Daher wurde in allen weiteren Experimenten mit 40 mM Epinastin gearbeitet.

Bienen wurden mit dem Tyraminrezeptorantagonisten Yohimbin in den Konzentrationen 0,1; 1 oder 10 mM injiziert, das Überleben überprüft und in Abbildung 3B dargestellt. Das Überleben von Bienen 24 Stunden nach der Injektion von 1 mM unterscheidet sich signifikant vom Überleben der DMSO-injizierten Kontrolltiere (Abb. 3B; rm ANOVA, Faktor Injektion: Faktor Injektion:  $F_{18; 1260} = 1,830$ ;  $p = 0,018$ ; Fisher LSD Post hoc Test).

Der Tyraminrezeptorantagonist Yohimbin ist im wässrigen schwer löslich. Die höchste im Experiment injizierte Konzentration ist 10 mM in 10 % DMSO. Um höhere Yohimbinkonzentrationen zu lösen, hätten höhere DMSO-Konzentrationen genutzt werden müssen. DMSO in hohen Konzentrationen hat selbst Effekte auf die Zellphysiologie (Lu und Mattson 2001; Sawada und Sato 1975; Theophilidis und Kravari 1994; Nilsson 1980; Reisner und Bucholtz 1977; Saborio und Koch 1973) und damit möglicherweise auf das Überleben der Bienen. Weitere Versuche wurden daher mit 10 mM Yohimbin durchgeführt.

Das Überleben von Bienen 24 Stunden nach der Injektion von 0,1; 1; 10; 20; 40 oder 80 mM des Dopaminrezeptorantagonisten Fluphenazin ist in Abbildung 3C dargestellt. Das Überleben von Bienen 24 Stunden nach der Injektion von 20 mM (rm ANOVA, Faktor Zeit x Injektion:  $F_{35; 2695} = 5,584$ ;  $p < 0,001$ ; Fisher LSD Post hoc Test:  $p = 0,0036$ ), 40 mM ( $p < 0,001$ ) und 80 mM ( $p < 0,001$ ) unterscheidet sich signifikant vom Überleben der PBS-injizierten Kontrolltiere.

Der Dopaminrezeptorantagonist Fluphenazin ist ab Konzentrationen von 20 mM für Bienen tödlich. Weitere Experimente wurden daher mit 10 mM Fluphenazin durchgeführt.



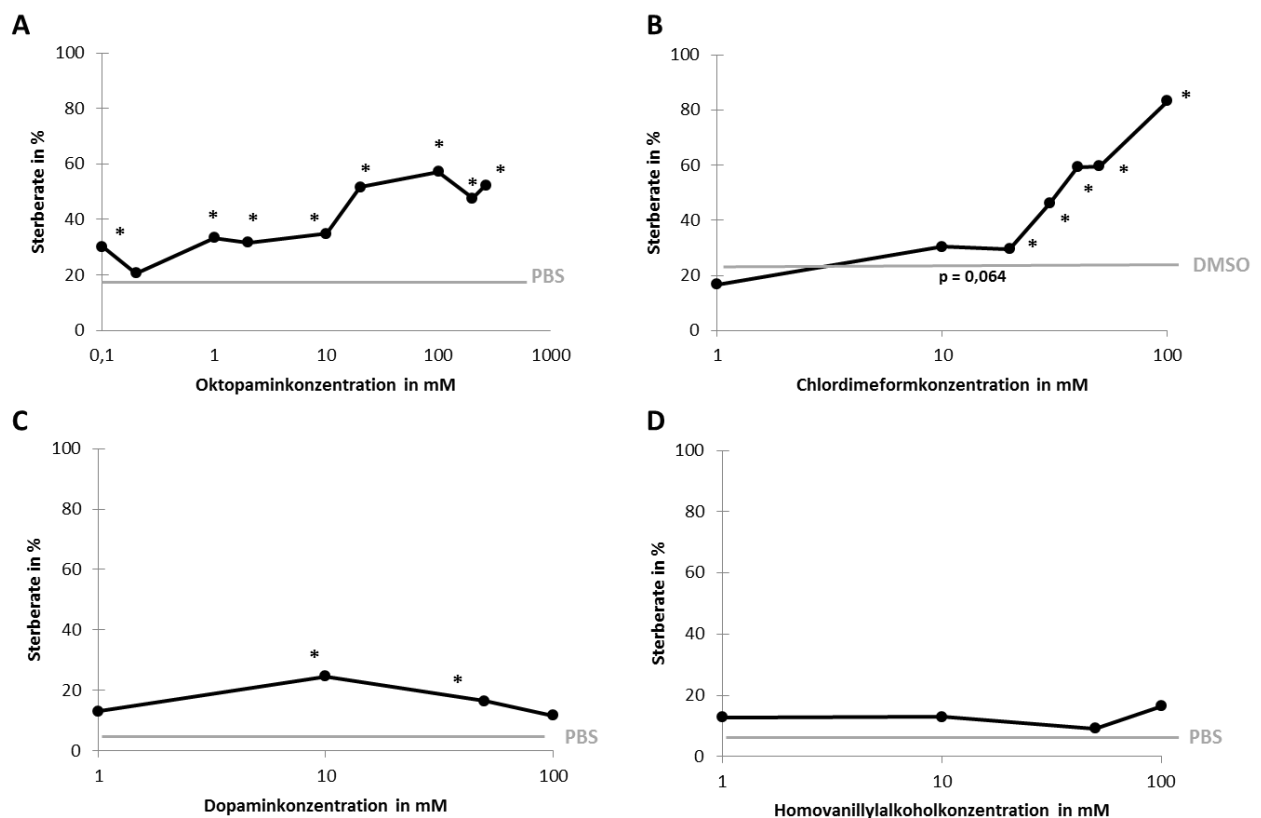
**Abbildung 3: Sterberaten der Tiere, die mit den Rezeptorantagonisten der biogenen Amine Oktopamin, Tyramin und Dopamin injiziert wurden.** Bienen wurde 1  $\mu$ l der Droge (schwarz) oder Kontrolllösung (grau) in den Flugmuskel injiziert. Das Überleben wurde beobachtet und 24 Stunden nach der Injektion notiert. Angegeben ist die Sterberate in % gegen die Drogenkonzentration in mM auf einer Logarithmischen Skala. (A) Vierundzwanzig Stunden nach der Injektion sind signifikante Unterschiede zwischen den Tieren, die mit der Kontrolllösung und 60 mM, 80 mM, 100 mM oder 132 mM Epinastin injiziert wurden, vorhanden. (B) Vierundzwanzig Stunden nach der Injektion sind signifikante Unterschiede zwischen den Tieren, die mit der Kontrolllösung und den mit 1 mM Yohimbin injiziert wurden, vorhanden. (C) Vierundzwanzig Stunden nach der Injektion von Fluphenazin sind signifikante Unterschiede zwischen den Tieren, die mit der Kontrolllösung oder mit 20 mM, 40 mM oder 80 mM Fluphenazin behandelt wurden, vorhanden. Sterne stehen für  $p < 0,05$ .

Das Überleben von Bienen, die mit Oktopamin injiziert wurden, zeigen, bis auf die Tiere, die mit 0,2 mM injiziert wurden, 24 Stunden nach der Injektion einen signifikanten Unterschied zu dem Überleben von Bienen, die mit PBS injiziert wurden (Abb. 4A; rm ANOVA, Faktor Zeit x Injektion:  $F_{45; 3095} = 2,86$ ;  $p < 0,001$ . Fisher LSD Post hoc Test: 0,1 mM:  $p = 0,0465$ ; 0,2 mM:  $p = 0,7760$ ; 1 mM:  $p = 0,0105$ ; 2 mM:  $p = 0,0229$ ; 10 mM:  $p = 0,0045$ ; 20 mM:  $p < 0,001$ ; 100 mM:  $p < 0,001$ ).

Da für fast alle Konzentrationen ein signifikanter Unterschied zur Kontrolle besteht und der Anstieg der Todesrate relativ linear verläuft, gehe ich davon aus, dass der Effekt, den Oktopamin auf das Überleben der Tiere ausübt, nicht aufgrund toxischer Eigenschaften zurückzuführen ist. Möglicherweise wird der Metabolismus der Tiere angeregt und dadurch sterben sie früher. In anderen Experimenten mit Honigbienen wurde mit 10 mM und 100 mM Oktopamin gearbeitet, welches, wie in meinem Fall systemisch injiziert wurde (Behrends und

Scheiner 2012). Nach persönlicher Rücksprach mit Jan Rillich, der in eigenen Versuchen mit Grillen und Oktopamin arbeitet, ergibt sich eine Oktopamin Arbeitskonzentration von 10 mM.

In Abbildung 4B ist die Todesrate der Tiere dargestellt, die mit 1; 10; 20; 30; 40; 50 oder 100 mM Chlordimeform oder 10 % DMSO in PBS injiziert wurden. Nach 24 Stunden sind signifikante Unterschiede zwischen dem Überleben von Bienen die mit DMSO injiziert wurden und den Bienen, die mit 20 mM (rm ANOVA, Faktor Zeit x Injektion:  $F_{42; 3204} = 13,087$ ;  $p < 0,001$ ; Fisher LSD Post hoc Test:  $p = 0,0399$ ), 30 mM ( $p < 0,001$ ) 40 mM ( $p < 0,001$ ), 50 mM ( $p < 0,001$ ) oder 100 mM ( $p < 0,001$ ) Chlordimeform injiziert wurden. Tiere, die mit 10 mM Chlordimeform injiziert wurden zeigen einen Trend zu einer höheren Sterberate, als die DMSO Kontrolle ( $p = 0,064$ ). Daraus ergibt sich eine Chlordimeform-Arbeitskonzentration von 1 mM.



**Abbildung 4: Sterberaten der Tiere, die mit den biogenen Aminen Oktopamin und Dopamin oder ihren Agonisten injiziert wurden.** Bienen wurde 1  $\mu$ l der Droge (schwarz) oder Kontrolllösung (grau) in den Flugmuskel injiziert. Das Überleben wurde beobachtet und 24 Stunden nach der Injektion notiert. Angegeben ist die Sterberate in % gegen die Drogenkonzentration in mM auf einer Logarithmischen Skala (A) Bienen, die mit Oktopamin injiziert wurden, zeigen signifikante Unterschiede zu den PBS Kontrollbienen. (B) Bienen, die mit dem Oktopaminrezeptoragonist Chlordimeform

injiziert wurden, zeigen signifikante Unterschiede zu den DMSO Kontrollbienen ab Konzentrationen von 20 mM Chlordimeform. (C) Bienen, die mit Dopamin injiziert wurden, zeigen signifikante Unterschiede zu den PBS Kontrollbienen. (D) Bienen, die mit dem Dopaminrezeptoragonisten Homovanillylalkohol injiziert wurden, zeigen keine signifikanten Unterschiede zu den PBS Kontrollbienen. Sterne stehen für  $p < 0,05$ .

Das Überleben von Bienen 24 Stunden nach Injektion von 1; 10; 50 oder 100 mM Dopamin ist in Abbildung 4C dargestellt. Das Überleben von Bienen 24 Stunden nach der Injektion von 10 mM (rm ANOVA, Faktor Zeit x Injektion:  $F_{24; 1800} = 1,716$ ;  $p = 0,0168$ ; Fisher LSD Post hoc Test:  $p < 0,001$ ) und 50 mM ( $p = 0,0297$ ) unterscheidet sich signifikant vom Überleben von den Tieren, die mit PBS injiziert wurden.

In späteren Experimenten wurde dennoch mit 10 mM Dopamin gearbeitet, obwohl es signifikante Unterschiede in der Sterberate zu der Kontrolle gibt, um die gleiche Dopaminkonzentration wie Oktopaminkonzentration zu nutzen (persönliche Rücksprache mit Jan Rillich).

Das Überleben von Bienen 24 Stunden nach Injektion von 1; 10; 50 oder 100 mM des Dopaminrezeptoragonisten Homovanillylalkohol ist in Abbildung 4D dargestellt. Das Überleben von Bienen 24 Stunden nach der Injektion unterscheidet sich nicht signifikant von dem Überleben der PBS Kontrolltiere (rm ANOVA, Faktor Zeit x Injektion:  $F_{24; 1656} = 0,07$ ;  $p = 0,8575$ ).

Die Injektion von Homovanillylalkohol hat keinen Einfluss auf das Überleben der Bienen. In späteren Experimenten wurde daher 50 mM Homovanillylalkohol verwendet.

## 5.2 OKTOPAMIN UND TYRAMIN MODULIEREN DIE RÜSSEL- ANTWORT IN ABHÄNGIGKEIT VON DEM FUTTERZUSTANDES

Im Folgenden soll der Einfluss biogener Amine auf die Rüsselantwort (*Proboscis extension response*, PER) der Honigbiene untersucht werden, da im späteren Verlauf die Bienen klassisch konditioniert werden sollen. Dafür wird ein Duft mit einer Zuckerbelohnung gepaart. Die Bienen bekommen die Zuckerbelohnung an ihre Antennen und müssen mit dem PER reagieren.

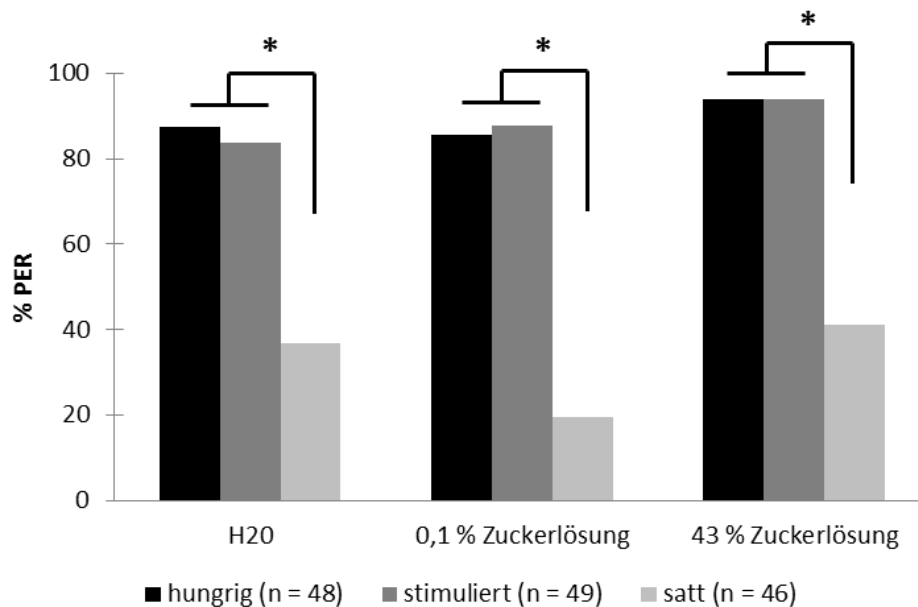
Daher wird der Einfluss des Futterzustandes und verschiedener biogener Amine auf die Rüsselantwort untersucht. Dafür wurde ein Zuckertest durchgeführt: Die Antennen der Bienen wurden mit Wasser, dann mit 0,1 %iger Zuckerlösung und zum Schluss mit 43 %iger Zuckerlösung berührt. Die Pause zwischen den Stimulationen betrug zwei Minuten. Der PER wurde notiert und prozentual graphisch dargestellt. 15 Minuten vor dem Zuckertest wurde den Bienen 1 µl der Droge oder der Kontrolle in den Flugmuskel injiziert. Da Oktopamin auch den Hungerzustand zu modulieren scheint (Burke et al. 2012; Liu et al. 2012), wurden diese Versuch mit hungrigen (18 Stunden keine Nahrung) und satten Bienen durchgeführt. Das Sattfüttern von Tieren erfolgte 30 Minuten vor dem Zuckertest.

Durch das mehrfache Berühren der Antennen mit Zuckerwasser während des Sattfütterns, könnte es zu einem Habituationseffekt in den sattgefütterten Gruppen kommen. Mögliche Verringerungen des PERs satt gefütterter Tiere, könnten so nicht eindeutig dem Sattfüttern zugeordnet werden. Zunächst wurde untersucht, ob das mehrfache Berühren der Antennen zur Habituation führt. Vor dem Zuckertest wurden die Bienen in drei Gruppen aufgeteilt. Eine wurde sattgefüttert (satt), eine nicht gefüttert (hungrig) und die dritte mit dem Futterzucker mehrfach (drei- bis fünfmal) an den Antennen stimuliert (stimuliert). Sollte die antennale Stimulation mit Zuckerwasser 30 Minuten vor dem Zuckertest zu Habituationseffekten führen, müsste sich der PER von Tieren, die mehrfach an den Antennen stimuliert wurden, von dem der unbehandelten Tiere signifikant unterscheiden.

Bienen, die 30 Minuten vor der Zuckerabfrage satt gefüttert wurden, haben eine geringere PER-Rate als hungrige Tiere (Abb. 5; rm ANOVA, Faktor Zeit x Injektion:  $F_{24; 1800} = 1,716$ ;  $p = 0,0168$ ; Fisher LSD Post hoc Test:  $p_{H_2O} < 0,001$ ;  $p_{0,1\%} < 0,001$ ;  $p_{1,25M} < 0,001$ ). Stimulierte Bienen haben eine signifikant höhere PER-Rate als die satten Tiere ( $p_{H_2O} < 0,001$ ;  $p_{0,1\%} <$

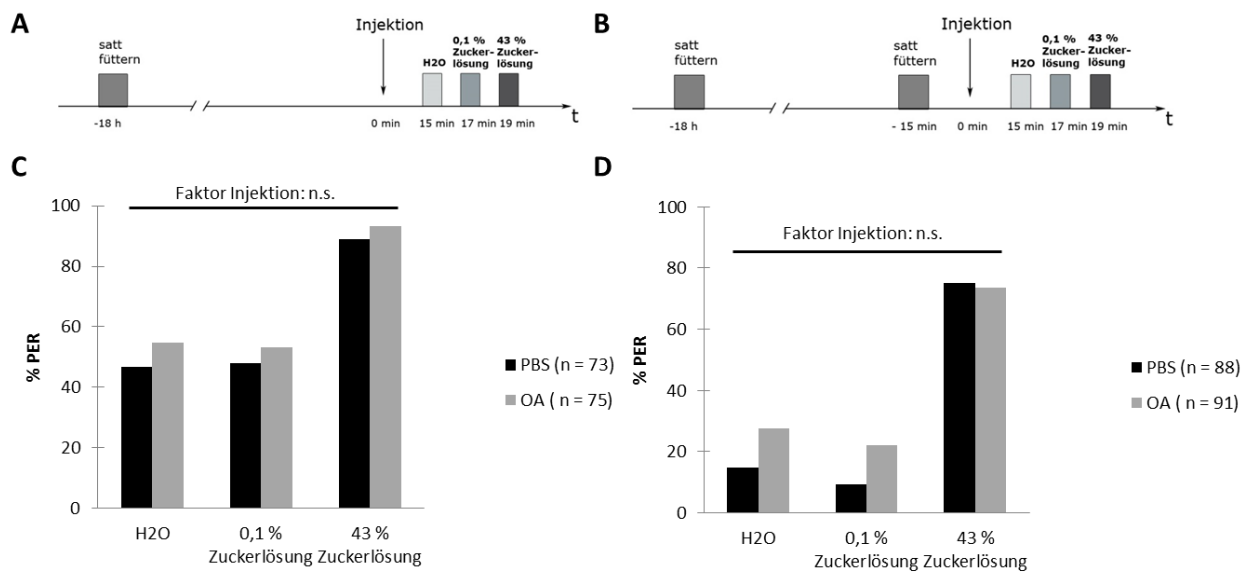


0,001;  $p_{1,25M} < 0,001$ ). Zwischen den hungrigen und den stimulierten Tieren sind keine Unterschiede vorhanden ( $p_{H_2O} = 0,6123$ ;  $p_{0,1\%} = 0,7568$ ;  $p_{1,25M} = 0,9865$ ).



**Abbildung 5: Mehrfache Stimulation der Antennen mit Zuckerlösung führt nicht zur Habituation.** Bienen wurden 30 Minuten vor dem Test satt gefüttert (hellgrau), mehrfach mit Zucker an den Antennen stimuliert (grau) oder nicht behandelt (schwarz). Die sattierten Tiere reagieren signifikant weniger als die hungrigen oder die an den Antennen stimulierten Bienen, zwischen denen keine Unterschiede vorhanden sind. Sterne stehen für  $p < 0,05$ . Anzahl der Tiere in Klammern.

Da es keine signifikanten Unterschiede zwischen dem PER von Tieren, die mehrfach an den Antennen stimuliert wurden und dem der unbehandelten Tiere gibt, kann eine Habituation, die durch das Sattfüttern der Bienen 30 Minuten vor dem Zuckertest ausgeschlossen werden. Der Futterzustand der Tiere (hungrig oder satt) hat jedoch einen Einfluss auf den PER.

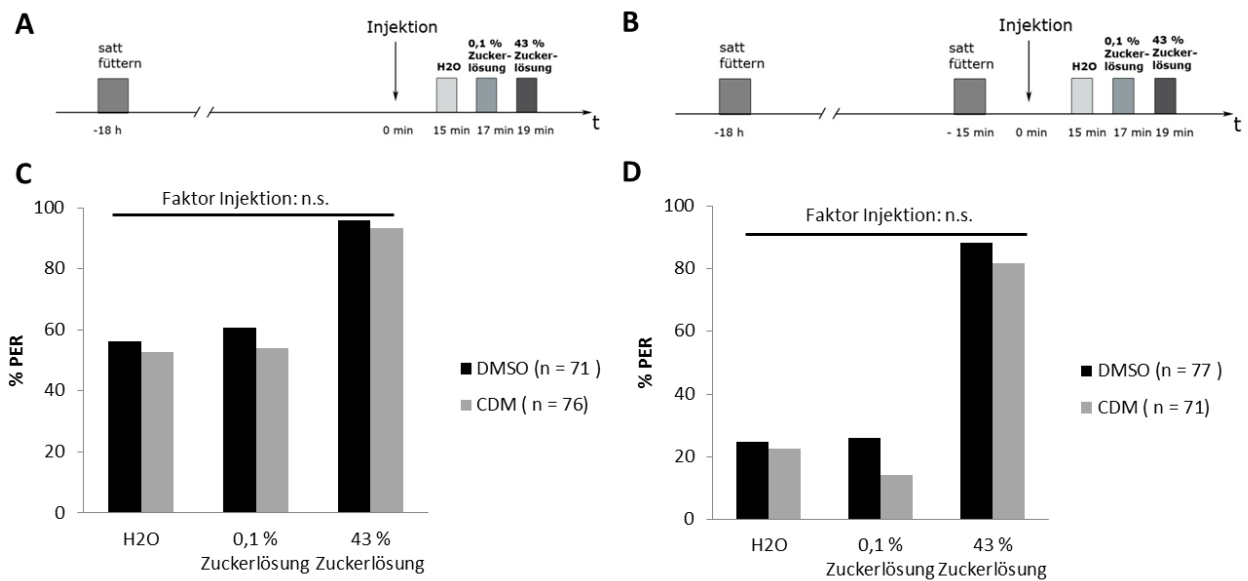


**Abbildung 6: Oktopamininjektion hat keinen Effekt auf den PER.** (A) Schematischer Überblick des Experiments mit hungrigen Tieren. (B) Schematischer Überblick des Experiments mit satt en Tieren. (C) In hungrigen Bienen hat 10 mM systemisch injiziertes Oktopamin (grau) keinen Effekt auf den PER. (D) In satt en Bienen sind keine signifikanten Unterschiede zwischen den Tieren, die mit Oktopamin (grau) injiziert wurden und den PBS Kontrolltieren (schwarz) vorhanden. Anzahl der Tiere in Klammern.

Um den Einfluss von Oktopamin auf die Rüsselantwort zu untersuchen, wurden Oktopamin, der Oktopaminrezeptoragonist Chlordimeform und der Oktopaminrezeptorantagonist Epinastin 15 Minuten vor der Zuckerabfrage injiziert.

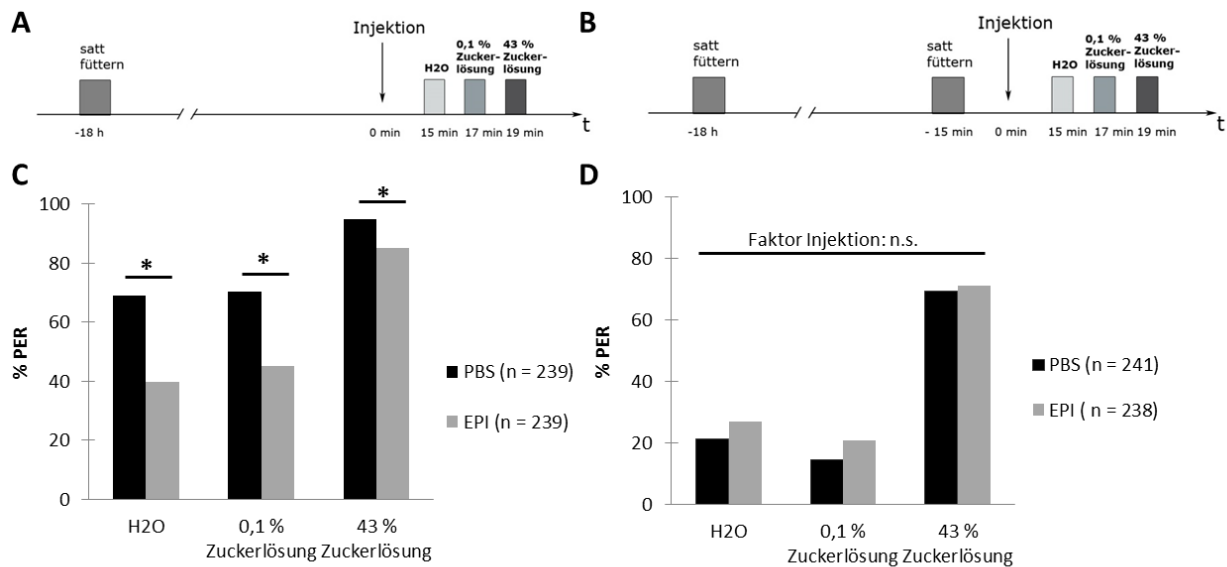
Weder für hungrige (Abb. 6C; rm ANOVA, Faktor Injektion:  $F_{1; 146} = 1,1004$ ;  $p = 0,2959$ ), noch für satt en Bienen (Abb. 6D; rm ANOVA, Faktor Injektion:  $F_{1; 177} = 3,1551$ ;  $p = 0,0774$ ), gibt es signifikante Unterschiede zwischen der PER-Rate von Bienen, die mit 10 mM Oktopamin und Bienen, die mit der Kontrolllösung injiziert wurden.

Weder für hungrige (Abb. 7C; rm ANOVA, Faktor Injektion:  $F_{1; 145} = 0,6029$ ;  $p = 0,4387$ ), noch für satte Bienen (Abb. 7D; rm ANOVA, Faktor Injektion:  $F_{1; 146} = 0,52512$ ;  $p = 0,1446$ ), gibt es signifikante Unterschiede zwischen den PER-Raten der Bienen, die mit 1 mM des Oktopaminagonisten Chlordimeform und Bienen, die mit der Kontrolllösung injiziert wurden.



**Abbildung 7: Die Injektion des Oktopaminrezeptoragonisten Chlordimeform hat keinen Effekt auf den PER.** (A) Schematischer Überblick des Experiments mit hungrigen Tieren. (B) Schematischer Überblick des Experiments mit satten Tieren. (C) In hungrigen Bienen sind keine Unterschiede zwischen den Tieren, die mit 1 mM Chlordimeform (grau) oder 10 %igem DMSO (schwarz) injiziert wurden, vorhanden. (D) In satten Bienen sind keine signifikanten Unterschiede zwischen den Tieren, die mit Chlordimeform (grau) injiziert wurden und den DMSO Kontrolltieren (schwarz) vorhanden. Anzahl der Tiere in Klammern.

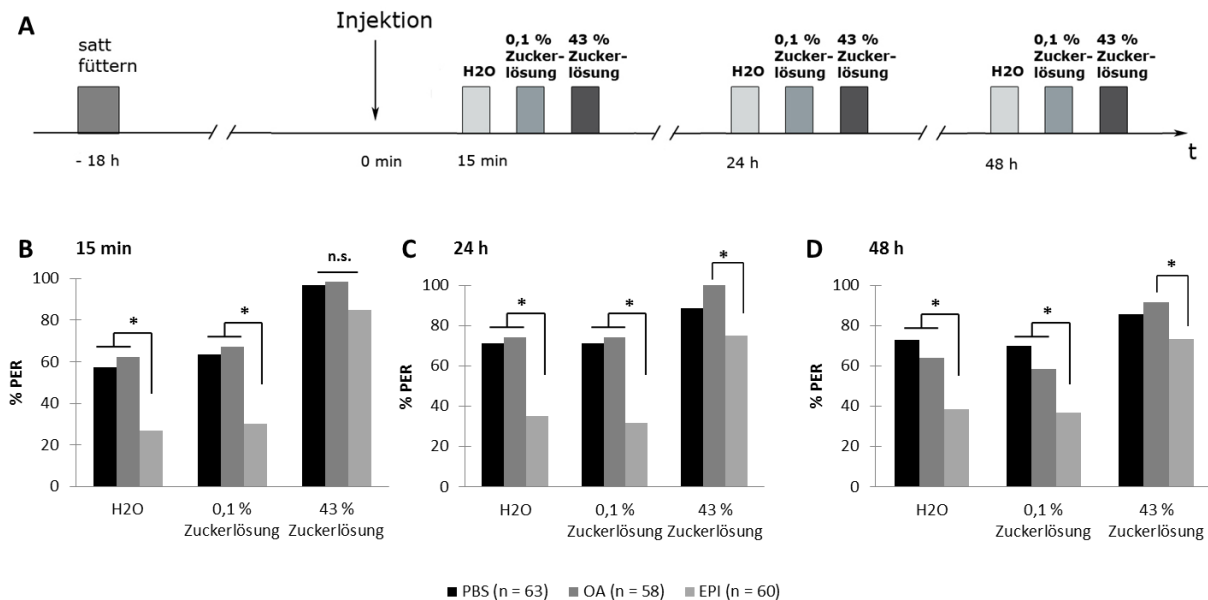
Hungrige Bienen, die mit 40 mM des Oktopaminrezeptorantagonist Epinastin injiziert wurden, zeigen eine Verringerung der PER-Rate gegenüber der Kontrolle (Abb. 8C; rm ANOVA, Faktor Injektion x Zuckerlösung:  $F_{2, 954} = 12,843$ ;  $p < 0,001$ ). In satten Bienen gibt es keine signifikanten Unterschiede zwischen den PER-Raten der Epinastin- und der Kontrollgruppe (Abb. 6D; rm ANOVA, Faktor Injektion:  $F_{1, 477} = 2,2498$ ;  $p = 0,1343$ ).



**Abbildung 8: Der Oktopaminrezeptorantagonist Epinastin verringert den PER in hungrigen Bienen.** (A) Schematischer Überblick des Experiments mit hungrigen Tieren. (B) Schematischer Überblick des Experiments mit sattten Tieren. (C) In hungrigen Bienen verringert 40 mM injiziertes Epinastin (grau) den PER. (D) In sattten Bienen sind keine signifikanten Unterschiede zwischen den Tieren, die mit Epinastin injiziert wurden und den PBS-Kontrolltieren (schwarz) vorhanden. Sterne stehen für  $p < 0,05$ . Anzahl der Tiere in Klammern.

Im Folgenden wurde erstens, die Dauer der Epinastinwirkung untersucht und zweitens, ob Oktopamin zu einem späteren Zeitpunkt nach der Injektion einen Einfluss auf den PER der Bienen hat. Dafür wurde der Zuckertest 24 und 48 Stunden nach der Injektion wiederholt. Fünfzehn Minuten nach der Injektion von Oktopamin, PBS oder Epinastin sind keine signifikanten Unterschiede zwischen den Tieren, die mit PBS und denen die mit Oktopamin injiziert wurden, vorhanden (Abb. 9; rm ANOVA, Faktor Injektion x Zuckerlösung:  $F_{16; 1424} = 2,393$ ;  $p = 0,0015$ ; Fisher LSD Post hoc Test: 15 Minuten: H<sub>2</sub>O:  $p = 0,5239$ ; 0,1 % Zucker:  $p = 0,6276$ ; 43 % Zucker:  $p = 0,8511$ ; 24 Stunden: H<sub>2</sub>O:  $p = 0,7259$ ; 0,1 % Zucker:  $p = 0,7259$ ; 43 % Zucker:  $p = 0,1507$ ; 48 Stunden: H<sub>2</sub>O:  $p = 0,2329$ ; 0,1 % Zucker:  $p = 0,1467$ ; 43 % Zucker:  $p = 0,4636$ ). Die Tiere, die mit Epinastin injiziert wurden, haben eine signifikant niedrigere PER-Rate für Wasser ( $p_{OA \text{ vs EPI}} < 0,001$ ;  $p_{PBS \text{ vs EPI}} < 0,001$ ) und 0,1 % Zucker ( $p_{OA \text{ vs EPI}} < 0,001$ ;  $p_{PBS \text{ vs EPI}} < 0,001$ ). Dieser Effekt ist nach 24 und 48 Stunden immer noch vorhanden (24 Stunden: H<sub>2</sub>O:  $p_{OA \text{ vs EPI}} < 0,001$ ;  $p_{PBS \text{ vs EPI}} < 0,001$ ; 0,1 % Zucker:  $p_{OA \text{ vs EPI}} < 0,001$ ;  $p_{PBS \text{ vs EPI}} < 0,001$ ; 48 Stunden: H<sub>2</sub>O:  $p_{OA \text{ vs EPI}} < 0,001$ ;  $p_{PBS \text{ vs EPI}} < 0,001$ ; 0,1 % Zucker:  $p_{OA \text{ vs EPI}} < 0,001$ ;  $p_{PBS \text{ vs EPI}} < 0,001$ ). Für den 43 %igen Zucker gibt es nach 15 Minuten keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen ( $p_{EPI \text{ vs. PBS}} = 0,1229$ ;  $p_{EPI \text{ vs.}}$

$OA = 0,898$ ;  $p_{OA \text{ vs. PBS}} = 0,8511$ ). Nach 24 und 48 Stunden sind jedoch Unterschiede zwischen den Oktopamin- und den Epinastin-injizierten Tieren vorhanden (24 Stunden:  $p = 0,0014$ ; 48 Stunden:  $p = 0,0212$ ).

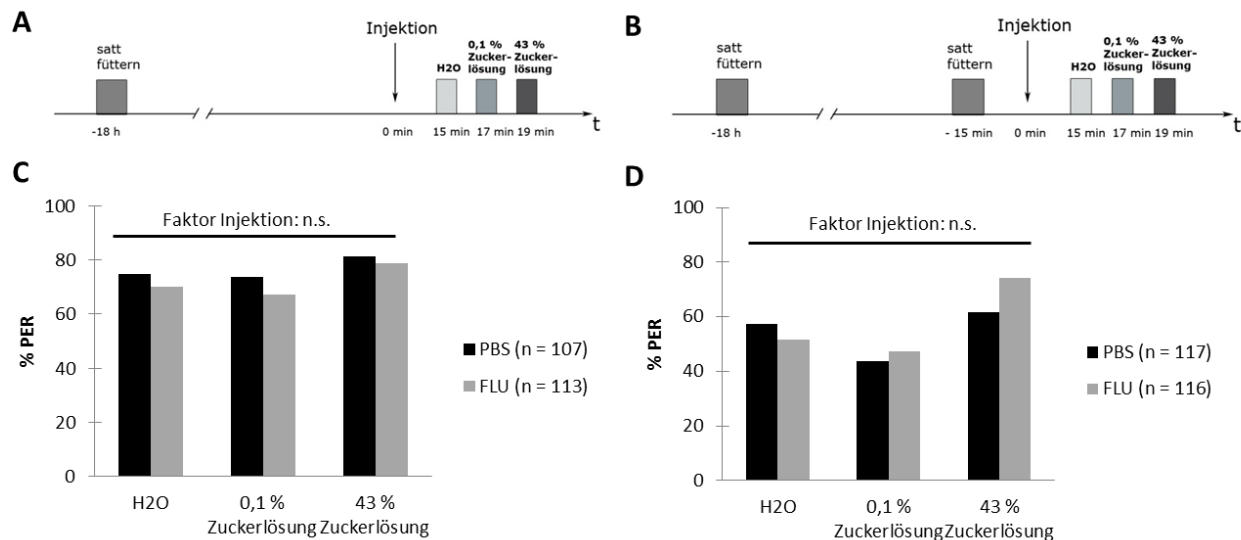


**Abbildung 9: Der Effekt des Oktopaminrezeptorantagonisten Epinastin hält für mindestens 48 Stunden nach der Injektion an.** (A) Schematische Darstellung des Experiments. Bienen wurden mit 1  $\mu$ l PBS (schwarz), Oktopamin (grau) oder Epinastin (hellgrau) injiziert. Es wurde an drei aufeinanderfolgenden Zeitpunkten der PER getestet. (B) 15 Minuten nach der Injektion ist eine signifikante Verringerung des PER zu beobachten. (C) Ein Tag nach der systemischen Injektion von Epinastin, Oktopamin und PBS ist ein signifikanter Unterschied zwischen den Tieren, die mit Epinastin injiziert wurden und den zwei anderen Gruppen vorhanden. (D) Zwei Tage nach der Injektion kann dieser Unterschied immer noch beobachtet werden. Sterne stehen für  $p < 0,05$ . Anzahl der Tiere in Klammern.

Epinastin reduziert die PER-Rate bei hungrigen Bienen. Dieser Effekt hält für mindestens 48 Stunden an. Daraus kann geschlossen werden, dass Oktopamin den PER bei hungrigen Bienen moduliert.

Die Arbeit mit Rezeptorantagonisten ist immer problematisch, da die Antagonisten in der Regel nicht hochspezifisch sind. Für Epinastin ist bekannt, dass es neben Oktopaminrezeptoren auch bestimmte Dopaminrezeptoren blockiert (AmDop2) (Mustard et al. 2003). Um sicherzustellen, dass der beobachtete Effekt auf Oktopamin und nicht Dopamin zurückzuführen ist, wurde ein Experiment mit Fluphenazin durchgeführt. Fluphenazin ist ein Dopaminrezeptorantagonist, der den Rezeptor AmDop2 blockiert (Beggs et al. 2011). Fluphenazin hat keinen Einfluss auf die PER-Rate der Bienen, weder in hungrigen (Abb. 10C;

rm ANOVA, Faktor Injektion:  $F_{1; 218} = 0,7919$ ;  $p = 0,3745$ ), noch in satten Bienen (Abb. 10D; rm ANOVA, Faktor Injektion:  $F_{1; 230} = 0,1820$ ;  $p = 0,6701$ ).

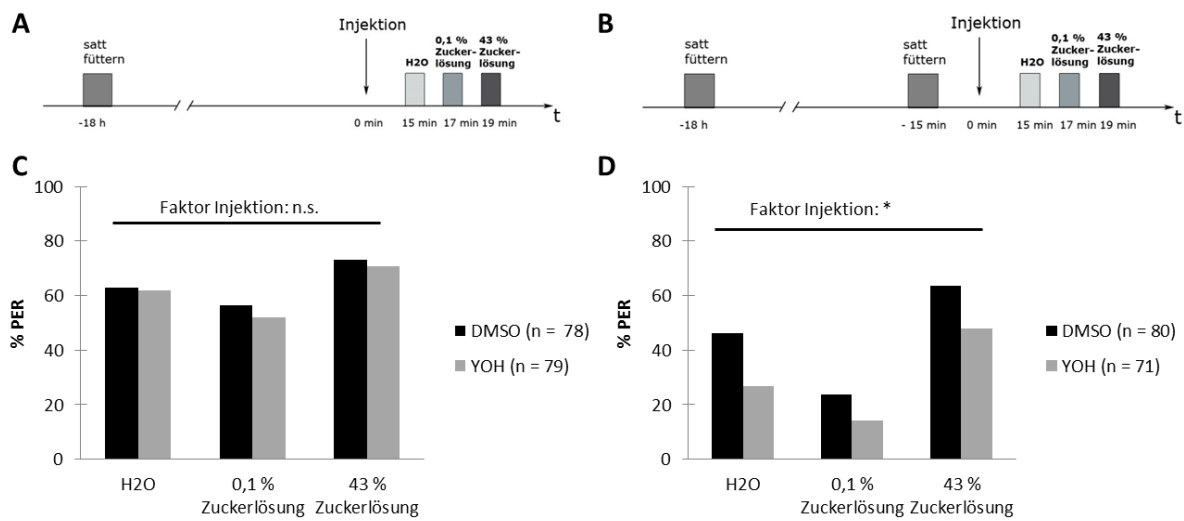


**Abbildung 10: Der Dopaminantagonist Fluphenazin hat keinen Effekt auf den PER.** (A) Schematischer Überblick des Experiments mit hungrigen Tieren. (B) Schematischer Überblick des Experiments mit satten Tieren. (C) In hungrigen Tieren ist kein signifikanter Unterschied zwischen Tieren, die mit Fluphenazin (grau) oder PBS (schwarz) injiziert wurden vorhanden. (D) In satten Bienen sind keine signifikanten Unterschiede zwischen Tieren, die mit Fluphenazin oder PBS injiziert wurden, vorhanden. Anzahl der Tiere in Klammern.

Daraus kann geschlossen werden, dass Dopamin keinen Einfluss auf den PER der Tiere hat.

Da Tyramin die Vorstufe von Oktopamin ist, wurde die Wirkung des Tyraminrezeptorantagonisten Yohimbin im Zuckertest untersucht. Yohimbin hat keinen Einfluss auf die PER-Rate in hungrigen Bienen (Abb. 11C; rm ANOVA, Faktor Injektion:  $F_{1; 155} = 0,1451$ ;  $p = 0,7038$ ), verringert aber die PER-Rate bei satten Tieren (Abb. 11D; rm ANOVA, Faktor Injektion:  $F_{1; 149} = 6,7216$ ;  $p = 0,0105$ ).

Im Gegensatz zu Oktopamin, welches einen Einfluss auf den PER in hungrigen Tieren hat, beeinflusst Tyramin den PER in satten Tieren. Oktopamin und Tyramin haben die gleiche verringere Wirkung auf den PER aber in Abhängigkeit des Futterzustandes. Möglicherweise ist die Modulation durch Tyramin der Grundzustand (satt). Wenn die Zeit der letzten Fütterung zunimmt, könnte Tyramin, als Vorstufe von Oktopamin, in dieses umgesetzt werden und dann moduliert Oktopamin im hungrigen Zustand den PER.



**Abbildung 11: Der Tyraminrezeptorantagonist Yohimbin verringert den PER bei sattten Tieren.** (A) Schematischer Überblick des Experiments mit hungrigen Tieren. (B) Schematischer Überblick des Experiments mit sattten Tieren. (C) In hungrigen Bienen ist kein signifikanter Unterschied zwischen den Tieren, die mit 10 mM Yohimbin (grau) oder 10 % DMSO (schwarz) injiziert wurden, vorhanden. (D) In sattten Tieren sind signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen vorhanden. Sterne stehen für  $p < 0,05$ . Anzahl der Tiere in Klammern.

Es kann daraus geschlossen werden, dass Oktopamin und Tyramin den PER in Abhängigkeit des Futterzustandes modulieren. Dopamin hat keinen Effekt auf den PER, weder in hungrigen, noch in sattten Tieren.

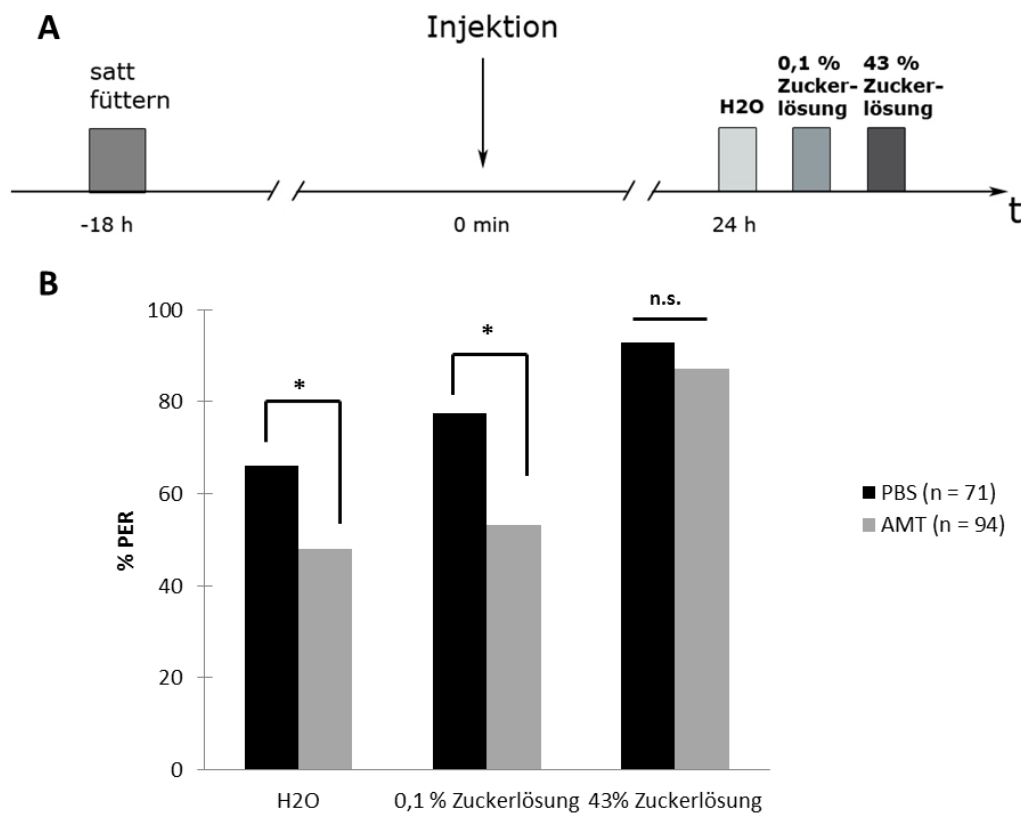
### 5.3 OKTOPAMIN IST NOTWENDIG UND HINREICHEND FÜR DIE MODULATION DER RÜSSELANTWORT IN HUNGRIGEN BIENEN

Um zu überprüfen, ob Oktopamin für die Modulation des PERs in hungrigen Bienen hinreichend ist, wurden Experimente mit der Droge  $\alpha$ -Methyl-p-Tyrosin (AMT) durchgeführt. AMT ist ein Oktopamin- und Dopaminsyntheseninhibitor (Stevenson et al. 2000). Folglich soll die Behandlung mit AMT zu einer Deprivierung von Dopamin, Tyramin und Oktopamin führen. Im Gegensatz zu der Benutzung von Rezeptorantagonisten, die den Rezeptor zum Teil irreversible blocken, kann durch die Nutzung von AMT der Gehalt der biogenen Amine reduziert werden und durch ein Einbringen der Amine der Gehalt wieder hergestellt werden.

AMT wurde genutzt, um die Oktopamin- und Dopaminsynthese zu stoppen, um so die Wirkung von extern zugeführtem Oktopamin und Dopamin auf den PER zu untersuchen. Zunächst wurde der Effekt von 30,5 mM AMT auf die PER-Rate überprüft, um zu gewährleisten, dass die Injektion dieser Substanz, wie Epinastin, eine Verringerung der PER-Rate mit sich bringt. Die Bienen wurden in zwei Gruppen aufgeteilt. Einer Hälfte wurde AMT, der anderen PBS injiziert. Vierundzwanzig Stunden nach der Injektion wurde der Zuckertest mit Wasser, 0,1 % und 43 % Zucker durchgeführt.

In der Gruppe die mit AMT injiziert wurden, ist 24 Stunden nach der Injektion eine signifikante Reduktion der PER-Rate zu finden (Abb. 12; rm ANOVA, Faktor Injektion x Zuckerlösung:  $F_{2; 326} = 3,0971$ ;  $p = 0,0465$ ; Fisher LSD Post hoc Test).





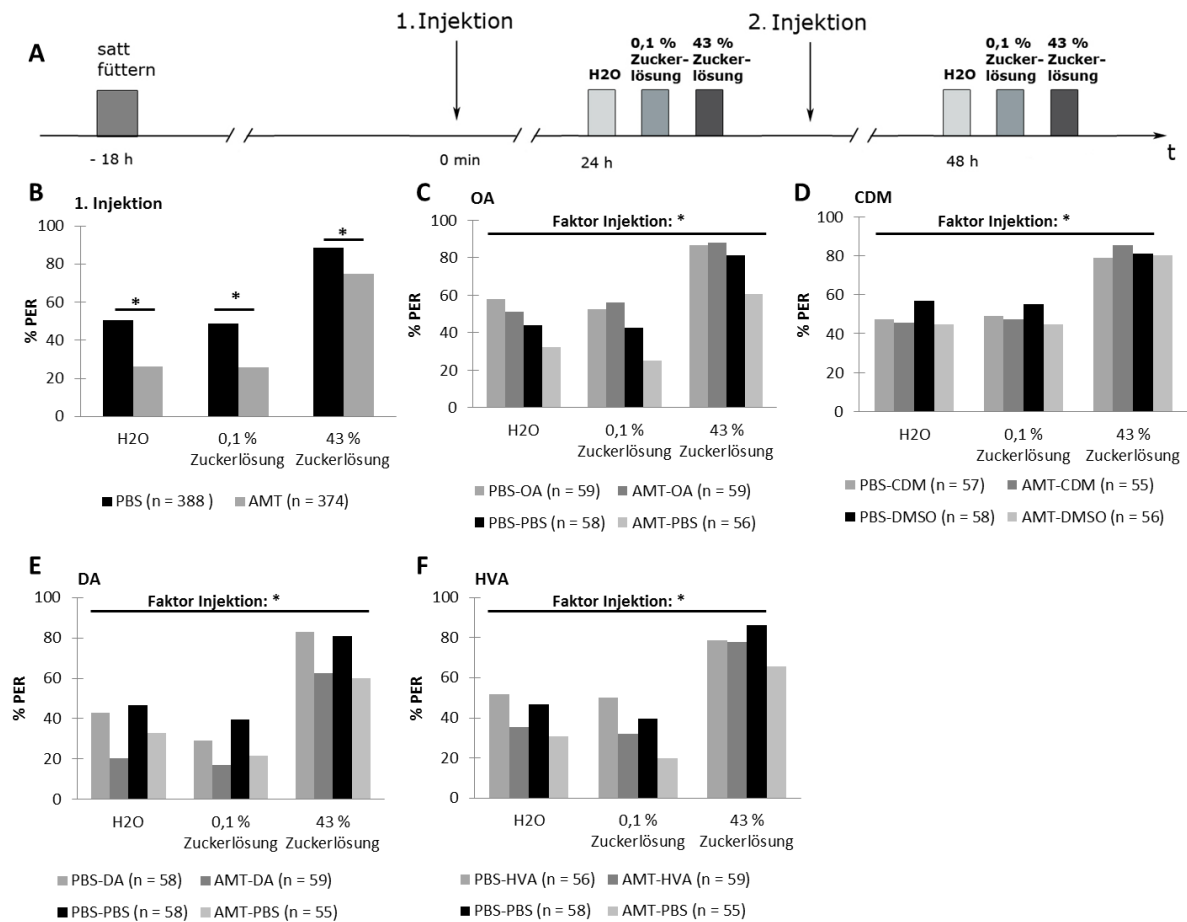
**Abbildung 12: Die systemische Injektion von  $\alpha$ -Methyl-p-Tyrosin (AMT) verringert den PER in hungrigen Bienen.** Den Bienen wurde 1  $\mu$ l AMT (grau) oder PBS (schwarz) in den Flugmuskel injiziert. Die Zuckerabfrage fand 24 Stunden nach der Injektion statt. Signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen sind vorhanden. Sterne stehen für  $p < 0,05$ . Anzahl der Tiere in Klammern.

Es kann daraus geschlossen werden, dass AMT zu einer Verringerung des PER führt, die auf einen Mangel an Oktopamin, Dopamin oder Tyramin zurückzuführen ist. Da in dem Kapitel zuvor gezeigt wurden, dass Oktopamin bei hungrigen Tieren für die Modulation des PERs notwendig ist, wurde nun ein zweites Experiment durchgeführt, in dem Oktopamin oder Dopamin dem Tier zugeführt wurde und es wurde untersucht, welchen Effekt diese Injektion auf den PER hat. Unter der Annahme, dass Oktopamin hinreichend für den PER in hungrigen Tieren ist, sollte ein Einbringen von Oktopamin nach AMT Behandlung die normale PER-Rate, d.h. von der Kontrollgruppe nicht signifikant unterschiedliche PER-Rate, wiederherstellen können. Dies sollte mit Dopamin nicht möglich sein.

AMT reduziert den PER 24 Stunden nach der Injektion (Abb. 13B; rm ANOVA, Faktor Injektion x Zuckerlösung:  $F_{2; 1520} = 6,368$ ;  $p = 0,0012$ . Fisher LSD Post hoc Test). Anschließend wurden die Tiere der AMT- und PBS-Gruppe in acht Untergruppen aufgeteilt. Ein Teil wurde mit Oktopamin bzw. PBS injiziert (Abb. 13C), ein Teil mit dem

Oktopaminrezeptoragonisten Chlordimeform (CDM) bzw. DMSO (Abb. 13D), ein Teil mit Dopamin bzw. PBS (Abb. 13E) und ein Teil mit dem Dopaminagonisten Homovanillylalkohol (HVA) bzw. PBS (Abb. 13F). Für jede Substanz entstehen so vier Untergruppen: eine Untergruppe erhielt zwei Kontrollinjektionen, eine Untergruppe erhielt als erste Injektion PBS, als zweite Injektion die zu untersuchende Substanz. Die dritte Untergruppe erhielt als erste Injektion AMT und als zweite Injektion die Kontrolllösung. Die vierte Untergruppe erhielt als erst Injektion AMT und als zweite Injektion die zu untersuchende Substanz. In dieser Gruppe sollte sich, je nach Beteiligung der Substanz am PER, eine Rettung des PER auf Kontrolllevel einstellen. Der Zuckertest mit Wasser, 0,1 % und 43 % Zucker wurde 24 Stunden nach der Injektion durchgeführt.

Der AMT-Effekt ist 48 Stunden nach der ersten Injektion noch immer vorhanden (Abb. 13C; rm ANOVA, Faktor Injektion x Zuckerlösung:  $F_{2; 1520} = 6,368$ ;  $p = 0,0012$ . Fisher LSD Post hoc Test:  $p = 0,0212$ ). Eine Oktopamininjektion nach AMT-Injektion (AMT-OA) stellt den PER der Kontrollgruppe (PBS-PBS) wieder her: Es gibt keine signifikanten Unterschiede zwischen der AMT-OA und der PBS-PBS Gruppe ( $p = 0,0212$ ). Der Unterschied zwischen der AMT-OA Gruppe und der AMT-PBS Gruppe ist ebenfalls signifikant ( $p = 0,0005$ ). Der Unterschied zwischen der AMT-OA Gruppe und der PBS-OA Gruppe ist nicht signifikant ( $p = 0,9304$ ). Letzteres Ergebnis reproduziert das Ausbleiben einer Erhöhung des PER bei Oktopamingabe.



**Abbildung 13: Oktopamin, aber nicht Dopamin, führt zu einer Rettung des AMT-Effekts.** (A) Schematischer Überblick des Experiments. (B) Ein Tag nach der ersten Injektion von 30,5 mM AMT (grau) oder PBS (schwarz) ist ein signifikanter Unterschied zwischen den Tieren vorhanden. Gezeigt sind die Tiere, vor der zweiten Injektion der Experimente C, D, E und F. (C) Die Injektion von Oktopamin führt zu einer Rettung des AMT-Effekts. (D) Die Injektion des Oktopaminrezeptoragonisten Chlordimeform führt nicht zu einer Rettung des AMT-Effekts. (E) 24 Stunden nach der systemischen Injektion von Dopamin ist keine Rettung des AMT-Effekts zu beobachten. (F) Die systemische Injektion des Dopaminagonisten Homovanillylalkohol führt zu keiner Rettung des AMT-Effekts. Sterne stehen für  $p < 0,05$ . Anzahl der Tiere in Klammern.

Der AMT-Effekt ist 48 Stunden nach der Injektion noch immer vorhanden (Abb. 13D; rm ANOVA, Faktor Injektion:  $F_{3; 222} = 4.456$ ;  $p = 0,0046$ . Fisher LSD Post hoc Test:  $p = 0,0212$ ). Eine Injektion des Oktopaminrezeptoragonisten CDM nach AMT-Injektion (AMT-CDM) stellt den PER der Kontrollgruppe (PBS-DMSO) nicht wieder her: Es gibt einen signifikanten Unterschied zwischen der AMT-CDM und der PBS-DMSO Gruppe (Abb. 13D; rm ANOVA, Faktor Injektion:  $F_{3; 222} = 4.456$ ;  $p = 0,0046$ . Fisher LSD Post hoc Test:  $p = 0,0074$ ). Der Unterschied zwischen AMT-CDM und AMT-DMSO ist nicht signifikant ( $p = 0,5189$ ). Es kommt nicht zu einer Rettung des PERs durch die Injektion von CDM.

Der AMT-Effekt ist 48 Stunden nach der ersten Injektion noch immer vorhanden (Abb. 13E; rm ANOVA, Faktor Injektion  $F_{3; 226} = 4,924$ ;  $p = 0,0025$ . Fisher LSD Post hoc Test:  $p = 0,0117$ ). Eine Dopamininjektion nach AMT Injektion (AMT-DA) stellt den PER der Kontrollgruppe (PBS-PBS) nicht wieder her: Es gibt einen signifikanten Unterschied zwischen der AMT-DA und der PBS-PBS Gruppe ( $p = 0,0010$ ) und keinen signifikanten Unterschied zwischen der AMT-DA und der AMT-PBS Gruppe ( $p = 0,9156$ ). Es kommt daher zu keiner Rettung des AMT-Effekts durch die Injektion von Dopamin.

Der AMT Effekt ist 48 Stunden nach der ersten Injektion noch immer vorhanden (Abb. 13F; rm ANOVA, Faktor Injektion:  $F_{3; 224} = 6,2181$ ;  $p = 0,0004$ . Fisher LSD Post hoc Test:  $p = 0,0004$ ). Eine Homovanillylalkoholinjektion nach AMT-Injektion (AMT-HVA) stellt den PER der Kontrollgruppe (PBS-PBS) nicht wieder her: Es gibt einen signifikanten Unterschied zwischen der AMT-HVA und der PBS-PBS Gruppe ( $p = 0,0029$ ) und keinen signifikanten Unterschied zwischen AMT-HVA und AMT-PBS ( $p = 0,4989$ ). Es kommt daher nicht zu einer Rettung des AMT-Effekts durch die Injektion von Homovanillylalkohol.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass weder Dopamin, noch der Dopaminrezeptoragonist HVA oder der Oktopaminrezeptoragonist CDM die Rüsselantwort in Bienen beeinflusst. In hungrigen Bienen mit einer blockierten Oktopamin- und Dopaminsynthese, also Bienen, die weder Oktopamin, noch Dopamin besitzen, konnte nur von außen zugeführtes Oktopamin zu einer „Rettung“ des PERs führen.

## 5.4 OKTOPAMIN BEEINFLUSST DAS ÜBERLEBEN

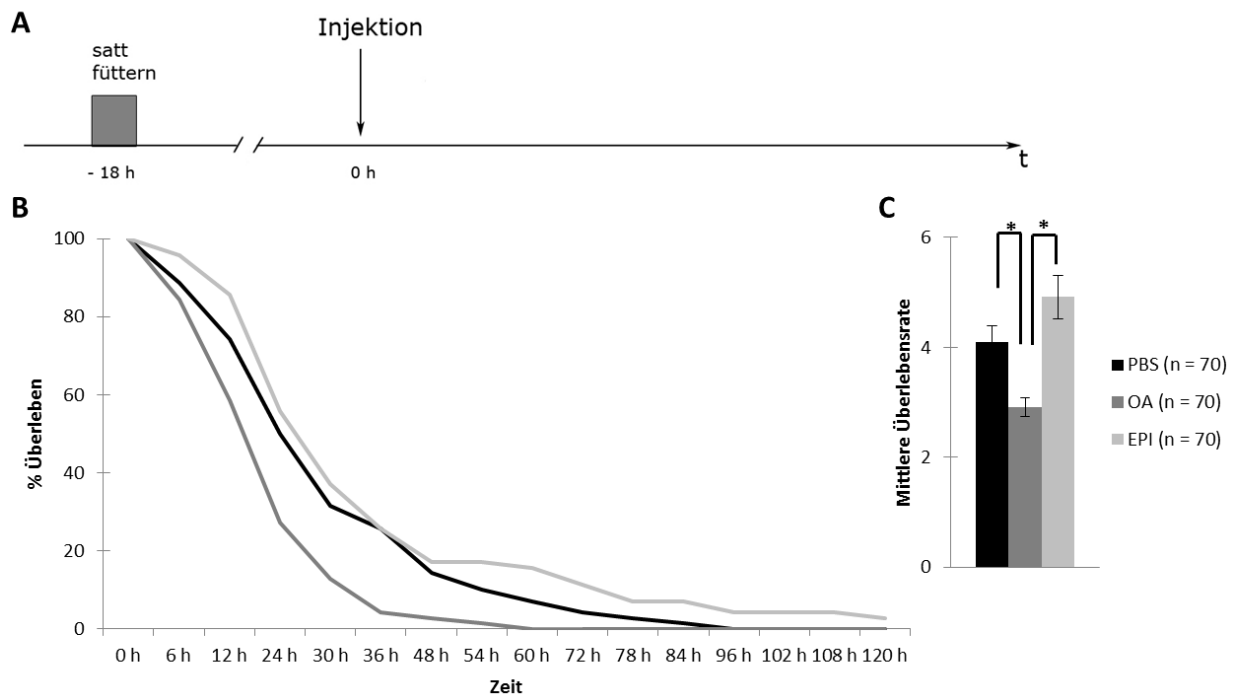
Die Hemmung der Oktopaminwirkung durch Injektion des Oktopaminrezeptorantagonisten Epinastin verringert die Rüsselantwort hungriger Bienen, ebenso wie das Sattfüttern die Rüsselantwort von Bienen verringert. Oktopamin spielt als Stresshormon eine wichtige neurohormonale Rolle. Die Ausschüttung von Oktopamin bereitet den Organismus auf Situationen vor, in denen der Körper Energie benötigt (*Fight or Flight*) (Roeder 2005; Evans 1980). Ein Oktopamin-vermittelter Anstieg des Metabolismus bzw. ein, durch die Hemmung der Oktopaminwirkung, vermittelter Abfall des Metabolismus, könnte die verringerte Rüsselantwort hungriger Bienen bei Epinastininjektion erklären. Der Einfluss von Oktopamin auf den Stoffwechsel wurde deshalb im Folgenden untersucht.

Honigbienen wurden mit Oktopamin, dem Oktopaminrezeptorantagonisten Epinastin oder dem Oktopaminrezeptoragonisten Chlordimeform behandelt und ihre Überlebensrate ohne erneute Nahrungszufuhr beobachtet. Unter der Annahme, dass Oktopamin, wie oben beschrieben, den Stoffwechsel erhöht, um Energie bereitzustellen, sollten Tiere die mit Oktopamin oder dem Oktopaminrezeptoragonisten behandelt wurden, ohne erneute Nahrungszufuhr früher sterben, da sie, aufgrund eines erhöhten Energieumsatzes, die vorhandene Energie früher verbrauchen. Tiere, die mit dem Oktopaminrezeptorantagonisten behandelt wurden, sollten, ohne erneute Nahrungszufuhr, später sterben, da sie, aufgrund eines niedrigeren Energieumsatzes, über einen längeren Zeitraum Energie zur Verfügung haben.

Im folgenden Experiment wurden Bienen 18 Stunden lang nicht gefüttert. Am Experimentiertag wurden die Tiere mit 10 mM Oktopamin, 40 mM Epinastin oder PBS und in einem zweiten Experiment mit 1 mM Oktopamin und 10 % DMSO injiziert und sechs, zwölf, 24, 30, 36, 48, 54, 60, 72, 78, 84, 96, 102, 108 und 120 Stunden nach der Injektion auf ihr Überleben überprüft. Das Überleben wurde prozentual aufgetragen. Anschließend wurde die mittlere Überlebensrate gebildet. Dafür wurde für jede Biene die Summe der Zeitpunkte, an der sie gelebt hat gebildet und dann der Mittelwert der Gruppen graphisch aufgetragen.

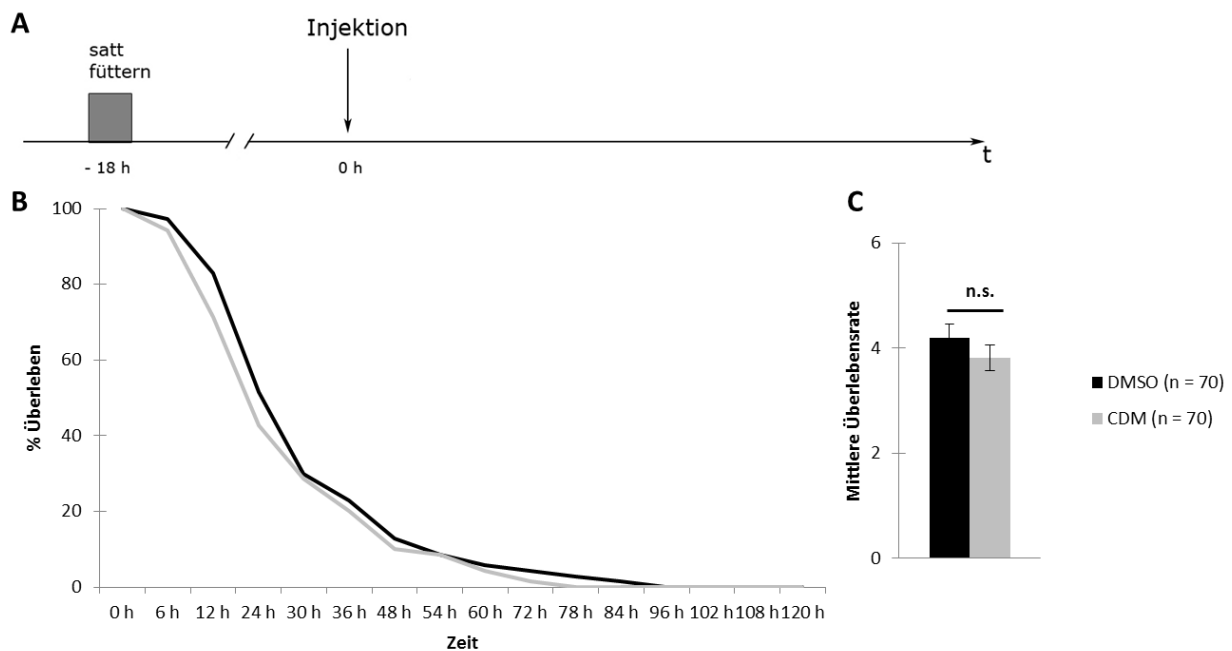
Das Überleben von Epinastin- und Oktopamin-injizierten Tieren unterscheidet sich signifikant (Abb. 14B; rm ANOVA, Faktor Injektion:  $F_{22; 394} = 1,7447$ ;  $p = 0,0206$ ; Fisher LSD Post hoc Test:  $p = 0,0276$ ). Die mittlere Überlebensrate von Oktopamin-injizierten

Tieren unterscheidet sich mit 2,91 signifikant von der von PBS- (Abb. 14C; einfaktorische ANOVA, Faktor Injektion:  $F_{2; 207} = 10,8305$ ;  $p < 0,001$ ; Fisher LSD Post hoc Test:  $p = 0,0066$ ) und der von Epinastin-injizierten Tieren ( $p < 0,001$ ).



**Abbildung 14: Oktopamin-injizierte Bienen sterben früher als Epinastin-injizierte Bienen** (A) Schematische Darstellung des Versuchsaufbaus. (B) Überlebenskurve der Bienen, die mit 1  $\mu$ l 10 mM Oktopamin (grau), 40 mM Epinastin (hellgrau) oder PBS (schwarz) injiziert wurden. Angegeben sind die Prozent der Tiere, die zu den verschiedenen Kontrollzeitpunkten noch gelebt haben. (C) Oktopamin-injizierte Tiere haben eine signifikant niedrigere Überlebensrate als die Tiere, die mit PBS oder Epinastin injiziert wurden. Sterne stehen für  $p < 0,05$ . Anzahl der Tiere in Klammern.

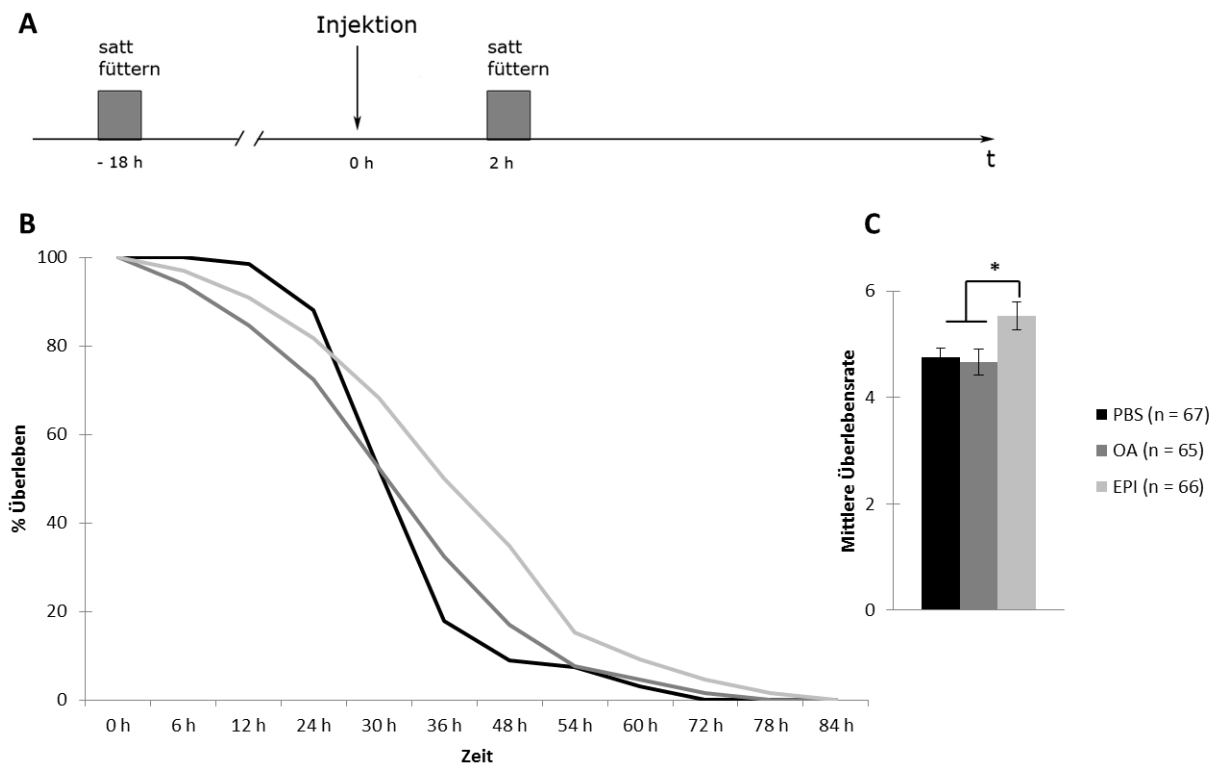
Anschließend wurde das Überleben von Tieren untersucht, die mit dem Oktopaminrezeptoragonisten Chlordimeform injiziert wurden. Das Überleben von Chlordimeform- und DMSO-injizierten Bienen unterscheidet sich nicht signifikant (Abb. 15B; rm ANOVA, Faktor Injektion:  $F_{11; 128} = 0,5914$ ;  $p = 0,8331$ ). Ebenso wenig sind signifikante Unterschiede in der mittleren Überlebensrate zwischen den Tieren vorhanden (Abb. 15C; einfaktorische ANOVA:  $F_{1; 138} = 1,1267$ ;  $p = 0,2903$ ).



**Abbildung 15: Die Injektion von Chlordimeform hat keinen Einfluss auf das Überleben der Bienen.** (A) Schematische Darstellung des Versuchsaufbaus. (B) Überlebenskurve der Bienen, die mit 1 µl 1 mM Chlordimeform (grau) oder 10 % DMSO in PBS (schwarz) injiziert wurden. Zwischen den Gruppen sind keine signifikanten Unterschiede vorhanden. Angegeben sind die Prozent der Tiere, die zu den verschiedenen Kontrollzeitpunkten noch gelebt haben. (C) Die mittleren Überlebensraten von CDM- und DMSO-injizierten Tieren sind nicht signifikant unterschiedlich. Anzahl der Tiere in Klammern.

In einer zweiten Reihe an Experimenten wurden die Tiere zwei Stunden nach der Injektion noch einmal mit 30 %iger Zuckerlösung sattgefüttert.

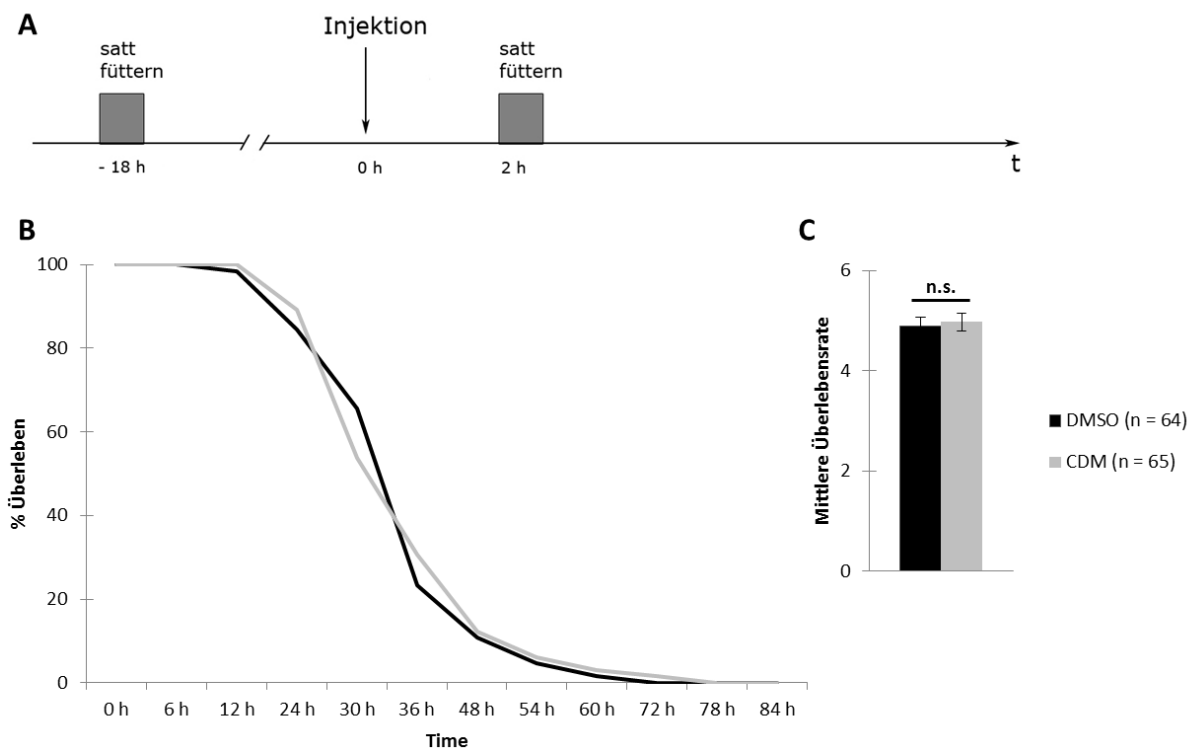
Das Überleben von Oktopamin- und PBS-injizierten Tieren unterscheidet sich signifikant (Abb. 16B; rm ANOVA, Faktor Injektion:  $F_{20; 364} = 2,0627$ ;  $p = 0,0050$ ; Fisher LSD Post hoc Test:  $p = 0,0403$ ). Die mittlere Überlebensrate von Epinastin-injizierten Tieren unterscheidet sich mit 5,53 signifikant von den PBS- (Abb. 16C; einfaktorielle ANOVA, Faktor Injektion:  $F_{2; 195} = 4,118$ ;  $p = 0,0177$ ; Fisher LSD Post hoc Test:  $p = 0,0207$ ) und Oktopamin-injizierten Tieren ( $p = 0,0096$ ). Zwischen den Tieren, die mit Oktopamin- oder PBS-injiziert wurden, sind keine signifikanten Unterschiede zu finden ( $p = 0,7637$ ).



**Abbildung 16: Oktopamin-injizierte Tiere sterben, wenn sie zwei Stunden nach der Injektion satt gefüttert werden, nicht mehr vor den Kontrolltieren.** (A) Schematische Darstellung des Experiments. (B) Überlebenskurve der Bienen, die mit 1  $\mu$ l 10 mM Oktopamin (grau), 40 mM Epinastin (hellgrau) oder PBS (schwarz) injiziert wurden. Signifikante Unterschiede zwischen den Tieren, die mit PBS und Oktopamin injiziert wurden sind vorhanden. Angegeben sind die Prozent der Tiere, die zu den verschiedenen Kontrollzeitpunkten noch gelebt haben. (C) Epinastin injizierte Tiere haben eine signifikant höhere Überlebensrate als die Tiere, die mit PBS und Oktopamin injiziert wurden. Sterne stehen für  $p < 0,05$ . Anzahl der Tiere in Klammern.

Das Überleben von Chlordimeform- und DMSO-injizierten Bienen unterscheidet sich nicht signifikant (Abb. 17B; rm ANOVA, Faktor Injektion:  $F_{8; 119} = 1,182$ ;  $p = 0,3158$ ). Ebenso wenig sind signifikante Unterschiede in der mittleren Überlebensrate zwischen den Tieren der beiden Gruppen vorhanden (Abb. 17C; einfaktorielle ANOVA:  $F_{1; 127} = 0,100$ ;  $p = 0,7519$ ).





**Abbildung 17: Der Oktopaminrezeptoragonist Chlordimeform hat keinen Einfluss auf das Überleben.** (A) Schematische Darstellung des Experiments. (B) Überlebenskurve der Bienen, die mit 1  $\mu$ l 1 mM Chlordimeform (grau) oder DMSO (schwarz) injiziert wurden. Zwischen den Gruppen sind keine signifikanten Unterschiede vorhanden. Angegeben sind die Prozent der Tiere, die zu den verschiedenen Kontrollzeitpunkten noch gelebt haben (C) Zwischen den Überlebensraten der beiden Gruppen sind keine signifikanten Unterschiede vorhanden. Anzahl der Tiere in Klammern.

Aus den oben beschriebenen Experimenten lässt sich schließen, dass Oktopamin das Überleben von Bienen beeinflusst: Bienen, die mit einem Oktopaminrezeptorantagonisten behandelt wurden, überlebten länger. Dieses Ergebnis unterstützt die Hypothese, dass Tiere mit weniger Oktopamin einen niedrigeren Energieumsatz haben, dadurch über einen längeren Zeitraum Energie zur Verfügung haben und länger überleben.

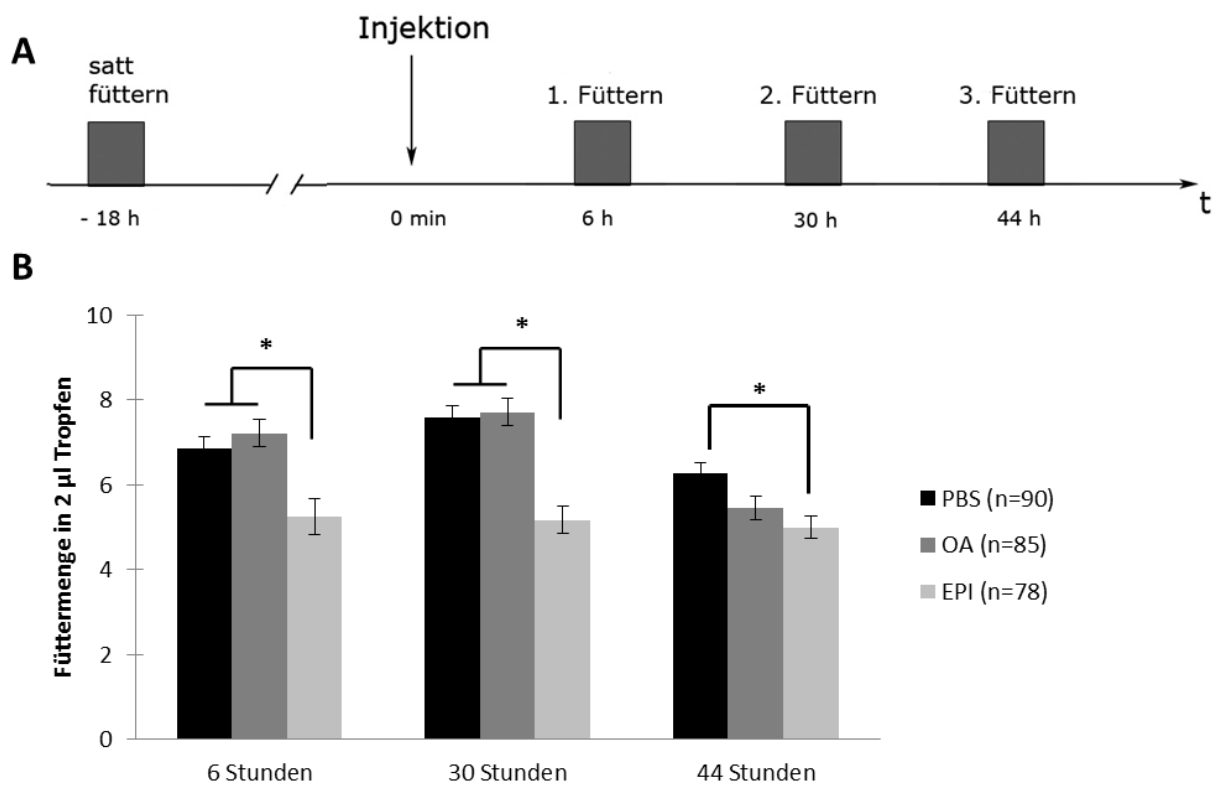
## 5.5 OKTOPAMIN BEEINFLUSST DIE AUFGENOMMENE NAHRUNGSMENGE

Bienen die, durch die Injektion des Oktopaminrezeptorantagonisten Epinastin, länger leben, scheinen einen verlangsamten Stoffwechsel zu haben. Dadurch sollten sie weniger Nahrung benötigen, da nicht so viel Energie verbraucht wird. Um zu überprüfen, ob Oktopamin einen Einfluss auf die aufgenommene Nahrungsmenge hat wurde Bienen 10 mM Oktopamin, 40 mM Epinastin oder PBS injiziert und diese, über einen Zeitraum von 72 Stunden, drei mal satt gefüttert und die Menge der Tropfen notiert.

Sechs Stunden nach der Injektion nehmen die PBS-injizierten Kontrolltiere im Mittel 6,84 Tropfen 30 %iger Zuckerlösung zu sich, Oktopamin-injizierte Tiere nehmen im Mittel 7,21 Tropfen und Epinastin-injizierte Tiere im Mittel 5,88 Tropfen zu sich. Die mittlere Tropfenzahl der Epinastin-injizierten Tiere unterscheidet sich signifikant von der, der Oktopamin-injizierten (Abb. 18B; rm ANOVA, Faktor Zeitpunkt x Injektion:  $F_{4; 500} = 3,869$ ;  $p = 0,0042$ ; Fisher LSD Post hoc Test:  $p < 0,001$ ) und der der PBS-injizierten Tiere ( $p < 0,001$ ). Die mittlere Tropfenzahl der Oktopamin-injizierten Tiere unterscheidet sich nicht signifikant von der der PBS-injizierten Tiere ( $p = 0,3838$ ).

Dreißig Stunden nach der Injektion nehmen die PBS-injizierten Tiere 7,59 Tropfen, die Oktopamin-injizierten Tiere 7,71 und die Epinastin-injizierten Tiere 5,24 Tropfen zu sich. Die mittlere Tropfenzahl der Epinastin-injizierten Tiere unterscheidet sich signifikant von der der Oktopamin-injizierten ( $p < 0,001$ ) und der PBS-injizierten Tiere ( $p = 0,0118$ ). Die mittlere Tropfenzahl der Oktopamin-injizierten Tiere unterscheidet sich nicht signifikant von der der PBS-injizierten Tiere ( $p = 0,7814$ ).

Vierundvierzig Stunden nach der Injektion nehmen die PBS-injizierten Tiere 6,26 Tropfen, die Oktopamin-injizierten Tiere 5,45 und die Epinastin-injizierten Tiere 4,99 Tropfen zu sich. Die mittlere Tropfenzahl der Epinastin-injizierten Tiere unterscheidet sich signifikant von der der PBS-injizierten Tiere ( $p = 0,0034$ ), aber nicht von der, der Oktopamin-injizierten Tiere ( $p = 0,2929$ ). Die mittlere Tropfenzahl der Oktopamin-injizierten Tiere unterscheidet sich nicht signifikant von der, der PBS-injizierten Tiere ( $p = 0,0555$ ).



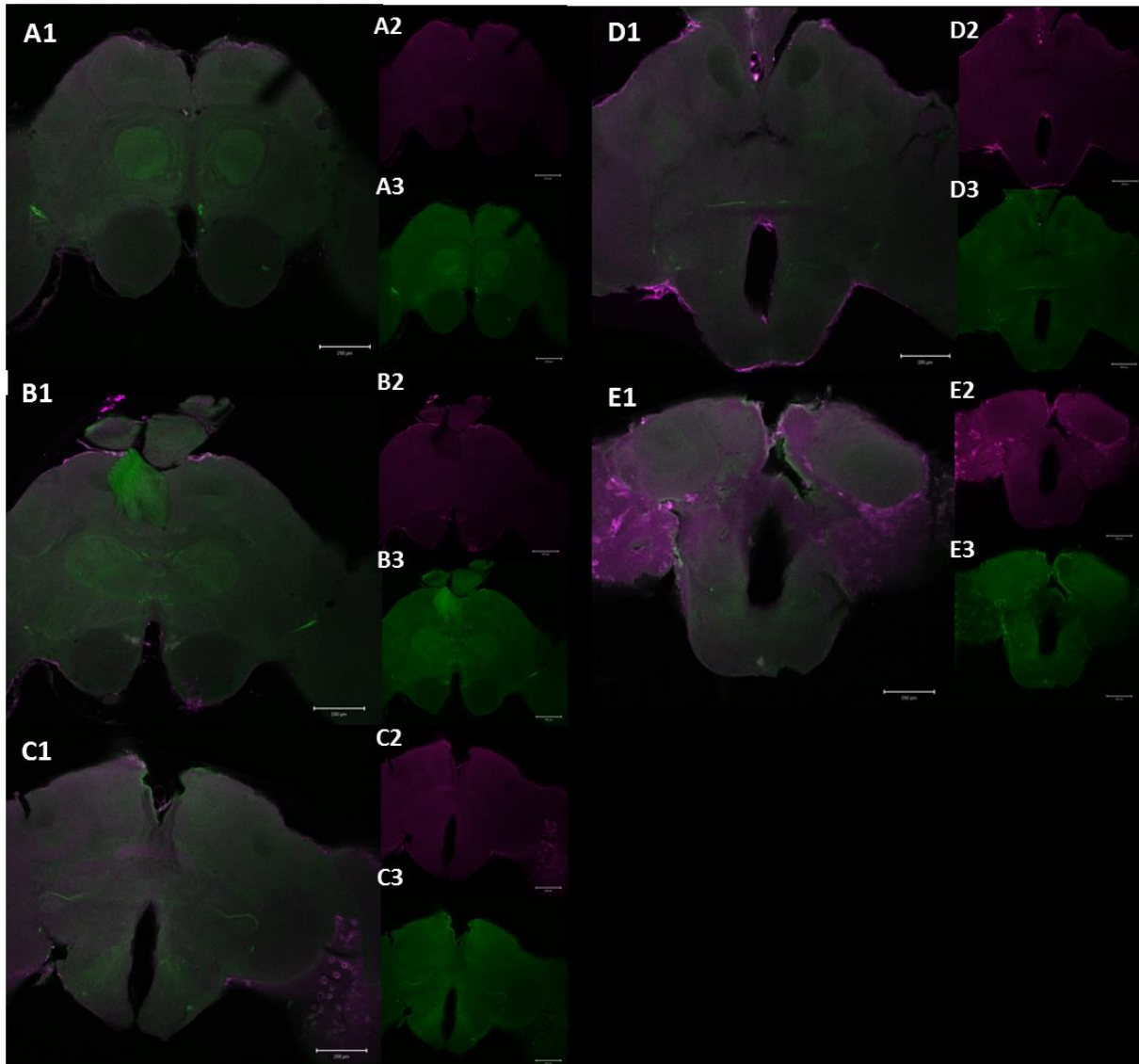
**Abbildung 18: Tiere, die mit Epinastin injiziert wurden, nehmen weniger Zuckerlösung zu sich.** (A) Schematische Darstellung des Experiments. (B) Sechs und 24 Stunden nach der Injektion nehmen Bienen, die mit Epinastin (hellgrau) injiziert wurden, signifikant weniger Zuckerlösung als die Kontroll- (schwarz) und die Oktopamin-injizierten (grau) Tiere, zu sich. Nach 44 Stunden sind signifikante Unterschiede zwischen den Epinastin- und den Kontrolltieren vorhanden. Sterne stehen für  $p < 0,05$ . Anzahl der Tiere in Klammern.

Zusammenfassend zeigt sich, dass Bienen, die mit dem Oktopaminrezeptorantagonisten Epinastin behandelt wurden, weniger Nahrung zu sich nehmen. Aufgrund eines möglichen niedrigeren Energieumsatzes sind die Bienen vermutlich weniger „hungrig“ als die Kontrolltiere. Oktopamin hat einen Einfluss auf den Metabolismus von Honigbienen.

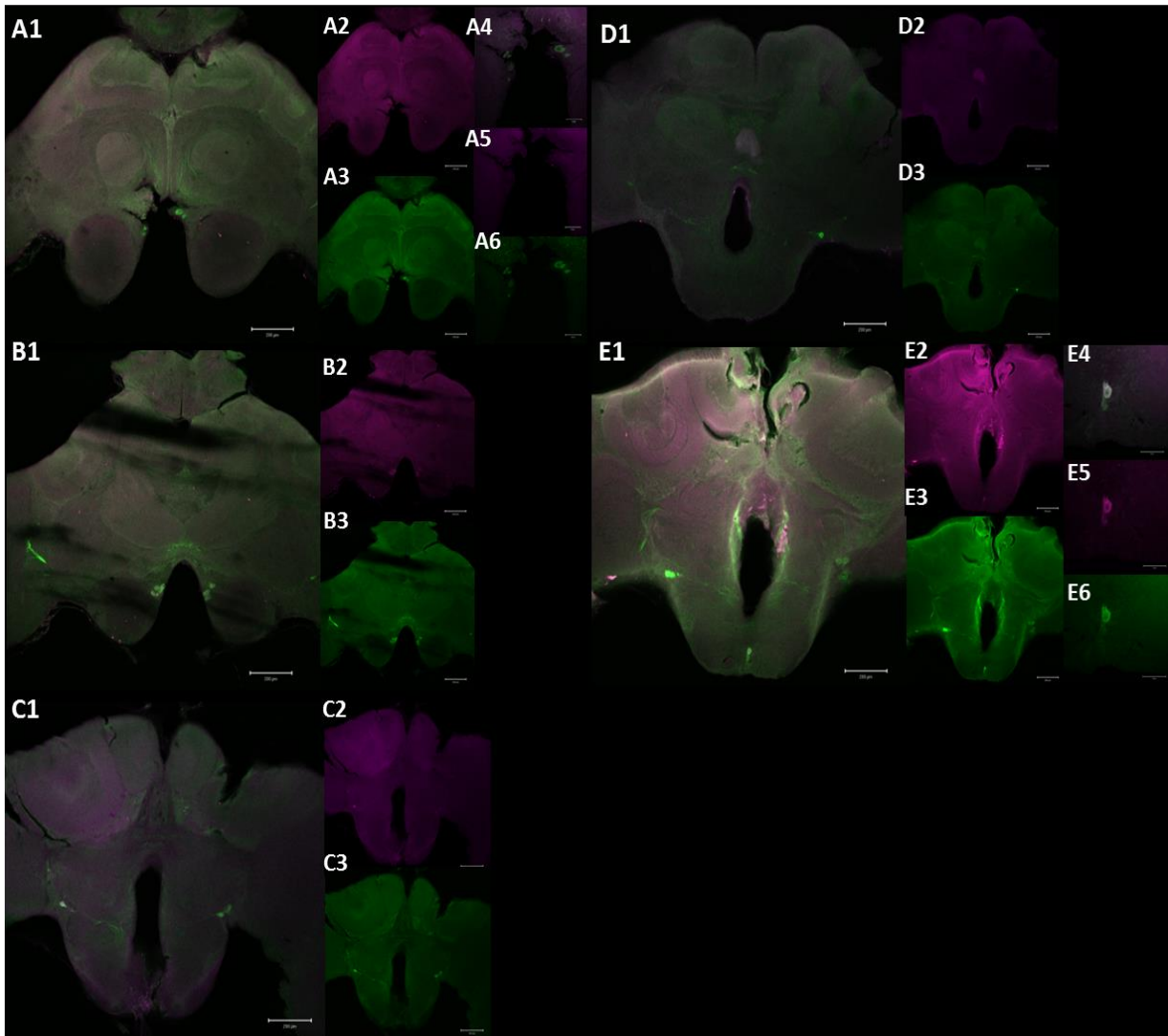
## 5.6 DER FUTTERZUSTAND HAT EINEN EINFLUSS AUF DEN OKTOPAMIN- UND TYRAMINGEHALT IM GEHIRN

Bienen die, durch die Injektion des Oktopaminrezeptorantagonisten Epinastin, länger leben und weniger Nahrung zu sich nehmen scheinen einen verlangsamten Stoffwechsel zu haben. Zusätzlich scheint Oktopamin einen Einfluss auf den Stoffwechsel zu besitzen. Um zu Überprüfen, ob der Futterzustand einen Einfluss auf die Menge an Oktopamin und Tyramin im Bienenhirn hat, wurden immunohistologische Untersuchungen von hungrigen und satten Bienen durchgeführt. Dafür wurden Bienen in drei Gruppen geteilt. Ein Drittel der Bienen wurde mit einer Pinzette an den Beinen gezogen und im Röhrchen eingeklemmt (Abb. 19; mechanisch gereizt), die zweite Gruppe nicht gefüttert (Abb. 20; hungrig) und die dritte Gruppe satt gefüttert (Abb. 21; satt). Dreißig Minuten nach der Behandlung der Tiere, wurden die Gehirne präpariert und nach dem Protokoll in Kapitel 3.6 beschrieben, gefärbt.

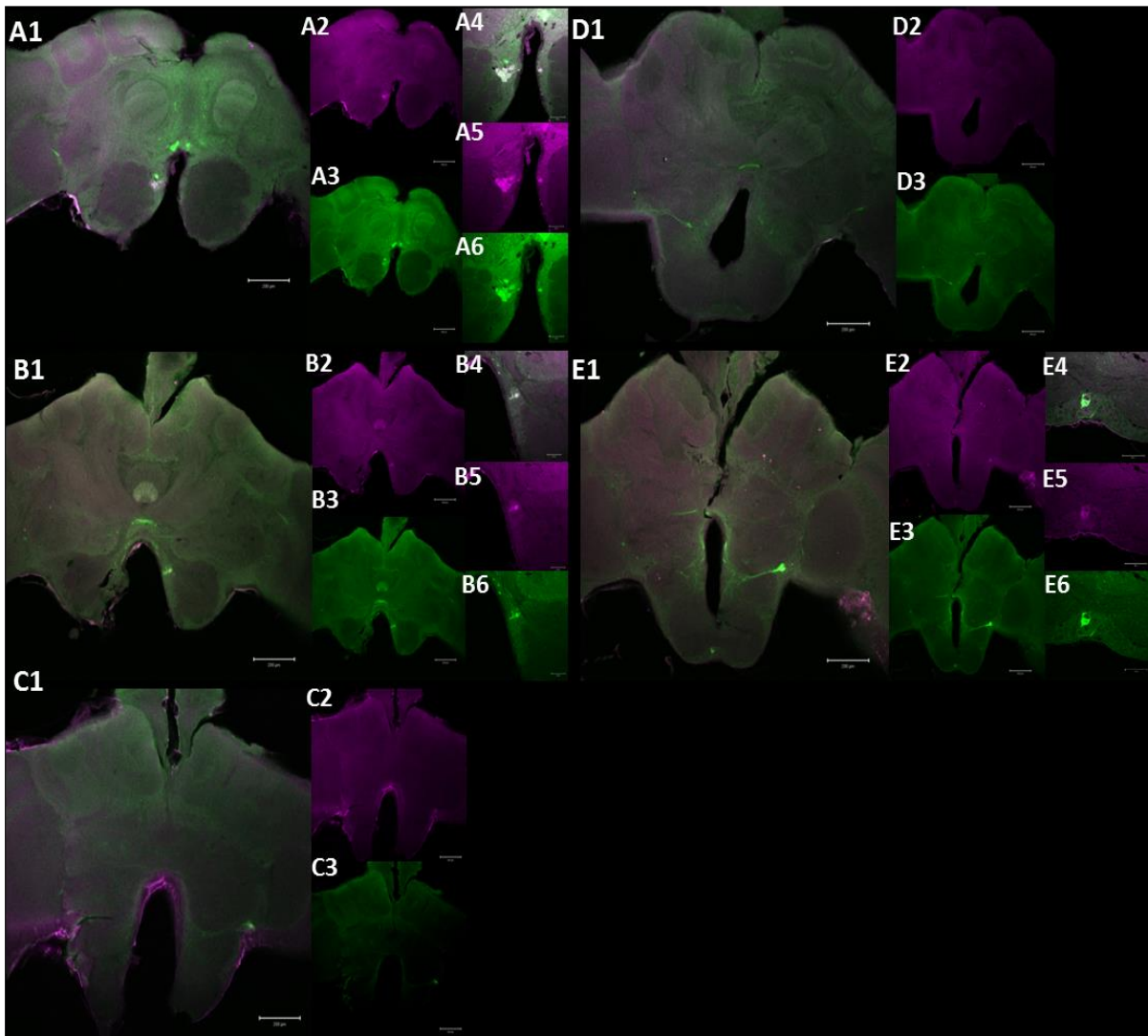
Insgesamt konnten acht *cluster* gefunden werden. Die Bezeichnung der *cluster* wurde von Sinakevitch et al. Übernommen (2005). Die *cluster* G 2a und b sind bei allen Gruppen tyraminerg aber nur das *cluster* G 2a ist auch bei satten Tieren oktopaminerg. Das *cluster* G 3a ist bei mechanisch gereizten Tieren nur tyraminerg und nicht oktopaminerg. Bei hungrigen und satten Tiere konnten bei diesem *cluster* sowohl Oktopamin, wie auch Tyraminsignale gefunden werden. Bei allen Tieren konnten die *cluster* G 3b und VUM gefunden werden. Diese *cluster* waren sowohl durch Tyramin, als auch durch Oktopamin gefärbt. Das *cluster* 5b ist in geärgerten Tieren nur tyraminerg. Bei den anderen beiden Gruppen sind sie sowohl oktopaminerge, als auch tyraminerge *cluster* vorhanden. Bei dem *cluster* 6a sind in keiner Gruppe oktopaminerge Signale zu finden. Der *cluster* LV ist bei satten und mechanisch gereizten Bienen nicht zu finden. In hungrigen Bienen ist dieses *cluster* tyraminerg. In Tabelle 3 sind die identifizierten *cluster* und ihre Signale angegeben.



**Abbildung 19: Mechanisch gereizte Bienen.** Dargestellt sind 70  $\mu\text{m}$  Schnitte von Gehirnen von Bienen, die vor der Präparation mechanisch gereizt wurden und mit einem Oktopamin- und einem Tyraminantikörper gefärbt wurden. Die Schnitte A - E sind in etwa dieselben Ebenen, wie die in Abbildung 2. Anti-Tyramin ist Grün dargestellt und Anti-Oktopamin Magenta. Die Vergrößerung der Schnitte ist 10-fach. In den Abbildungen A - E 1 sind die Überlagerungen von Oktopamin und Tyramin und in A - E 2 Oktopamin und A - E 3 Tyramin dargestellt.



**Abbildung 20: Hungerige Bienen.** Dargestellt sind 70 µm Schnitte von Gehirnen von Bienen, die 18 Stunden keine Nahrung erhalten haben und die mit einem Octopamin- und einem Tyraminantikörper gefärbt wurden. Die Schnitte der Abbildung A-E sind in etwa dieselben Ebenen, wie die in Abbildung 2. Anti-Tyramin ist Grün dargestellt und Anti-Octopamin Magenta. Die Vergrößerungen der Schnitte der Abbildungen A - E 1 bis 3 sind 10-fach, die A - E 4 bis 6 sind 40-fache Vergrößerungen. In 1 und 4 sind die Überlagerungen von Octopamin und Tyramin und in 2 und 3 und 5 und 6 entweder Tyramin oder Tyramin dargestellt.



**Abbildung 21: Sattge Bienen.** Dargestellt sind 70 µm Schnitte von Gehirnen von Bienen, die vor der Präparation satt gefüttert wurden und mit einem Oktopamin- und einem Tyraminantikörper gefärbt wurden. Die Schnitte der Abbildungen A - E sind in etwa dieselben Ebenen, wie die in Abbildung 2. Anti-Tyramin ist Grün dargestellt und Anti-Oktopamin Magenta. Die Vergrößerungen der Schnitte A - E 1 bis 3 sind 10-fache, die Schnitte A 4 bis 6 sind 40-fache und die Schnitte B 4 bis 6 und E 4 bis 6 sind 63-fache Vergrößerungen. In 1 und 4 sind die Überlagerungen von Oktopamin und Tyramin und in 2 und 3 und 5 und 6 entweder Oktopamin oder Tyramin dargestellt.

Tabelle 3: Identifizierte Oktopamin- und Tyramincluster und ihre Färbungen in Abhängigkeit der Behandlung der Tiere

<i>cluster</i>	Mechanisch gereizt	Hungrig	Satt
G 2a	TA	TA	TA
	Kein OA	Kein OA	OA
G 2b	TA	TA	TA
	Kein OA	Kein OA	Kein OA
G 3a	TA	TA	TA
	Kein OA	OA	OA
G 3b	TA	TA	TA
	OA	OA	OA
G 5b	TA	TA	TA
	Kein OA	OA	OA
G 6a	TA	TA	TA
	Kein OA	Kein OA	Kein OA
VUM	TA	TA	TA
	OA	OA	OA
LV	Kein TA	TA	Kein TA
	Kein OA	Kein OA	Kein OA

Aus der Tabelle wird deutlich, dass in mechanisch gereizten Tieren in zwei von acht *clustern* (25 %) Oktopaminsignale und in sieben von acht *clustern* (87,5 %) ein Tyraminsignal zu finden sind. In hungrigen Tieren sind in vier von acht *clustern* (50 %) und in satten Tieren in fünf von acht *clustern* (62,5 %) Oktopaminsignale zu finden. In hungrigen Tieren sind alle gefundenen *cluster* (100 %) tyraminerg und in satten Tieren sind in sieben von acht *clustern* (87,5 %) Tyraminsignale zu finden.

In einem weiteren Experiment wurden Bienenhirne auf die absolute Menge von Oktopamin und Tyramin untersucht. Dafür wurden Tiere 30 Minuten vor der Präparation satt gefüttert

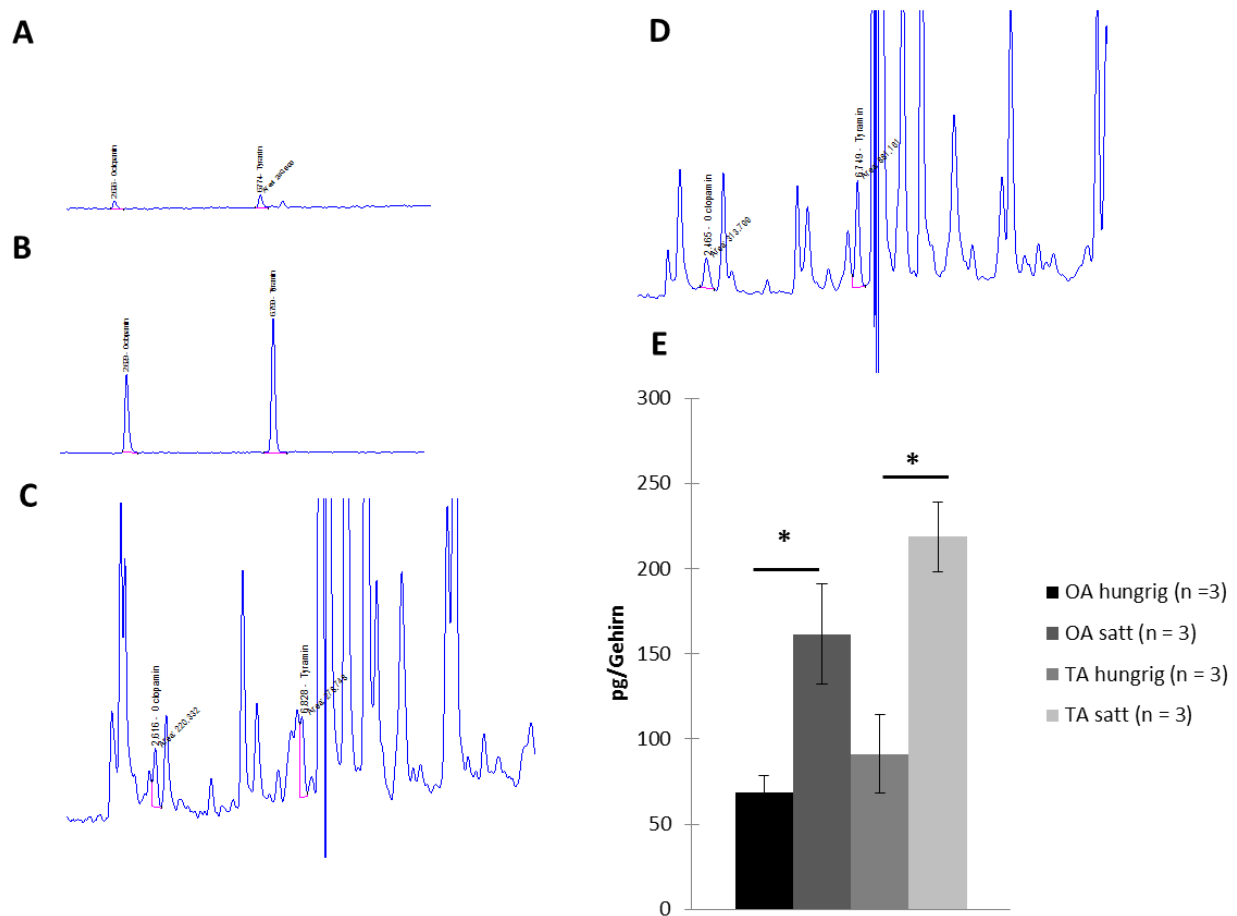


(satt) oder nicht gefüttert (hungrig). Anschließend wurden die Gehirne präpariert und jeweils zehn in ein Gefäß gegeben und wie in Kapitel 3.6 beschrieben, behandelt.

Dann wurde eine HPLC (*high performance liquid chromatography*) durchgeführt. Eine HPLC ist eine Methode zur Analyse fester und flüssiger Substanzgemische. Die HPLCs wurden in Kooperation mit Frau Prof. Irene Nehls, Dr. Roland Becker und Dipl. Ing. Christian Jung von der Bundesanstalt für Materialforschung, Fachbereich 1.2 Organische Spurenanalytik durchgeführt.

Zunächst wurden Kalibrierungschromatogramme mit 0,025 µM bzw. 0,5 µM Oktopamin und Tyramin erstellt (Abb. 22A und B). Anschließend wurden die Proben in die Säule der Anlage gegeben und die Messung der Inhaltsstoffe konnte durchgeführt werden. Die Chromatogramme der Proben der hungrigen Tiere sind in Abbildung 22C und die der satten Tiere in Abbildung 22D dargestellt.

Der Gehalt an Oktopamin und Tyramin pro Gehirn ist in Abbildung 22E dargestellt. Der Mittelwert der drei Doppelbestimmungen beträgt für Oktopamin bei den hungrigen Bienen 68,62 pg/Gehirn und für Tyramin 91,24 pg/Gehirn. Bei den satten Tieren beträgt der Oktopamingehalt 161,53 pg/Gehirn und für Tyramin 218,65 pg/Gehirn. Der Oktopamingehalt ist bei den hungrigen Tieren signifikant niedriger als bei den satten Tieren (Mann-Whitney U Test:  $U = -1,964$ ;  $p = 0,0495$ ). Ebenso ist dies der Fall für Tyramin (Mann-Whitney U Test:  $U = -1,964$ ;  $p = 0,0495$ ).



**Abbildung 22: Oktopamin- und Tyramingehalt im Bienengehirn.** (A) Kalibrierung der HPLC mit 0,025  $\mu$ M Oktopamin und Tyramin. Der erste Peak ist Oktopamin, der zweite Tyramin. (B) Kalibrierung der HPLC mit 0,5  $\mu$ M Oktopamin und Tyramin. Der erste Peak ist Oktopamin, der zweite Tyramin. (C) Chromatogramm der Proben der hungrigen Tiere. Der erste rote Peak ist Oktopamin und der zweite Tyramin. (D) Chromatogramm der Proben mit satten Tieren. Der erste rote Peak ist Oktopamin und der zweite Tyramin. (E) Der Oktopamin- und Tyramingehalt in satten Tieren ist höher als in hungrigen. Angegeben ist der Mittelwert von drei Proben mit dem Standardfehler. Sterne stehen für  $p < 0,05$ . Anzahl der Proben in Klammern.

Entgegen der Hypothese, dass hungrige Tiere einen erhöhten Oktopamingehalt aufweisen, kann aus den immunohistologischen Experimenten und den HPLC Proben, geschlossen werden, dass der Oktopamin- und Tyramingehalt bei satten Tieren höher ist, als in hungrigen.

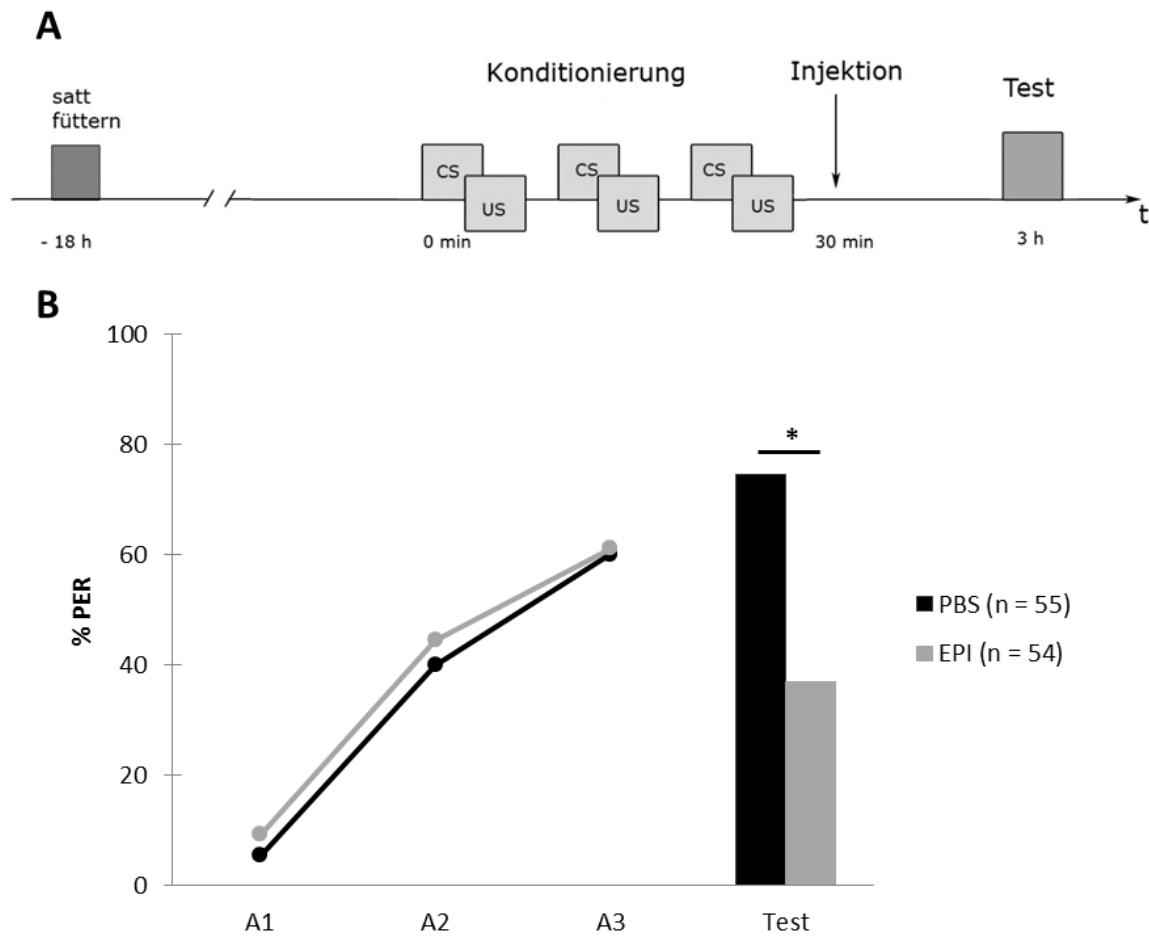
## 5.7 OKTOPAMIN UND TYRAMIN HABEN EINEN EINFLUSS AUF DAS DREI-STUNDEN GEDÄCHTNIS

Bisher wurde der Einfluss von Oktopamin und Tyramin auf den US und den Metabolismus im Detail untersucht. Nun sollte untersucht werden welchen Einfluss Oktopamin und Tyramin auf den CS haben. Es wurden daher klassische Lernexperimente durchgeführt.

Der Einfluss von Oktopamin und Tyramin auf den Gedächtnisabruf in der Honigbiene soll untersucht werden. Bienen wurden mit drei CS-US-Paarungen konditioniert und danach zufällig in zwei Gruppen aufgeteilt, von denen eine Gruppe 30 Minuten nach Beginn der Konditionierung mit PBS, die andere mit Epinastin injiziert wurden. Ein zweites Experiment wurde entsprechend durchgeführt, nur das in diesem Experiment Yohimbin oder 10 % DMSO in PBS injiziert wurde. Drei Stunden nach der Konditionierung wurde das Gedächtnis abgefragt.

Während der Konditionierung sind zwischen den Tieren, die anschließend mit Epinastin oder PBS injiziert wurden, keine signifikanten Unterschiede vorhanden (Abb. 23B; rm ANOVA, Faktor Injektion:  $F_{1; 107} = 0,2464$ ;  $p = 0,6206$ ). Die PER-Rate während der Abfrage ist zwischen den beiden Gruppen signifikant unterschiedlich (einfaktorielle ANOVA:  $F_{1; 107} = 17,8114$ ;  $p < 0,001$ ).

Daraus schließe ich, dass Oktopamin die Abfrage des 3-Stunden Gedächtnisses beeinflusst.



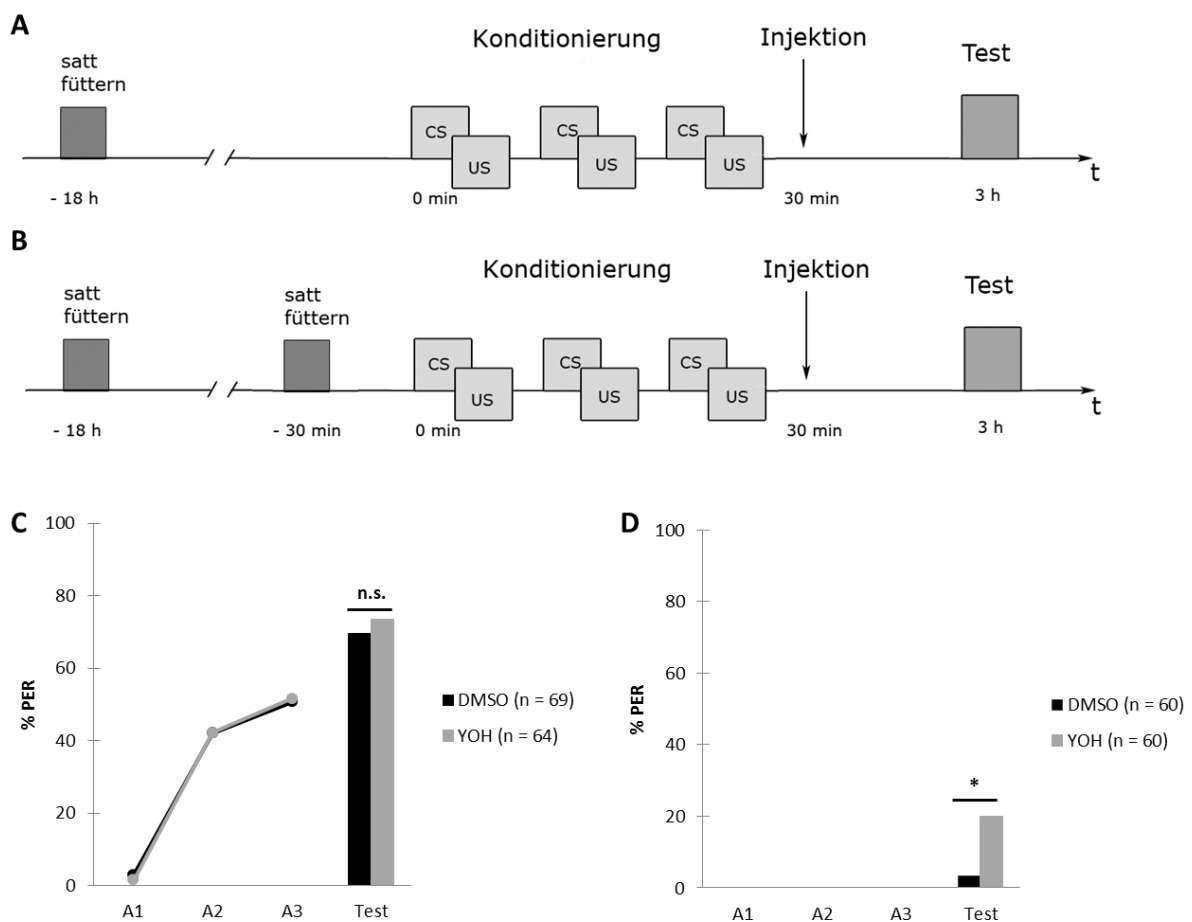
**Abbildung 23: Oktopamin beeinflusst das 3-Stunden Gedächtnis.** (A) Schematische Darstellung des Experiments. (B) Während der Konditionierung der Tiere sind keine Unterschiede zwischen den Epinastin-injizierten (grau) und den PBS-Tieren (schwarz) vorhanden. Das 3-Stunden Gedächtnis wird durch Epinastin beeinflusst. Sterne stehen für  $p < 0,05$ . Anzahl der Tiere in Klammern.

In einem zweiten Experiment wurde der Einfluss von Tyramin auf den Gedächtnisabruf, drei Stunden nach der Konditionierung, untersucht. Bienen wurden nach einer 18-stündigen Phase ohne Nahrungsaufnahme in zwei Gruppen aufgeteilt. Eine Gruppe der Tiere wurde mit 30 %igem Zucker satt gefüttert und die andere Gruppe wurde nicht gefüttert. Diese werden im Weiteren als satte und hungrige Tiere bezeichnet. Die Bienen wurden mit drei CS-US-Paarungen konditioniert und 30 Minuten nach Beginn der Konditionierung mit dem Tyraminrezeptorantagonisten Yohimbin oder 10 % DMSO in PBS injiziert. Drei Stunden nach der Konditionierung wurde das Gedächtnis abgefragt.

In den hungrigen Tieren sind, während der Konditionierung, keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen vorhanden (Abb. 24C; rm ANOVA, Faktor Injektion:  $F_{1; 131} = 0,0004$ ;

$p = 0,9834$ ). Unterschiede zwischen den PER-Raten während des Gedächtnistests sind nicht signifikant (einfaktorielle ANOVA:  $F_{1; 131} = 0,2407$ ;  $p = 0,6245$ ).

Satte Tiere zeigen keine Lernkurve (Abb. 24D). Die Unterschiede zwischen den PER-Raten der behandelten Gruppen und der Kontrollgruppe während des Gedächtnistests sind signifikant (einfaktorielle ANOVA, Faktor Injektion:  $F_{1; 118} = 8,5260$ ;  $p = 0,0042$ ).



**Abbildung 24: Tyramin beeinflusst das 3-Stunden Gedächtnis in sattten Tieren.** (A) Schematische Darstellung des Experiments mit hungrigen Tieren. (B) Schematische Darstellung des Experiments mit sattten Tieren. (C) In hungrigen Tieren sind keine Unterschiede während der Konditionierung zu finden. In dem Gedächtnistest drei Stunden später sind keine Unterschiede vorhanden. (D) Satte Bienen zeigen Reaktion während der Konditionierung. In der Gedächtnisabfrage drei Stunden nach der Konditionierung zeigen die mit Yohimbin-injizierten Tiere (grau) eine signifikant höhere PER-Rate als die Kontrolltiere (schwarz). Sterne stehen für  $p < 0,05$ . Anzahl der Tiere in Klammern.

Die Hemmung der Oktopaminwirkung durch Injektion des Oktopaminrezeptorantagonisten Epinastin verringert die drei Stunden Gedächtnisabfrage in hungrigen Bienen. Ebenso wird auch die Rüsselantwort hungriger Bienen verringert (Seite 43, Abb. 8). Die Hemmung von

Oktopamin hat also auf das Gedächtnis für eine Duft-Zucker-Assoziation den gleichen Effekt wie auf die Zuckersensitivität. Analog hat die Hemmung von Tyramin durch die Injektion des Tyraminrezeptorantagonisten Yohimbin keinen Effekt auf das drei Stunden Gedächtnis in hungrigen Tieren. Überraschend ist jedoch, dass Yohimbin die drei Stunden Gedächtnisabfrage in satten Bienen erhöht. Denn Yohimbin verringert die Rüsselantwort satter Bienen. Tyramin scheint also auf das drei Stunden Gedächtnis eine andere Wirkung zu haben, als auf die Zuckersensitivität.

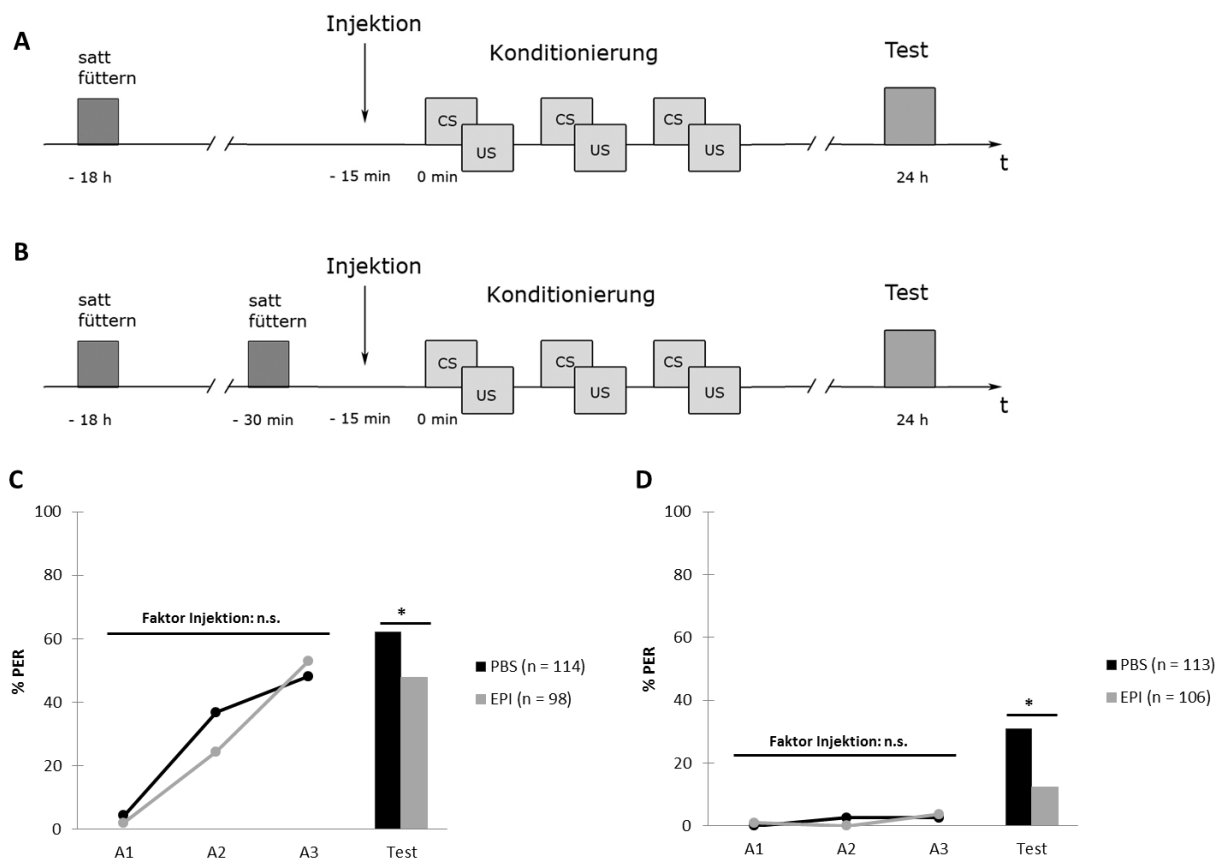
## 5.8 OKTOPAMIN UND TYRAMIN HABEN KEINEN EINFLUSS AUF DIE AKQUISITION

Oktopamin und Tyramin haben einen Einfluss auf den Gedächtnisabruf, wenn die Drogen nach der Akquisition injiziert wurden. Im folgendem sollte nun untersucht werden, welchen Einfluss Oktopamin und Tyramin auf die Akquisition und das 24 Stunden Gedächtnis haben. Dieses Experiment wurde sowohl mit hungrigen, als auch mit satten Tieren durchgeführt.

Die Bienen wurden in zwei Gruppen aufgeteilt und 30 Minuten vor der Konditionierung mit 30 %iger Zuckerlösung satt gefüttert oder nicht gefüttert. Beide Gruppen wurden wiederum in zwei Gruppen aufgeteilt und 15 Minuten vor der Konditionierung mit dem Oktopaminrezeptorantagonisten Epinastin oder PBS bzw. dem Tyraminrezeptorantagonisten Yohimbin oder DMSO injiziert. Anschließend wurden die Bienen mit drei CS-US-Paarungen konditioniert und 24 Stunden nach der Konditionierung das Gedächtnis der Tiere abgefragt.

Während der Konditionierung hungriger Bienen sind keine signifikanten Unterschiede zwischen Epinastin-injizierten Tieren und Kontrolltieren vorhanden (Abb. 25C; rm ANOVA Faktor Injektion:  $F_{1; 210} = 0,6187$ ;  $p = 0,4324$ ). Satte Bienen reagieren während der Akquisitionsphase nicht auf den CS. Zwischen den Gruppen gibt es keine signifikanten Unterschiede (Abb. 25D; rm ANOVA Faktor Injektion:  $F_{1; 217} = 0,0399$ ;  $p = 0,8418$ ). Oktopamin hat also weder in hungrigen, noch in satten Bienen einen Einfluss auf das Lernen.

Die PER-Raten während der Abfrage sind zwischen den beiden Gruppen signifikant unterschiedlich (einfaktorielle ANOVA: hungrige Bienen, Abb. 25C:  $F_{1; 210} = 4,4298$ ;  $p = 0,0365$ ; satte Bienen, Abb. 25D: einfaktorielle ANOVA:  $F_{1; 217} = 11,6813$ ;  $p < 0,001$ ).



**Abbildung 25: Oktopamin hat keinen Einfluss auf die Konditionierung, aber auf das 24 Stunden Gedächtnis.** (A) Schematische Darstellung des Experiments, durchgeführt mit hungrigen Bienen. (B) Schematische Darstellung des Experiments, durchgeführt mit satten Bienen. (C) Hungrige Tiere, die mit Epinastin (grau) oder PBS (schwarz) injiziert wurden, zeigen keinen Unterschied während der Konditionierung aber in der 24 Stunden Gedächtnisabfrage. (D) Satte Tiere, die mit Epinastin oder PBS injiziert wurden, zeigen keinen Unterschied in ihrer Reaktion auf den Duft während der Konditionierung aber in der Abfrage 24 Stunden später. Sterne stehen für  $p < 0,05$ . Anzahl der Tiere in Klammern.

Daraus schließe ich, dass Oktopamin keinen Einfluss auf die Konditionierung, aber auf einen Gedächtnistest nach 24 Stunden hat.

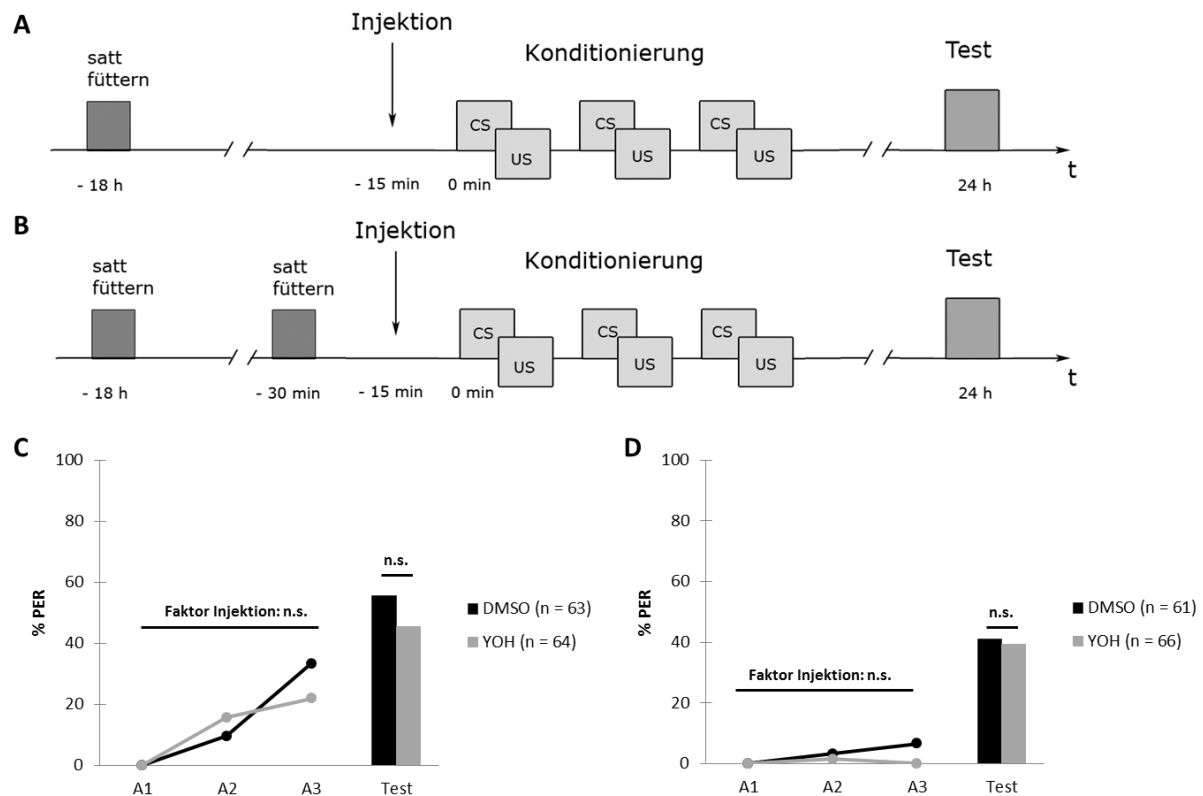
In dem zweiten Experiment wurde der Einfluss von Tyramin auf die Konditionierung und den Gedächtnisabruf nach 24 Stunden überprüft. In den hungrigen Bienen sind, während der Konditionierung, keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen vorhanden (Abb. 26C; rm ANOVA, Faktor Injektion:  $F_{1; 125} = 0,2093$ ;  $p = 0,6482$ ). Die Unterschiede zwischen den PER-Raten beider Gruppen während des Gedächtnistests sind nicht signifikant (einfaktorielle ANOVA:  $F_{1; 131} = 0,2407$ ;  $p = 0,6245$ ).

Nur sehr wenige satte Tiere reagieren während der Akquisitionsphase auf den CS. Zwischen den Yohimbin-injizierten Tiere und den Kontrolltieren sind, während der Konditionierung,



keine signifikanten Unterschiede vorhanden (Abb. 26D; rm ANOVA, Faktor Injektion:  $F_{1; 125} = 0,2093$ ;  $p = 0,6482$ ).

Die Unterschiede zwischen den PER-Raten während des Gedächtnisabrufs, 24 Stunden später, sind nicht signifikant (einfaktorielle ANOVA:  $F_{1; 125} = 1,3254$ ;  $p = 0,2518$ ).



**Abbildung 26: Tyramin hat keinen Einfluss auf die Konditionierung oder das 24 Stunden Gedächtnis.** (A) Schematische Darstellung des Experiments, durchgeführt mit hungrigen Bienen. (B) Schematische Darstellung des Experiments, durchgeführt mit satt gefütterten Tieren. (C) Weder während der Konditionierung, noch in dem Gedächtnisabruf, 24 Stunden nach der Akquisition, sind Unterschiede zwischen den hungrigen Yohimbin-injizierten Tieren (grau) und den DMSO-Tieren (schwarz) vorhanden. (D) In satt gefütterten Bienen sind keine Unterschiede während der Konditionierung oder in dem Gedächtnisabruf, 24 Stunden später, zwischen den Gruppen vorhanden. Anzahl der Tiere in Klammern.

Aus den oben beschriebenen Experimenten lässt sich schließen, dass Tyramin keinen Einfluss auf die Akquisition oder das 24 Stunden Gedächtnis hat.

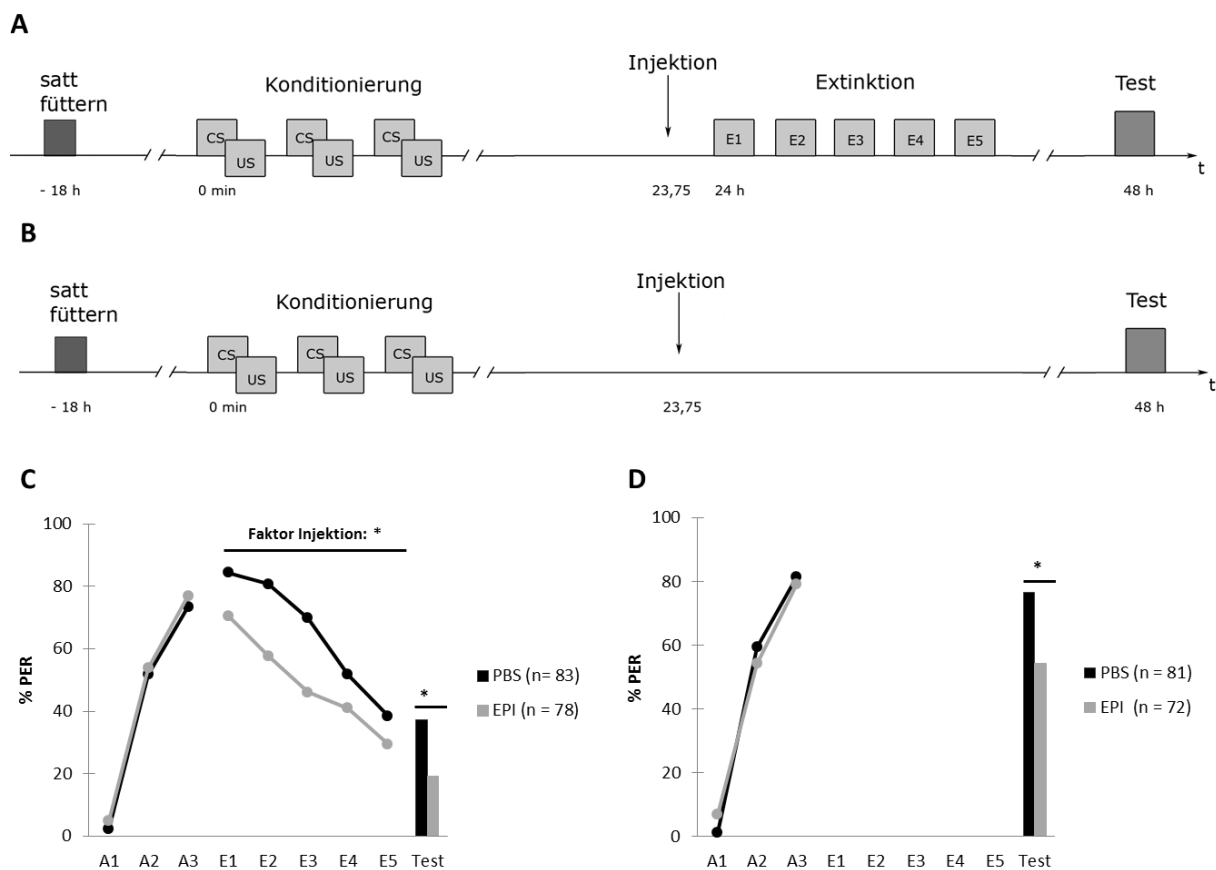
## 5.9 OKTOPAMIN, ABER NICHT TYRAMIN, HAT EINEN EINFLUSS AUF DIE EXTINKTION

Oktopamin und Tyramin haben keinen Einfluss auf die Konditionierung. Tyramin hat einen Einfluss auf das drei Stunden Gedächtnis aber nicht auf das 24 Stunden Gedächtnis. Oktopamin hat einen Einfluss sowohl auf den Gedächtnisabruf drei und 24 Stunden nach der Konditionierung. Extinktion ist eine weitere Form von Lernen, die in dieser Arbeit untersucht werden soll. Die Bildung eines Extinktionsgedächtnisses ist nicht das Vergessen des zuvor gelernten, sondern ein neues Gedächtnis. Die Tiere lernen, dass auf den zuvor belohnten und gelernten Stimulus nun keine Belohnung mehr folgt und damit kommt es zu einer Reduktion der konditionierten Reaktion. Im Folgenden wird der Einfluss von Oktopamin und Tyramin auf das Extinktionslernen untersucht.

Dafür wurden Bienen mit drei CS-US-Paarungen konditioniert und 24 Stunden nach der Konditionierung so in vier Gruppen aufgeteilt, dass die Bienen jeder Gruppe alle in etwa gleich reagiert haben. Die Hälfte der Bienen wurden nach einer 18 stündigen Hungerphase extingiert, d.h. der CS wurden den Tieren fünfmal, mit einem *inter trial interval* von zehn Minuten, präsentiert. Fünfzehn Minuten vor Beginn der Extinktion wurde den Tieren der Oktopaminrezeptorantagonist Epinastin oder PBS injiziert. Ein Gedächtnisabruf wurde 24 Stunden später durchgeführt. Dazu wurde allen Tieren der CS einmal präsentiert.

Während der Konditionierung der Bienen sind keine signifikanten Unterschiede in der PER-Rate zwischen den Epinastin- und PBS-injizierten Tiere in den anschließend extingierten (Abb. 27C; rm ANOVA, Faktor Injektion:  $F_{1; 159} = 0,3496$ ;  $p = 0,5552$ ) oder den Tieren, die nicht extingiert wurden (Abb. 27D; rm ANOVA, Faktor Injektion:  $F_{1; 151} = 0,0012$ ;  $p = 0,9727$ ), vorhanden. Die Extinktionslernkurve der Epinastin-injizierten Tiere ist signifikant unterschiedlich zu der der Kontrolltieren (rm ANOVA, Faktor Injektion:  $F_{1; 159} = 7,7892$ ;  $p = 0,0059$ ). Bei dem Gedächtnisabruf, 24 Stunden nach der Extinktion, sind in der Gruppe der extingierten (einfaktorielle ANOVA:  $F_{1; 159} = 6,6554$ ;  $p = 0,0108$ ) und in der Gruppe der nicht extingierten Tiere (einfaktorielle ANOVA:  $F_{1; 151} = 8,890$ ;  $p = 0,0033$ ) signifikante Unterschiede zwischen den Epinastin-injizierten Tieren und den PBS-Kontrolltieren vorhanden.

Daraus lässt sich schließen, dass Oktopamin sowohl einen Einfluss auf die Extinktion, als auch auf den Gedächtnisabruf nach 48 hat. Da ein Effekt von Oktopamin sowohl in der extinguierten, als auch in der nicht-extinguierten Gruppe zu beobachten ist, wirkt Oktopamin auf den Gedächtnisabruf, unabhängig von der Extinktion. Dieses Ergebnis deutet darauf hin, dass Oktopamin keine Rolle beim Lernen, sondern vielmehr beim Gedächtnisabruf spielt.



**Abbildung 27: In hungrigen Tieren beeinflusst Oktopamin die Antwort der Bienen bei der Extinktion und dem Gedächtnisabruf.** (A) Schematische Darstellung des Experiments mit hungrigen Bienen, die extinguiert wurden. (B) Schematische Darstellung des Experiments mit hungrigen Bienen, die nicht extinguiert wurden. (C) Während der Konditionierung hungriger Bienen, sind keine Unterschiede zwischen den Epinastin-injizierten (grau) und den PBS-injizierten Tiere (schwarz) vorhanden. Bei der Extinktion, 24 Stunden später sind signifikante Unterschiede zwischen den Epinastin-injizierten und den Kontrolltieren vorhanden. Während des Gedächtnisabrufs, 24 Stunden nach der Extinktion, sind signifikante Unterschiede zwischen den Epinastin-injizierten Tieren und den Kontrolltieren vorhanden. (D) Während der Konditionierung sind keine Unterschiede zwischen den Epinastin-injizierten und den Kontrolltieren vorhanden. Während des Gedächtnisabrufs, 48 Stunden nach der Konditionierung, sind signifikante Unterschiede zwischen den Epinastin-injizierten und den Kontrolltieren vorhanden. Sterne stehen für  $p < 0,05$ . Anzahl der Tiere in Klammern.

Oktopamin hat einen Einfluss auf den Gedächtnisabruf von hungrigen Tieren. Dieser Einfluss hat möglicherweise mit der Motivation der Tiere zu tun auf den CS zu reagieren, der mit der

Beeinflussung des Stoffwechsels durch Oktopamin zusammenhängt. Tyramin ist die Vorstufe von Oktopamin und bei der Zuckerabfrage beeinflusst Tyramin den PER in sattten Tieren. Es wäre also möglich, dass auch Tyramin einen Effekt auf die Extinktion in sattten Tieren hat. Um einen Einfluss von Tyramin auf die Extinktion zu untersuchen, müssen Versuche mit sattten Tieren durchgeführt werden, da bei der Zuckerabfrage Effekte bei sattten Tieren zu beobachten waren.

Damit diese Experimente mit den Oktopaminexperimenten verglichen werden könne, wurden ein zweites Experimente mit dem Oktopaminrezeptorantagonisten Epinastin durchgeführt. Zunächst wurden Bienen mit drei CS-US-Paarungen konditioniert und 24 Stunden nach der Konditionierung in acht Gruppen aufgeteilt. Vier Gruppen wurden 30 Minuten vor der Extinktion satt gefüttert und vier Gruppen nicht gefüttert. Fünfzehn Minuten später wurde der Oktopaminrezeptorantagonist Epinastin oder PBS injiziert. Die eine Hälfte der Bienen wurde mit 5 CS-Durchgängen extingiert, wohingegen die andere Hälfte der Bienen nicht extingiert wurde. Der Gedächtnisabruf wurde 24 Stunden später durchgeführt.

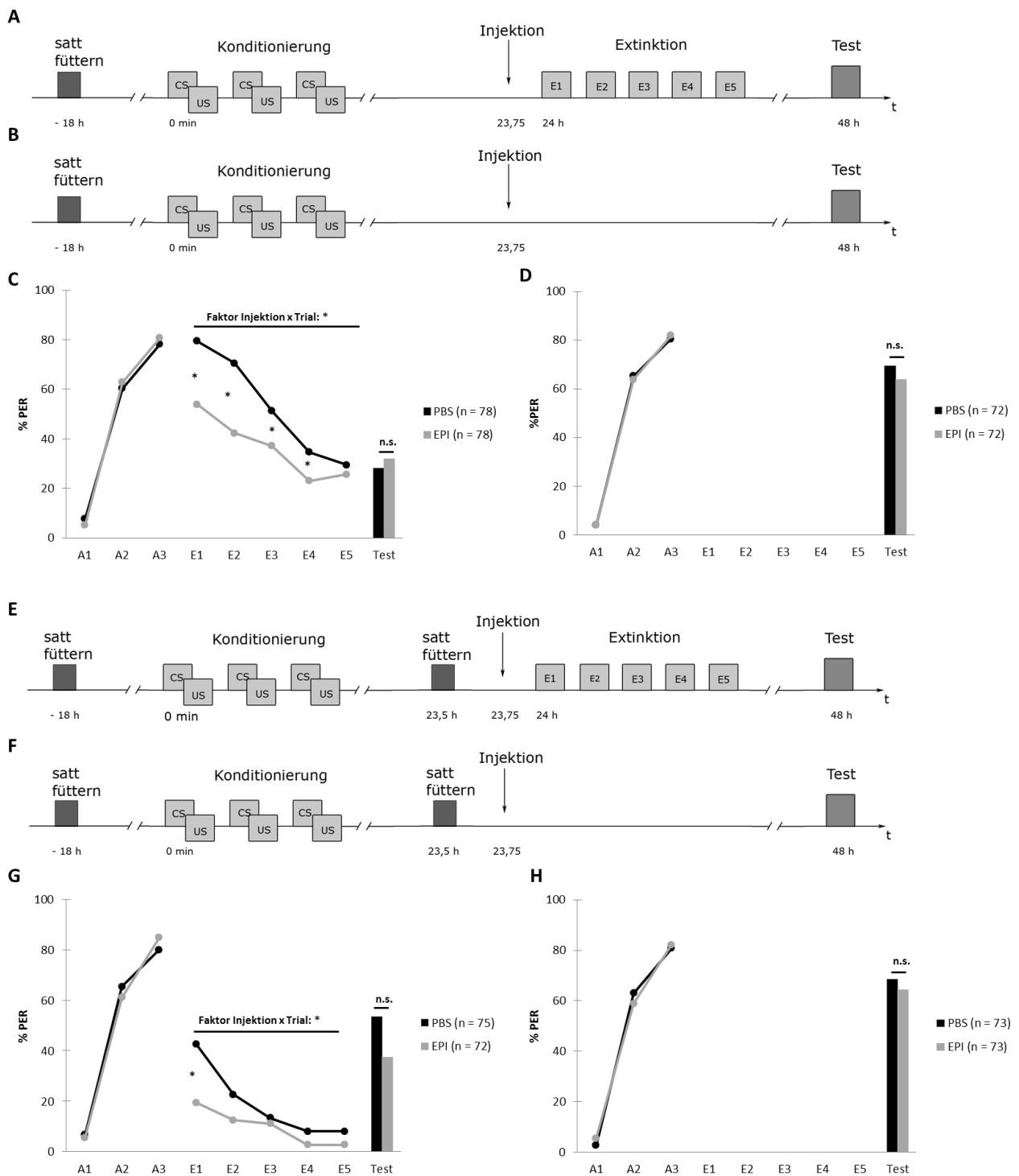
Während der Konditionierung sind in allen Untergruppen der Experimente keine signifikanten Unterschiede zwischen Epinastin-injizierten und Kontrolltieren vorhanden (hungrige Tiere mit Extinktion; Abb. 28C: rm ANOVA, Faktor Injektion:  $F_{2; 130} = 0,2064$ ;  $p = 0,8138$ ; hungrige Tiere ohne Extinktion, Abb. 28D: rm ANOVA Faktor Injektion:  $F_{2; 122} = 0,0915$ ;  $p = 0,9126$ ; satte Tiere mit Extinktion; Abb. 28G: rm ANOVA, Faktor Injektion:  $F_{2; 134} = 0,5271$ ;  $p = 0,5915$ ; satte Tiere ohne Extinktion; Abb. 28H: rm ANOVA Faktor Injektion:  $F_{1; 128} = 0,0189$ ;  $p = 0,8910$ ).

Während der Extinktion der Bienen sind signifikante Unterschiede zwischen den Epinastin-injizierten und den Kontrolltieren vorhanden. Diese Unterschiede sind sowohl in den hungrigen (Abb. 28C; rm ANOVA Faktor Injektion x Trial:  $F_{4; 524} = 3,7521$ ;  $p = 0,0051$ . Fisher LSD Post hoc Test: E1:  $p < 0,001$ ; E2:  $p < 0,001$ ; E3:  $p = 0,0213$ ; E4:  $p = 0,0418$ ; E5:  $p = 0,6073$ ) als auch in den sattten Tieren (Abb. 28G; rm ANOVA Faktor Injektion x Trial:  $F_{4; 540} = 2,4714$ ;  $p = 0,0437$ . Fisher LSD Post hoc Test: E1:  $p < 0,001$ ; E2:  $p = 0,1399$ ; E3:  $p = 0,7203$ ; E4:  $p = 0,2631$ ; E5:  $p = 0,2631$ ) signifikant.

Während der Gedächtnisabfrage 24 Stunden nach der Extinktion sind keine signifikanten Unterschiede zwischen den Epinastin-injizierten Tieren und den PBS-Kontrolltieren vorhanden (hungrige Tiere mit Extinktion; Abb. 28C: einfaktorielle ANOVA:  $F_{1; 131} = 0,0474$ ;

$p = 0,8279$ ; hungrige Tiere ohne Extinktion; Abb. 28D: einfaktorielle ANOVA Faktor Injektion:  $F_{1; 123} = 0,0630$ ;  $p = 0,8022$ ; satte Tiere mit Extinktion; Abb. 28G: einfaktorielle ANOVA:  $F_{1; 135} = 1,6413$ ;  $p = 0,2023$ ; satte Tiere ohne Extinktion; Abb. 28H: einfaktorielle ANOVA:  $F_{1; 128} = 1,0007$ ;  $p = 0,3190$ ).

Das oben gezeigte Experiment deutet daraufhin, dass Oktopamin die Wertigkeit des CS moduliert. Aus der Literatur ist bekannt, dass die Wertigkeit eines CS vom physiologischen Zustand des Tieres, wie der Futterzustand oder dem Erregungszustand des Tieres beeinflusst werden kann (Berridge 2012). Das bedeutet, dass eine Modulation der Wertigkeit des CS durch Oktopamin möglicherweise von dem physiologischen Zustand der Tiere abhängig ist. Da wie hier nur den Futterzustand der Tiere kontrolliert haben, nicht jedoch ihr Alter, und die beiden Experimente zu verschiedenen Jahreszeiten durchgeführt wurden, ist es denkbar, dass Tiere in diesem Experiment sich in einem anderen physiologischen Zustand befanden, als die Tiere in dem vorhergegangenen Experiment.



**Abbildung 28: Oktopamin hat einen Einfluss auf die Extinktion, nicht aber auf den 48-Stunden Gedächtnisabruf.** (A) Schematische Darstellung des Experiments mit hungrigen Tieren die extinguiert wurden. (B) Schematische Darstellung des Experiments mit hungrigen Tieren die nicht extinguiert wurden. (C) Experiment durchgeführt nach Schema in Abb. 22A. Während der Konditionierung sind keine signifikanten Unterschiede, während der Extinktion sind signifikante Unterschiede und während des Gedächtnisabrufs, 48 Stunden nach der Konditionierung, sind keine signifikanten Unterschiede zwischen den Epinastin-injizierten (grau) und den Kontrolltieren (schwarz) vorhanden. (D) Experiment durchgeführt nach Schema in Abb. 22B. Während der Konditionierung und während des Gedächtnisabrufs, 48 Stunden nach der Konditionierung, sind keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen vorhanden. (E) Schematische Darstellung des Experiments mit sattten Tieren, die extinguiert wurden. (F) Schematische Darstellungen des Experiments mit sattten Tieren, die nicht extinguiert wurden. (G) Experiment durchgeführt nach Schema in Abb. 22E. Während der Konditionierung sind keine signifikanten

Unterschiede, während der Extinktion sind signifikante Unterschiede und während des Gedächtnisabrufs, 48 Stunden nach der Konditionierung, sind keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen vorhanden. (H) Experiment durchgeführt nach Schema in Abb. 22F. Während der Konditionierung und dem Gedächtnisabrufs, 48 Stunden nach der Konditionierung, sind keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen vorhanden. Sterne stehen für  $p < 0,05$ . Anzahl der Tiere in Klammern.

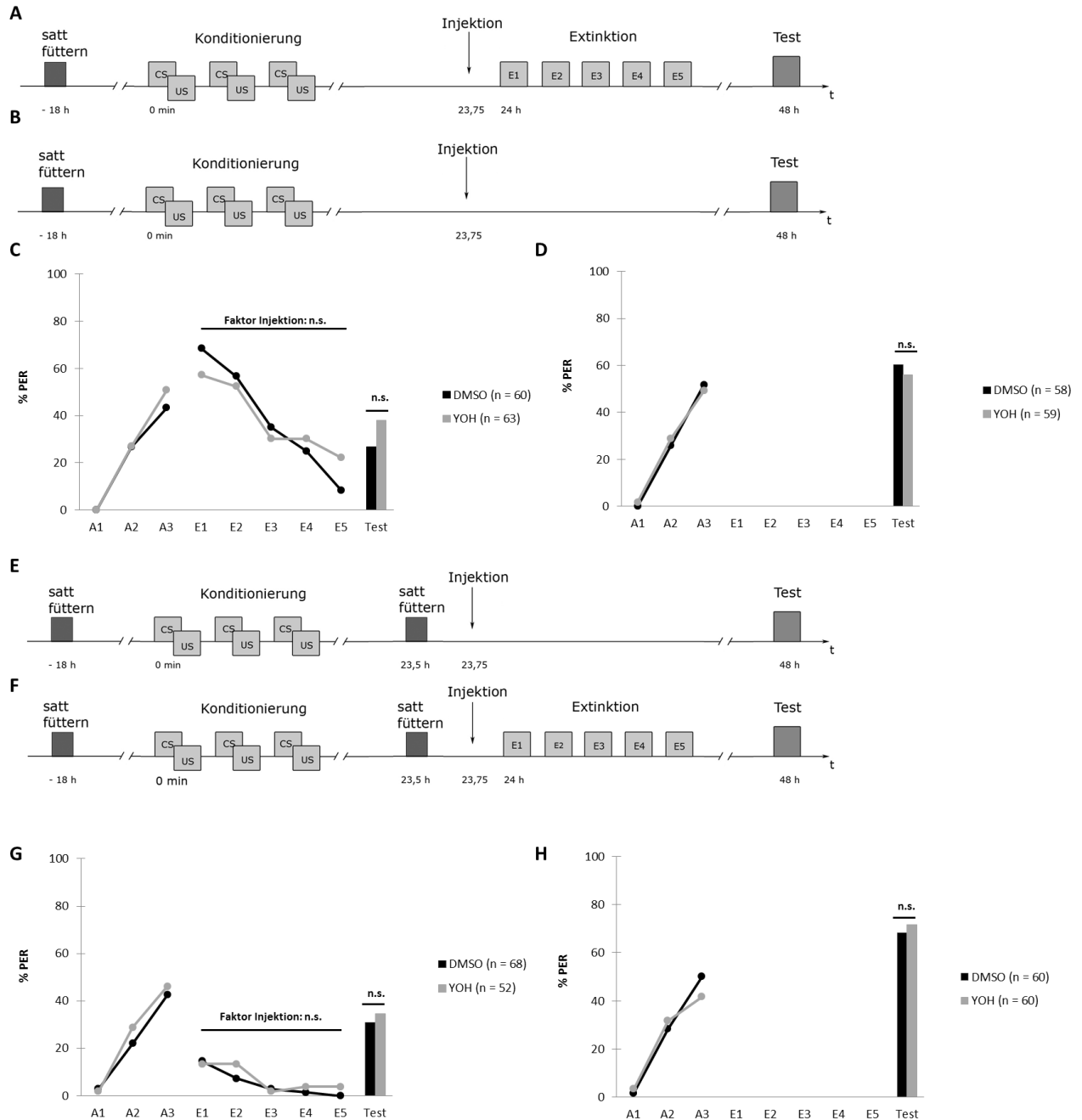
Im Folgenden wurde der Einfluss von Tyramin auf die Extinktion untersucht. Bienen wurden, wie oben beschrieben mit 3 CS-US-Paarungen konditioniert und 24 Stunden nach der Konditionierung so in acht Gruppen aufgeteilt, dass alle Gruppen in etwa gleich auf den CS während der Konditionierung reagiert haben. Vier der Gruppen wurden 30 Minuten vor der Extinktion satt gefüttert, vier nicht gefüttert. Fünfzehn Minuten später wurden der Tyraminrezeptorantagonist Yohimbin oder 10 % DMSO in PBS injiziert. Anschließend wurde die Hälfte der Tiere mit fünf CS Präsentationen extingiert und die andere Hälfte nicht extingiert. Ein Gedächtnistest wurde 24 Stunden später durchgeführt.

Während der Konditionierung sind in allen Untergruppen der vier Experimente keine signifikanten Unterschiede zwischen den PER-Raten der Yohimbin-injizierten und Kontrolltieren vorhanden (hungrige Tiere mit Extinktion; Abb. 29C: rm ANOVA, Faktor Injektion:  $F_{1; 121} = 0,2694$ ;  $p = 0,6047$ ; hungrige Tiere ohne Extinktion, Abb. 29D: rm ANOVA, Faktor Injektion:  $F_{1; 115} = 0,006$ ;  $p = 0,9809$ ; satte Tiere mit Extinktion; Abb. 29G: rm ANOVA, Faktor Injektion:  $F_{1; 118} = 0,4424$ ;  $p = 0,5072$ ; satte Tiere ohne Extinktion; Abb. 29H: rm ANOVA Faktor Injektion:  $F_{1; 118} = 0,0984$ ;  $p = 0,7543$ ).

Während der Extinktion sind keine signifikanten Unterschiede in der PER-Rate zwischen den Yohimbin-injizierten und den Kontrolltieren vorhanden, weder bei hungrigen (Abb. 29C: rm ANOVA Faktor Injektion:  $F_{1; 121} = 0,0018$ ;  $p = 0,9663$ ), noch bei satten Tieren (Abb. 29G: rm ANOVA Faktor Injektion:  $F_{1; 118} = 0,6151$ ;  $p = 0,4344$ ).

Während der Gedächtnisabfrage 24 Stunden nach der Extinktion sind keine signifikanten Unterschiede zwischen den Yohimbin-injizierten Tieren oder den DMSO-Kontrolltieren vorhanden (hungrige Tiere mit Extinktion; Abb. 29C: einfaktorielle ANOVA:  $F_{1; 121} = 1,8265$ ;  $p = 0,1791$ ; hungrige Tiere ohne Extinktion; Abb. 29D: einfaktorielle ANOVA:  $F_{1; 115} = 0,4961$ ;  $p = 0,4826$ ; satte Tiere mit Extinktion; Abb. 29G: einfaktorielle ANOVA:  $F_{1; 118} = 0,1844$ ;  $p = 0,6684$ ; satte Tiere ohne Extinktion; Abb. 29H: einfaktorielle ANOVA:  $F_{1; 118} = 0,1563$ ;  $p = 0,6933$ ).

Daraus lässt sich schließen, dass Tyramin keinen Einfluss auf die Extinktion oder die 48-Stunden Abfrage hat. Im Gegensatz zu Oktopamin scheint Tyramin also keinen Einfluss auf die Wertigkeit des CS zu haben.



**Abbildung 29: Tyramin hat keinen Einfluss auf die Extinktion oder den Gedächtnisabruf.** (A) Schematische Darstellung des Experiments mit hungrigen Tieren, die extinguiert wurden. (B) Schematische Darstellung des Experiments mit hungrigen Tieren, die nicht extinguiert wurden. (C) In hungrigen Tieren sind keine Unterschiede zwischen DMSO- (schwarz) und Yohimb-injizierten Tieren (grau) während der Konditionierung, der Extinktion oder während des Gedächtnisabrufs



vorhanden. **(D)** In hungrigen Tieren sind keine Unterschiede zwischen den DMSO- und Yohimbin-injizierten Tieren während der Konditionierung oder dem Gedächtnisabrufs vorhanden. **(E)** Schematische Darstellung des Experiments mit sattten Tieren, die extingiert wurden. **(F)** Schematische Darstellung des Experiments mit sattten Tieren, die nicht extingiert wurden. **(G)** In sattten Tieren sind keine Unterschiede zwischen den DMSO- und Yohimbin-injizierten Tieren während der Konditionierung, der Extinktion oder während des Gedächtnisabrufs vorhanden. **(H)** In sattten Tieren, die nicht extingiert sind, sind keine Unterschiede zwischen den Gruppen während der Konditionierung oder dem Gedächtnisabruf vorhanden. Anzahl der Tiere in Klammern.

## 5.10 OKTOPAMIN BEEINFLUSST DIE DUFTWAHRNEHMUNG

Oktopamin hat einen Einfluss auf den drei Stunden Gedächtnisabruf, die Extinktion und zu bestimmten Jahreszeiten auch auf den Gedächtnisabruf 48 Stunden später. Im Folgenden soll nun geklärt werden, ob Oktopamin einen Einfluss auf die Spezifität des Gedächtnisses für den Duft hat. Düfte können unterschiedlich wahrgenommen werden und können möglicherweise für Bienen unterschiedlich attraktiv sein. Es wäre möglich, dass das bisher verwendete Nelkenöl als CS attraktiver oder unattraktiver ist. Daher wurde zusätzlich zu Nelkenöl als CS auch Hexanol verwendet.

Dafür wurden Bienen in zwei Gruppen aufgeteilt und 30 Minuten vor der Konditionierung mit 30 %iger Zuckerlösung satt gefüttert oder nicht gefüttert. Beide Gruppen wurden wiederum in zwei Gruppen aufgeteilt und 15 Minuten vor der Konditionierung mit dem Oktopaminrezeptorantagonisten Epinastin oder PBS injiziert.

Anschließend wurden die Bienen mit drei CS-US-Paarungen konditioniert. Dabei wurde eine Hälfte der Bienen, wie in den Experimenten zuvor mit Nelkenöl konditioniert und die andere mit Hexanol. Der Gedächtnisabruf fand 24 Stunden später statt. Dabei wurde das Gedächtnis entweder zuerst mit Hexanol und zehn Minuten später mit Nelkenöl getestet oder zuerst mit Nelkenöl und zehn Minuten später mit Hexanol.

Bienen die mit Hexanol konditioniert wurden, wurden daher entweder erst mit dem CS oder dem unbekanntem Duft abgefragt oder erst mit dem unbekanntem Duft und dann mit dem CS. Genauso wurde mit den Bienen verfahren, die während der Konditionierung Nelkenöl präsentiert bekommen haben. Damit gab es insgesamt 16 Gruppen:

1. Satte Tiere; Injektion PBS; Konditionierung mit Hexanol; Abfrage: erst CS, dann neuer Duft
2. Satte Tiere; Injektion PBS; Konditionierung mit Hexanol; Abfrage: erst neuer Duft, dann CS
3. Satte Tiere; Injektion EPI; Konditionierung mit Hexanol; Abfrage: erst CS, dann neuer Duft
4. Satte Tiere; Injektion EPI; Konditionierung mit Hexanol; Abfrage: erst neuer Duft, dann CS

5. Satte Tiere; Injektion PBS; Konditionierung mit Nelkenöl; Abfrage: erst CS, dann neuer Duft
6. Satte Tiere; Injektion PBS; Konditionierung mit Nelkenöl; Abfrage: erst neuer Duft, dann CS
7. Satte Tiere; Injektion EPI; Konditionierung mit Nelkenöl, Abfrage: erst CS, dann neuer Duft
8. Satte Tiere; Injektion EPI; Konditionierung mit Nelkenöl, Abfrage: erst neuer Duft, dann CS
9. Hungrige Tiere; Injektion PBS; Konditionierung mit Hexanol; Abfrage: erst CS, dann neuer Duft
10. Hungrige Tiere; Injektion PBS; Konditionierung mit Hexanol; Abfrage: erst neuer Duft, dann CS
11. Hungrige Tiere; Injektion EPI; Konditionierung mit Hexanol; Abfrage: erst CS, dann neuer Duft
12. Hungrige Tiere; Injektion EPI; Konditionierung mit Hexanol; Abfrage: erst neuer Duft, dann CS
13. Hungrige Tiere; Injektion PBS; Konditionierung mit Nelkenöl; Abfrage: erst CS, dann neuer Duft
14. Hungrige Tiere; Injektion PBS; Konditionierung mit Nelkenöl; Abfrage: erst neuer Duft, dann CS
15. Hungrige Tiere; Injektion EPI; Konditionierung mit Nelkenöl, Abfrage: erst CS, dann neuer Duft
16. Hungrige Tiere; Injektion EPI; Konditionierung mit Nelkenöl, Abfrage: erst neuer Duft, dann CS

Während der Gedächtnisabfrage nach 24 Stunden sind keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen vorhanden, die mit dem gleichen Duft konditioniert wurden, die selbe Substanz injiziert bekommen haben und den gleichen Futterzustand hatten (Gruppe 1 gegen Gruppe 2, Gruppe 3 gegen Gruppe 4 usw.) aber entweder erst den CS und dann den neuen Duft oder andersherum präsentiert bekommen haben. Die Reaktion auf den CS und den unbekanntem Duft ist zwischen den Gruppen nicht signifikant unterschiedlich, egal in welcher

Reihenfolge sie die Düfte präsentiert bekommen haben. Die Statistik dazu ist in Tabelle 4 angegeben.

**Tabelle 4: Statistik der Gruppen mit unterschiedlicher Duftreihenfolge während des Gedächtnistests.**

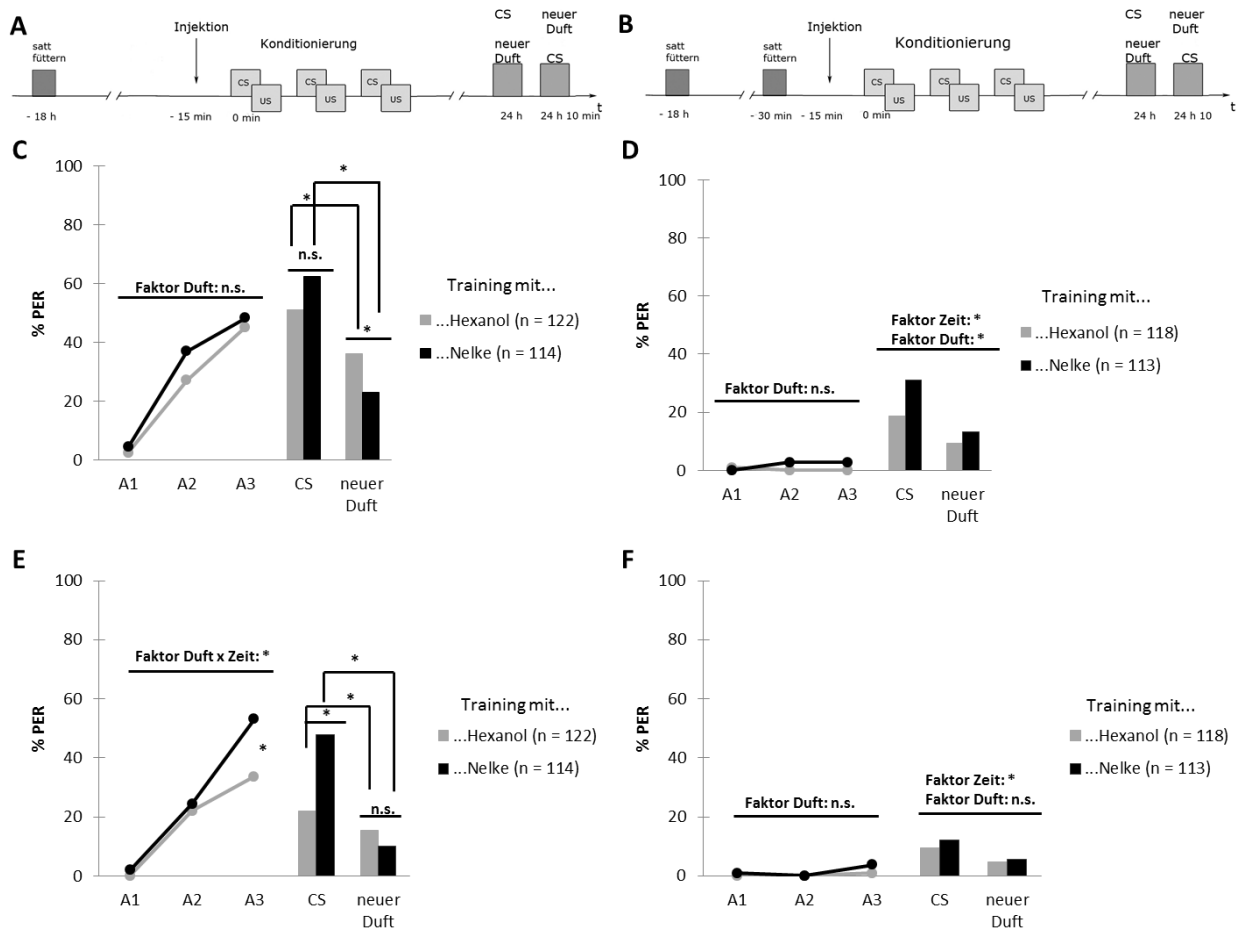
Getestete Gruppen	Zustand	Duft während der Konditionierung	Injektion mit ...	rm ANOVA Faktor Duft
1 gegen 2	Satt	Hexanol	PBS	$F_{1;116} = 0,0109$ ; $p = 0,9172$
3 gegen 4	Satt	Hexanol	Epinastin	$F_{1;102} = 0,0264$ ; $p = 0,8713$
5 gegen 6	Satt	Nelke	PBS	$F_{1;111} = 0,7492$ ; $p = 0,3903$
7 gegen 8	Satt	Nelke	Epinastin	$F_{1;104} = 0,7635$ ; $p = 0,3842$
9 gegen 10	Hungrig	Hexanol	PBS	$F_{1;120} = 0,0238$ ; $p = 0,8775$
11 gegen 12	Hungrig	Hexanol	Epinastin	$F_{1;102} = 0,7043$ ; $p = 0,4033$
13 gegen 14	Hungrig	Nelke	PBS	$F_{1;112} = 0,0152$ ; $p = 0,9020$
15 gegen 16	Hungrig	Nelke	Epinastin	$F_{1;96} = 3,4827$ ; $p = 0,0651$

Da die Reihenfolge der Düfte während des Gedächtnistests nicht signifikant unterschiedlich war, wurden die jeweiligen Gruppen zusammengefügt, sodass anschließend insgesamt nur noch acht Gruppen vorhanden waren.

Unterschiede zwischen hungrigen, PBS-injizierten Bienen, die mit Hexanol oder mit Nelkenöl konditioniert wurden sind nicht signifikant (Abb. 30C; rm ANOVA, Faktor Duft:  $F_{1;234} = 1,5133$ ;  $p = 0,2199$ ). In der Gruppe der Epinastin-injizierten Tiere hingegen, sind signifikante Unterschiede zwischen Tieren zu finden, die mit Hexanol konditioniert wurden und Tieren, die mit Nelke konditioniert wurden (Abb. 30E; rm ANOVA Faktor Duft x Zeit:  $F_{2;400} = 4,9235$ ;  $p = 0,0077$ , Fisher LSD Post hoc Test: A3 Hexanol vs. Nelke:  $p < 0,001$ ). Unterschiede zwischen satt, PBS-injizierten Tieren, die mit Hexanol oder Nelkenöl konditioniert wurden, sind nicht signifikant (Abb. 30D; rm ANOVA, Faktor Duft:  $F_{1;229} = 2,2586$ ;  $p = 0,1343$ ). Ebenso sind Unterschiede zwischen Epinastin-injizierten Tieren, die mit Hexanol oder Nelkenöl konditioniert wurden, nicht signifikant (Abb. 30F; rm ANOVA Faktor Duft:  $F_{1;208} = 3,6249$ ;  $p = 0,0583$ ).

Hungrige Bienen, die mit PBS injiziert wurden, reagieren nicht unterschiedlich auf den jeweiligen CS, während des Gedächtnisabrufs 24 Stunden später. Es sind somit keine Unterschiede zwischen Hexanol und Nelkenöl als CS vorhanden. (Abb. 30C; rm ANOVA, Faktor Duft x Zeit:  $F_{1; 234} = 14,8929$ ;  $p = 0,0001$ , Fisher LSD Post hoc Test:  $p = 0,0646$ ). Auf den neuen unbekanntem Duft reagieren die Tiere signifikant weniger, als auf den CS (Akquisition mit Hexanol:  $p = 0,0011$ ; Akquisition Nelkenöl:  $p < 0,001$ ). Auf den jeweils neuen Duft reagieren die Tiere, die mit unterschiedlichen Düften konditioniert wurden, signifikant unterschiedlich ( $p = 0,0327$ ).

Hungrige Bienen, die mit Epinastin injiziert wurden, reagieren unterschiedlich auf den jeweiligen CS während des Gedächtnisabrufs 24 Stunden später (Abb. 30E; rm ANOVA Faktor Duft x Zeit:  $F_{1; 200} = 17,3882$ ;  $p < 0,001$ , Fisher LSD Post hoc Test:  $p < 0,001$ ). Auf den neuen unbekanntem Duft reagieren die Tiere signifikant weniger, als auf den CS (Akquisition mit Hexanol:  $p = 0,0208$ ; Akquisition Nelkenöl:  $p < 0,001$ ). Auf den jeweils neuen Duft reagieren die Tiere, die mit unterschiedlichen Düften konditioniert wurden, signifikant nicht unterschiedlich ( $p = 0,5650$ ).



**Abbildung 30: Oktopamin hat einen Einfluss auf die Konditionierung in Abhängigkeit des Dufts.** (A) Schematische Darstellung des Experiments, durchgeführt mit hungrigen Bienen. Während der Gedächtnisabfrage wurde entweder erst der CS und zehn Minuten später der neue Duft abgefragt oder andersherum. (B) Schematische Darstellung des Experiments, durchgeführt mit sattierten Tieren. Während der Gedächtnisabfrage wurde entweder erst der CS und zehn Minuten später der neue Duft präsentiert oder andersherum. (C) Hungrige Tiere, die mit PBS injiziert wurden, zeigen während der Konditionierung keine Unterschiede zwischen Düften. Tiere reagieren in dem Gedächtnisabruf, 24 Stunden später, auf den gelernten Duft mehr als auf den unbekanntem Duft (D) Sattierte Tiere die mit PBS injiziert wurden, zeigen während der Konditionierung keine Unterschiede. Während der Abfrage, 24 Stunden nach der Konditionierung, sind signifikante Unterschiede zwischen dem gelernten und dem ungelerten Duft und zwischen Hexanol und Nelkenduft vorhanden. (E) Hungrige Tiere, die mit Epinastin injiziert wurden, zeigen während der Konditionierung Unterschiede zwischen den Düften. Während des Gedächtnisabrufs, 24 Stunden später, sind Unterschiede zwischen den beiden Düften, als auch auf den bekannten und unbekanntem Duft vorhanden. (F) Sattierte Tiere, die mit Epinastin injiziert wurden, zeigen während der Konditionierung keine Unterschiede. Während des Gedächtnisabrufs, 24 Stunden später, sind signifikante Unterschiede zwischen dem gelernten und dem ungelerten Duft nicht aber zwischen Hexanol und Nelkenduft vorhanden. Sterne stehen für  $p < 0,05$ . Anzahl der Tiere in Klammern.

Es sind signifikante Unterschiede zwischen den Düften (Abb. 30D; rm ANOVA, Faktor Duft:  $F_{1; 229} = 3,9088$ ;  $p = 0,0492$ ). und zwischen dem CS und dem neuen Duft (rm ANOVA, Faktor Zeit:  $F_{1; 229} = 23,8691$ ;  $p < 0,001$ ) bei sattierten Bienen, die mit PBS injiziert wurden, vorhanden.

Bei Tieren, die mit Epinastin injiziert wurden, ist ein signifikanter Unterschied zwischen dem CS und dem unbekanntem Duft (Abb. 30F; rm ANOVA, Faktor Zeit:  $F_{1; 208} = 8,2203$ ;  $p = 0,0046$ ), nicht aber zwischen den Tieren, die mit Hexanol oder Nelke konditioniert wurden (rm ANOVA, Faktor Duft:  $F_{1; 208} = 0,3013$ ;  $p = 0,5837$ ) vorhanden.

Durch die Hemmung von Oktopamin durch die Injektion des Rezeptorantagonisten Epinastin, wird die Konditionierung mit Hexanol, nicht aber die mit Nelkenöl beeinflusst. Ebenso ist der Gedächtnisabruf nach Konditionierung mit Hexanol, 24 Stunden nach der Konditionierung, stark verringert und nicht mehr unterschiedlich zu dem neuen Duft. Daraus kann geschlossen werden, dass Oktopamin, in Abhängigkeit des Dufts, das Lernen beeinflusst.

## 6 DISKUSSION

Ich habe in dieser Arbeit den Einfluss biogener Amine auf die Zuckersensitivität, den Metabolismus und Lernen und Gedächtnis in der Honigbiene untersucht. Ich habe gezeigt, dass Oktopamin und Tyramin die Beantwortung einer Zuckerstimulation an den Antennen mit dem Herausstrecken des Rüssels (*proboscis extension response*, PER) in Abhängigkeit des Hungerzustandes modulieren. Ich habe gezeigt, dass Dopamin an der Modulation der Zuckersensitivität nicht beteiligt ist. Oktopamin beeinflusst, in Abhängigkeit vom zu lernenden Duft, das Lernen. Oktopamin beeinflusst das Gedächtnis von Bienen. Die Effekte auf das Gedächtnis, entsprechen denen der Zuckersensitivität: Die Hemmung der Oktopaminwirkung durch Injektion eines Rezeptorantagonisten verringert die Antwort auf Zucker (Zuckersensitivitätsexperimente) und auf den erlernten Duft (Lernexperimente). Ebenso hat Oktopamin einen Einfluss auf die PER-Rate während des Extinktionslernens und auch während des Abrufs des Extinktionsgedächtnisses. Ich habe gezeigt, dass sich Oktopamin- und Tyraminspiegel im Bienengehirn in Abhängigkeit vom Futterzustand verändern und dass ein verminderter Oktopaminspiegel eine Verringerung der Metabolismusrate nach sich zieht.



## 6.1 DIE ANTWORT AUF ZUCKER IST REDUZIERT, WEIL DIE METABOLISMUS-RATE REDUZIERT IST

Bienen, die mit Oktopamin behandelt wurden und anschließend nicht mehr gefüttert wurden, haben eine niedrigere mittlere Überlebensrate als Tiere, die mit PBS oder Epinastin behandelt wurden. Wenn Bienen zwei Stunden nach der Injektion von Oktopamin, Epinastin oder PBS noch einmal mit 30 %iger Zuckerlösung satt gefüttert wurden, ist kein Unterschied zwischen Oktopamin und der Kontrolle in der mittleren Überlebensrate vorhanden. Der Effekt wird gerettet. Aus diesem Ergebnis schließe ich, dass Oktopamin den Stoffwechsel der Tiere anregt, sodass die vorhandenen Zuckerreserven verbraucht werden und nicht mehr genug Zucker zur Verfügung steht. Daher könnten die Oktopamin-behandelten Tiere schneller sterben als die Kontrolltiere.

In Insekten wird, in energieaufwendigen Situationen zusätzliche Energie bereitgestellt indem der Zucker Trehalose aus dem Fettkörper synthetisiert und in die Hämolymphe abgegeben wird. Dieser Prozess der Trehalosefreisetzung dauert einige Zeit. Da die vorhandene Trehalose in der Hämolymphe jedoch bereits verbraucht wird, sinkt der Trehalosespiegel der Hämolymphe. Bienen befördern deshalb Nektar aus dem Honigmagen in den Mitteldarm und verdauen diesen (Crailsheim 1988; Blatt und Roces 2001). So gelangt Fruktose und Glukose in die Hämolymphe und kann zur Energiegewinnung genutzt werden (Blatt und Roces 2002). Sammlerbienen, haben im Gegensatz zu Ammenbienen und anderen Insekten einen fast komplett leeren Fettkörper. Sie gewinnen zusätzliche Energie also fast ausschließlich über die Verdauung von Nektar (Woodring et al. 1994; Panzenböck und Crailsheim 1997). Oktopamin erhöht, als Stresshormon, möglicherweise den Transport des Zuckers in die Hämolymphe, um Energie bereitzustellen. Dadurch wird der Zucker schneller verbraucht und die Tiere sterben früher. Wenn man nun die Tiere zwei Stunden nach der Injektion noch einmal satt füttert, wird der Effekt gerettet, da jetzt genug Zucker im Magen vorhanden ist, der in die Hämolymphe transportiert werden kann. Der Honigmagen ist so gefüllt, dass es keine Unterschiede mehr zwischen oktopamininjizierten Tieren und den Kontrolltieren gibt. Epinastin auf der anderen Seite verringert möglicherweise den Transport der Glucose in die Hämolymphe und auch die Aktivität des Stoffwechsels. Daher haben die Tiere, die mit Epinastin injiziert wurden, eine höhere Überlebensrate als die Kontroll- und Oktopamintiere.

Der Zucker, den sie zu Beginn des Experiments erhalten, hält länger vor und somit sterben die Tiere später.

Der Oktopaminrezeptoragonist Chlordimeform hat keinen Effekt auf das Überleben der Bienen. Es ist unklar, warum Chlordimeform in unseren Experimenten keinen Effekt hat. Oktopamin hat viele Funktionen in der Biene. Es ist ein Neurotransmitter, Neuromodulator und Neurohormon (Evans 1985; Neckameyer und Leal 2009). Oktopaminrezeptoren werden in zwei Klassen: OA<sub>1</sub> und OA<sub>2</sub> eingeteilt. Die OA<sub>2</sub> Rezeptoren werden weiter in Subklassen A und B eingeteilt (Osborne 1996). Oktopaminrezeptoren, an die Chlordimeform bindet, spielen möglicherweise keine Rolle bei der Regulation des Energiestoffwechsels und der Zuckerwahrnehmung. Oktopamin gelangt bei systemischer Injektion in das Gehirn der Bienen (Barron et al. 2007), jedoch gelangt Chlordimeform besser über die Blut-Hirn-Schranke in das Gehirn (Stevenson et al. 2005; Schofield und Treherne 1985, 1986). Oktopaminrezeptoren, an die Chlordimeform bindet, sind möglicherweise im zentralen Nervensystem zu finden, die Regulation des Stoffwechsels könnte jedoch über Oktopaminrezeptoren im peripheren Nervensystem reguliert werden.

Die Hypothese, dass Oktopamin den Metabolismus anregt, wird durch das Futterexperiment gestützt. In diesem Experiment wurde die Menge an Zuckertropfen untersucht, die die Bienen zu sich nehmen. Nach der Injektion von Epinastin, Oktopamin oder PBS fressen die Epinastintiere signifikant weniger als die Kontrolltiere. Die Tiere, die mit Epinastin injiziert wurden, haben einen verlangsamten Stoffwechsel bzw. der Zucker gelangt möglicherweise langsamer in die Hämolymphe. Deshalb benötigten sie auch weniger Zucker, da sie zu dem Zeitpunkt der Fütterung noch satter sind als die Kontrolltiere. Zwischen PBS-injizierten und Oktopamin-injizierten Tieren gibt es keine Unterschiede in der aufgenommenen Futtermenge. Eigentlich wäre zu erwarten, dass die Tiere, die mit Oktopamin injiziert wurden, mehr Nahrung zu sich nehmen als die PBS Tiere. In Fliegen wurde genau dieses Phänomen beschrieben (Long und Murdock 1983). Eine Oktopamininjektion in den Antennallobus des Gehirns von Honigbienen oder Fliegen führt zu einer Stimulation der Futteraufnahme (Bicker und Menzel 1989; Long und Murdock 1983).

Da Epinastin den PER bei hungrigen Tieren verringert, müsste der Umkehrschluss lauten, dass Oktopamin oder sein Agonist Chlordimeform den PER bei hungrigen Tieren erhöht. Dies wurde in früheren Studien gezeigt (Bicker und Menzel 1989; Scheiner 2004), konnte

aber in unserem Experiment nicht bestätigt werden. Die Injektion von Oktopamin führt bei satten Bienen jedoch zu einer leichten Erhöhung des PER. Diese Erhöhung ist statistisch nicht signifikant. Der p-Wert beträgt 0,0774 und es kann von einem Trend gesprochen werden. Im Gegensatz zu meinen Versuchen, wurden in Scheiners Versuch die Bienen drei Stunden vor der Abfrage satt gefüttert (Scheiner et al. 2002). Da die Tiere in meinen Experimenten kurz vor der Zuckerabfrage satt gefüttert wurden, ist ihr Magen möglicherweise noch so voll und der Hämolymphezuckerspiegel bereits so stark erhöht, dass nur sehr wenige Tiere auf den Zucker reagieren und es zu keiner Erhöhung der PER-Rate kommt. Es handelt sich möglicherweise um einen Deckeneffekt.

Epinastin ist sowohl Oktopamin- als auch Dopaminrezeptorantagonist (Beggs et al. 2011). Bei der Zuckeraufnahme von *Drosophila* kommt es zu erhöhter Kalziumausschüttung in den PAM-Dopaminneuronen im Gehirn. Diese Kalziumausschüttung ist in satten Tieren stark verringert (Liu et al. 2012). Daher wäre eine Modulation durch Dopamin denkbar. Eine Beteiligung von Dopamin an den beschriebenen Effekten konnte in meinen Versuchen aus folgenden Gründen ausgeschlossen werden. (1) Die Injektion von Fluphenazin, einem Dopaminrezeptorantagonisten (Mustard et al. 2003), hat keinen Einfluss auf die Zuckerabfrage. (2) Eine Dopamininjektion nach biogener Amin-Deprivierung durch  $\alpha$ -Methyl-p-Tyrosin (AMT) (Stevenson et al. 2000) kann eine Zuckerabfrage auf Kontrolllevel nicht wiederherstellen. (3) Durch Injektion des Dopaminrezeptoragonisten Homovanillylalkohol nach biogener Amin-Deprivierung durch AMT (Stevenson et al. 2000) kann eine Zuckerabfrage auf Kontrolllevel nicht wiederhergestellt werden.

HPLC und Immunohistochemie zeigen, dass sowohl der Oktopaminspiegel als auch der Tyraminspiegel in satten Tieren deutlich erhöht ist. Hungrige Tiere besitzen also weniger Oktopamin als satte Tiere. Eine weitere Erniedrigung des Oktopaminspiegels in hungrigen Tieren durch Epinastininjektion führt zu einer verminderten Antwort im Zuckertest, zu einer verringerten Nahrungsaufnahme, zu einer gesenkten Metabolismusrate und folglich einer höheren Überlebensrate.

Diese Ergebnisse zeigen deutlich die modulierende Funktion von Oktopamin hinsichtlich der Nahrungsaufnahme und des Nahrungsangebotes. Der Oktopaminspiegel in hungrigen Tieren ist erniedrigt und jede weitere Erniedrigung des Oktopaminspiegels führt zu akuter Einschränkung des Metabolismus. Der Stoffwechsel verlangsamt sich möglicherweise

aufgrund des fehlenden Nahrungsangebotes und ermöglicht dem Tier so ein längeres Überleben. Längeres Überleben in „schlechten Zeiten“ erhöht die Wahrscheinlichkeit des Wechsels in „gute Zeiten“ und eine Modulation des Stoffwechsels durch Oktopamin stellt so möglicherweise eine höhere Fitness her, die evolutiv das Überleben der Art sichert.

## 6.2 SPIELEN NEURONE IM BIENENGHIRN EINE ROLLE BEI DER MODULATION DES METABOLISMUS?

Schnitte von Bienengehirnen, die mit Oktopamin- und Tyraminantikörpern gefärbt wurden, zeigen tyraminerge und oktopaminerger Signale in den Zellkörpern unterschiedlicher Neuronengruppen (*cluster*). Die Färbung von *cluster* G 3a und G 5b im Gehirn von mechanisch gereizten Tieren ist für Oktopamin negativ. Diese *cluster* sind daher möglicherweise der Ort oktopaminmodulierter stressabhängiger Prozesse. Eine Verringerung des Oktopaminlevels im Gehirn gestresster Bienen wurde zunächst nicht erwartet, da Oktopamin als Stresshormon bekannt ist und so peripher wirkt (Roeder 2005; Evans 1980). Bei Stress kommt es zu einer Erhöhung des Oktopamingehalts in der Hämolymphe (Davenport und Evans 1984a, 1984b, Harris und Woodring 1992). Ein erhöhter Oktopaminspiegel in der Hämolymphe wurde in hungrigen Heuschrecken nachgewiesen (Davenport und Evans 1984a). Eine Untersuchung an Bienen hat gezeigt, dass Stress zu einer Erhöhung des Oktopamingehalts im Gehirn führen kann. Die Bienen wurden mechanischem Stress (Drehungen), thermischen Stress (Eisbehandlung) und chemischen Stress (CO<sub>2</sub>-Behandlung) ausgesetzt. Jedoch war nur nach mechanischem Stress der Oktopamingehalt im Gehirn erhöht. Nach thermischem Stress wurde der Oktopamingehalt verringert und nach chemischem Stress war keine Veränderung zu beobachten (Chen et al. 2008). Es wäre daher möglich, dass Hungerstress den Gehalt an Oktopamin im Bienengehirn verringert, auch wenn er in der Hämolymphe erhöht wird.

In den *cluster* LV, G 6a und G 2b wurde in meinen Experimenten kein Oktopamin nachgewiesen. In den für die Auswertung als Vorlage herangezogenen Färbungen, sind diese *cluster* als oktopaminerger Cluster identifiziert worden (Sinakevitch et al. 2005). Zudem

besitzen oktopaminerge Neurone immer auch Tyramin, da es die Vorstufe des Oktopamins ist. Ich habe allerdings Cluster identifiziert, die ausschließlich oktopaminerg scheinen. Zur genaueren Untersuchung der Oktopamincluster in hungrigen, satt und mechanisch gereizten Bienen sollten weitere Bienenhirne präpariert und gefärbt werden. Mit der Optimierung des Färbeprotokolls und einer höheren Anzahl gefärbter Hirnpräparate könnten genauere Aussagen getroffen werden. Ebenso wäre es sinnvoll die absolute Menge der Amine in der Hämolymphe zu bestimmen.

### **6.3 IN ABHÄNGIGKEIT VOM HUNGERZUSTAND MODULIERT TYRAMIN ODER OKTOPAMIN DIE ZUCKERSENSITIVITÄT**

Oktopamin und Tyramin modulieren die Zuckersensitivität in Abhängigkeit des Hungerzustandes der Tiere. Bei hungrigen Tieren hat der Oktopaminrezeptorantagonist Epinastin und bei satt Tieren der Tyraminrezeptorantagonist Yohimbin eine verringernde Wirkung der PER-Rate. Hunger ist ein metabolisches Defizit, welches zu einer höheren Wahrscheinlichkeit führt, dass ein Tier nach Nahrung sucht (Dethier 1976; Abizaid und Horvath 2008; Saper et al. 2002). Oktopamin ist nicht nur in den Anstieg der Bewegungsgeschwindigkeit hungernder *Drosophila* Larven involviert, sondern auch in die Antwort auf Futtermangel (Koon et al. 2011; Horvitz et al. 1982; Suo et al. 2006).

Hunger ist eine Form von Stress. In hungrigen Heuschrecken ist der Oktopaminspiegel in der Hämolymphe erhöht (Davenport und Evans 1984a). Es scheint daher wahrscheinlich, dass, wenn die Tiere hungrig sind die Modulation von Tyramin zu Oktopamin umschaltet. Tyramin ist die Vorstufe von Oktopamin und für motorischen Funktionen ist bekannt, dass Oktopamin und Tyramin gegensätzliche Effekte haben (Brembs et al. 2007; Fussnecker et al. 2006; Downer 1979; Uzzan und Dudai 1982). Tyramin und Oktopamin werden oft mit Noradrenalin und Adrenalin der Wirbeltiere verglichen (Roeder 1999, 2005; Neckameyer und Leal 2009; Farooqui 2012). Oktopamin ist auch ein Stresshormon, welches bei Insekten ausgeschüttet wird, wenn sie Stress haben (Evans 1980; Roeder 2005; Harris und Woodring 1992;

Davenport und Evans 1984b; Hirashima et al. 1992). Es wäre möglich, dass satte Bienen den normalen nicht gestressten Zustand darstellen und die Zuckersensitivität durch Tyramin gesteuert wird. Die hungrigen Tiere stellen somit den gestressten Zustand dar und Tyramin wird zu Oktopamin umgesetzt. Dann wird die Zuckersensitivität durch Oktopamin reguliert. Da ich eine Verringerung des Oktopamingehalt im Gehirn unter Stressbedingungen gezeigt habe, könnte die Modulation der Zuckersensitivität auf einen erhöhten Oktopamingehalt in der Hämolymphe herrühren.

Frühere Versuche haben gezeigt, dass Oktopamin und Tyramin die PER-Rate erhöhen können (Braun und Bicker 1992; Menzel et al. 1990). In anderen Versuchen wurde jedoch gezeigt, dass nur Oktopamin und nicht Tyramin die PER-Rate auf Zuckerlösungen verändert (Behrends und Scheiner 2012). Die genaue Versuchsanordnung scheint sehr wichtig zu sein. Wenn die Bienen zu satt sind, ist Oktopamin nicht mehr in der Lage, den PER zu erhöhen und der Effekt von Tyramin bzw. dem Antagonisten Yohimbin ist in hungrigen Tieren nicht zu finden. Ausgehungerte Fliegen reagieren deutlich schneller mit dem PER, auch bei niedrigen gustatorischen Stimuli (Brookhart et al. 1987; Farhadian et al. 2012; Hergarden et al. 2012; Keene und Waddell 2007; Inagaki et al. 2012; Barton Brown 1980; Scheiner 2004). Satte Tiere reagieren zudem erst bei sehr hohen gustatorischen Stimuli, d.h. hoch-konzentrierten Zuckerlösungen (Brookhart et al. 1987).

Der Tyraminspiegel im Bienengehirn ändert sich ebenfalls mit dem Futterzustand. Der Tyraminspiegel in satten Tieren ist erhöht. Dieses Ergebnis könnte erklärt, warum eine Verringerung des Tyraminspiegels durch Yohimbin in satten Tieren einen Effekt auf den PER hat. Die Hemmung der Tyraminwirkung durch Injektion eines Tyraminrezeptorantagonisten verringert die in diesem Zustand hohen Tyramingehalt und verringert so die Antwort auf Wasser und Zucker im Zuckertest.

## **6.4 OKTOPAMIN BEEINFLUSST MÖGLICHERWEISE DIE METABOLISMUS-RATE UND DARAUS RESULTIEREND KOMMT ES BEIM GEDÄCHTNISABRUF ZU EINER VERRINGERTEN ANTWORT AUF DEN ERLERNTEN DUFT**

Bienen, denen Epinastin injiziert wurde, reagieren drei Stunden und 24 Stunden später signifikant weniger auf den gelernten Duft (konditionierter Stimulus, CS). Ein ähnliches Ergebnis konnte bei Grillen, sowohl bei olfaktorischem, als auch bei visuellem Lernen beobachtet werden: Grillen, die 30 Minuten vor der Gedächtnisabfrage mit Oktopaminrezeptorantagonisten behandelt wurden, reagierten auf den CS signifikant weniger (Mizunami et al. 2009).

Es ergeben sich vier mögliche Hypothesen zur Interpretation des verminderten Gedächtnisabrufes durch die Blockade der Oktopaminrezeptoren. (1) Oktopamin könnte nach dem Lernen wichtig sein um das Gedächtnis zu bilden. Zur Bildung eines intermediären Gedächtnisses (*mid-term memory*), zu dem das drei Stunden Gedächtnis zählt (Folkers et al. 1993; Grünbaum und Müller 1998; Tully et al. 2003; Scheunemann et al. 2012), ist die Aktivität der Proteinkinase C wichtig (Grünbaum und Müller 1998). Für die Bildung eines Langzeitgedächtnisses (*long-term memory*) hingegen, ist die Aktivität der cAMP-abhängigen Proteinkinase A (PKA) von Nöten (Abel et al. 1997; Müller 1996; Friedrich et al. 2004). Um ein stabiles Langzeitgedächtnis zu formen, findet Transkription und Proteinsynthese statt (Friedrich et al. 2004; Wüstenberg et al. 1998; Menzel et al. 2001; Dudai 2004; Alberini 2008). Diese Möglichkeit scheint mir allerdings am unwahrscheinlichsten, da Neurotransmitter während des Lernprozesses zur Übertragung neuronaler Signale nötig sind und nicht dafür bekannt sind, darüber hinaus als *second messenger* zu agieren. (2) Die Injektion von Epinastin könnte direkt den Gedächtnisabruf vermindern. Auch diese Möglichkeit scheint eher unwahrscheinlich, denn zwischen Injektion und Abruf liegen 150 Minuten für den drei Stunden-Gedächtnisabruf und ca. 24 Stunden für den 24 Stunden-Gedächtnisabruf. Eine direkte Wirkung der Injektion auf den 24 Stunden- Gedächtnisabruf mit demselben Ergebnis wie nach dem drei Stunden-Gedächtnisabruf scheint nahezu ausgeschlossen. (3) Die dritte Hypothese ergibt sich aus einer Studie von Placais und Preat (2013). Die Autoren zeigen in dieser Studie, dass nicht gefütterte Fliegen kein

Langzeitgedächtnis für eine Duft-Bestrafungsassoziation ausbilden. Nicht gefütterte Fliegen bilden im hungrigen Zustand kein Langzeitgedächtnis, da die Bildung eines Langzeitgedächtnisses aufgrund der Synthese neuer Proteine sehr energieaufwendig ist (Davis und Squire 1984; Scharf et al. 2002; Mery und Kawecki 2005). So wird Energie gespart und ein längeres Überleben gesichert. Ich vermute, dass die Hemmung der Oktopaminwirkung zu einer gesenkten Metabolismus-Rate führt und argumentiere, dass es sich dabei um einen *fitness determining factor* handelt, der ein längeres Überleben sichert. Dadurch, dass kein Langzeitgedächtnis für die CS-US-Assoziation unter Oktopamin-Mangel angelegt wird, könnte es sich um eine energiesparende Anpassung handeln, die letztlich ein längeres Überleben sichern soll. In weiteren Studien müsste man nun zeigen, ob es sich bei dem verbleibenden Gedächtnis 24 Stunden nach der Konditionierung um ein proteinsyntheseabhängiges Gedächtnis handelt (Friedrich et al. 2004; Stollhoff et al. 2005; Stollhoff & Eisenhardt 2009). Eine Verringerung des drei Stunden-Gedächtnisses lässt sich so allerdings nicht erklären, denn bei dem drei Stunden-Gedächtnis handelt es sich nicht um ein energieaufwendiges, weil proteinsyntheseabhängiges Langzeitgedächtnis (Friedrich et al. 2004). (4) Die vierte Hypothese, ist die, dass die Effekte auf das Gedächtnis, denen der Zuckersensitivität entsprechen: Die Hemmung der Oktopaminwirkung durch Injektion des Oktopaminrezeptorantagonisten Epinastin, verringert die Antwort auf Zucker (Zuckersensitivitätsexperimente, S. 43, Abb. 8 und S. 44, Abb. 9) und auf den erlernten Duft (Lernexperimente S. 67, Abb. 23; S. 71, Abb. 25; S. 74; Abb. 27; S. 77; Abb. 28). Die Antwort auf den Zucker ist nachweislich reduziert, weil die Metabolismus-Rate möglicherweise gesenkt ist, die Tiere haben weniger Hunger (S. 58, Abb. 18), um ein längeres Überleben zu sichern. Aufgrund der gesenkten Metabolismus-Rate und den daraus resultierenden Effekten kommt es auch beim Gedächtnisabruf zu einer verringerten Antwort auf den erlernten Duft, denn dieser wurde mit der Zuckerbelohnung (unkonditionierter Stimulus, US) assoziiert. Diese Hypothese erklärt sowohl die Ergebnisse der drei Stunden-Abfrage als auch die der 24 Stunden-Abfrage, denn ich habe gezeigt, dass der Effekt von Epinastin auf die Zuckersensitivität 48 Stunden anhält. Aus diesem Grund erscheint mir diese Argumentation als die treffendsten.

In anderen Experimenten ist gezeigt worden, dass Oktopamin eine modulierende Funktion übernimmt (Kaczer und Maldonado 2009; Schwärzel et al. 2003; Unoki et al. 2006; Mizunami et al. 2009). Appetitive Duftkonditionierung jedoch ist in *Drosophila* nur mit



PAM-Dopaminneuronen möglich (Liu et al. 2012). Die Signalwege von Oktopamin und Dopamin interagieren, wobei die PAM-Dopaminneurone im Signalweg der Oktopaminneuronen nachgeschaltet sind. Durch die Stimulation von Oktopamin konnte ein appetitives Gedächtnis geformt werden, aber nur dann, wenn das Dopaminsystem funktionstüchtig war (Liu et al. 2012; Burke et al. 2012). Die Paarung von Duft und aktivierten PAM-Dopaminneuronen führt zu einem langanhaltenden appetitiven Gedächtnis, auch wenn kein Oktopamin vorhanden ist. Das Blocken der PAM-Dopaminneurone verhindert jedoch appetitives Lernen mit süßen Zuckern die keinen Nährwert haben (Burke et al. 2012), jedoch nicht das appetitive Lernen mit Zuckern, die einen Nährwert aufweisen (Burke et al. 2012; Liu et al. 2012). Oktopamin eher eine wichtige Rolle bei der Wahrnehmung von Zuckern spielt. Es scheint die Wahrnehmung der Süße des Zuckers und nicht die kalorische Wertigkeit und dadurch die Wertigkeit der Belohnung zu modulieren. Einige der Oktopaminsignale scheinen den Hungerzustand zu modulieren und dadurch das Level an Belohnung zu verändern (Burke et al. 2012; Liu et al. 2012). Wenn Oktopamin die Metabolismus-Rate der Tiere verändert und damit die Wertigkeit eines Zuckers und die Motivation, dann erklärt es, warum Bienen weniger auf den CS reagieren.

Für die Extinktion und die Gedächtnisabfrage 24 Stunden nach der Extinktion gilt das gleiche. Auf Grund der verringerten Metabolismusrate und den Effekten, die sie nach sich zieht, kommt es zu einer verringerten Reaktion der Bienen auf den CS. Da ein Effekt von Oktopamin sowohl in der extinguierten, als auch in der nicht-extinguierten Gruppe zu beobachten ist, wirkt Oktopamin auf den Gedächtnisabruf, unabhängig von der Extinktion. Dieses Ergebnis deutet darauf hin, dass Oktopamin keine Rolle beim Lernen, sondern vielmehr beim Gedächtnisabruf spielt.

## 6.5 OKTOPAMIN MODULIERT LERNEN DUFTSPEZIFISCH

Während der Konditionierung mit Nelkenöl als konditionierten Stimulus (CS) hat der Oktopaminrezeptorantagonist Epinastin keine Effekte auf die Lernkurve. (S. 71, Abb. 25). Vergleicht man jedoch die Lernkurven von Tieren, die mit Epinastin behandelt wurden und entweder mit Hexanol oder Nelke als CS konditioniert wurden, ist ein signifikanter Unterschied bei der dritten CS-US Paarung zu beobachten: Tiere, die mit Nelke konditioniert wurden, haben eine höhere Antwortrate, als die Tiere, die mit Hexanol konditioniert wurden. Oktopamin scheint hier duftspezifisch zu modulieren. Epinastin beeinflusst möglicherweise die Bedeutung der Assozierbarkeit (Rescorla und Wagner 1972) in Abhängigkeit der Düfte. Da Nelke ein komplexer Duft ist, ist er möglicherweise attraktiver für Bienen, die normalerweise komplexe Blütendüfte erlernen.

Bienen, die mit Oktopamin behandelt wurden, können besser zwischen stockeigenen und stockfremden Arbeiterinnen unterscheiden (Roeder 1999). Diese Fähigkeit beruht auf olfaktorischen Reizen. Ebenso hat Oktopamin einen Einfluss auf die Wahrnehmung des Bruthormons (Barron et al. 2002). Epinastin führt zu einer Reduktion in Sensillen auf der Antenne von Bienen (Haupt 2005). Die Wahrnehmung bestimmter Düfte wird entweder durch Oktopamin abgeschwächt (Zhukovskaya 2008) oder verstärkt (Vander Meer, Robert K. et al. 2008). Auch in den vorliegenden Experimenten konnte die Wahrnehmung von Hexanol durch Epinastin verändert werden. Dies könnte der Grund für Unterschiede in den Lernkurven sein.

Bienen, die mit Hexanol konditioniert wurden, reagieren signifikant stärker auf den unbekanntes Nelkenduft als Tiere, die mit Nelke konditioniert wurden auf Hexanol. (S. 85; Abb. 30C). Möglicherweise kommt es zu leichten Generalisierungseffekte (Ghirlanda und Enquist 2003; Smith 1991). Generalisierung kann auftreten, wenn der unbekanntes Stimulus die gleichen räumlichen und/oder zeitlichen Bereiche im Gehirn aktiviert, die durch den CS aktiviert werden (Pearce 1987).

Die Reaktion auf den unbekanntes Duft während der 24 Stunden-Abfrage unterscheidet sich signifikant: Die hungrigen PBS-Kontrollbienen, die mit Hexanol konditioniert wurden, reagieren auf den unbekanntes Nelkenduft signifikant mehr, als Bienen, die mit Nelkenöl konditioniert wurden und mit Hexanol als unbekanntes Duft abgefragt werden. Interessanterweise ist eben dieser Generalisierungseffekt durch die Injektion von Epinastin

vor der Konditionierung aufgehoben: Hexanol-konditionierte, Epinastin-injizierte Tiere reagieren während der Abfrage signifikant weniger als die Nelkenöl-konditionierten Tiere. Bei der Reaktion auf den unbekanntes Duft sind keine Unterschiede zwischen Hexanol und Nelke zu finden. Daraus lässt sich schließen, dass Oktopamin duftspezifisch Generalisierungseffekte unterbindet.

Selbige Phänomene lassen sich für die satten Tiere finden (S. 85, Abb. 30D): Satte, PBS-injizierte Tiere reagieren auf den gelernten Duft signifikant mehr als auf den unbekanntes Duft und insgesamt mehr auf Nelkenduft. Werden satte Tiere mit Epinastin injiziert, reagieren die Tiere auf den gelernten Duft mehr als auf den neuen Duft. Epinastin sorgt jedoch dafür, dass es insgesamt keine signifikanten Unterschiede zwischen den beiden ungelerten Düften gibt.

Tyramin hat auf die Konditionierung, das Extinktionslernen und den 24- und 48-Stunden Gedächtnisabruf keinen Einfluss. Die Hemmung des Tyraminrezeptors durch die Injektion von Yohimbin hat jedoch einen Einfluss auf das drei-Stunden Gedächtnis. Während die Hemmung von Oktopamin die drei Stunden Gedächtnisabfrage in hungrigen Bienen erniedrigt, erhöht das die Hemmung von Tyramin die drei Stunden Gedächtnisabfrage in satten Bienen. Die Hemmung von Oktopamin verringert auch die Rüsselantwort hungriger Bienen (Seite 43, Abb. 8). Die Hemmung von Oktopamin hat also auf das Gedächtnis für eine Duft-Zucker-Assoziation den gleichen Effekt wie auf die Zuckersensitivität. Die Hemmung von Tyramin hat keinen Effekt auf das drei Stunden Gedächtnis in hungrigen Tieren. Überraschend ist jedoch, dass die Hemmung von Tyramin die drei Stunden Gedächtnisabfrage in satten Bienen erhöht. Denn die Hemmung von Tyramin verringert die Rüsselantwort satter Bienen (Seite 46, Abb. 11). Tyramin scheint also auf das drei Stunden Gedächtnis eine andere Wirkung zu haben, als auf die Zuckersensitivität.

Hier könnte es sich um eine antagonistische Wirkung von Oktopamin und Tyramin auf Generalisierungseffekte handeln. Während die Hemmung von Oktopamin durch Injektion des Oktopaminrezeptorantagonisten Epinastin Generalisierungseffekte zu verringern scheint, ist es möglich das Tyramin Generalisierungseffekte erhöht. In weiteren Studien sollten Lernexperimente mit zwei Düften und Abfragen mit dem erlernten und einem unbekanntes Duft unter Blockade der Tyraminrezeptoren durch Yohimbininjektion durchgeführt werden um diese Hypothese zu überprüfen.

## 6.6 DURCH ÄNDERUNGEN DES OKTOPAMINSPIEGELS ÜBER DAS JAHR HAT EPINASTIN EINEN SCHWANKENDEN EFFEKT

Die Reaktion der satten Tiere während der Konditionierung, ist sehr niedrig oder sogar gar nicht vorhanden. Vierundzwanzig Stunden nach der Konditionierung, reagieren die Tiere jedoch auf den präsentierten Duft. Satte Bienen sind also in der Lage einen Duft zu lernen, auch wenn sie in keine Reaktion während der Akquisition aufweisen.

Tiere, die 30 Minuten vor der Extinktion satt gefüttert wurden, haben eine niedrige Extinktionskurve, d. h. es reagieren wenige Bienen auf den präsentierten Duft. In der Abfrage, 24 Stunden nach der Extinktion, reagiert dann aber wieder ein Teil der Tiere. Die Extinktion wird durch Epinastin beeinflusst. Die Kurven sind bei hungrigen und auch bei satten Tieren niedriger. Es reagieren weniger Tiere auf den CS. Die Reaktionen, 24 Stunden nach der Extinktion, sind in den beiden Extinktionsexperimenten unterschiedlich. In dem Experiment, in dem nur hungrige Bienen untersucht wurden, sind, in der Abfrage nach 24 Stunden, signifikante Unterschiede zwischen Epinastin-injizierten Tieren und der Kontrolle vorhanden. Die Tiere, die mit Epinastin injiziert wurden, reagieren in dem Test weniger, sowohl die Tiere, die extingiert wurden, als auch die Tiere, die nicht extingiert wurden. In dem Experiment, in dem hungrige und satte Bienen untersucht wurden, sind in keiner Gruppe signifikante Unterschiede zwischen Epinastin und PBS zu finden.

Der schwankende Effekt von Epinastin könnte auf Schwankungen des Oktopamingehalts zurückzuführen sein. Ältere Bienen besitzen einen höheren Gehalt an Oktopamin (Wagner-Hulme et al. 1999; Harris und Woodring 1992; Taylor et al. 1992; Bloch 2002) und es gibt jahreszeitliche Schwankungen (Harris und Woodring 1992). Laut Harris und Woodring (1992) ist der Oktopamingehalt im Bienengehirn von Juni bis August am höchsten, im April und Mai und Oktober und November am niedrigsten. Die Versuche, in denen Epinastininjektion einen Einfluss auf die Abfrage hat, sind im Frühling bzw. Frühsommer gemacht worden. Die Experimente, in denen Epinastininjektion keinen Einfluss auf die Abfrage hat, sind im Spätsommer bzw. Herbst durchgeführt worden.

Im Frühjahr beginnt die Königin nach der Winterruhe zu brüten. Daher handelt es sich bei den Bienen im Stock zu dieser Jahreszeit vorwiegend um junge Bienen. Der Oktopamingehalt bei ihnen ist niedriger als bei älteren Tieren (Bloch 2002; Wagner-Hulme et al. 1999; Harris und

Woodring 1992; Taylor et al. 1992; Schulz und Robinson 2001). Eine weitere Verringerung des Oktopamingehalts durch die Injektion eines Oktopaminrezeptorantagonisten führt möglicherweise zu einer stärkeren Verringerung der Metabolismusrate, als bei Bienen, die im Spätsommer gefangen wurden, die älter sind und somit mehr Oktopamin besitzen (Bloch 2002; Wagner-Hulme et al. 1999; Harris und Woodring 1992; Taylor et al. 1992; Schulz und Robinson 2001). Im Frühjahr ist der Bienenstock auch leerer als im Spätsommer. Die Bienen müssen zu Beginn ihrer Saison zunächst die Vorräte, die sie im Winter verbraucht haben, wieder auffüllen. Der Mangel an Nahrung im Stock könnte möglicherweise mit dem hungrigen Zustand der Bienen in meinen Experimenten vergleichbar sein. Damit hätten Bienen im Frühsommer, zusätzlich zu dem Einfluss des Alters, einen niedrigeren Gehirnoktopamingehalt. Durch diese Effekte sind die Schwankungen der Epinastinwirkung in meinen Experimenten zu erklären.

In meiner Arbeit habe ich den Einfluss biogener Amine auf die Zuckersensitivität, das Überleben, die aufgenommene Futtermenge und Lernen und Gedächtnis in der Honigbiene, *Apis mellifera*, untersucht. Ich habe gezeigt, dass Oktopamin und Tyramin in Abhängigkeit ihres Futterzustandes mit dem Herausstrecken ihres Rüssels auf eine Zuckerstimulation ihrer Antennen reagieren. Dopamin ist an der Modulation dieses Verhaltens nicht beteiligt. Oktopamin beeinflusst die aufgenommene Nahrung, das Überleben und in Abhängigkeit von dem zu lernendem Duft, das Lernen. Die Extinktion und der Abrufs des Extinktionsgedächtnisses entsprechen dem der Zuckersensitivität: Bienen reagieren mit einer niedrigeren PER-Rate. Der Oktopamin- und Tyramingehalt im Gehirn der Tiere ist im satten Zustand erhöht. Ich schließe aus meinen Experimenten, dass Oktopamin den Metabolismus der Tiere beeinflusst und dadurch zu den weiteren beschriebenen Effekten führt.

## 7 ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abbildung 1:	Darstellung der Oktopamincluster im Bienengehirn, nach Sinakevitch et al. 2005.....	25
Abbildung 2:	Zeitliche Abfolge eines Konditionierungsdurchgangs.....	27
Abbildung 3:	Sterberaten der Tiere, die mit den Rezeptorantagonisten der biogenen Amine Oktopamin, Tyramin und Dopamin injiziert wurden.....	35
Abbildung 4:	Sterberaten der Tiere, die mit den biogenen Aminen Oktopamin und Dopamin oder ihren Agonisten injiziert wurden.....	36
Abbildung 5:	Mehrfache Stimulation der Antennen mit Zuckerlösung führt nicht zur Habituation.....	39
Abbildung 6:	Oktopamininjektion hat keinen Effekt auf den PER.....	40
Abbildung 7:	Die Injektion des Oktopaminrezeptorantagonisten Chlordimeform hat keinen Effekt auf den PER.....	41
Abbildung 8:	Der Oktopaminrezeptorantagonist Epinastin verringert den PER in hungrigen Bienen.....	42
Abbildung 9:	Der Effekt des Oktopaminrezeptorantagonisten Epinastin hält für mindestens 48 Stunden nach der Injektion an.....	43
Abbildung 10:	Der Dopaminantagonist Fluphenazin hat keinen Effekt auf den PER.....	44
Abbildung 11:	Der Tyraminrezeptorantagonist Yohimbin verringert den PER bei satten Tieren.....	45
Abbildung 12:	Die systemische Injektion von $\alpha$ -Methyl-p-Tyrosin (AMT) verringert den PER in hungrigen Bienen.....	47
Abbildung 13:	Oktopamin, aber nicht Dopamin, führt zu einer Rettung des AMT-Effekts.....	49
Abbildung 14:	Oktopamin-injizierte Bienen sterben früher als Epinastin-injizierte Bienen.....	52
Abbildung 15:	Die Injektion von Chlordimeform hat keinen Einfluss auf das Überleben der Bienen.....	53
Abbildung 16:	Oktopamin-injizierte Tiere sterben, wenn sie zwei Stunden nach der Injektion satt gefüttert werden, nicht mehr vor den Kontrolltieren.....	54
Abbildung 17:	Der Oktopaminrezeptorantagonist Chlordimeform hat keinen Einfluss auf das Überleben.....	55
Abbildung 18:	Tiere, die mit Epinastin injiziert wurden, nehmen weniger Zuckerlösung zu sich.....	57
Abbildung 19:	Mechanisch gereizte Bienen.....	59
Abbildung 20:	Hungrige Bienen.....	60
Abbildung 21:	Satte Bienen.....	61
Abbildung 22:	Oktopamin- und Tyramingehalt im Bienengehirn.....	64
Abbildung 23:	Oktopamin beeinflusst das 3-Stunden Gedächtnis.....	66
Abbildung 24:	Tyramin beeinflusst das 3-Stunden Gedächtnis in satten Tieren.....	67

---

Abbildung 25: Oktopamin hat keinen Einfluss auf die Konditionierung, aber auf das 24 Stunden Gedächtnis.....	70
Abbildung 26: Tyramin hat keinen Einfluss auf die Konditionierung oder das 24 Stunden Gedächtnis.....	71
Abbildung 27: In hungrigen Tieren beeinflusst Oktopamin die Antwort der Bienen bei der Extinktion und dem Gedächtnisabruf.....	73
Abbildung 28: Oktopamin hat einen Einfluss auf die Extinktion, nicht aber auf den 48-Stunden Gedächtnisabruf. ....	76
Abbildung 29: Tyramin hat keinen Einfluss auf die Extinktion oder den Gedächtnisabruf. ....	78
Abbildung 30: Oktopamin hat einen Einfluss auf die Konditionierung in Abhängigkeit des Dufts.....	84

## 8 TABELLENVERZEICHNIS

Tabelle 1: Genutzte Pharmaka, Konzentrationen und Versuchszeitraum .....	17
Tabelle 2: An den Experimenten beteiligte Personen und Versuchszeiträume.....	19
Tabelle 3: Identifizierte Oktopamin- und Tyramincluster und ihre Färbungen in Abhängigkeit der Behandlung der Tiere .....	62
Tabelle 4: Statistik der Gruppen mit unterschiedlicher Duftreihenfolge während des Gedächtnistests.....	82



## 9 LITERATURVERZEICHNIS

- Abdoun, K.; Messnier-Sabin, M.; Baudry-Partiaglou, N.; Nicolas, P.; Chohen, P. (1995): Separation of oviposition stimulating peptides and myotropic factors from head extracts of *Galleria mellonella* L: Comparative effects of myotropic and non-myotropic factory on egg-laying. In: *Journal of Chromatography B* 165, S. 102–109.
- Abel, Ted; Nguyen, Peter V.; Barad, Mark; Deuel, Thomas A.S; Kandel, Eric R.; Bourtchouladze, Roussoudan (1997): Genetic Demonstration of a Role for PKA in the Late Phase of LTP and in Hippocampus-Based Long-Term Memory. In: *Cell* 88 (5), S. 615–626.
- Abizaid, Alfonso; Horvath, Tamas L. (2008): Brain circuits regulating energy homeostasis. In: *Regulatory Peptides* 149 (1-3), S. 3–10.
- Alberini, Cristina M. (2008): The role of protein synthesis during the labile phases of memory: revisiting the skepticism. In: *Neurobiol Learn Mem* 89 (3), S. 234–246.
- Barron, Andrew B.; Maleszka, Joanna; Vander Meer, Robert K.; Robinson, Gene E.; Maleszka, Ryszard (2007): Comparing injection, feeding and topical application methods for treatment of honeybees with octopamine. In: *Journal of Insect Physiology* 53, S. 187–194.
- Barron, Andrew B.; Schulz, David J.; Robinson, Gene E. (2002): Octopamine modulates responsiveness to foraging-related stimuli in honey bees (*Apis mellifera*). In: *J Comp Physiol A* 188 (8), S. 603–610.
- Barton Brown, L. (1980): Regulatory mechanisms in insect feeding. In: John Edwin Treherne, Michael J. Berridge und Vincent B. Wigglesworth (Hg.): *Advances in insect physiology*. London: Academic press, S. 1–116.
- Beggs, Kyle T.; Tyndall, Joel D. A.; Mercer, Alison R. (2011): Honey bee dopamine and octopamine receptors linked to intracellular Kalzium signailling have a close phylogenetic and pharmacological relationship. In: *PLoS ONE* 6 (11), S. 1–10.
- Behrends, Andreas; Scheiner, Ricarda (2012): Octopamine improves learning in newly emerged bees but not in old foragers. In: *The Journal of Experimental Biology* 215, S. 1076–1083.
- Berridge, Kent C. (2012): From prediction error to incentive salience: mesolimbic computation of reward motivation. In: *Eur. J. Neurosci.* 35 (7), S. 1124–1143.

- Bicker, Gerd; Menzel, Randolph (1989): Chemical codes for the control of behaviour in arthropods. In: *Nature* 337 (5), S. 33–39.
- Bittermann, M. E.; Menzel, Randolph; Fietz, A.; Schäfer, S. (1983): Classical conditioning of proboscis extension in honeybees (*Apis mellifera*). In: *J Comp Physiol A* 97, S. 107–119.
- Blatt, J.; Roces, F. (2001): Haemolymph sugar levels in foraging honeybees (*Apis mellifera carnica*): Dependence on metabolic rate and in vivo measurement of maximal rates of trehalose synthesis. In: *Journal of Experimental Biology* 204 (15), S. 2709–2716.
- Blatt, J.; Roces, F. (2002): The control of the proventriculus in the honeybee (*Apis mellifera carnica* L.) II. Feedback mechanisms. In: *Journal of Insect Physiology* 48 (7), S. 683–691.
- Blenau, Wolfgang; Baumann, Arnd (2003): Aminergic signal transduction in invertebrates: Focus on tyramine and octopamine receptors. In: *Recent research developments in neurochemistry* 6, S. 225–240.
- Bloch, Guy (2002): Endocrine influences on the organization of insect societies. In: Donald W. Pfaff (Hg.): *Hormones, brain, and behavior*. Amsterdam, Boston: Academic press, S. 195–235.
- Blumenthal, Edward M. (2002): Regulation of chloride permeability by endogenously produced tyramine in the *Drosophila* Malpighian tubule. In: *American Journal of Physiology - Cell Physiology* 284, S. 718–728.
- Bouton, Mark E.; Moody, Erik W. (2004): Memory processes in classical conditioning. In: *Neuroscience & Biobehavioral Reviews* 28 (7), S. 663–674.
- Braun, Götz; Bicker, Gerd (1992): Habituation of an appetitive reflex in the honeybee. In: *Journal of Neurobiology* 67 (3), S. 588–598.
- Brembs, Björn; Christiansen, F.; Pflüger, Hans-Joachim; Duch, C. (2007): Flight initiation and maintenance deficits in flies with genetically altered biogenic amine levels. In: *Journal of Neuroscience* 27 (41), S. 11122–11131.
- Brookhart, Gary L.; Edgecomb, Robert S.; Murdock, Larry L. (1987): Amphetamine and reserpine deplete brain biogenic amines and alter blow flies feeding behavior. In: *Journal of Neurochemistry* 48 (4), S. 1307–1315.

Burke, Christopher J.; Oswald, David; Perisse, Emmanuel; Krashes, Michael J.; Das, Gaurav; Gohl, Daryl et al. (2012): Layered reward signalling through octopamine and dopamine in *Drosophila*. In: *Nature* 492 (7429), S. 433–437.

Burke, Christopher J.; Waddell, Scott (2011): Remembering nutrient quality of sugar in *Drosophila*. In: *Current Biology* 21, S. 746–750.

Chen, Yi-Ling; Hung, Yu-Shan; Yang, En-Cheng (2008): Biogenic amine levels change in the brain of stressed honeybee. In: *Archives of Insect Biochemistry and Physiology* 68, S. 241–250.

Couvillon, M. J. (2012): The dance legacy of Karl von Frisch. In: *Insect. Soc.* 59 (3), S. 297–306.

Cowan, W. Maxwell; Südhof, Thomas C.; Stevens, Charles F. (2001): Synapses. Baltimore: Johns Hopkins University Press.

Crailsheim, Karl (1988): Intestinal transport of sugars in the honeybee (*Apis mellifera* L.). In: *Journal of Insect Physiology* 34 (9), S. 839–845.

Davenport, Anthony P.; Evans, Peter D. (1984a): Changes in haemolymph octopamine levels associated with food deprivation in the locust, *Schistocerca gregaria*. In: *Physiol Entomol* 9 (3), S. 269–274.

Davenport, Anthony P.; Evans, Peter D. (1984b): Stress-induced changes in the octopamine levels of insect hemolymph. In: *Insect Biochemistry* 14 (2), S. 135–143.

Davis, H. P.; Squire, L. R. (1984): Protein synthesis and memory: A review. In: *American Psychological Association* 96 (3), S. 518–559.

Dethier, V. G. (1976): The hungry fly: A physiological study of the behavior associated with feeding. Oxford: Harvard U Press.

Downer, Roger G.H. (1979): Trehalose production in isolated fat body of the american cockroach, *Periplaneta americana*. In: *Comp. Biochem. Physiol.* 62, S. 31–34.

Downer, Roger G.H.; Hiripi, László; Juhos, Szilvester (1993): Characterization of the tyraminergetic system in the central nervous system of the locust, *Locusta migratoria migratoides*. In: *Neurochem Res* 18 (12), S. 1245–1248.

- Dudai, Yadin (2004): Memory from A to Z. Keywords, concepts, and beyond. Oxford: Oxford University Press.
- Evans, Peter D. (1980): Biogenic amines in the insect nervous system. In: Michael J. Berridge, John Edwin Treherne und Vincent B. Wigglesworth (Hg.): Advances in insect physiology. London: Academic press, S. 317–437.
- Evans, Peter D. (1985): Octopamine. In: Gerald A. Kerkut und L. I. Gilbert (Hg.): Comprehensive insect physiology, biochemistry and pharmacology. Oxford, Paris [etc.]: Pergamon, S. 499–530.
- Even, Naïla; Devaud, Jean-Marc; Barron, Andrew (2012): General Stress Responses in the Honey Bee. In: *Insects* 3 (4), S. 1271–1298.
- Farhadian, Shelli F.; Suárez-Fariñas, Mayte; Cho, Christine E.; Pellegrino, Maurizio; Vosshall, Leslie B. (2012): Post-fasting olfactory, transcriptional, and feeding responses in *Drosophila*. In: *Physiology & Behavior* 105 (2), S. 544–553.
- Farina, Walter M.; Grüter, Christoph; Arenas, Andrés (2012): Olfactory information transfers during recruitment in honey bees. In: C. Giovanni Galizia, Dorothea Eisenhardt und Martin Giurfa (Hg.): Honeybee Neurobiology and Behavior. A Tribute to Randolph Menzel. Dordrecht: Springer Science+Business Media B.V, S. 89–101.
- Farooqui, Tahira (2012): A potential link among biogenic amines-based pesticides, learning and memory, and colony collapse disorder: A unique hypothesis. In: *Neurochemistry International* 62 (1), S. 122–136.
- Felsenberg, Johannes; Gehring, Katrin B.; Antemann, Victoria; Eisenhardt, Dorothea (2011): Behavioural pharmacology in classical conditioning of the proboscis extension response in Honeybees (*Apis mellifera*). In: *Journal of Visualized Experiments* (47).
- Folkers, E.; Drain, P.; Quinn, W. G. (1993): Radish, a *Drosophila* mutant deficient in consolidated memory. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 90 (17), S. 8123–8127.
- Friedrich, Anke; Thomas, Ulf; Müller, Uli (2004): Learning at different satiation levels reveals parallel functions for the cAMP-protein kinase A cascade in formation of long-term memory. In: *The Journal of Neuroscience* 24 (18), S. 4460–4468.

Fujita, Michiko; Tanimura, Teiichi (2011): *Drosophila* evaluates and learns the nutritional value of sugars. In: *Curr. Biol.* 21 (9), S. 751–755.

Fussnecker, Brendon L.; Smith, Brian H.; Mustard, Julie A. (2006): Octopamine and tyramine influence the behavioral profile of locomotor activity in the honey bee (*Apis mellifera*). In: *Journal of Insect Physiology* 52 (10), S. 1083–1092.

Genschel, Ulrike; Becker, Claudia (2005): *Schliessende Statistik. Grundlegende Methoden*. Berlin: Springer.

Ghirlanda, Stefano; Enquist, Magnus (2003): A century of generalization. In: *Animal Behaviour* 66 (1), S. 15–36.

Giurfa, Martin; Sandoz, Jean-Christophe (2012): Invertebrate learning and memory: Fifty years of olfactory conditioning of the proboscis extension response in honeybees. In: *Learn. Mem.* 19 (2), S. 54–66.

Grünbaum, Lore; Müller, Uli (1998): Induction of a specific olfactory memory leads to a long-lasting activation of protein kinase C in the antennal lobe of the honeybee. In: *The Journal of Neuroscience* 18 (11), S. 4384–4392.

Hammer, Martin; Menzel, Randolph (1995): Learning and memory in the honeybee. In: *The Journal of Neuroscience* 15 (3), S. 1617–1630.

Hammer, Martin; Menzel, Randolph (1998): Multiple sites of associative odor learning revealed by local brain microinjections of octopamine in honeybees. In: *Learning & Memory* 5, S. 146–156.

Harris, Jeffrey W.; Woodring, Joseph (1992): Effects of stress, age, season, and source colony on levels of octopamine, dopamine and serotonin in the honey bee (*Apis mellifera* L.) brain. In: *Journal of Insect Physiology* 38 (1), S. 29–35.

Haupt, Stephan Shuichi (2005): *Das gustatorische System und antennales Lernen in der Honigbiene (Apis mellifera)*. Dissertation. Technische Universität Berlin, Berlin. Fakultät VI.

Hergarden, A. C.; Tayler, T. D.; Anderson, D. J. (2012): Allatostatin-A neurons inhibit feeding behavior in adult *Drosophila*. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences* 109 (10), S. 3967–3972.

Hirashima, A.; Suetsugu, S.; Hirokado, S.; Kuwano, E.; Taniguchi, E.; Eto, Morifusa (1999): Effect of octopamine on the activity of juvenile hormone esterase in the silkworm *Bombyx mori* and red flour beetle *Tribolium freemani*. In: *General and Comparative Endocrinology* 116, S. 373–381.

Hirashima, A.; Ueno, R.; Eto, Morifusa (1992): Effects of various stressor on larval growth and whole body octopamine levels of *Tribolium castaneum*. In: *Pesticide Biochemistry and Physiology* 44, S. 1242–1249.

Hirashima, Akinori; Eto, Morifusa (1993): Effect of stress on levels of octopamine, dopamine and serotonin in the american cockroach (*Periplaneta americana* L.). In: *Comp. Biochem. Physiol.* 105 (2), S. 279–284.

Hiripi, László; Juhos, Szilvester; Downer, Roger G.H. (1994): Characterization of tyramine and octopamine receptors in the insect (*Locusta migratoria migratorioides*) brain. In: *Brain Research* 633, S. 119–126.

Horvitz, H. Robert; Chalfie, Martin; Sulston, John E.; Evans, Peter D. (1982): Serotonin and octopamine in the nematode *Caenorhabditis elegans*. In: *Science* 216, S. 1012–1014.

Inagaki, Hidehiko K.; Ben-Tabou de-Leon, Shlomo; Wong, Allan M.; Jagadish, Smitha; Ishimoto, Hiroshi; Barnea, Gilad et al. (2012): Visualizing neuromodulation in vivo: TANGO-mapping of dopamine signaling reveals appetite control of sugar sensing. In: *Cell* 148 (3), S. 583–595.

Kaczer, Laura; Maldonado, Héctor (2009): Contrasting role of octopamine in appetitive and aversive learning in the crab *Chasmagnathus*. In: *PLoS ONE* 4 (7), S. 1–13.

Keene, Alex C.; Waddell, Scott (2007): *Drosophila* olfactory memory: single genes to complex neural circuits. In: *Nat Rev Neurosci* 8 (5), S. 341–354.

Koon, Alex C.; Ashley, James; Barria, Romina; DasGupta, Shamik; Brain, Ruth; Waddell, Scott et al. (2011): Autoregulatory and paracrine control of synaptic and behavioral plasticity by octopaminergic signaling. In: *Nature Neuroscience* 14 (2), S. 190–199.

Krashes, Michael J.; DasGupta, Shamik; Vreede, Andrew; White, Benjamin; Armstrong, J. Douglas; Waddell, Scott (2009): A neuronal circuit mechanism integration motivational state with memory expression in *Drosophila*. In: *Cell* 139 (2).

Krashes, Michael J.; Waddell, Scott (2008): Rapid consolidation to a radish and protein synthesis dependent long-term memory after single-session appetitive olfactory conditioning in *Drosophila*. In: *The Journal of Neuroscience* 28 (12), S. 3103–3113.

Kutsukake, Mayako; Komatsu, Akira; Yamamoto, Daisuke; Ishiwa-Chigusa, Sadao (2000): A tyramine receptor gene mutation causes a defective olfactory behavior in *Drosophila melanogaster*. In: *Gene* 245 (1), S. 31–42.

Kuwabara, M. (1957): Bildung des bedingten Reflexes von Pavlovs Typus bei der Honigbiene, *Apis mellifica*. In: *J. Fac Sci Hokkaido Univ Ser VI Zool* 13, S. 458–464.

Lange, Angela B. (2009): Tyramine: From octopamine precursor to neuroactive chemical in insects. In: *General and Comparative Endocrinology* 162, S. 18–26.

Lee, Hyun-Gwan; Seong, Chang-Soo; Kim, Young-Cho; Davis, Ronald L.; Han, Kyung-An (2003): Octopamine receptor OAMB is required for ovulation in *Drosophila melanogaster*. In: *Developmental Biology* 264 (1), S. 179–190.

Liu, Chang; Plaçais, Pierre-Yves; Yamagata, Nobuhiro; Pfeiffer, Barret D.; Aso, Yoshinori; Friedrich, Anja B. et al. (2012): A subset of dopamine neurons signals reward for odour memory in *Drosophila*. In: *Nature* 488 (7412), S. 512–516.

Long, Thomas F.; Murdock, Larry L. (1983): Stimulation of blowfly feeding behavior by octopaminergic drugs. In: *Neurobiology* 80, S. 4159–4163.

Lu, Chengbiao; Mattson, Mark P. (2001): Dimethyl Sulfoxide Suppresses NMDA- and AMPA-Induced Ion Currents and Kalzium Influx and Protects against Excitotoxic Death in Hippocampal Neurons. In: *Experimental Neurology* 170 (1), S. 180–185.

Lunney, Gerald H. (1970): Using Analysis of Variance with dichotomous dependent variable: An empirical study. In: *Journal of Educational Measurement* 7 (4), S. 263–269.

Menzel, Randolph (1990): Learning, memory and "cognition" in honey bees. In: Raymond P. Kesner und David S. Olton (Hg.): *Neurobiology of comparative cognition*. Hillsdale, N.J.: L. Erlbaum Associates (Comparative cognition and neuroscience), S. 237–292.

Menzel, Randolph (2012): The honeybee as a model for understanding the basis of cognition. In: *Nat. Rev. Neurosci.* 13 (11), S. 758–768.

- Menzel, Randolph; Heye, Andrea; Kinzel, Cordula; Gerber, Bertram; Fiala, André (1999): Pharmacological dissociation between the reinforcing, sensitizing, and response-releasing functions of reward in honeybee classical conditioning. In: *Behavioral Neuroscience* 113 (4), S. 744–754.
- Menzel, Randolph; Manz, Gisela; Greggers, Uwe (2001): Massed and spaced learning in honeybees: The role of CS, US, the intertrial interval, and the test interval. In: *Learn. Mem.* 8 (4), S. 198–208.
- Menzel, Randolph; Wittstock, S.; Sugawa, M. (1990): Chemical codes of learning in honey bees. In: Larry R. Squire und E. Lindenlaub (Hg.): *The Biology of memory*. Symposium Bernried, Germany, October 15th-19th, 1989. Stuttgart, New York: F.K. Schattauer (Symposia medica Hoechst, 23), S. 335–360.
- Mery, Frederic; Kawecki, Tadeusz (2005): A Cost of Long-Term Memory in *Drosophila*. In: *Science* 308 (5725), S. 1148.
- Mizunami, Makoto; Unoki, Sae; Mori, Yashuhiro; Hirashima, Daisuke; Hatano, Ai; Matsumoto, Yukihiisa (2009): Roles of octopaminergic and dopaminergic neurons in appetitive and aversive memory recall in an insect. In: *BMC Biology* 7 (46), S. 1–16.
- Müller, Uli (1996): Inhibition of Nitric Oxide Synthase Impairs a Distinct Form of Long-Term Memory in the Honeybee, *Apis mellifera*. In: *Neuron* 16 (3), S. 541–549.
- Müller, Uli (2000): Prolonged Activation of cAMP-Dependent Protein Kinase during Conditioning Induces Long-Term Memory in Honeybees. In: *Neuron* 27 (1), S. 159–168.
- Mustard, Julie A.; Blenau, Wolfgang; Hamilton, Ingrid S.; Ward, Vernon K.; Ebert, Paul R.; Mercer, Alison R. (2003): Analysis of two D1-like receptors from the honey bee *Apis mellifera* reveals agonist-independent activity. In: *Molecular Brain Research* 113, S. 67–77.
- Nagaya, Yuki; Kutsukake, Mayako; Chigusa, Sadao I.; Komatsu, Akira (2002): A trace amine, tyramine, functions as a neuromodulator in *Drosophila melanogaster*. In: *Neuroscience Letters* 329 (3), S. 324–328.
- Neckameyer, Wendi S.; Leal, Sandra M. (2009): Biogenic amines as circulating hormones in insects. In: Donald W. Pfaff (Hg.): *Hormones, brain, and behavior*. 2. Aufl. Amsterdam, Boston: Elsevier/Academic Press, S. 967–1002.



- Nilsson, J. R. (1980): Effects of dimethyl sulphoxide on ATP content and protein synthesis in *Tetrahymena*. In: *Protoplasma* 103 (2), S. 189–200.
- Orchard, I.; Carlisle, J. A.; Loughton, B. G.; Gole, J.W.D.; Downer, R.G.H. (1982): In vitro studies on the effects of octopamine on locust fat body. In: *General and Comparative Endocrinology* 48 (1), S. 7–13.
- Osborne, Richard H. (1996): Insect neurotransmission: Neurotransmitters and their receptors. In: *Pharmacology & Therapeutics* 69 (2), S. 117–142.
- O'Shea, Michael; Evans, Peter D. (1979): Potentiation of neuromuscular transmission by octopaminergic neurone in the Locust. In: *The Journal of Experimental Biology* 79, S. 169–190.
- Pankiw, Tanya; Page, Robert E. (2000): Response thresholds to sucrose predict foraging division of labor in honeybees. In: *Behavioral Ecology Sociobiology* 47, S. 265–267.
- Panzenböck, Ute; Crailsheim, Karl (1997): Glycogen in honeybee queens, workers and drones (*Apis mellifera carnica* Pollm.). In: *Journal of Insect Physiology* 43 (2), S. 155–165.
- Papaefthimiou, Chrisovalantis; Theophilidis, George (2011): Octopamine- A single modulator with double action on the heart of two insect species (*Apis mellifera macedonica* and *Bactrocera oleae*): Acceleration vs. inhibition. In: *Journal of Insect Physiology* 57, S. 316–325.
- Pavlov, Ivan P. (1927): Conditioned reflexes. Unter Mitarbeit von s. Republ. Mineola, NY: Dover Publ.
- Pearce, John M. (1987): A model for stimulus generalization in Pavlovian conditioning. In: *Psychological Review* 94 (1), S. 61–73.
- Placais, Pierre-Yves; Preat, Thomas (2013): To Favor Survival Under Food Shortage, the Brain Disables Costly Memory. In: *Science* 339 (6118), S. 440–442.
- Ramirez, Jan-Marino; Pearson, Keir G. (1991): Octopamine induces bursting and plateau potentials in insect neurones. In: *Brain Research* 549 (2), S. 332–337.
- Reisner, A. H.; Bucholtz, Carolyn (1977): The in vivo effect of dimethyl sulphoxide (DMSO) on protein synthesis and the polyribosome profile in *Paramecium*. In: *J. Cell. Physiol.* 90 (2), S. 169–177.

- Rescorla, Robert A. (2004): Spontaneous Recovery. In: *Learning & Memory* 11 (5), S. 501–509.
- Rescorla, Robert A.; Wagner, A. R. (1972): A theory of Pavlovian conditioning: Variations in the effectiveness of reinforcement and nonreinforcement. In: A. H. Black und W. F. Prokasy (Hg.): *Classical conditioning, II*. New York: Appleton-Century-Crofts, S. 64–99.
- Roeder, Thomas (1999): Octopamine in invertebrates. In: *Progress in Neurobiology* 59, S. 533–561.
- Roeder, Thomas (2005): Tyramine and octopamine: Ruling behavior and metabolism. In: *Annu. Rev. Entomol.* 50 (1), S. 447–477.
- Saborio, Jose L.; Koch, Gebhard (1973): Reversible inhibition of protein synthesis in HeLa Cells by dimethylsulfoxide. In: *Journal of Biological Chemistry* 249, S. 8343–8347.
- Sandoz, Jean-Christophe; Pham-Delègue, Minh-Hà (2004): Spontaneous recovery after extinction of the conditioned proboscis extension response in the honeybee. In: *Learn. Mem.* 11 (5), S. 586–597.
- Saper, Clifford B.; Chou, Thomas C.; Elmquist, Joel K. (2002): The need to feed. In: *Neuron* 36 (2), S. 199–211.
- Saraswati, Sudipta; Fox, Lyle E.; Soll, David R.; Wu, Chun-Fang (2004): Tyramine and octopamine have opposite effects on the locomotion of *Drosophila* larvae. In: *Journal of Neurobiology* 58 (4), S. 425–441.
- Sawada, Masashi; Sato, Makoto (1975): The effect of dimethyl silfoxide on the neuronal excitability and cholinergic transmission in *Aplysia* ganglion cells. In: *Ann NY Acad Sci* 243 (1 Biological Ac), S. 337–357.
- Scharf, Matthew T.; Woo, Newton H.; Lattal, K. Matthew; Young, Jennie Z.; Nguyen, Peter V.; Abel, Ted (2002): Protein synthesis is required for the enhancement of long-term potentiation and long-term memory by spaced learning. In: *Journal of Neurophysiology* 87, S. 2770–2777.
- Scheiner, Ricarda (2004): Responsiveness to sucrose and habituation if the proboscis extension response in honey bees. In: *Journal of Comparative Physiology A* 190, S. 727–733.

- Scheiner, Ricarda; Plückhahn, Stephanie; Öney, Bahar; Blenau, Wolfgang; Erber, Joachim (2002): Behavioural pharmacology of octopamine, tyramine and dopamine in honey bees. In: *Behavioural Brain Research* 136, S. 545–553.
- Scheunemann, Lisa; Jost, Eva; Richlitzki, Antje; Day, Jonathan P.; Sebastian, Sujith; Thum, Andreas S. et al. (2012): Consolidated and Labile Odor Memory Are Separately Encoded within the *Drosophila* Brain. In: *Journal of Neuroscience* 32 (48), S. 17163–17171.
- Schofield, P. K.; Treherne, John Edwin (1985): Octopamine reduces potassium permeability of the glia that form the insect blood-brain barrier. In: *Brain Research* 360 (1-2), S. 344–348.
- Schofield, P. K.; Treherne, John Edwin (1986): Octopamine sensitivity of the blood-brain barrier of an insect. In: *Journal of Experimental Biology* 123, S. 423–439.
- Schulz, David J.; Robinson, Gene E. (2001): Octopamine influences division of labor in honey bee colonies. In: *Journal of Comparative Physiology A: Sensory, Neural, and Behavioral Physiology* 187 (1), S. 53–61.
- Schulz, David J.; Sullivan, Joseph P.; Robinson, Gene E. (2002): Juvenile hormone and octopamine in the regulation of division of labor in honey bee colonies. In: *Hormones and Behavior* 42, S. 222–231.
- Schwarz, S. (2006): Tyramine modulates electrical properties of *Drosophila* olfactory sensilla and carbon dioxide sensitive neurons express a gustatory receptor. Dissertation. Freie Universität Berlin, Berlin. Neurobiologie.
- Schwärzel, Martin; Monastirioti, Maria; Scholz, Henrike; Friggi-Grelin, Florence; Birman, Serge; Heisenberg, Martin (2003): Dopamine and octopamine differentiate between aversive and appetitive olfactory memories in *Drosophila*. In: *The Journal of Neuroscience* 23 (33), S. 10495–10502.
- Sinakevitch, Irina; Niwa, Mamiko; Strausfeld, Nicholas J. (2005): Octopamine-like immunoreactivity in the honey bee and cockroach: Comparable organization in the brain and subesophageal ganglion. In: *The Journal of Comparative Neurology* 488 (3), S. 233–254.
- Smith, Brian H. (1991): The olfactory memory of the honeybee *Apis mellifera*. Odorant modulation of short- and intermediate-term memory after single-trial conditioning. In: *Journal of Experimental Biology* 161, S. 367–382.

- Sombati, Sompong; Hoyle, Graham (1984): Generation of specific behaviors in a locust by local release into neuropil of the natural neuromodulator octopamine. In: *J. Neurobiol.* 15 (6), S. 481–506.
- Stafford, J. W.; Lynd, K. M.; Jung, A. Y.; Gordon, M. D. (2012): Integration of Taste and Calorie Sensing in *Drosophila*. In: *Journal of Neuroscience* 32 (42), S. 14767–14774.
- Stevenson, Paul A.; Dyakonova, Varya; Rillich, Jan; Schildberger, Klaus (2005): Octopamine and experience-dependent modulation of aggression in crickets. In: *The Journal of Neuroscience* 25 (6), S. 1441.
- Stevenson, Paul A.; Hofman, Hans A.; Schoch, Korinna; Schildberger, Klaus (2000): The fight and flight response of crickets depleted of biogenic amines. In: *Journal of Neurobiology* 43 (2), S. 107–120.
- Stollhoff, Nicola; Menzel, Randolph; Eisenhardt, Dorothea (2005): Spontaneous recovery from extinction depends on the reconsolidation of the acquisition memory in an appetitive learning paradigm in the honeybee (*Apis mellifera*). In: *Journal of Neuroscience* 25 (18), S. 4485–4492.
- Suo, Satoshi; Kimura, Yoshishige; Van Tol, Hubert H. M. (2006): Starvation induces cAMP response element-binding protein-dependent gene expression through octopamin-Gq signaling in *Caenorhabditis elegans*. In: *The Journal of Neuroscience* 26 (40), S. 10082–10090.
- Taylor, D. J.; Robinson, Gene E.; Logan, B. J.; Lavery, R.; Mercer, Alison R. (1992): Changes in brain amine levels associated with the morphological and behavioural development of the worker honeybee. In: *Journal of Comparative Physiology A* 170, S. 715–721.
- Theophilidis, George; Kravari, K. (1994): Dimethylsulfoxide (DMSO) eliminates the response of the sensory neurons of an insect mechanoreceptor, the femoral chordotonal organ of *Locusta migratoria*, but blocks conduction of their sensory axons at much higher concentrations: a possible mechanism of analgesia. In: *Neuroscience Letters* 181, S. 91–94.
- Tully, T.; Bourtchouladze, R.; Scott, R.; Tallman, J. (2003): Targeting the CREB pathway for memory enhancers. In: *Nature reviews. Drug discovery* 2 (4), S. 267–277.

- Unoki, Sae; Matsumoto, Yukihiisa; Mizunami, Makoto (2005): Participation of octopaminergic reward system and dopaminergic punishment system in insect olfactory learning revealed by pharmacological study. In: *European Journal of Neuroscience* 22, S. 1409–1416.
- Unoki, Sae; Matsumoto, Yukihiisa; Mizunami, Makoto (2006): Roles of octopaminergic and dopaminergic neurons in mediating reward and punishment signals in insect visual learning. In: *European Journal of Neuroscience* 24, S. 2031–2038.
- Uzzan, Anat; Dudai, Yadin (1982): Aminergic receptors in *Drosophila melanogaster*: Responsiveness of adenylate cyclase to putative neurotransmitters. In: *Journal of Neurochemistry* 38 (6), S. 1542–1550.
- Vander Meer, Robert K.; Preston, C. A.; Hefetz, A. (2008): Queen regulates biogenic amine level and nestmate recognition in workers of the fire ant, *Solenopsis invicta*. In: *Naturwissenschaften* 95, S. 1155–1158.
- Vergoz, Vanina; Roussel, Edith; Sandoz, Jean-Christophe; Giurfa, Martin (2007): Aversive learning in honeybees revealed by the olfactory conditioning of the sting extension reflex. In: *PLoS ONE* 2 (3), S. e288.
- Wagener-Hulme, C.; Kuehn, J. C.; Schulz, David J.; Robinson, Gene E. (1999): Biogenic amines and division of labor in honey bee colonies. In: *Journal of Comparative Physiology A* 184, S. 471–479.
- Wehner, Rüdiger; Gehring, Walter J.; Kühn, Alfred (1995): Zoologie. 29 Tab. 23., neu bearb. Aufl. Stuttgart, New York: Thieme.
- Wood, Anne T.; Hall, Michael R. (2000): Reversed-phase high-performance liquid chromatography of catecholamines and indoleamines using a simple gradient solvent system and native fluorescence detection. In: *Journal of Chromatography B* 774, S. 221–225.
- Woodring, Joseph; Das, Subrata; Gäde, Gerd (1994): Hypertrehalosemic factors from the corpora cardiaca of the honeybee (*Apis mellifera*) and the paper wasp (*Polistes exclamans*). In: *Journal of Insect Physiology* 40 (8), S. 685–692.
- Wüstenberg, Daniel; Gerber, Bertram; Menzel, Randolph (1998): Long- but not medium-term retention of olfactory memories in honeybees is impaired by actinomycin D and anisomycin. In: *European Journal of Neuroscience* 10, S. 2742–2745.

Zhukovskaya, Marianna I. (2008): Selective regulation of sensitivity to odours of different behavioural significance in the American cockroach, *Periplaneta americana*. In: *Physiol Entomol* 33 (2), S. 162–166.

## 10 ANHANG

### Oktopamin- /Tyramin Färbeprotokoll

Fixation: 2,5 ml Glutaraldehyd 25 %  
7,5 ml Pikrinsäure  
0,05 ml Eisessig  
0,101 g SMBS

2 x 5 Minuten: 1 % SMBS in A. dest

Je 10 Minuten: 50 %, 70 %, 90 % Ethanol

2 x 5 Minuten: 100 % Ethanol

2 x 4 Minuten: Xylol

2 x 5 Minuten: 90 % Ethanol

2 x 5 Minuten: 70 % Ethanol

5 Minuten: 50 % Ethanol

3 x 15 Minuten: 0,1 M Tris-HCl-SMBS (0,45 %) pH 7,6

Einbettung in 5-6 % Agarose

15 Minuten: 0,1 M Tris-HCl-SMBS

10 Minuten: 1 % Na-borhydrid in Tris-HCl

15 Minuten: 0,1 M Tris-HCl-SMBS

4 x 15 Minuten: 0,1 M Tris-HCl-SMBS + 1 % Triton X

1 Stunde: 10 Normal Goat Serum (NGS) in 0,1 M Tris-HCl-SMBS + 1 % Triton X

Inkubation: Anti-Tyramin 1:500 + Anti-Oktopamin 1:1000 in 0,1 M Tris-HCl + 1 % Triton X  
+ 1 % NGS + 0,05 % Na-azid → 4-5 Tage in den Kühlraum

6 x 20 Minuten: 0,1 M Tris-HCl + 1 % Triton X

Sekundärer Fluoreszenzantikörper: 1:100 Dylight488 Goat-anti Mouse und 1:100 Cy5 Goat-  
anti Rabbit in Tris-HCl + 1 % Triton X

4 x 20 min Tris-HCl

Eindeckeln