

Die Rolle des Neurotransmitters GABA bei der Gedächtnisbildung und Modulation neuronaler Aktivität in Honigbiene und Fruchtfliege

Dissertation

Zur Erlangung des akademischen Grades des Doktors der
Naturwissenschaften der Naturwissenschaftlich-Technischen Fakultät III
Chemie, Pharmazie, Bio- und Werkstoffwissenschaften der Universität
des Saarlandes

Von

Davide Raccuglia

Saarbrücken

November 2011

Tag des Kolloquiums: 25.01.2012.....

Dekan: Prof. Dr. W.F. Meier.....

Berichterstatter: Prof. Dr. U. Müller.....

Prof. Dr. F. Kirchhoff.....

.....

Vorsitz: Prof. Dr. M.J. Schmitt.....

Akademischer Mitarbeiter: Dr. G.-W. Kohring.....

„Willst du dich am Ganzen erquicken, so musst du das Ganze im Kleinsten erblicken“

Johann Wolfgang von Goethe (1749-1832)

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Modulation der Gedächtnisbildung durch inhibitorische Neurone und Rezeptoren	2
1.1.1	GABAerge Neurone beeinflussen die Gedächtnisbildung.....	2
1.1.2	Gedächtnisbildung unter dem Einfluss von GABA-Rezeptoren	2
1.1.3	GABA und das Studium seiner Funktion in der Gedächtnisbildung	5
1.2	Neuronale und molekulare Grundlagen des Lernens	6
1.2.1	Klassische Konditionierung und synaptische Plastizität	6
1.2.2	Koinzidenzdetektion.....	7
1.3	Lernparadigmen in der Honigbiene und die Frage nach der Funktion von GABA	9
1.3.1	Assoziative olfaktorische Konditionierung	10
1.3.2	Nicht-assoziative Lernparadigmen und Zuckerwasserempfindlichkeit..	11
1.4	GABAerge Neurone und die Informationsverarbeitung im Gehirn der Honigbiene.....	12
1.4.1	Neuronale Prozessierung der Duftinformation	12
1.4.2	Die Integration von Duft und Belohnung in den Pilzkörpern verändern die Eigenschaften der GABAergen Feedbackneurone.....	14
1.5	Assoziatives Lernen und der Einfluss von GABA-Rezeptoren in der Fruchtfliege <i>Drosophila melanogaster</i>	15
1.5.1	Aversive olfaktorische Konditionierung	15
1.5.2	GABAerge Inhibition der Pilzkörper und der Gedächtnisbildung in der Fruchtfliege.....	16
2	Zielsetzung	18

3 Methoden	19
3.1 Verhaltensexperimente mit der Honigbiene <i>Apis mellifera carnica</i>	19
3.1.1 Haltung der Honigbienen	19
3.1.2 Assoziative olfaktorische Konditionierung	20
3.1.3 Sensitisierung	21
3.1.4 Habituation und Dishabituation des PER.....	21
3.1.5 Testen der Zuckerwasserempfindlichkeit (Responsiveness)	22
3.1.6 Lichtinduziertes Freisetzen von GABA während der olfaktorischen Konditionierung	22
3.1.7 Injektionen.....	23
3.2 Immunchemische und immunhistologische Techniken.....	24
3.2.1 Präparation eines Bienenhirns	24
3.2.2 ELISA zur Bestimmung von freigesetztem GABA.....	24
3.2.3 Immunhistologie	26
3.3 Messung der neuronalen Aktivität der Kenyonzellen der Honigbiene im Durchflusssystem.....	27
3.3.1 Beschichtung der Deckgläser	27
3.3.2 Präparation adulter Kenyonzellen	27
3.3.3 Das Durchflusssystem	28
3.3.4 Imaging-Setup und Datenprozessierung.....	30
3.4 Messung der neuronalen Aktivität der Kenyonzellen von <i>Drosophila melanogaster</i>	30
3.4.1 <i>Drosophila melanogaster</i> : Haltung und verwendeter Genotyp.....	30
3.4.2 Präparation des larvalen Gehirns von <i>Drosophila</i>	31
3.4.3 Imaging-Setup.....	31
3.4.4 Das stationäre System	32
3.4.5 Das Durchflusssystem	33

4	Materialien.....	34
4.1	Chemikalien.....	34
4.2	Geräte und Materialien.....	36
4.3	Puffer, Medien und Fruchtfliegenfutter	37
4.3.1	PBS (Phosphate-buffered saline).....	37
4.3.2	Bienen-Ringer.....	37
4.3.3	Bienen-Medium.....	37
4.3.4	<i>Drosophila</i> -Futter	38
4.3.5	<i>Drosophila</i> -Ringer	39
4.3.6	<i>Drosophila</i> -Medium.....	39
4.4	Immunhistochemische Lösungen	40
4.4.1	Antikörper.....	40
4.4.2	ELISA.....	40
4.4.3	Histologie	40
5	Ergebnisse.....	41
5.1	Beeinflussung des assoziativen Gedächtnisses der Honigbiene durch Aktivierung des GABAergen Systems.....	41
5.1.1	Selektive Aktivierung metabotroper GABA-Rezeptoren beeinflusst die olfaktorische Diskriminierung.....	41
5.1.2	Selektive Aktivierung ionotroper GABA-Rezeptoren hemmt die Bildung des assoziativen Gedächtnisses	44
5.1.3	Die selektive Aktivierung ionotroper GABA-Rezeptoren hat keinen Einfluss auf die nicht-assoziativen Lernparadigmen.....	49
5.1.4	Lichtinduzierte lokale Freisetzung von GABA während der Acquisition hemmt die Bildung des assoziativen Gedächtnisses.....	51

5.2	GABAerge Modulation neuronaler Aktivität in isolierten Kenyonzellen der Honigbiene.....	58
5.2.1	Stimulation isolierter Kenyonzellen im Durchflusssystem	58
5.2.2	Zeitliche Paarung von ACh und GABA inhibiert die neuronale Aktivität	60
5.2.3	Gegensätzliche Modulation der neuronalen Aktivität durch ionotrope und metabotrope GABA-Rezeptoren.....	63
5.3	GABAerge Modulation neuronaler Aktivität in einer isolierten Subpopulation des Pilzkörpers von <i>Drosophila</i>	67
5.3.1	Der Genotyp 201y-GAL4; UAS-Cameleon.....	67
5.3.2	Grundlagen neuronaler Aktivität im stationären System	68
5.3.3	GABAerge Modulation neuronaler Aktivität im stationären System	70
5.3.4	GABAerge Modulation neuronaler Aktivität im Durchflusssystem.....	71
6	Diskussion	75
6.1	Wechselwirkung zwischen Exzitation und Inhibition reguliert Intensität und zeitliche Ausdehnung neuronaler Aktivität	75
6.1.1	ACh-Rezeptoren induzieren Depolarisation und Öffnung spannungsabhängiger Calcium-Kanäle.....	75
6.1.2	Ionotrope GABA-Rezeptoren hemmen die Öffnung spannungsabhängiger Calcium-Kanäle.....	77
6.1.3	Schnelle Inhibition durch ionotrope GABA-Rezeptoren und langsame Faszilitierung durch metabotrope GABA-Rezeptoren.....	79
6.2	Metabotrope GABA-Rezeptoren, Katatonie, olfaktorische Diskriminierung.	82
6.2.1	Der selektive Agonist 3-APMPA induziert eine Katatonie	82
6.2.2	Die Aktivierung metabotroper GABA-Rezeptoren verbessert die olfaktorische Diskriminierung.....	83

6.3	Ionotrope GABA-Rezeptoren hemmen die Bildung des assoziativen Gedächtnisses	85
6.3.1	Wechselwirkungen zwischen Inhibition und Acquisition.....	85
6.3.2	GABA beeinflusst die Koinzidenz von CS und US.....	89
6.3.3	GABA hemmt die Koinzidenz von CS und US in Antennalloben und Pilzkörper	90
6.4	Die Mechanismen der Wechselwirkung zwischen CS/US-Koinzidenz und der GABAergen Inhibition.....	92
6.5	Die biologische Funktion des Neurotransmitters GABA	96
7	Zusammenfassung.....	97
8	Summary	98
9	Verzeichnisse	99
9.1	Abbildungsverzeichnis.....	99
9.2	Abkürzungsverzeichnis.....	101
9.3	Literaturverzeichnis	104
10	Danksagung.....	121

1 Einleitung

Im gesamten Tierreich wird neuronale Hemmung (Inhibition) durch den Neurotransmitter GABA (γ -aminobutyric acid) vermittelt. Dieser Inhibition steht die neuronale Erregung (Exzitation) gegenüber, die von Neurotransmittern wie Glutamat und Acetylcholin vermittelt wird. Die Balance zwischen diesen beiden Eigenschaften ist von essentieller Bedeutung für die korrekte Verarbeitung äußerer Einflüsse und der Repräsentation mentaler Zustände [1]. Fehlfunktionen des inhibitorischen Systems oder das Blockieren von GABA-Rezeptoren führen zu einem Ungleichgewicht und zur Übererregung, was Schizophrenie auslösen oder auch in epileptischen Anfällen resultieren kann [2, 3]. Dies zeigt, dass die grundlegende Eigenschaft des Neurotransmitters GABA darin besteht, neuronale Erregung zu modulieren bzw. zu kontrollieren. Obwohl GABA-Rezeptoren im gesamten menschlichen Gehirn vorkommen, besitzen inhibitorische Systeme in unterschiedlichen Hirnregionen ganz verschiedene Aufgaben. Das inhibitorische System reguliert z.B. in der Amygdala emotionale Zustände. So löst das Blockieren der GABA-Rezeptoren der Amygdala Angstsymptome aus [4], die künstliche Aktivierung hingegen unterdrückt Angstsymptome [5]. Im Gegensatz dazu steuern GABAerge Neurone im Hypothalamus unseren Schlafrhythmus [6]. Die künstliche Aktivierung von GABA-Rezeptoren im Hypothalamus kann abhängig vom genauen Ort Schlaf induzieren [7] oder zur Schlaflosigkeit führen [8]. Auch der Hippocampus, der essentiell für den Erwerb neuer Gedächtnisinhalte ist [9], besitzt zahlreiche GABA-Rezeptoren und wird von GABAergen Neuronen innerviert [10]. Im gesamten Tierreich findet man GABA-Rezeptoren in Hirnbereichen, die für die Gedächtnisbildung verantwortlich sind. Diese Arbeit widmet sich der Fragestellung, welche Funktionen die inhibitorischen Neurone und Rezeptoren während der Gedächtnisbildung besitzen und mit welchen zellulären und molekularen Mechanismen diese Funktion vermittelt wird.

1.1 Modulation der Gedächtnisbildung durch inhibitorische Neurone und Rezeptoren

1.1.1 GABAerge Neurone beeinflussen die Gedächtnisbildung

Um die schweren epileptischen Anfälle von Henry Gustav Molaison zu behandeln, wurden ihm 1953 große Teile seiner medialen temporalen Loben entfernt [11]. Seit dieser Operation konnte sich Patient H.M., wie er damals genannt wurde, keine neuen Sachverhalte mehr einprägen. Dem Patienten H.M. wurde nämlich auch der Hippocampus entfernt, der essentiell für die Gedächtnisbildung ist und dessen Schädigung zu einer irreversiblen anterograden Amnesie führt [12]. Seit Patient H.M. wird untersucht, wie der Hippocampus die Speicherung von Gedächtnisinhalten vermittelt. Doch die Suche nach den Mechanismen der Gedächtnisbildung im Hippocampus gestaltet sich schwierig, da der Hippocampus ein komplex verschaltetes Netzwerk unterschiedlicher Neurone ist. Der Hippocampus besteht zum Großteil aus exzitatorischen Neuronen und zu 10% aus inhibitorischen Neuronen [13]. Die exzitatorischen Neurone bilden die Neurotransmitter Glutamat und Acetylcholin, die inhibitorischen Neurone sind GABAerge Neurone, die den Neurotransmitter GABA bilden. Wird ein GABAerges Neuron aktiviert, so schüttet es GABA aus und inhibiert exzitatorische, sowie andere inhibitorische Neurone. Diese Inhibition gestaltet das zeitliche und örtliche Aktivitätsmuster im Hippocampus und ist somit grundlegend an den neuronalen Prozessen der Gedächtnisbildung beteiligt [14].

1.1.2 Gedächtnisbildung unter dem Einfluss von GABA-Rezeptoren

Das Studium der Funktion des Neurotransmitters GABA wird durch die Vielzahl verschiedener GABA-Rezeptoren erschwert. Dabei gibt es grundlegend zwei Typen von GABA-Rezeptoren: ionotrope und metabotrope.

Die ionotropen GABA-Rezeptoren bilden aus fünf Untereinheiten einen Chlorid-Kanal (Abb. 1-1). In adulten Säugetieren führt die Bindung von GABA an diesen Rezeptor zur Öffnung des Chlorid-Kanals und zum Einstrom von Chlorid-Ionen, was eine Hyperpolarisation zur Folge hat.

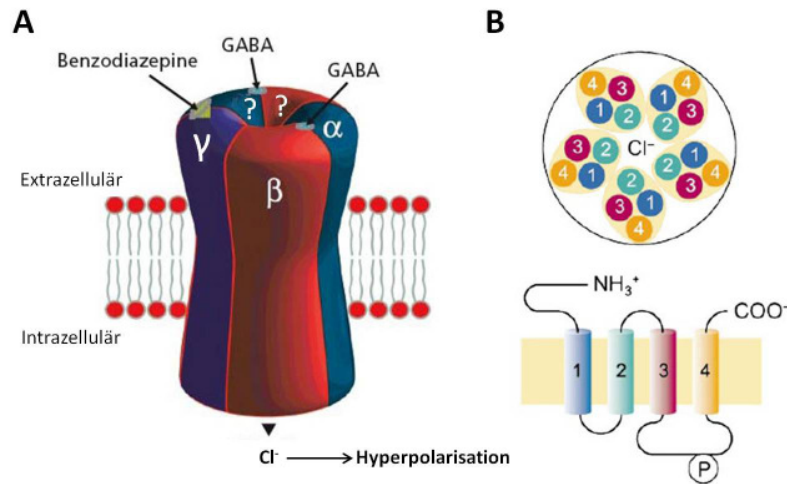


Abb. 1-1: Der ionotrope GABA-Rezeptor

A: Ein ionotroper GABA-Rezeptor besteht aus fünf Untereinheiten, die in der Membran von Neuronen einen Chlorid-Kanal bilden. Durch Bindung von GABA öffnet sich der Kanal, worauf Chlorid-Ionen in das Zellinnere strömen und zur Hyperpolarisation führen. Ionotrope GABA-Rezeptoren können sich aus vielen verschiedenen Untereinheiten zusammensetzen und bilden somit Rezeptoren mit den verschiedensten Affinitäten für GABA, Benzodiazepinen und anderen Agonisten, sowie Antagonisten. Quelle der Abbildung: [15].

B: Jede Untereinheit besteht aus vier Transmembrandomänen, deren Eigenschaften sich über posttranslationale Modifikationen, wie Phosphorylierungen, modulieren lassen. Quelle der Abbildung: [16].

Die Untereinheiten, aus denen sich der ionotrope Rezeptor bildet, sind in eine Vielzahl unterschiedlicher Klassen unterteilt, von denen es wiederum unterschiedliche Varianten gibt (6 α -Untereinheiten, 3 β -Untereinheiten, 3 γ -Untereinheiten, 1 δ -Untereinheiten, 1 ϵ -Untereinheiten, 1 π -Untereinheiten, 1 θ -Untereinheiten, 3 ρ -Untereinheiten) [17]. Ein funktioneller ionotroper GABA-Rezeptor besteht immer aus mindestens einer α -Untereinheit, einer β -Untereinheit und einer γ -Untereinheit [18]. Aus der Variation dieser und den anderen beiden Untereinheiten ergibt sich prinzipiell eine Vielzahl unterschiedlicher ionotroper GABA-Rezeptoren, die sich in ihrer Affinität zu GABA, sowie anderen Agonisten oder Antagonisten unterscheiden. Neben zwei Bindestellen für GABA besitzen ionotrope GABA-Rezeptoren allosterische Bindestellen für Benzodiazepine, Barbiturate, Neurosteroiden und sogar Ethanol [17]. Vor allem Benzodiazepine verstärken die Wirkung von GABA und werden sehr effektiv bei der Behandlung von Schlaf- und Angststörungen eingesetzt [19]. Sehr hohe Dosen an Benzodiazepinen können sogar transiente anterograde Amnesien auslösen [20]. Allgemein führt die Aktivierung ionotroper GABA-Rezeptoren im Hippocampus zu einer Verschlechterung der Gedächtnisleistung, während die Hemmung dieser Rezeptoren die Gedächtnisleistung verbessern kann [21, 22]. Die Aufklärung der Funktionen

einzelner Untereinheiten wird jedoch sehr kontrovers diskutiert. Während z.B. der Knockout der $\beta 3$ -Untereinheit die Gedächtnisleistung verschlechtert [23], führt der Knockout der $\alpha 5$ -Untereinheit zu einer Verbesserung [24]. Die hohe Anzahl verschiedener Kombinationen und unbekannte Kompensationsmechanismen machen eine zuverlässige Aussage über die Funktion einzelner Untereinheiten durch Knockout-Experimente eher unwahrscheinlich.

Im Gegensatz zu den ionotropen Rezeptoren, die eine schnelle Inhibition hervorrufen, vermitteln metabotrope GABA-Rezeptoren eine langsamere Form der Inhibition. Metabotrope GABA-Rezeptoren bestehen nur aus zwei Untereinheiten, die als Heterodimer eine funktionelle Einheit bilden (Abb. 1-2) [25]. Die metabotropen GABA-Rezeptoren sind an G-Proteine gekoppelt, die durch Bindung von GABA aktiviert werden und unterschiedliche molekulare Prozesse induzieren können (z.B. Hemmung der Adenylylcyclase [26] oder Öffnung von Kaliumkanälen [25]). Über die Funktion der metabotropen Rezeptoren ist allgemein sehr wenig bekannt. Die Aktivierung dieser Rezeptoren im Hippocampus führt jedoch ebenfalls zu einer Verschlechterung der Gedächtnisleistung [22].

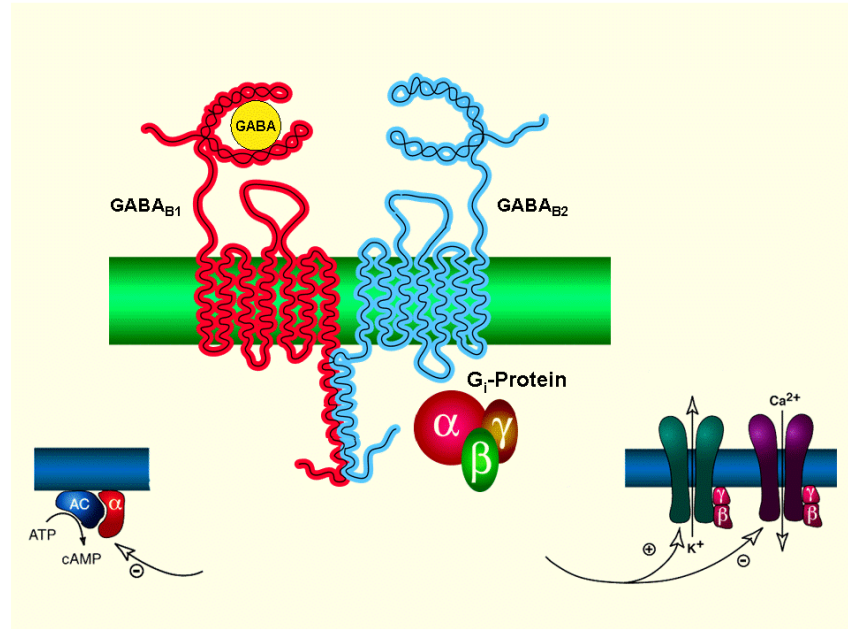


Abb. 1-2: Der metabotrope GABA-Rezeptor

Ein metabotroper GABA-Rezeptor setzt sich aus zwei Untereinheiten zusammen, die jeweils aus sieben membrandurchspannenden helikalen Domänen bestehen. Die Bindung von GABA aktiviert das gekoppelte G-Protein, welches die Aktivität von Enzymen und Kanälen moduliert. In dieser Abbildung ist das inhibitorische Wirkungsspektrum der G_i-Proteine gezeigt, die die Aktivität der Adenylylcyclase (AC) hemmen oder die Durchlässigkeit von Kalium-Kanälen fördern bzw. die der Calcium-Kanäle hemmen.

Quelle: <http://www.pharma.uzh.ch/research/neuropharmacology/researchareas/signaltransduction/introduction.html>.

1.1.3 GABA und das Studium seiner Funktion in der Gedächtnisbildung

Die Aktivierung des inhibitorischen Systems des Hippocampus verschlechtert die Gedächtnisleistung, während die Hemmung die Gedächtnisleistung verbessert. In Tierexperimenten erfolgt die Aktivierung bzw. Hemmung meist durch die Injektion von selektiven Agonisten bzw. Antagonisten. Diese Injektionen bringen jedoch verschiedene Probleme mit sich. Beispielsweise lässt sich nicht exakt bestimmen, wie lange die injizierte Droge wirkt. Dadurch wird häufig die Frage vernachlässigt, ob sich die Manipulation des inhibitorischen Systems auf alle Phasen der Konditionierung (Gedächtniserwerb/Acquisition, Kurzzeit-/Langzeitgedächtnis, Gedächtnisabruf) gleich auswirkt? Zum anderen ist das inhibitorische System durch die Injektion ständig aktiv oder gehemmt, was einer unphysiologischen Manipulation entspricht. Eine physiologische Manipulation würde darin bestehen, die GABA-Rezeptoren gezielt zu bestimmten Zeitpunkten zu aktivieren oder zu hemmen. Eine solche physiologische Manipulation gestaltet sich jedoch durch die schwere Zugänglichkeit des Gehirns von Säugetieren als schwierig. Zudem wären konkrete Aussagen aufgrund der Komplexität der neuronalen Netzwerke im Hippocampus und der Vielzahl unterschiedlicher GABA-Rezeptoren nur schwer möglich.

Daher werden in dieser Arbeit die Modellorganismen Honigbiene (*Apis mellifera*) und Fruchtfliege (*Drosophila melanogaster*) genutzt, um die Funktion des inhibitorischen Systems während der Gedächtnisbildung zu untersuchen. Diese beiden Modellorganismen zeichnen sich durch diverse Vorteile gegenüber Säugetieren aus. Honigbienen sind in der Lage, sich Düfte und die damit verbundenen Assoziationen über Tage einzuprägen (s. Kap. 1.3). Zudem ist ihr Gehirn über das Öffnen der Kopfkapsel sehr gut zugänglich. In der Fruchtfliege lassen sich sogar gezielt neuronale Netzwerke markieren und untersuchen. Das Gehirn beider Organismen ist sehr ähnlich aufgebaut und besitzt eine Struktur, die als Pendant zum Hippocampus der Säugetiere angesehen wird: die Pilzkörper. Hippocampus und Pilzkörper sind beide unerlässlich für die Gedächtnisbildung und in beiden Strukturen stehen exzitatorische Neurone unter der Kontrolle GABAerger Neurone, die die Gedächtnisbildung entscheidend mitgestalten (s. Kap. 1.4). Im Gegensatz zum Hippocampus sind die Pilzkörper einfacher strukturiert und es gibt weniger Untereinheiten für GABA-Rezeptoren (s. Kap. 1.5.2). Dies macht die Pilzkörper zum optimalen Studienobjekt, um die Grundlagen der Inhibition während der Gedächtnisbildung zu untersuchen.

1.2 Neuronale und molekulare Grundlagen des Lernens

Um zu verstehen, wie der Neurotransmitter GABA Lernprozesse in den entsprechenden Hirnstrukturen beeinflusst, muss man zunächst wissen, was Lernen und Gedächtnis überhaupt bedeutet und welche neuronalen und molekularen Prozesse dazu notwendig sind. Der Mensch kennt viele verschiedene Formen des Lernens. Grundlegend unterscheidet man das deklarative Gedächtnis vom nicht-deklarativen Gedächtnis [27]. Das deklarative Gedächtnis, zu dem z.B. autobiografische Informationen gehören, gilt als Lernen höherer Ordnung, da man dazu zur Selbstreflexion fähig sein muss. Nicht-deklarative Gedächtnisse, wie z.B. das Erlernen motorischer Abläufe, sind sehr viel einfacher aufgebaut und lassen sich im gesamten Tierreich wieder finden. Aus diesem Grund wird diese Form des Lernens in der Wissenschaft genutzt, um die neuronalen Grundlagen der Gedächtnisbildung zu erforschen. Grundlegend versteht man unter einfachen Formen des Lernens, die Fähigkeit sein Verhalten aufgrund erworbener Erfahrungen anzupassen. Die Persistenz dieser Verhaltensänderung bezeichnet man als Gedächtnis.

1.2.1 Klassische Konditionierung und synaptische Plastizität

Die älteste und wohl bekannteste Studie zu einer einfachen Form des Lernens wurde 1927 von Iwan Petrowitsch Pawlow durchgeführt, der seine Hunde einer klassischen Konditionierung unterzog [28]. Bei der klassischen Konditionierung wird einem Tier ein neutraler Stimulus (konditionierter Stimulus, CS) zusammen mit einer Belohnung oder einer Bestrafung (unkonditionierter Stimulus, US) präsentiert. Das Tier erlernt also, einen neutralen Reiz mit einem bedeutungsvollen Reiz zu assoziieren. Infolgedessen wird das Tier nach Präsentation des CS dieselbe körperliche Reaktion zeigen, wie nach Präsentation des US. Pawlow verknüpfte regelmäßig die Fütterung (US) seiner Hunde mit einem Klingelton (CS). Nach diesem „Training“ begannen die Hunde bereits nach Präsentation des Klingeltons zu salivieren, was sie normalerweise nur beim Anblick der Nahrung tun. Die Hunde haben also gelernt, den Klingelton mit der Fütterung zu assoziieren. Die neurophysiologische Grundlage dieser Gedächtnisbildung ist die neuronale bzw. synaptische Plastizität, die 1949 von dem Psychologen Donald Hebb ausführlich beschrieben wurde [29]. Die Hebbsche Lernregel besagt, dass die gleichzeitige Aktivität der Neurone, die den CS und US vermitteln, molekulare Prozesse induziert, die die Verknüpfung und somit die

Signalweiterleitung zwischen diesen Neuronen verstärkt oder abschwächt. Demnach führt die gemeinsame Aktivität der verantwortlichen Neurone dazu, dass diese auf den nächsten Stimulus stärker oder schwächer reagieren. Allgemein beschreibt die synaptische Plastizität eine aktivitätsabhängige Änderung der Stärke der synaptischen Übertragung. GABAerge Neurone beeinflussen die Entstehung der synaptischen Plastizität und somit auch die Gedächtnisbildung [30]. Es ist jedoch nicht bekannt, welche neuronalen Netzwerke, die an der synaptischen Plastizität beteiligt sind, durch GABA inhibiert werden. Im Falle der klassischen Konditionierung besteht die Fragestellung also darin, ob die Vermittlung des CS, des US oder gar die Koinzidenz dieser beiden Signale durch GABA moduliert wird?

1.2.2 Koinzidenzdetektion

Um synaptische Plastizität zu induzieren, müssen laut der Hebbschen Lernregel die neuronalen Netzwerke, die CS und US vermitteln, gleichzeitig aktiv sein. Folglich muss es einen Koinzidenzdetektor geben, der die Informationen von CS und US integriert. Mögliche molekulare Mechanismen der Koinzidenzdetektion und die dadurch induzierten Modifikationen wurden in verschiedenen Organismen beschrieben (z.B. in der Maus *mus musculus* [31, 32], in der Meeresschnecke *Aplysia californica* [33-35], der Honigbiene *Apis mellifera* [36, 37] und der Fruchtfliege *Drosophila melanogaster* [38-41]). Im Hippocampus der Säugetiere gilt der NMDA-Rezeptor als vielversprechender Kandidat für einen Koinzidenzdetektor. Es handelt sich hierbei um einen ionotropen Glutamat-Rezeptor, der einen Calcium-Kanal formt, welcher mit einem Mg^{2+} -Pfropf verschlossen ist [42]. Ca^{2+} strömt nur dann durch diesen Kanal in das Neuron, wenn der Mg^{2+} -Pfropf aus dem Kanal entfernt wird. Dies geschieht nur, wenn Glutamat am Rezeptor gebunden ist und das Neuron gleichzeitig depolarisiert wird.

Ein weiterer vielversprechender Mechanismus der Koinzidenzdetektion wurde mithilfe von *Aplysia* [43] und Lernmutanten in *Drosophila* entdeckt [44]. Im Mittelpunkt dieses Mechanismus steht die Ca^{2+} -abhängige Adenylylcyclase (Ac), die die konvergierenden Signale von CS und US integriert (Abb. 1-3). Die Ac ist besonders aktiv, wenn erstens eine erhöhte intrazelluläre Calcium-Konzentration vorliegt und zweitens die Ac gleichzeitig über ein G-Protein stimuliert wird [43, 45]. Die Signalübertragung von CS und US muss also innerhalb eines neuronalen Netzwerkes konvergieren. Dabei führt eines der beiden Signale zur Erhöhung der intrazellulären Calcium-Konzentration, das andere aktiviert die G-Proteine.

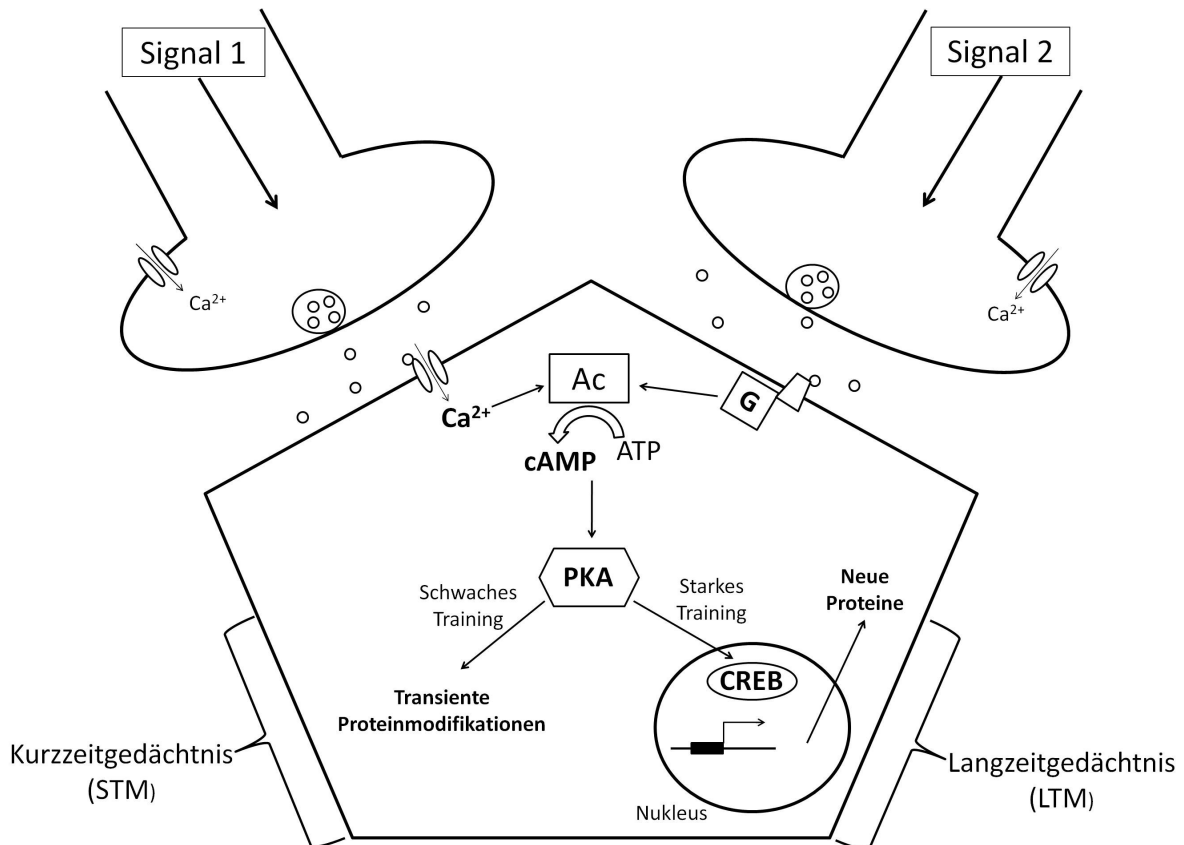


Abb. 1-3: Molekulare Mechanismen der Gedächtnisbildung

In assoziativen Lernformen müssen beide Signale (CS und US) konvergieren, um einen Koinzidenzdetektor zu aktivieren. Im Falle der Ca²⁺-abhängigen Adenylylcyclase (Ac) führt eines der beiden Signale zur Erhöhung der intrazellulären Calcium-Konzentration, während das andere Signal über metabotrope Rezeptoren G-Proteine aktiviert. Die Koinzidenz beider Signale verstärkt die Aktivierung der Ca²⁺-abhängigen Adenylylcyclase (Ac), die somit besonders viel cAMP produziert. Abhängig von der gebildeten Menge an cAMP wird die PKA unterschiedlich stark aktiviert. Ein schwaches Training bewirkt eine leichte Aktivierung der PKA und induziert transiente Proteinmodifikationen, die die molekulare Grundlage des Kurzzeitgedächtnisses (STM) sind. Nach starkem Training und verstärkter Aktivität der PKA wird der Transkriptionsfaktor CREB aktiviert, der die Bildung neuer Proteine induziert. Diese neuen Proteine stärken langfristig die Verknüpfung zwischen den Synapsen und sind die molekulare Grundlage des Langzeitgedächtnisses (LTM).

Die Ac bildet den second messenger cAMP (cyclisches Adenosinmonophosphat), der unter anderem die PKA (Proteinkinase A) aktiviert [46]. Die Aktivität der PKA entscheidet darüber, ob es zur Bildung eines Kurzzeit- (short term memory; STM) oder Langzeitgedächtnisses (long term memory; LTM) kommt. Nach einem schwachen Training (wenige CS-US-Paarungen) kommt es zu transienten Proteinmodifikationen, die die molekulare Grundlage des STM sind [47] (z.B. Phosphorylierung von K⁺-Kanälen [48, 49], wodurch sich die Erregbarkeit des Neurons für eine gewisse Zeit verstärkt). Diese transienten Modifikationen erfolgen innerhalb von weniger Minuten, was sich durch den Gedächtniserwerb während des Trainings beobachten lässt (Acquisition). Nach einem starken Training (mehrere CS-US-Paarungen) kommt es zur verstärkten Bildung von cAMP und somit zu einer

verstärkten Aktivität der PKA. Dadurch werden Proteinmodifikationen induziert, die schwache Gedächtnisse konsolidieren bzw. stabilisieren und auch die Bildung des LTM begünstigen [37, 50]. Dazu gehört die Aktivierung des Transkriptionsfaktors CREB (cAMP response element binding protein) im Nukleus, was Transkription und Translation induziert und zur Bildung neuer Proteine führt [51]. Die Bildung neuer Proteine ist essentiell um ein STM in ein LTM zu transformieren (Konsolidierung) [52, 53]. Diese Proteine werden meist zur aktiven Synapse transportiert und stärken dort langfristig die Verknüpfung und somit auch die Signalübertragung zwischen den Neuronen [54].

Wie bereits erwähnt, beeinflusst der Neurotransmitter GABA die Bildung der synaptischen Plastizität und somit auch die Gedächtnisbildung. Dadurch ergeben sich für diese Arbeit die folgenden Fragestellungen, die es eingehender zu untersuchen gilt: An welcher Stelle der molekularen Kaskade der Gedächtnisbildung wirkt GABA? Beeinflusst GABA Kurz- und Langzeitgedächtnis gleichermaßen? Hängt die Wirkung von GABA von der Anzahl der CS-US-Paarungen ab?

1.3 Lernparadigmen in der Honigbiene und die Frage nach der Funktion von GABA

Als soziales Insekt besitzt die Honigbiene ein faszinierendes und reichhaltiges Repertoire an verschiedenen Verhaltensmustern. Zu den wichtigsten Aufgaben im Leben einer Honigbiene gehört das Sammeln von Nektar und Pollen, um eine ausreichende Versorgung des Bienenstocks mit Nahrung zu gewährleisten. Dazu prägen sich die Sammlerinnen Ort, Farbe und Duft reichhaltiger Blüten ein und geben diese Informationen per Schwänzeltanz an andere Bienen im Stock weiter [55-57]. Die Sammlerinnen eines Bienenvolkes besitzen die Fähigkeit, Hinweise aus der Umwelt mit Belohnungen zu verknüpfen und diese Assoziationen über mehrere Tage im Gedächtnis zu behalten [58]. Viele dieser Lernparadigmen lassen sich auch unter Laborbedingungen durchführen, weshalb die Honigbiene ein beliebter Modellorganismus ist, um die molekularen Grundlagen der Gedächtnisbildung zu erforschen [59].

1.3.1 Assoziative olfaktorische Konditionierung

Bei der appetitiven Konditionierung der Honigbiene wird ein ihr unbekannter Duft (CS) mit einer Belohnung in Form von Zuckerwasser (US) gepaart (Abb. 1-4 und s. Kap. 3.1.2). Um das Zuckerwasser aufzunehmen, streckt die Biene ihren Rüssel heraus, was als Rüsselreflex oder auch als Proboscis extension reflex (PER) bezeichnet wird [60]. Hat die Biene die Assoziation zwischen CS und US korrekt erlernt, wird sie bei einem späteren Gedächtnisabruf, auf den Duft alleine, mit dem PER reagieren [61, 62]. Wie lange dieses Gedächtnis anhält, hängt von der Anzahl der CS-US-Paarungen ab [63, 64]. Nach einer CS-US-Paarung bildet die Biene ein Kurzzeitgedächtnis, welches über einen Tag lang stabil sein kann [65]. Nach drei CS-US-Paarungen bildet die Biene ein Langzeitgedächtnis, welches über mehr als vier Tage stabil sein kann [66, 67]. Dabei kann man bereits während des Trainings den Gedächtniserwerb der Bienen beobachten (Acquisition). Das Lernparadigma der appetitiven olfaktorischen Konditionierung wird in dieser Arbeit genutzt werden, um die Auswirkungen der Aktivierung von GABA-Rezeptoren auf die Gedächtnisbildung zu untersuchen.

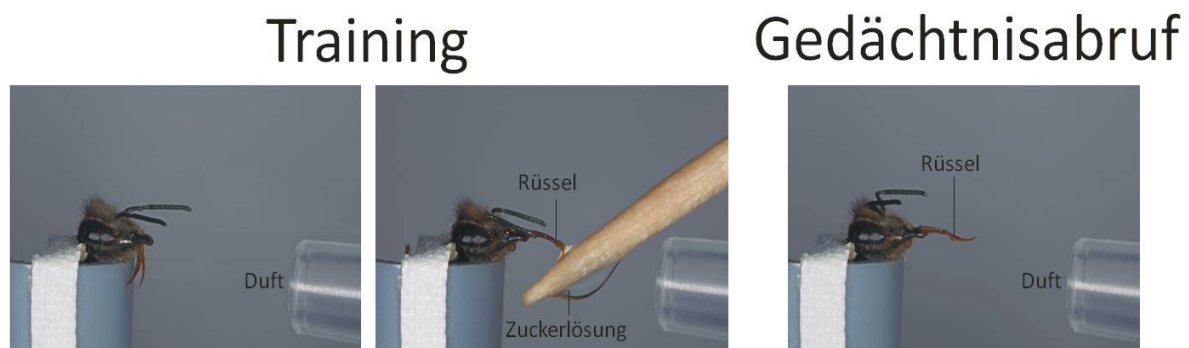


Abb. 1-4: Appetitive olfaktorische Konditionierung der Honigbiene

Während der Konditionierung wird ein naiver Duft (CS) mit einer Belohnung in Form von Zuckerwasser (US) gepaart. Dabei wird der Biene zunächst der Duft präsentiert. Noch während der Duftpräsentation wird der Biene das Zuckerwasser zunächst an der Antenne präsentiert, woraufhin die Biene den Rüssel heraus streckt (PER). Damit die Biene die Belohnung auch aufnehmen kann, lässt man sie anschließend an der Zuckerlösung lecken. Erlernt die Biene die Assoziation zwischen CS und US, so wird sie bei einem später durchgeführten Gedächtnisabruf mit dem CS alleine, in Erwartung auf eine Belohnung, mit dem PER reagieren.

1.3.2 Nicht-assoziative Lernparadigmen und Zuckerwasserempfindlichkeit

Bei den nicht-assoziativen Lernparadigmen erlernt die Honigbiene, die Reaktionen auf einzelne Stimuli, in Abhängigkeit von dessen Bedeutung, zu verändern. Mit diesen Lernparadigmen, zu denen die Sensitisierung und die Habituation gehört, lässt sich untersuchen, ob die Wahrnehmung bzw. die neuronale Verarbeitung der Duftinformation oder der Belohnung durch die GABAerge Inhibition beeinflusst wird. Die Wahrnehmung der Belohnung lässt sich zudem mit Hilfe der Zuckerwasserempfindlichkeit überprüfen.

Unter Sensitisierung versteht man die Zunahme der Reaktionsstärke auf einen unbedeutenden Reiz. Die verstärkte Reaktion wird hervorgerufen durch die Stimulation mit einem unabhängigen, sehr starken Reiz. Bei der Honigbiene wird die Reaktion auf einen Duftreiz durch vorherige Stimulation mit einer stark konzentrierten Zuckerlösung sensitisiert [68] (s. Kap. 3.1.3). Mit Hilfe der Sensitisierung lässt sich überprüfen, ob das inhibitorische System die Wahrnehmung der Duftinformation verändern kann.

Unter Habituation versteht man die Gewöhnung an einen dauerhaft präsentierten Reiz. Dabei tritt eine Abschwächung der Reaktion auf den Reiz dann ein, wenn dieser sich als unbedeutend erweist. Bei der Habituation der Honigbiene wird eine Antenne so oft mit Zuckerwasser stimuliert, bis der Rüsselreflex ausbleibt (s. Kap. 3.1.4) [69]. Somit lässt sich testen, ob das inhibitorische System die neuronale Prozessierung der Belohnung manipulieren kann.

Zusätzlich zur Habituation lässt sich die Wahrnehmung der Belohnung mit Zuckerwasser mit Hilfe der Zuckerwasserempfindlichkeit überprüfen (s. Kap. 3.1.5). Dabei wird der Umstand genutzt, dass die Biene mit höherer Wahrscheinlichkeit mit dem Rüsselreflex (PER) reagiert, umso größer die Zuckerkonzentration ist, mit der die Antenne stimuliert wird [36, 70].

1.4 GABAerge Neurone und die Informationsverarbeitung im Gehirn der Honigbiene

Die Gehirne von Honigbiene und Fruchtfliege sind wie das menschliche Gehirn in verschiedene Kompartimente unterteilt, die auf die Verarbeitung von Information aus unterschiedlichen Quellen spezialisiert sind. Im Folgenden wird das Wissen von Honigbiene und Fruchtfliege kombiniert, um zu erläutern, wie CS (Duft) und US (Belohnung oder Bestrafung) während der assoziativen Konditionierung im Gehirn der Insekten prozessiert werden. Besonders wichtig ist hierbei, wie die Informationswege von CS und US konvergieren, um ein assoziatives Gedächtnis zu bilden (Abb. 1-5). Zudem wird erläutert, in welchen Hirnregionen exzitatorische Neurone unter der Kontrolle von inhibitorischen Neuronen stehen und welche GABA-Rezeptoren an der Inhibition beteiligt sind. Das Verständnis der neuronalen Prozessierung ist unerlässlich, um die Funktion inhibitorischer Neurone während der Gedächtnisbildung nachvollziehen zu können.

1.4.1 Neuronale Prozessierung der Duftinformation

Die Perzeption der Duftinformation erfolgt über olfaktorische Rezeptorneurone (ORN) in den Antennen und Maxillen [71, 72]. Von hier aus wird die Duftinformation im ganzen Gehirn der Honigbiene und der Fruchtfliege über den primären und wichtigsten exzitatorischen Neurotransmitter Acetylcholin (ACh) weitergeleitet [73]. Die wichtigsten ACh-Rezeptoren (AChR) sind nikotinische AChR (nAChR), deren Untereinheiten Na^+ -Kanäle formen. Bei Aktivierung kommt es zum Na^+ -Einstrom und somit zur Depolarisierung des Neurons [74]. Die cholinerge Transmission ist unerlässlich für das olfaktorische Gedächtnis [75].

Von den ORN wird die Duftinformation zu den Antennalloben (AL) weitergeleitet (hellblaue Pfeile in Abb. 1-5), in denen die primäre Duftverarbeitung stattfindet [76]. Die AL bestehen aus funktionellen Untereinheiten, die als Glomeruli bezeichnet werden [77, 78]. Jeder Duft aktiviert ein anderes Set verschiedener Glomeruli und bildet somit ein individuelles topografisches Muster [79, 80]. Dieses Aktivitätsmuster entsteht aus dem Zusammenspiel von exzitatorischen cholinergen Neuronen und inhibitorischen GABAergen Interneuronen [81]. Das topografische Muster des AL wird über Projektionsneurone (PN) an das laterale Protocerebrum (LP, auch lateral horn genannt) und die Pilzkörper (Mushroom bodies, MB) weitergegeben (dunkelblaue Pfeile in Abb. 1-5).

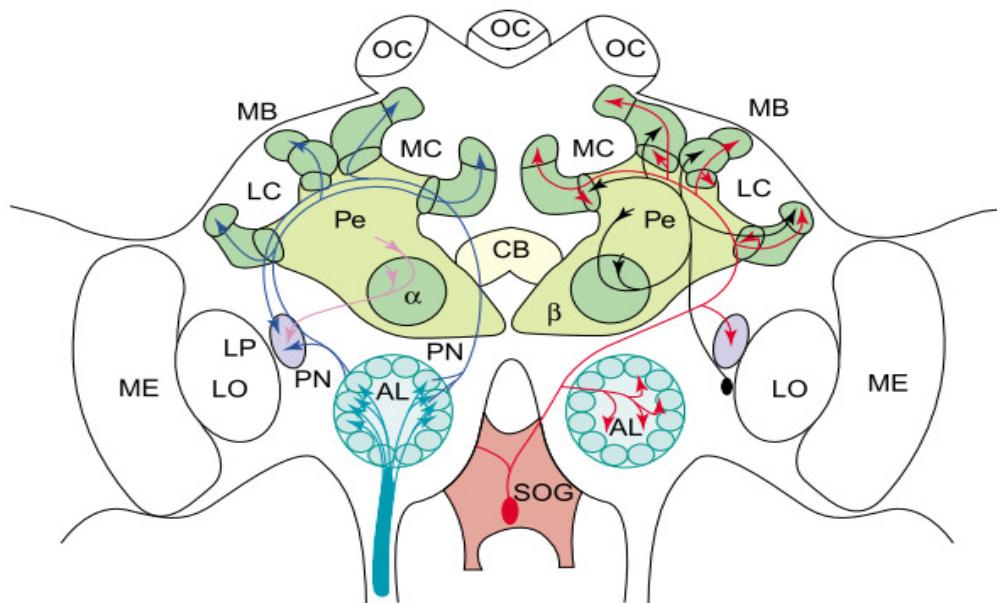


Abb. 1-5: Neuronale Netzwerke im Gehirn der Honigbiene

Schematische Darstellung des Bienenhirns mit den neuronalen Verarbeitungswegen von Duft und Belohnung. Die olfaktorische Information (linke Seite) wird von den Rezeptorneuronen zum Antennallobus (AL) transportiert (hellblaue Pfeile), wo ein individuelles topografisches Aktivitätsmuster gebildet wird. Vom AL wird die Duftinformation über Projektionsneuronen (PN) an das laterale Protocerebrum (LP) und die Calyces (lateraler Calyx, LC und medianer Calyx, MC) der Pilzkörper (MB, grün) vermittelt (blaue Pfeile). Über den Pedunculus (Pe) gelangt die Information zu den α - und β -Loben der Pilzkörper und von dort aus in andere Bereiche des Gehirns (violette Pfeile). Die Belohnung durch Zuckerwasser aktiviert im suboesophagalen Ganglion (SOG) das VUM_{mx1} , welches AL, LP und die Pilzkörper innerviert (rote Pfeile). Die Integration von Duft und Belohnung findet in AL und in den Pilzkörpern statt, die somit Sitz des olfaktorischen Gedächtnisses sind. Die inhibitorische Rückkopplungsschleife (schwarze Pfeile) inhibiert die Neuronen der Pilzkörper und beeinflusst das olfaktorische Gedächtnis.

Weitere Abkürzungen: ME, medulla; LO, lobula; OC, ocelli; CB central body

Quelle: Menzel und Giurfa [82]

Über die Funktion des LP ist nur sehr wenig bekannt. Man vermutet, dass ihre Funktion in erfahrungsunabhängigen Reaktionen auf naive Düfte liegen [83, 84].

Die Pilzkörper besitzen eine zentrale Rolle in der Gedächtnisbildung der Insekten und werden oft als Pendant zum Hippocampus der Säugetiere angesehen. Beide Hirnstrukturen sind unerlässlich für die Gedächtnisbildung und in beiden stehen exzitatorische Neurone unter der Kontrolle von inhibitorischen Neuronen. Die Input-Region der Pilzkörper sind die Calyces (medianer calyx, MC und lateraler calyx, LC). Hier werden visuelle, gustatorische und olfaktorische Informationen integriert und das daraus entstehende Signal an andere Hirnregionen weitergeleitet [85, 86]. Die intrinsischen Neurone der Calyces werden als Kenyonzellen bezeichnet, in ihnen findet die sekundäre Duftverarbeitung statt [87].

Die Axone der Kenyonzellen vereinigen sich zum Pedunculus (Pe) und bringen so die Duftinformation zu den Loben der Pilzkörper. Von den α - und β -Loben der Pilzkörper wird die Information dann in andere Regionen des Gehirns transportiert, wie z.B. zum LP (violette Pfeile in Abb. 1-5) oder der Motorregion des suboesophagalen Ganglions (SOG), von wo aus der PER gesteuert wird [88].

Es sind ca. 50 inhibitorische GABAerge Feedbackneurone, die die α - und β -Loben mit der Calyxregion der Pilzkörper verbinden (schwarze Pfeile in Abb. 1-5) [89]. Diese Neurone werden sowohl durch die Duftinformation als auch durch die Belohnung aktiviert, woraufhin sie GABA ausschütten und die GABA-Rezeptoren der Kenyonzellen aktivieren [90, 91]. Welche Funktion dies hat, ist nicht genau bekannt. Dass diese GABAergen Feedbackneurone jedoch an der Gedächtnisbildung beteiligt sind, zeigen physiologische Eigenschaften, die im nächsten Kapitel erläutert werden.

1.4.2 Die Integration von Duft und Belohnung in den Pilzkörpern verändern die Eigenschaften der GABAergen Feedbackneurone

Die Belohnung während der appetitiven Konditionierung in der Honigbiene wird über das VUM_{mx1} (ventral unpaired median neuron maxillare 1) vermittelt [92]. Der Zellkörper des VUM_{mx1} befindet sich im SOG und wird durch Präsentation des Zuckerwassers am Rüssel stimuliert [93]. Die Axone konvergieren ausschließlich mit den Neuropilen, die für die Verarbeitung der olfaktorischen Information zuständig sind (rote Pfeile in Abb. 1-5). Dies deutet darauf hin, dass das VUM_{mx1} spezialisiert ist, um Belohnung und Duft miteinander zu koppeln [94]. Die Belohnung wird von VUM_{mx1} über den Neurotransmitter Octopamin vermittelt. Dies lässt sich eindrucksvoll demonstrieren, indem sich die Belohnung durch Injektion von Octopamin in AL oder Pilzkörper ersetzen lässt [65, 93]. Die Octopamin-Rezeptoren sind metabotrop und erhöhen über G-Proteine die intrazelluläre cAMP-Konzentration oder setzen Ca^{2+} aus dem endoplasmatischem Retikulum frei [95, 96].

Um ein assoziatives Gedächtnis zu bilden, muss laut Hebb die Integration von CS und US zu Änderungen in der Signalübertragung durch den CS führen (s. Kap. 1.2). Dies geschieht sowohl in den AL, als auch im MB. Die Integration von CS und US im AL führt kurzfristig dazu, dass der CS durch zusätzlich rekrutierte PN repräsentiert wird [97]. Zudem ist die Aktivität des AL direkt nach einer CS-US-Paarung wichtig, um ein STM zu bilden [98]. Nach multiplen CS-US-Paarungen lässt sich in den AL eine erhöhte PKA-Aktivität messen, welche essentiell für die Induktion des LTM ist

[37]. Desweiteren haben Studien in *Drosophila* gezeigt, dass auch die Pilzkörper Sitz des assoziativen Gedächtnisses sind [99]. Die Aktivität der Pilzkörper während des Gedächtnisabrufes ist unerlässlich um ein STM oder LTM festzustellen [75]. D.h., das assoziative Gedächtnis ist in Pilzkörperneuronen gespeichert, ohne deren Aktivität die bereits erworbene Erfahrung nicht zu Verhaltensänderungen führt.

Durch die Integration von Duft und Belohnung in den Pilzkörpern wird die Aktivität der GABAergen Feedbackneurone reduziert [91]. Dies bedeutet, durch die Assoziation wird weniger GABA ausgeschüttet und die Kenyonzellen weniger stark inhibiert. Somit werden die Kenyonzellen bei der nachfolgenden Stimulation stärker aktiviert werden. Es wurde jedoch nicht untersucht, ob diese Form der synaptischen Plastizität notwendig ist, um ein assoziatives Gedächtnis zu bilden. Um der Antwort auf diese Frage näher zu kommen, wird in dieser Arbeit die Aktivität der GABAergen Feedbackneurone künstlich imitiert, indem durch fokale Lichtblitze GABA lokal und zeitlich exakt definiert im Pilzkörper freigesetzt wird (s. Kap. 5.1.4). Somit lässt sich untersuchen, zu welchen Zeitpunkten der olfaktorischen Konditionierung die Aktivierung der GABA-Rezeptoren die Gedächtnisbildung beeinflusst.

1.5 Assoziatives Lernen und der Einfluss von GABA-Rezeptoren in der Fruchtfliege *Drosophila melanogaster*

1.5.1 Aversive olfaktorische Konditionierung

Im Gegensatz zur Honigbiene ist die Fruchtfliege *Drosophila melanogaster* kein sozial lebendes Insekt, doch besitzt auch sie ein reichhaltiges Repertoire an Verhaltensmustern [100]. Die genetischen Grundlagen der Gedächtnisbildung werden in *Drosophila* seit über 30 Jahren studiert [101-103]. Die Selektion von Mutanten hat es ermöglicht, Gene zu identifizieren, die für die Gedächtnisbildung unerlässlich sind [104, 105]. Das bevorzugt verwendete Lernparadigma ist die aversive olfaktorische Konditionierung [106, 107]. Dabei werden den Fliegen während eines Trainings nacheinander zwei Düfte präsentiert, wobei der erste Duft (CS+) mit einer Bestrafung in Form von elektrischen Schocks (US) gekoppelt wird. Der zweite Duft (CS-) wird ohne jegliche Assoziation präsentiert.

In einem anschließenden Gedächtnisabruf werden den Fliegen in einer sogenannten „T-maze“ beide Düfte zur Auswahl gestellt. Haben die Fliegen die Assoziation korrekt erlernt, meiden sie den bestrafte Duft (CS+) und bewegen sich zum unbestraften Duft (CS-).

Wie bereits erwähnt, ist der Aufbau der Gehirne von Honigbiene und Fruchtfliege sehr ähnlich. Wie in der Honigbiene, wird die Duftinformation in der Fruchtfliege mittels des exzitatorischen Neurotransmitters Acetylcholin zu Antennalloben und Pilzkörper gebracht. Weit weniger gut untersucht, sind die neuronalen Netzwerke, die an der Übertragung der Bestrafung (elektrische Schocks) beteiligt sind. Man weiß jedoch, dass die Signalübertragung durch dopaminerge Neurone unverzichtbar für die Vermittlung der Bestrafung ist [108, 109]. Zudem sind für eine erfolgreiche Gedächtnisbildung metabotrope Dopamin-Rezeptoren in den Pilzkörpern erforderlich, die je nach Typ die intrazelluläre cAMP-Konzentration erhöhen oder verringern [95, 110]. Dies zeigt wiederum, dass die Integration von CS und US, die für die Gedächtnisbildung notwendig ist, in den Pilzkörpern stattfindet. Interessanterweise stehen die Pilzkörper und auch die Gedächtnisbildung unter der Kontrolle zweier riesiger inhibitorischer GABAerger Neurone.

1.5.2 GABAerge Inhibition der Pilzkörper und der Gedächtnisbildung in der Fruchtfliege

In jeder Hirnhälfte wird der Pilzkörper von einem GABAergen APL-Neuron (anterior paired lateral) innerviert [111]. Wie für die GABAergen Feedbackneurone der Honigbiene konnte für dieses Neuron gezeigt werden, dass dessen Aktivität durch die assoziative Konditionierung verringert wird [111]. Zudem kann die Gedächtnisleistung der Fruchtfliege verbessert werden, wenn die GABA-Synthese innerhalb der APL-Neurone reduziert wird [111]. Somit zeigt sich auch in der Fruchtfliege, dass eine verringerte Aktivität GABAerger Neurone die Gedächtnisleistung verbessern kann, während die Überaktivierung des inhibitorischen Systems die Gedächtnisleistung verschlechtert [111].

Das Wissen um die verschiedenen Typen von GABA-Rezeptoren in Insekten stammt fast hauptsächlich aus Forschungen an *Drosophila* [112, 113]. Wie in Säugetieren, kommen im Gehirn der Insekten sowohl ionotrope als auch metabotrope GABA-Rezeptoren vor. Die ionotropen Rezeptoren bilden ebenfalls aus fünf Untereinheiten einen Chlorid-Kanal. Im Gegensatz zu den Säugetieren gibt es jedoch nur drei

Untereinheiten: RDL, LCCH3 und GRD [113]. Die Untereinheiten LCCH3 und GRD, von denen jeweils nur eine Variante bekannt ist, scheinen alleine nicht in der Lage zu sein, funktionelle GABA-Rezeptoren zu bilden [114]. Daher wird vermutet, dass diese Untereinheiten nur mit RDL, von dem vier Varianten bekannt sind [115], funktionelle GABA-Rezeptoren bilden. Die RDL-Untereinheit ist die am weitesten verbreitete Untereinheit im Gehirn der Insekten [116] und bildet mit den anderen Untereinheiten, oder auch aus homo-oligomeren, funktionelle GABA-Rezeptoren [114]. Die Überexpression von RDL innerhalb der Pilzkörper führt in *Drosophila* zu einer Verschlechterung des assoziativen Gedächtnisses [117, 118]. Im Gegensatz dazu führt ein Knockdown von RDL zu einer verbesserten Gedächtnisleistung [117, 118]. Auch der metabotrope GABA-Rezeptor wird im Gehirn der Insekten exprimiert [119]. Die Funktion dieses Rezeptors ist weitestgehend unbekannt. Es gibt jedoch Hinweise, dass die Manipulation metabotroper GABA-Rezeptoren in *Drosophila* die Wahrnehmung von „Schmerzen“ verändert [120]. Somit könnten diese Rezeptoren auch an der Wahrnehmung von elektrischen Schocks während der aversiven Konditionierung beteiligt sein.

Durch die Manipulation des Expressionsniveaus einer einzelnen Untereinheit lassen sich in der Fruchtfliege eindeutige Veränderungen der Gedächtnisleistung bewirken. Dies macht die Fruchtfliege zu einem optimalen Modellorganismus, um die Funktion inhibitorischer Neurone während der Gedächtnisbildung zu studieren. Manipulationen des Expressionsniveaus stellen jedoch langsame Veränderungen dar, mit denen sich der Einfluss des inhibitorischen Systems auf Acquisition, Konsolidierung und Gedächtnisabruf nicht unterscheiden lässt. Zudem lassen sich die Konsequenzen dieser Manipulation auf zellulärer Ebene nur sehr schwer vorhersagen. Daher wird in dieser Arbeit untersucht, wie die Kenyonzellen, die unter anderem das Ziel der GABAergen APL-Neurone sind, GABAerge Informationen verarbeiten. Dazu wird das GAL4/UAS-System der Fruchtfliege genutzt [121, 122], um das calciumsensitive Fluoreszenzprotein Cameleon 2.1 [123, 124] in einer Subpopulation von Kenyonzellen einzuschleusen, die an der Gedächtnisbildung beteiligt sind [125]. Auf diese Weise lässt sich nicht nur zeigen, wie GABA die neuronale Aktivität von Kenyonzellen reguliert, sondern es lassen sich auch Vorhersagen machen, wie sich Veränderungen des GABAergen Systems auf die Gedächtnisleistung auswirken könnten.

2 Zielsetzung

Ziel dieser Arbeit ist es, die Funktionen des Neurotransmitters GABA während der Gedächtnisbildung der assoziativen olfaktorischen Konditionierung in der Honigbiene zu ergründen. Dazu werden der Honigbiene selektive Agonisten ionotroper und metabotroper GABA-Rezeptoren in Kopf und Thorax injiziert, um folgende Fragen zu beantworten:

-Wie wirkt sich die Aktivierung der GABA-Rezeptoren auf Acquisition, Konsolidierung und Gedächtnisabruf aus?

-Unterscheiden sich die Auswirkungen der selektiven Agonisten nach schwachem und starkem Gedächtnistraining?

Um GABA-Rezeptoren zeitlich und räumlich definiert zu aktivieren, wurde eine Methode entwickelt, mit der sich GABA im Gehirn der Biene durch fokale Lichtblitze freisetzen lässt. Diese Methode soll folgende Fragen beantworten:

-Wie unterscheidet sich die Funktion der GABA-Rezeptoren in Antennallobus und Pilzkörper während der Gedächtnisbildung?

-Welche Rolle spielt der zeitliche Kontext der Aktivierung der GABA-Rezeptoren relativ zu Duft und Belohnung während der Paarung von CS/US und dem Gedächtnisabruf?

Anschließend soll untersucht werden, wie sich die zeitliche Relation zwischen der Freisetzung von GABA und der Prozessierung von CS/US auf die neuronale Aktivität des Pilzkörpers auswirkt. Daher wird die Integration von Inhibition und Exzitation auf isolierte Neuronen des Pilzkörpers von Honigbiene und Fruchtfliege übertragen, um folgende Frage zu klären:

-Wie beeinflussen ionotrope und metabotrope GABA-Rezeptoren die neuronale Aktivität in Abhängigkeit der zeitlichen Relation zwischen Exzitation und Inhibition?

Es sollen die Ergebnisse der Verhaltensexperimente und der isolierten Neurone kombiniert werden, um zu erläutern, mit welchen molekularen und zellulären Mechanismen GABA die Gedächtnisbildung im Pilzkörper beeinflusst. Letztlich soll dadurch auch etwas Licht auf die biologische Funktion von GABA geworfen werden.

3 Methoden

3.1 Verhaltensexperimente mit der Honigbiene *Apis mellifera carnica*

3.1.1 Haltung der Honigbienen

Alle Untersuchungen wurden ganzjährig an Sammlerinnen der Honigbiene *Apis mellifera carnica* durchgeführt. Im Sommer wurden die Bienen in normalen Bienenstöcken im Freien gehalten und konnten sich von natürlichen Futterquellen ernähren. Die Sammlerinnen wurden beim Ausfliegen aus dem Stock mittels einer Plexiglaspyramide gefangen und in Fangröhrchen überführt. Im Winter wurden die Bienen mit ihrem Stock in ein mit Insektennetz umspanntes Holzgerüst umgesiedelt, welches wiederum im Winterflughaus mit UV-durchlässigem Glasdach untergebracht ist (Temperatur: 23-25 °C mit Nachtabenkung; Luftfeuchtigkeit: 50%). Hier wurden die Bienen mit 30% (w/v) Zuckerwasser und Pollen gefüttert. Da das Insektennetz über Klettverschlüsse mit dem Holzgerüst befestigt ist, lässt es sich einfach abnehmen, um die Bienen in Fangröhrchen zu überführen.

In den Fangröhrchen wurden die Bienen auf Eis immobilisiert und anschließend mit Textilklebeband in kleine Röhrchen eingespannt (Abb. 3-1). Dabei ist wichtig, dass sich die Bienen nur solange wie nötig auf dem Eis befinden. Der Kopf der Biene kann zusätzlich mit Hilfe eines Lötkolbens und Dentalwachs fixiert werden. Die Bienen wurden 2x täglich, sowohl vor- als auch nachmittags, mit 2-3 Tropfen einer 1 M Zuckerlösung gefüttert.

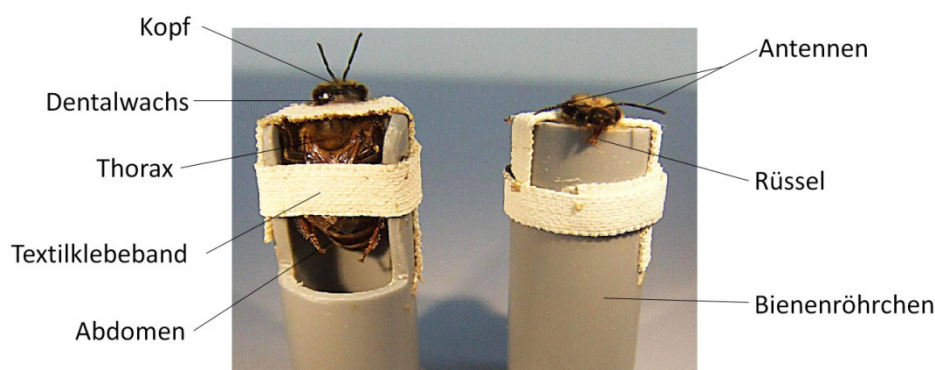


Abb. 3-1: In Plastikröhrchen eingespannte Bienen

Auf der linken Seite ist eine eingespannte Biene von hinten zu sehen. Die Hauptkörperteile Kopf, Thorax und Abdomen sind deutlich zu erkennen. Um Bewegungen des Kopfes zu minimieren wird dieser mit Dentalwachs am Textilklebeband befestigt. Von vorne (rechte Seite) sind die Antennen und der Rüssel zu sehen, die zur Fütterung und für die Experimente frei beweglich sein müssen.

3.1.2 Assoziative olfaktorische Konditionierung

Als Proboscis Extension Reflex (PER) bezeichnet man das reflexartige Herausstrecken des Rüssels nach Stimulation der Antenne mit einer Zuckerlösung. Dieser Reflex lässt sich durch die Assoziation mit einem Duft konditionieren. Dabei stellt der Duft den konditionierten Stimulus dar (CS), der mit einer Belohnung (unkonditionierter Stimulus/US) in Form von 1 M Zuckerlösung (die den PER hervorruft) gepaart wird (Abb. 3-2 und Kap. 1.3.1, Abb. 1-4). Die olfaktorische Konditionierung des PER erfolgte mit am Vortag gefangenen Bienen, die seit mindestens 16 Stunden nicht mehr gefüttert wurden. Dazu wurde jede Biene einzeln vor einem Luftabzug für 4-5 s mit einer Duftspritze (in der Regel Nelkenduft) angeblasen (CS) (Abb. 3-2). Nach etwa der Hälfte der Duftapplikation wird ein in 1 M Zuckerlösung getränkter Zahnstocher zunächst an eine Antenne und anschließend an den herausgestreckten Rüssel gehalten (US). Für ca. weitere drei Sekunden darf die Biene an der Zuckerlösung lecken und den Zucker somit aufnehmen.

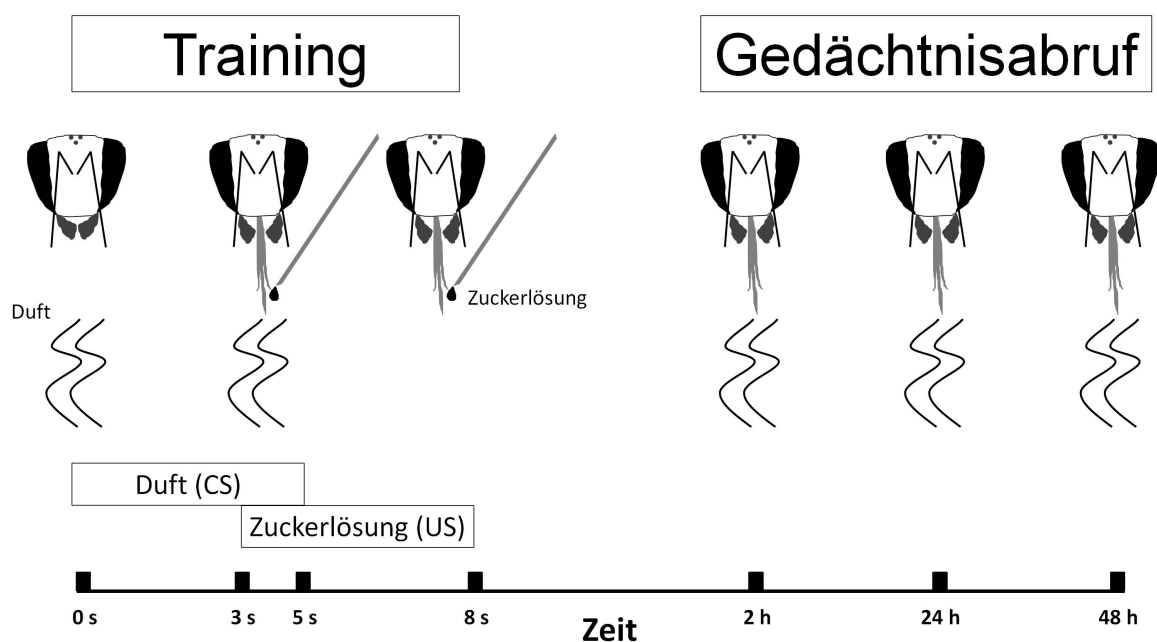


Abb. 3-2: Assoziative olfaktorische Konditionierung der Honigbiene

Während des Trainings findet die Paarung von Duft (CS) und Zuckerlösung (US) als Belohnung statt. Dabei wird die Biene zunächst für ca. 5 s mit dem Duft angeblasen. Noch während der Duftpräsentation wird der Biene die Zuckerlösung angeboten (Berührung der Antenne), woraufhin sie den Rüssel herausstreckt (PER). Damit die Biene den Zucker aufnehmen kann, lässt man sie für weitere 3 s daran lecken. Ist die Konditionierung erfolgreich, wird die Biene beim Gedächtnisabruf nach 2, 24 oder 48 Stunden auf den Duft alleine mit dem PER reagieren. Die Stabilität dieses Gedächtnisses hängt davon ab, wie oft das Training durchgeführt wird.

Die zeitliche Überlappung von CS und US ist hierbei essentiell für das Gelingen der Konditionierung. Die Paarung von CS und US wird als Training bezeichnet und je nach Versuch einmal (Ein-Trial-Training) oder auch mehrmals durchgeführt. Die Zeit zwischen den CS-US Paarungen wird als Inter-Trial-Intervall (ITI) bezeichnet. Für den Gedächtnisabruf wurden die Bienen zu den entsprechenden Zeitpunkten wieder einzeln vor einem Luftabzug mit dem trainierten Duft angeblasen. Bei der Auswertung werden alle Bienen ausgeschlossen, die auf die allererste Duftapplikation mit dem PER reagierten oder während des Trainings nicht auf den US mit dem PER reagierten (i.d.R. 5-10% der Bienen). Die Fütterung der Bienen erfolgte frühestens 30 min nach dem letzten Abruf eines Tages.

3.1.3 Sensitisierung

Unter Sensitisierung versteht man die Zunahme der Reaktionsstärke auf einen unbedeutenden Reiz, hervorgerufen durch die Stimulation mit einem unabhängigen, sehr starken Reiz. Die Honigbiene wird bei der Sensitisierung zunächst mit einer Nelkenöl enthaltenden Duftspritze angeblasen. Auf diesen unbedeutenden Reiz reagieren nur sehr wenige Bienen mit dem PER (ca. 5%). Zwei Minuten nach der Duftapplikation wird eine Antenne der Honigbiene mit einem in 1 M Zuckerlösung getränkten Zahnstocher berührt. Dieser unabhängig präsentierte, sehr starke Reiz, stellt die Sensitisierung dar. 20 s darauf erfolgt wieder eine Applikation mit Nelkenduft, woraufhin mehr Bienen mit dem PER reagieren als bei der ersten Duftapplikation. Mit diesem Verhaltensassay lässt sich überprüfen, ob applizierte Substanzen die Wahrnehmung der Duftinformation verändern. Bienen, die bei der Sensitisierung nicht mit dem PER reagierten, wurden aus der Auswertung ausgeschlossen (i.d.R. 5-10% der Bienen).

3.1.4 Habituation und Dishabituation des PER

Unter Habituation versteht man die Gewöhnung an einen dauerhaft präsentierten Reiz. Dabei tritt eine Abschwächung der Reaktion auf den Reiz dann ein, wenn dieser sich als unbedeutend erweist. Bei der Habituation der Bienen werden diese mit einem in 1 M Zuckerlösung benetzten Zahnstocher so oft an einer Antenne berührt, bis die Tiere auf fünf aufeinanderfolgende Stimuli nicht mehr mit dem Rüsselreflex reagieren oder eine Toleranzgrenze von 50 Stimuli erreicht ist. Dabei ist wichtig, dass die Bienen vor dem Experiment so angefütert werden, dass sie nur moderat hungrig sind und somit zwischen 20-30 Stimuli benötigen, um zu

habituierten. Um sicherzustellen, dass es sich bei dem Ausbleiben des Rüsselreflexes um eine echte Habituation und nicht um Ermüdungserscheinungen oder sensorische Adaptation handelt, wird anschließend die andere, nicht habituierte Antenne mit dem mit Zuckerlösung benetzten Zahnstocher berührt. Dies sollte zur Dishabituation führen, die Bienen sollten also auf diesen Stimulus mit dem Rüsselreflex reagieren. Aus der Statistik wurden alle Bienen ausgeschlossen, die mehr als 50 Stimuli benötigten, um zu habituierten oder sich nicht dishabituierten ließen (i.d.R. max. 5%).

3.1.5 Testen der Zuckerwasserempfindlichkeit (Responsiveness)

Mit Hilfe der Zuckerwasserempfindlichkeit (Responsiveness) lässt sich überprüfen, ob applizierte Substanzen die Wahrnehmung einer Stimulation mit Zuckerwasser verändern. Dazu wird der Umstand genutzt, dass die Bienen mit höherer Wahrscheinlichkeit ihren Rüssel herausstrecken (PER), umso größer die Zuckerkonzentration ist, mit der die Antenne stimuliert wird [70]. Um die Zuckerwasserempfindlichkeit zu testen, wurden die Bienen zunächst derart mit 1 M Zuckerlösung angefütert, dass nicht mehr als 10% der Bienen auf pures Wasser mit dem PER reagierten. Anschließend wurden die Bienen mit aufsteigenden Zuckerkonzentrationen (0 mM, 30 mM, 100 mM, 300 mM und 1000 mM) auf den PER getestet. Dabei wurden alle Bienen, die nicht auf 1000 mM Zucker reagierten aus der Statistik ausgeschlossen (i.d.R. 5-10% der Bienen). Nach diesem Test wurde die zu untersuchende Substanz injiziert und die Zuckerwasserempfindlichkeit erneut getestet.

3.1.6 Lichtinduziertes Freisetzen von GABA während der olfaktorischen Konditionierung

Einen Tag vor dem Verhaltensexperiment wurde der Kopf mit Wachs fixiert und mittels eines Skalpell ein Fenster in die Kopfkapsel geschnitten. Dieses Fenster erlaubt visuellen Zugang zum Gehirn und ermöglicht es, einen gewünschten Bereich des Gehirns mit Licht zu stimulieren. Bienen mit dicken, gelben Futtersaftdrüsen wurden an dieser Stelle vom Experiment ausgeschlossen (ca. 25%), da nicht gewährleistet ist, dass das applizierte Licht das Gehirn erreicht. Die Photostimulation erfolgte durch ein Blitzgerät mit einer Xenonlampe (JML-C2 von Rapp OptoElectronic GmbH). Der Ausgang des Blitzgerätes ist mit dem Adapterport eines Binokulars verbunden. Während des Verhaltensexperimentes befindet sich die Biene direkt unter dem Binokular. Die Schärfereinstellung und Vergrößerung des Binokulars

erlauben es, den Blitz in Bezug auf das Bienenhirn exakt auszurichten. Zusätzlich befindet sich im Strahlengang des Blitzes eine selbstgemachte Blende, die es ermöglicht, nur bestimmte Hirnregionen zu blitzen [126]. In jedem Experiment wurde die gewünschte Hirnregion sieben Mal geblitzt. Das zeitliche Muster in Bezug auf die CS-US Paarung oder dem Gedächtnisabruf ist in jedem Experiment eigens angegeben.

3.1.7 Injektionen

Um Substanzen systemisch zu verabreichen, erfolgte die Injektion mit einer aus einer Glaskapillare angefertigten Mikrospritze in den Thorax. Das Injektionsvolumen betrug je nach Experiment 1 oder 2 μl .

Um die Verteilung von Substanzen auf den Kopf zu beschränken, erfolgen die Injektionen über den medianen Ocellus. Dazu wurde der Kopf der Biene am Tag vor dem Verhaltensexperiment mit Dentalwachs fixiert und die Linse des Ocellus mit einem Skalpell entfernt. Die Injektion erfolgte mit einer aus einer Glaskapillare angefertigten Mikrospritze. Durch die Injektion in den medianen Ocellus verteilen sich applizierte Substanzen über den Haupttrakt der Ocellen schnell über das ganze Gehirn [127].

Die Injektionen für die ELISA-Messungen und die Injektionen von CNB-GABA erfolgten direkt in das freiliegende Gehirn.

3.2 Immunchemische und immunhistologische Techniken

3.2.1 Präparation eines Bienenhirns

Die Biene wird auf Eis immobilisiert, der Kopf mit einem Skalpell abgetrennt und in Wachs eingebettet. Mittels Skalpell wird durch einen waagerechten Schnitt von den Antennen bis zu den obersten Ocellen die Kopfkapsel geöffnet. Mit einer feinen Pinzette wird anschließend das Gehirn von Tracheen und Futtersaftdrüsen befreit, sowie das Neurolemma entfernt (Abb. 3-3). Das gewünschte Areal wird mit einem Skalpell vom Rest des Gehirns getrennt und mit einer Pinzette entnommen.



Abb. 3-3: Präparation eines Bienenhirns

Dargestellt ist ein in Wachs eingebetteter Bienenkopf mit geöffneter Kopfkapsel. Tracheen, Futtersaftdrüsen und Neurolemma wurden bereits entfernt, das Gehirn liegt frei in der Kopfkapsel. Abkürzungen: OC, Ocelli; MB, mushroom body (Pilzkörper); α L, α -Loben; AL, Antennallobus; OL, optische Loben. Bild wurde erstellt von Angelika Gardezi.

3.2.2 ELISA zur Bestimmung von freigesetztem GABA

Um die durch UV-Blitze freigesetzte Menge an GABA mittels ELISA zu messen, wurden eigens entsprechende Protokolle für Messungen *in vitro* und *in vivo* angefertigt.

Bei der *in vitro* Messung wurde eine Lösung des lichtsensitiven CNB-GABA (γ -aminobutyric acid, α -carboxy-2-nitrobenzyl ester, trifluoroacetic acid salt) mit einem Blitzsystem mit Xenonlicht (JML-C2 von Rapp OptoElectronic GmbH) geblitzt. Die anschließende ELISA-Messung gibt Aufschluss darüber, ob die Lichtquelle genügend Energie besitzt, um das CNB-GABA zu spalten und ob die Menge an freigesetztem GABA mit den erworbenen Antikörpern ermittelt werden kann.

Bei der *in vivo* Messung wurde die CNB-GABA-Lösung zunächst in das Gehirn der Honigbiene injiziert und anschließend geblitzt. Die Menge an freigesetztem GABA innerhalb des Bienenhirnhomogenats wurde mittels ELISA ermittelt.

In vitro: 50 µl einer 1 mM Lösung von CNB-GABA und PBS (Kontrolle) wurden in Eppendorfgefäßen mittels eines Blitzsystems mit Xenonlicht geblitzt (0, 6, 10, 20, 25 Mal). Damit das freigesetzte GABA vom entsprechenden Antikörper erkannt werden kann, muss die Fixierung an BSA mittels Glutardialdehyd erfolgen. Dazu wurden die Proben mit 10 µl Glutardialdehyd, 50 µg BSA und 440 µl PBS für 1 h bei 6 °C inkubiert. Die Konjugation wurde durch die Zugabe von 500 µl Tris (100 mM, pH 7) gestoppt. Anschließend wurden die Proben für die ELISA-Messung auf eine Konzentration von 4 µM verdünnt.

In vivo: Den eingespannten Bienen wurde der Kopf mit Wachs fixiert und mittels Skalpell ein Fenster in die Kopfkapsel geschnitten. Durch dieses Fenster wurde anschließend 200 nl Tiagabin (10 mM) direkt in das Gehirn injiziert. Tiagabin hemmt die Wiederaufnahme von freigesetztem GABA und verhindert somit dessen Abbau [128]. 20 Minuten nach der Injektion von Tiagabin wurde 200 nl CNB-GABA (20 mM) in das Gehirn injiziert. 10-15 Minuten nach dieser Injektion wurde das Zentralhirn mittels des Blitzsystems mit Xenonlicht sieben Mal geblitzt (Kontrollgruppe wurde nicht geblitzt). Sofort nach dem Blitzen wurde das Zentralhirn, wie in Kapitel 3.2.1 geschildert, präpariert und in 200 µl Homogenisierungspuffer (1xPBS; 1 M Urea; 1 mM EDTA) in einem Glashomogenisator auf Eis überführt. Mittels S-Pistillen wurde das Zentralhirn homogenisiert und die Proben in Eppendorfgefäße überführt. Um das freigesetzte GABA mit BSA zu fixieren, wurde den Proben 10 µl Glutardialdehyd, sowie 12 µg BSA hinzugefügt und für eine Stunde bei 6 °C inkubiert. Diese Konjugationsreaktion wurde anschließend durch die Zugabe von 50 µl Tris-HCl (100 mM, pH 7) gestoppt.

ELISA-Messung: Die hergestellten Proben wurden in einer 1:2 Verdünnung (50 µl Probe +100 µl Homogenisierungspuffer) auf die ELISA-Platte aufgetragen und es wurde eine fünfstufige Verdünnungsreihe (1:1) erstellt. Die ELISA-Platte wurde 1 h bei RT mit den Proben inkubiert. Die Kavitäten wurden anschließend geleert, mit 400 µl ELISA-Blocklösung (1x PBS; 0,5% (w/v) BSA) gefüllt und für 1-2 h bei 6 °C geblockt. Danach wurde die Blocklösung verworfen und zu jeder Kavität wurde 50 µl des primären Antikörpers (Anti-GABA, 1:1000, s. Kap. 4.4.1) hinzugegeben. Die Platte wurde über Nacht bei 4 °C auf einem Schüttler inkubiert. Am nächsten Tag erfolgte das Waschen mit PBS (3x5 min) und eine Inkubation mit dem sekundären Antikörper (Anti-Maus IgG, Alkaline Phosphatase-Konjugat, 100 µl pro Kavität,

1:4000 s. Kap. 4.4.1) für 1 h bei RT. Nach erneutem Waschen mit PBS (3x5 min) wurde 200 µl Färbelösung (1x RxN-Puffer; 1 mM p-NPP) in jede Kavität pipettiert und die ELISA-Platte bei 37°C im Brutschrank entwickelt, bis eine leichte Gelbfärbung sichtbar war. Aufgrund der Konzentrationsreihe ergibt sich eine kontinuierliche Steigung dieser Gelbfärbung, die ein Maß für die Menge an freigesetztem GABA darstellt. Um innerhalb der *in vivo*-Messung Schwankungen der verwendeten Homogenatmenge auszugleichen, wurde mittels eines zusätzlichen primären Antikörpers (Anti-PKA, 1:1000, s. Kap. 4.4.1) die Menge an PKA ermittelt und in Relation zur freigesetzten Menge an GABA gestellt. Um die Messungen verschiedener ELISA-Platten zusammentragen zu können, wurden die Messungen einer Platte anhand des Mittelwertes der Kontrollen dieser Platte normiert.

3.2.3 Immunhistologie

Der eingespannten Biene wurde der Kopf mit Wachs fixiert und mittels Skalpell ein Fenster in die Kopfkapsel geschnitten. Durch dieses Fenster wurde in jede Hirnhälfte zunächst 100 nl Tiagabin und 15 min später 100 nl CNB-GABA injiziert. Anschließend wurde nur der Pilzkörper der linken Hirnhälfte direkt neben den optischen Loben sieben Mal geblitzt. Zur Vorfixierung wurde ein Tropfen Fixierlösung (0,5% Fixierlösung + 1,25% Glutardialdehyd) in die Kopfkapsel gegeben und für 30 min bei RT inkubiert. Danach wurde das Gehirn wie in Kap. 3.2.1 erläutert heraus präpariert und in der Fixierlösung für weitere 2,5 h auf Eis inkubiert. Um das Gehirn zu säubern, wurde es dreimal für 15 min in Phosphatpuffer ausgewaschen. Zur Entwässerung wurden die Gehirne in 60% Isopropylalkohol überführt und über Nacht bei 4°C auf dem Schüttler inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Gehirne bei RT für jeweils eine Stunde in 90% und 100% Isopropylalkohol inkubiert. Anschließend wurden die Gehirne für jeweils eine Stunde bei 45°C in 100% Isopropylalkohol und bei 70°C in einem Paraffin-Isopropylalkoholgemisch (1:1) inkubiert. Um die Gehirne in einen Wachsblock einzubetten, wurden sie über Nacht in flüssigem Paraffin bei 60°C aufbewahrt. Am nächsten Morgen wurde das Paraffin erneuert und nachdem das Paraffin nach ca. 2 h fest geworden war, konnten die Gehirne ausgeblockt werden. Für die Mikrotom-Paraffinschnitte wurden die Paraffinblöcke zurecht getrimmt und 7 µm dünne Serienschnitte angefertigt, die auf einen mit Poly-L-Lysin beschichteten Glasobjektträger mit Hilfe von Aqua dest. übertragen und anschließend bei 40°C auf einer Heizplatte gestreckt und getrocknet wurden. Danach verblieben die Schnitte über Nacht bei 45°C im Wärmeschrank. Um eine

Antikörperfärbung durchzuführen, mussten die Schnitte auf dem Objektträger zunächst entparaffiniert werden. Dazu wurden die Objektträger in Xylol (zweimal 5 min) und anschließend in eine absteigende Ethanolreihe überführt (96%, 90 %, 80%, 70 %, 50%; für je 2 min). Die nun folgenden Schritte wurden alle in einer dunklen Schale durchgeführt. Für 30 min wurden die Schnitte in Blockpuffer geblockt und über Nacht bei 4°C mit dem primären Antikörper inkubiert (Anti-GABA in Blockpuffer; 1:1000, s. Kap. 4.4.1). Am nächsten Tag wurde der Primärantikörper abgespült und die Schnitte dreimal für 5 min mit PBS-T gewaschen und anschließend mit dem sekundären Antikörper (Anti-Mouse IgG Cy3-Konjugat; 1:500 in PBS-T) für 1,5 h bei RT inkubiert. Zum Schluss wurden die Schnitte mit PBS-T gewaschen (dreimal für 5 min), ein Tropfen eines Glycerin-Aqua dest. Gemisches (1:1) hinzugegeben und mit einem Deckglas abgedeckt. So können die Schnitte im Kühlschrank bei 4°C gelagert werden. Um die Schnitte zu mikroskopieren und fotografieren, wurde das in Kap. 3.3.4 erläuterte Imaging-Setup verwendet.

3.3 Messung der neuronalen Aktivität der Kenyonzellen der Honigbiene im Durchflusssystem

In diesem Kapitel wird erläutert, wie die adulten Kenyonzellen der Honigbiene präpariert und aus dem Zellverband herausgelöst wurden. Anschließend wurden die Kenyonzellen auf beschichtete Deckgläser aufgebracht und über Nacht ruhen gelassen. Am nächsten Tag wurden die Kenyonzellen mit Fluo-4 geladen und für die Messungen im Durchflusssystem integriert.

3.3.1 Beschichtung der Deckgläser

Die Deckgläser (Ø 3 cm) wurden mittels Ethanol entfettet. Anschließend wurde mit einem Edding ein Kreis in die Mitte des Deckglases gezeichnet, welcher die Position der Zellsuspension markiert. Der Kreis wurde mit einem Fettstift nachgezogen, mit Poly-L-Lysin (0,01%) bedeckt und anschließend für 30-45 min bei RT inkubiert. Nach der Inkubationszeit wurde das Poly-L-Lysin entfernt (nicht gewaschen) und das Deckglas an der Luft getrocknet, bis keine Flüssigkeit mehr zu sehen war. Die fertig beschichteten Deckgläser können im Kühlschrank bei 4°C aufbewahrt werden.

3.3.2 Präparation adulter Kenyonzellen

Für jedes Experiment wurden 8-10 Bienen (Sammlerinnen) gefangen. Die Pilzkörper wurden wie in Kap. 3.2.1 erläutert präpariert und in ein Eppendorfgefäß mit 200 µl

Collagenase/Dispase Mix (1 mg/ml; gelöst in calciumfreiem Bienen-Ringer) überführt. Um das Herauslösen der Zellen während der anschließenden 30-minütigen Inkubation bei 34 °C zu beschleunigen, wurde die Zellsuspension alle 10 min vorsichtig 7-10 Mal durchmischt (tituriert). Nach dem letzten Titurationsschritt lässt man das Gewebe für 30 s absetzen und überführt den Überstand in ein neues Eppendorfgefäß. Der Überstand enthält die einzelnen Neurone und wurde weiter verwendet. Das abgesetzte Gewebe wurde verworfen, es besteht aus abgerissenen Neuriten und der Gliahülle des Bienenhirns. Der Überstand wurde für 3,5 min bei 1200 rpm zentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand verworfen, das Pellet in 500 µl Bienen-Ringer resuspendiert. Die Zellsuspension wurde auf zehn beschichtete Deckgläser übertragen (10 x 50 µl). Damit die Zellen am Untergrund haften können, ruhten sie für 1 h bei RT in einer Feuchtkammer. Anschließend wurde der Ringer durch Bienen-Medium ersetzt und die Zellen ruhten über Nacht bei RT in einer Feuchtekammer.

3.3.3 Das Durchflusssystem

15 min vor der Messung wurde das Bienen-Medium durch 2 µM Fluo-4 ersetzt (1 mM Stammlösung, in DMSO gelöst, wurde mittels Bienenringer 1:500 verdünnt). In dieser Zeit dringt das Fluo-4 in die Zellen ein und ermöglicht die Detektion von intrazellulärem Calcium, was Rückschlüsse auf die neuronale Aktivität erlaubt (Abb. 3-4). Nach der Inkubationszeit wurde das Deckglas mit der Zellsuspension in die selbstgebaute Durchflussskammer eingesetzt und mit frischem Bienenringer auf ein Volumen von 700 µl aufgefüllt (Abb. 3-5). Dabei wurden Fassung, Deckglas und Silikoneinsatz mit Hochvakuumfett wasserdicht zusammengesetzt. Die Durchflussskammer ermöglicht es, die Zellen ständig mit frischem extrazellulärem Milieu zu versorgen, sowie mit Neurotransmittern zu stimulieren und diese wieder wegzuwaschen. Die fertige Durchflussskammer wurde in das Durchflusssystem integriert: Frischer Ringer fließt mittels einer 2-Kanal-Pumpe hinein und wird durch dasselbe Gerät wieder herausgepumpt, wodurch ein stabiler Fluss mit einer Durchflussgeschwindigkeit von 6 ml/min entsteht. Anschließend wurden die Zellen für 3-4 min mit Ringer gewaschen. Die Stimulation mit den entsprechenden Neurotransmittern erfolgte durch den Wechsel vom Ringer-Reservoir zu einem entsprechenden Neurotransmitter-Reservoir. Dieser Wechsel erfolgte für alle Neurotransmitter für 3 s. Alle Neurotransmitter wurden in Bienenringer gelöst und dem System mit einer Konzentration von 5 µM hinzugefügt.

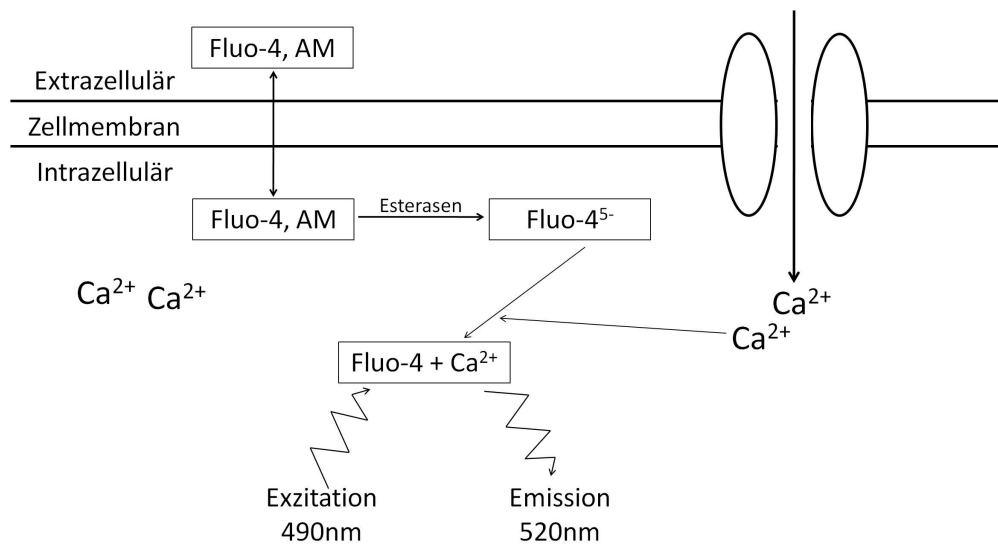


Abb. 3-4: Funktionsweise von Fluo-4, AM

Das hydrophobe Molekül Fluo-4, AM diffundiert durch die Zellmembran in das Zellinnere, wo intrazelluläre Esterasen die Ester-Gruppen des Fluo-4-Moleküls abspalten. Dadurch wird Fluo-4 negativ geladen, wodurch es in der Lage ist, positives Ca²⁺ zu binden. Erst wenn Fluo-4 Ca²⁺ bindet, fluoresziert es nach Anregung mit 490 nm. Erhöht sich die intrazelluläre Calcium-Konzentration nach Aktivierung der Zelle, z.B. durch Calciumeinstrom von außen, so erhöht sich auch die Fluoreszenzintensität bei 520 nm.

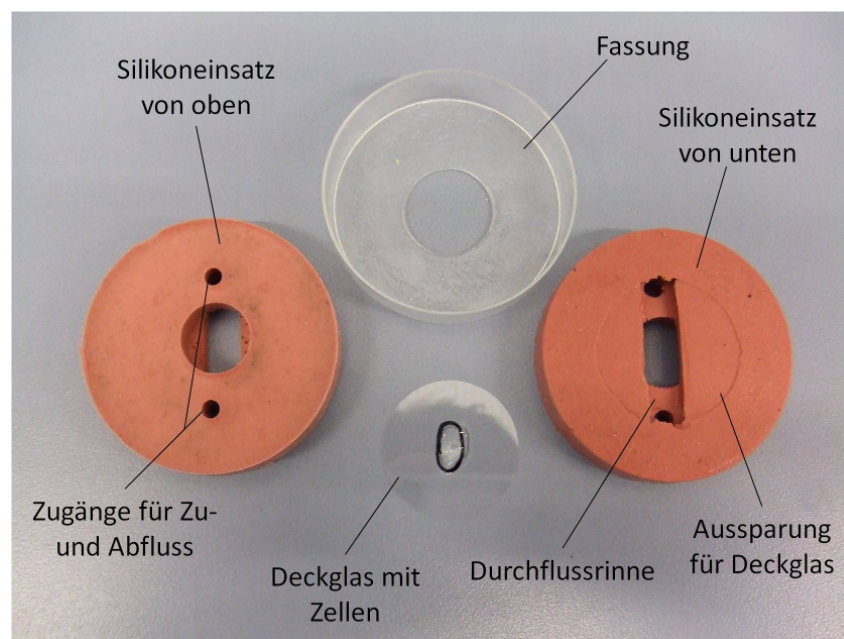


Abb. 3-5: Selbstgebaute Durchflusskammer

Das Deckglas wird über der Aussparung der Fassung platziert. Dabei werden Deckglas und Fassung mittels Hochvakuumfett miteinander verbunden. Durch die Aussparung können die Zellen später besser sichtbar gemacht werden, da sich kein Plastik zwischen Objektiv und Deckglas befindet. Anschließend wird der Silikoneinsatz, der aus Silikonkautschuk gegossen wurde, von oben in die Fassung gedrückt und sichergestellt, dass diese luft- und wasserdicht miteinander verbunden sind. Betrachtet man den Silikoneinsatz von unten, so ist eine Aussparung für das Deckglas und die Rinne, durch die später der Ringer über die Zellen fließt, sichtbar. Nachdem die fertige Durchflusskammer mit Ringer aufgefüllt ist, werden die Zugänge für Zu- und Abfluss gelegt.

3.3.4 Imaging-Setup und Datenprozessierung

Als Mikroskop wurde für alle Messungen das Axiovert 200M von Zeiss verwendet. Die Messungen wurden mit einem 20X Plan-Neofluar Objektiv (NA 0.5) durchgeführt. Der Polychromator, ausgestattet mit einem computer-gesteuerten Shutter, generiert die Wellenlänge 490 nm, die das Fluo-4 anregt (Abb. 3-4). Während der Messung wurde alle 1,6 s ein Bild aufgenommen, wobei die Belichtungsdauer für jedes Einzelbild 100 ms betrug. Die auf diese Weise erstellten Bilder wurden mit Hilfe des Programms Slidebook™ 4.2 ausgewertet. Die erste Stimulation der Kenyonzellen mit ACh diente als Referenzstimulation. Nur Kenyonzellen, die einen eindeutigen Calciumeinstrom und auch einen Calciumausstrom aufwiesen, wurden für die nächsten Stimulationen in Betracht gezogen. Innerhalb einer Messung wurden alle Zellen, die dieses Kriterium erfüllten, gemittelt. Die Amplitude der ersten Stimulation jeder Messung wurde auf 100% gesetzt und die nachfolgenden Stimulationen daran normiert. Zudem wurde der Beginn jeder Stimulation auf 0 (Baseline) gesetzt.

3.4 Messung der neuronalen Aktivität der Kenyonzellen von *Drosophila melanogaster*

In diesem Kapitel wird erläutert, wie die Fruchtfliegen gehalten und gefüttert werden. Wie die adulten Gehirne der Honigbiene (Kapitel 3.3) wurden auch die larvalen Gehirne von *Drosophila* präpariert und die Kenyonzellen für die Messung der neuronalen Aktivität vorbereitet.

3.4.1 *Drosophila melanogaster*: Haltung und verwendeter Genotyp

Alle Fliegen wurden in Brutkästen in einem 12/12 Stunden Hell/Dunkel Zyklus bei 24 °C und 60% relativer Luftfeuchtigkeit gehalten. Entsprechendes *Drosophila*-Futter [129] steht ständig zur Verfügung. Alle Experimente mit *Drosophila* wurden mit den Larven des Stamms w^+ ; 201y-GAL4; UAS-cameleon 2.1 durchgeführt, der freundlicherweise von Dr. Andre Fiala zur Verfügung gestellt wurde [123, 130, 131]. Der Stamm ist homozygot für das GAL4 und das UAS-Konstrukt und exprimiert somit stabil das Protein Cameleon 2.1 in einer Teilmenge der Kenyonzellen des Pilzkörpers.

3.4.2 Präparation des larvalen Gehirns von *Drosophila*

Für jedes Experiment wurden 18-21 Larven im 3. Larvenstadium (post feeding) gesammelt und mit dH₂O gewaschen. Die Gehirne wurden in *Drosophila*-Ringer präpariert und in ein Eppendorfgefäß mit 60 µl Collagenase/Dispase Mix (1mg/ml; gelöst in calciumfreien *Drosophila*-Ringer) überführt. Während einer 30-minütigen Inkubation bei 34 °C lösen sich die Neurone voneinander und vom umliegenden Gewebe. Um das Herauslösen der Zellen aus dem Zellverband zu beschleunigen, kann man die Probe mehrmals sanft titurieren. Nach der Inkubation wurde die Probe für 3,5 min bei 1600 rpm zentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand verworfen und das Pellet in 160 µl *Drosophila*-Medium resuspendiert. Für das stationäre System wurden 8x20 µl Tropfen der Zellsuspension auf einen beschichteten Objektträger (24x50 mm) übertragen. Für das Durchflusssystem wurde die Zellsuspension auf 3 beschichtete Deckgläser (Ø 3 cm) übertragen (3x50 µl). Damit die Zellen am Untergrund haften können, ruhten sie über Nacht bei RT in einer Feuchtekammer.

3.4.3 Imaging-Setup

Die Messungen an den Kenyonzellen von *Drosophila* wurden mit demselben Mikroskop, Objektiv und Polychromator durchgeführt, die in Kapitel 3.3.4 erläutert sind. Der Polychromator erzeugt eine Wellenlänge von 440 nm, mit der das Cameleon-Protein in den Kenyonzellen angeregt wird. Das daraufhin von Cameleon emittierte Licht wird vom Dual-View Imager in zwei verschiedene Kanäle aufgetrennt (Abb. 3-6). Die Wellenlängen von ECFP (enhanced cyan fluorescent protein) und EYFP (enhanced yellow fluorescent protein) werden durch das dichromatische Filterset im Dual-View Imager so aufgetrennt, dass die CCD Kamera diese beiden Signale separat und simultan aufnehmen kann. Alle 1,2 s wurde ein Bild der emittierten Wellenlängen aufgenommen, wobei die Belichtungsdauer für EYFP 150 ms betrug und für ECFP 300 ms. Die auf diese Weise erstellten Bilder wurden mit Hilfe des Programms SlidebookTM 4.2 ausgewertet.

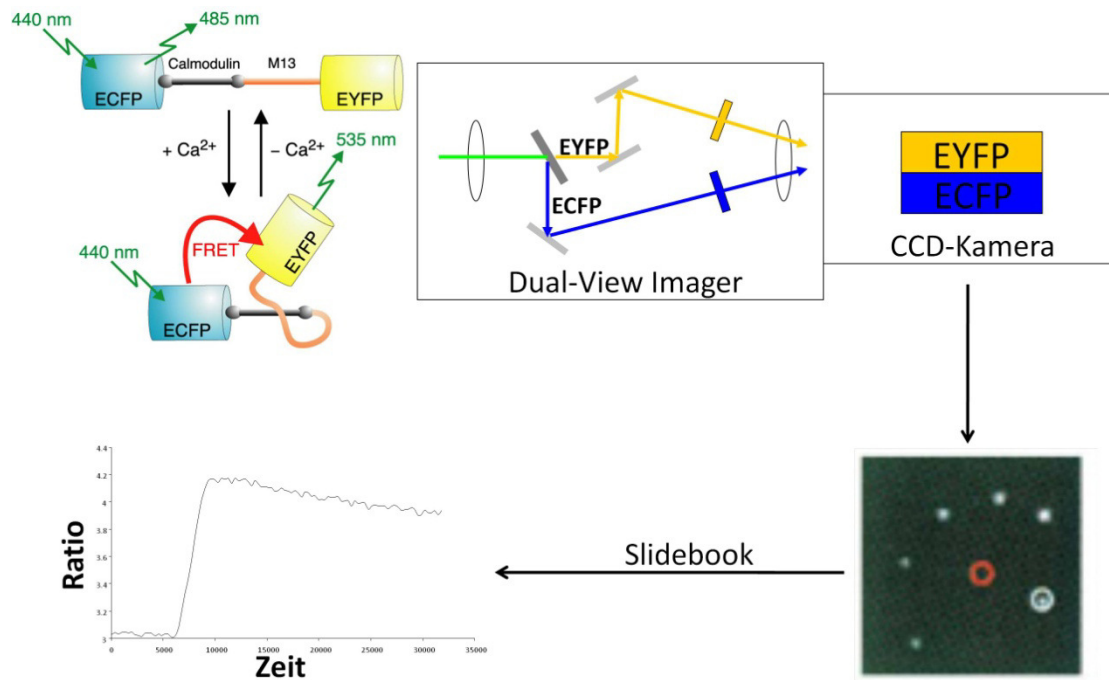


Abb. 3-6: Funktionsweise und Verarbeitung der Signale von Cameleon

Das Cameleon-Protein besteht aus dem ECFP und dem EYFP, welche über Calmodulin (CaM) und das calmodulin Zielpeptid M13 miteinander verbunden sind. Ohne gebundenes Calcium fluoresziert Cameleon nach Anregung mit 440 nm bei 485 nm. Bindet Cameleon durch Erhöhung der intrazellulären Calcium-Konzentration Ca^{2+} , kommt es zur Konformationsänderung und zur Energieübertragung (FRET, fluorescence resonance energy transfer) von ECFP auf EYFP. Dadurch entsteht eine neue Fluoreszenzwellenlänge bei 535 nm, während sich die Fluoreszenzintensität bei 485 nm verringert. Diese beiden Emissionswellenlängen von Cameleon werden durch den dichromatischen Filter im Dual-View Imager in zwei separate Kanäle aufgetrennt und von der CCD Kamera simultan aufgenommen. Es entsteht ein Bild von zwei überlagerten Fluoreszenzwellenlängen, die mithilfe der Slidebook-Software ausgewertet werden. Dabei wird untersucht, ob sich die Ratio der Wellenlängen (EYFP/ECFP) durch die Zugabe von verschiedenen Neurotransmittern verändert.

Quelle der Abbildung von Cameleon:

<http://stke.sciencemag.org/content/sigtrans/vol2003/issue174/images/large/1742003pl6F1.jpeg>

3.4.4 Das stationäre System

Vor der Messung wurde das Medium, in dem sich die Zellen befinden, durch frischen *Drosophila*-Ringer ersetzt. Nachdem das Deckglas am Imaging-Mikroskop eingespannt wurde, sucht man mittels Durchlicht innerhalb eines Kreises eine Stelle, an der sich möglichst viele Zellen befinden. Anschließend wurde unter den entsprechenden Fluoreszenzbedingungen überprüft, ob sich im visuellen Feld Zellen befinden, die das Cameleon-Protein exprimieren. Das visuelle Feld wurde dann so gewählt, dass möglichst viele fluoreszierende Zellen zu sehen sind. Nun wurde eine Messreihe gestartet, bei der ca. 30 s lang die beiden Emissionswellenlängen des Cameleon-Proteins gleichzeitig aufgenommen wurden. Ca. 5-10 s nach dem Start der Messreihe wurden 2 μl der entsprechenden Neurotransmitter zu den Zellen gegeben. Bei der Auswertung der Daten wurde für jede Zelle ein Wert Q gebildet, der

sich durch den Quotienten der Mittelwerte der EYFP/ECFP-Ratio 10-20 s nach der Stimulation und vor der Stimulation ergibt. Der Wert Q sagt aus, um wie viel Prozent sich die EYFP/ECFP-Ratio durch die Stimulation verändert hat. Im Rahmen meiner Diplomarbeit konnte gezeigt werden, dass ein Wert für $Q > 1,01$ nur dann auftritt, wenn die Zellen mit dem exzitatorischen Neurotransmitter Acetylcholin stimuliert wurden. Bei Zugabe von Ringer konnte ein solcher Wert nicht erreicht werden. Daher wurden alle Zellen mit einem Wert $Q > 1,01$ als stimuliert betrachtet. Unterhalb dieses Wertes wurde eine Zelle als nicht stimuliert betrachtet. Sind direkt die Calciumkinetiken der Kenyonzellen dargestellt, so ist die prozentuale Veränderung der EYFP/ECFP-Ratio (Ratiochange) abgebildet. Dabei wurde der höchste Wert der Calciumkinetik als 100% festgelegt und alle anderen Werte daran normiert.

3.4.5 Das Durchflusssystem

Das Deckglas wurde in die selbstgebaute Durchflussskammer (Abb. 3-5) eingesetzt und mit frischem *Drosophila*-Ringer auf ein Volumen von 700 μ l aufgefüllt. Nun wurde die Durchflussskammer in das Durchflusssystem integriert. Frischer Ringer fließt mittels Gravitation hinein und wird durch eine 1-Kanal-Pumpe herausgepumpt. So entsteht ein stabiler Fluss, der mittels Schlauchklemme und Pumpgeschwindigkeit auf eine Durchflussgeschwindigkeit von 6 ml/min eingestellt wurde. Anschließend wurden die Zellen für 3-4 min mit Ringer gewaschen. Die Stimulation mit den entsprechenden Neurotransmittern erfolgte durch den Wechsel vom Ringer-Reservoir zu einem entsprechenden Neurotransmitter-Reservoir. Dieser Wechsel erfolgte für alle Neurotransmitter für 3 s. Alle Neurotransmitter wurden in *Drosophila*-Ringer gelöst und mit einer Konzentration von 10 μ M verwendet.

4 Materialien

4.1 Chemikalien

1-Octanol	Apotheke
3-APMPA (SKF 97541)	Acent Scientific
Acetylcholin	Sigma
Agar-Agar	Propio GMBH
Bierhefe	Propio GMBH
BSA (bovine serume albumine)	PAA
CaCl ₂ (Calciumchlorid)	AppliChem
CNB caged GABA	Invitrogen
Collagenase/Dispase-Mix	Sigma
Dextrose	Sigma
DMSO (Dimethylsulfoxid)	Z-Chem
EDTA (Ethylendiamintetraessigsäure)	Z-Chem
FCS (Fötales Kälberserum)	PAA
Fluo 4 AM	Invitrogen
Formaldehyd	Z-Chem
Fructose	Applichem
GABA (gamma-aminobutyric acid)	Sigma
Gentamicin	Sigma-Aldrich
Geraniol	Apotheke
Gerstenmalzextrakt	Demeter
Glutamat	Sigma
Glucose	Supermarkt
Glutardialdehyd	Roth
H ₃ PO ₄ (Phosphorsäure)	Sigma
Hepes	AppliChem
Hochvakuumfett (Schwer)	Wacker Silicones

Isopropylalkohol	Z-Chem
KCl (Kaliumchlorid)	Sigma
KH ₂ PO ₄ (Kaliumdihydrogenphosphat)	Merck
L-15 Medium	Gibco
Maisgrieß	Bäko
MgCl ₂ (Magnesiumchlorid)	AppliChem
Muscimol	Ascent Scientific
Na ₂ HPO ₄ (Natriumhydrogenphosphat)	Grüssing GMBH
NaCl (Natriumchlorid)	AppliChem
Nelkenöl	Apotheke
Nipagin	AppliChem
Paraffinwachs	Fluka
Penicillin-Streptomycin Mix	Sigma
Picrotoxin	Sigma
Pipes	Applichem
p-NPP	AppliChem
Poly-L-Lysin (0,01%ige Lösung)	Sigma
Prolin	AppliChem
Propionsäure	Sigma
Saccharose	AppliChem
Silikonkautschuk M4601	Elastosil/ Wacker
Sojamehl	Propio GMBH
TC 100 Insektenmedium	PAA
Tiagabine hydrochlorid	Ascent Scientific
Tris (Tris(hydroxymethyl)-aminomethan)	Sigma-Aldrich
Triton-X-100	Fluka
Urea	Sigma
Yestolat	Gibco
Zuckerrübensirup	Grafschafter

4.2 Geräte und Materialien

1-Kanal-Pumpe LKB; Pump P-1	Pharmacia
2-Kanal-Pumpe ISM 849	Ismatec
1 mL-Glashomogenisator mit Glas-S-Stößel	Braun
Bienenracks	eigene Herstellung
Bienenröhrchen	eigene Herstellung
Binokular	S6D Leica
Block-Heizgerät (Accu Block)	Labnet
Brutschrank	Horo
CCD Kamera CoolSnap HQ2	Photometrics
Deckgläser (24x50mm)	Roth
Deckgläser (Ø 3cm)	VWR international
Dual-View Imager	Optical Insights, LLC
ELISA-Reader	safire ² Tecan
Inverses Imaging-Mikroskop Axiovert 200 M	Zeiss
Kaltlichtquelle KL 1500 LCD	Schott
LötKolben	eigene Herstellung
Mikroinjektor Pikospritzer II	General Valve
Mikropipetten Puller Model P-87	Sutter Instrument Co.
Mikrotom Autocut 2040	Reichert-Jung
pH-Meter (inoLab pH 730)	WTW
Pinzetten	Dumont
Polychromator Polychrome V	TILL Photonics
Reaktionsgefäße (1,5 ml)	Eppendorf
Rührheizgerät IKA RCT basic	IKA-Labortechnik
Schüttler KS501 digital	IKA-Labortechnik
Waage CP3202S und CP225D	Sartorius
Xenon Blitzlichtsystem JML-C2	Rapp Opto Electronic
Zentrifuge (Spectrafuge 24D)	Labnet

4.3 Puffer, Medien und Fruchtfliegenfutter

4.3.1 PBS (Phosphate-buffered saline)

Inhaltsstoff	Molarität (mM)	Konzentration (mg/l)
KCl	2,7	200
KH ₂ PO ₄	1,8	250
NaCl	137	8000
Na ₂ HPO ₄	10,1	1800

4.3.2 Bienen-Ringer

Inhaltsstoff	Molarität (mM)	Konzentration (mg/l)
NaCl	130	7600
KCl	6	450
CaCl ₂ x 2 H ₂ O	5	740
MgCl ₂ x 6 H ₂ O	4	810
Hepes	10	2400
	pH auf 6,7 einstellen	
Glucose	23	4150
Saccharose	117	40000

4.3.3 Bienen-Medium

25 ml L-15 Medium wurden komplementiert mit 100 mg Glucose, 62,5 mg Fructose, 82,5 mg Prolin und 1 g Saccharose. Zur Pufferung wurden darin 16,7 mg Pipes gelöst (pH 6,7). Anschließend wurden hinzugefügt: 3,34 ml FCS, 267 µl Yestolat, 1% Penicillin-Streptomycin Mix (10000 U Penicillin, 10 mg/ml Streptomycin) und 0,1% Gentamicin (50 mg/ml). Zuletzt wurde das ganze sterilfiltriert.

4.3.4 *Drosophila*-Futter

Für das *Drosophila*-Futter wurde ein sog. Kraftfutterrezept verwendet (abgewandelt nach Guo et al. [129])

Tab. 4-1: Kraftfutterrezept für *Drosophila* (1 Liter Volumen)

Zutat	Menge
Agar-Agar	8 g
Sojamehl	80 g
Bierhefe	80 g
Maisgries	100 g
Malz	80 g
Zuckerrübensirup	20 g
MgSO ₄ *7H ₂ O	0,54 g
CaCl ₂ *2H ₂ O	0,5 g
Propionsäure	6 ml
Nipagin	2,5 g

Zunächst wird das Wasser gekocht, um darin das Malz und den Sirup zu lösen. Anschließend wurde darin langsam die Mischung aus Agar-Agar, Sojamehl, Bierhefe und Maisgries gelöst. Dabei muss die Bildung von Klumpen vermieden werden. Auch die Salze MgSO₄ und CaCl₂ können nun gelöst werden. Das Ganze muss anschließend wieder aufgekocht werden. Nachdem sich der Nährbrei auf ca. 70 °C abgekühlt hat, gibt man die Propionsäure und das Nipagin hinzu.

4.3.5 *Drosophila*-Ringer

Inhaltsstoff	Molarität (mM)	Konzentration (mg/l)
NaCl	130	7600
KCl	5	370
CaCl ₂ x 2 H ₂ O	2	290
MgCl ₂ x 6 H ₂ O	2	410
Hepes	5	1190
pH auf 7 einstellen (mit NaOH neutralisieren)		
Saccharose	36	12300

4.3.6 *Drosophila*-Medium

TC 100 Insektenmedium wurde mit 10% fötalem Kälberserum, sowie 1% Penicillin-Streptomycin Mix (10000 U Penicillin, 10 mg/ml Streptomycin) und 0,1% Gentamicin (50 mg/ml) komplementiert.

4.4 Immunhistochemische Lösungen

4.4.1 Antikörper

Anti-GABA: Primärer Antikörper (monoklonal) der Firma Sigma (A0310). Erkennt GABA-BSA-Konjugate und wurde in der Maus hergestellt.

Anti-PKA: Primärer Antikörper (polyklonal) aus eigener Herstellung. Erkennt die regulatorischen Untereinheiten der PKA und wurde in der Maus hergestellt.

Anti-Maus IgG gekoppelt an Alkaline Phosphatase: Sekundärer Antikörper der Firma Sigma. Erkennt Maus-Antigene und wurde in Ziegen hergestellt.

Anti-Maus IgG gekoppelt an Cy3: Sekundärer Antikörper der Firma Dianova. Erkennt Maus-Antigene und wurde in Ziegen hergestellt.

4.4.2 ELISA

Homogenisierungspuffer: 1x PBS, 1 M Urea, 1 mM EDTA

Blocklösung: 1x PBS; 0,5% (w/v) BSA

RxN-Puffer: 0,1 M Tris/HCl pH 8,7; 1 mM $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$

Färbelösung: 1x RxN; 1 mM p-NPP

4.4.3 Histologie

Phosphatpuffer: 40 mM KH_2PO_4 ; 160 mM $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$

Blockpuffer: 1x PBS; 0,5% (w/v) BSA; 0,1% (v/v) Triton

PBS-T: 1x PBS; 0,1% (v/v) Triton

5 Ergebnisse

5.1 Beeinflussung des assoziativen Gedächtnisses der Honigbiene durch Aktivierung des GABAergen Systems

In diesem Kapitel wird untersucht, wie die künstliche Aktivierung der GABA-Rezeptoren das assoziative Gedächtnis beeinflusst. Dazu werden der Honigbiene *Apis mellifera* während der olfaktorischen Konditionierung selektive Agonisten in Thorax und Kopf injiziert. Um die Wirkungen von ionotropen und metabotropen GABA-Rezeptoren voneinander zu unterscheiden, werden spezifische Agonisten verwendet, die jeweils nur einen Rezeptortyp aktivieren.

5.1.1 Selektive Aktivierung metabotroper GABA-Rezeptoren beeinflusst die olfaktorische Diskriminierung

Die Droge 3-APMPA aktiviert spezifisch metabotrope GABA-Rezeptoren in Insekten [132]. Nach Injektion dieser Droge in den Thorax verändert sich das phänotypische Verhalten der Honigbiene deutlich. Ca. 10-20 min nach Injektion hoher Dosen beginnen die Bienen den Rüssel unkontrolliert heraus und wieder hinein zu bewegen. Nach ein bis zwei Stunden erscheint die fixierte Biene im Röhrchen erstarrt, der Rüssel bleibt ausgefahren. Eine solche Biene ist kaum von einer toten Biene zu unterscheiden. Berührt man die Antennen jedoch mit Zuckerwasser, so bewegt sich die Biene wieder und ist auch in der Lage, das Zuckerwasser über den Rüssel aufzunehmen. Entlässt man die Biene aus dem Röhrchen, so bewegt sie zwar ihre Beine, kann aber ihre Bewegungen nicht koordinieren und liegt meist strampelnd auf der Seite. Ein ähnliches Verhalten nach Injektion von 3-APMPA ist bereits in *Drosophila* beobachtet worden [133] und wird dort als katatonische Starre bzw. Katatonie bezeichnet. In Abb. 5-1 ist der prozentuale Anteil katatonischer Bienen abhängig von der Konzentration an 3-APMPA dargestellt. Nach einer thorakalen Injektion von 1 μ l 20 mM 3-APMPA sind alle Bienen katatonisch. Bei Injektion von 2 mM bzw. 100 μ M sind noch 80% bzw. 70% der Bienen nach 2 h katatonisch. Auffällig ist hierbei, dass der prozentuale Anteil katatonischer Bienen nach 1 d noch weiter ansteigt. Dies deutet darauf hin, dass die katatonische Starre irreversibel ist. Nach Injektion von 10 μ M 3-APMPA ist ein starker Abfall des Anteils katatonischer Tiere im Vergleich zu den anderen Konzentrationen zu vermerken.

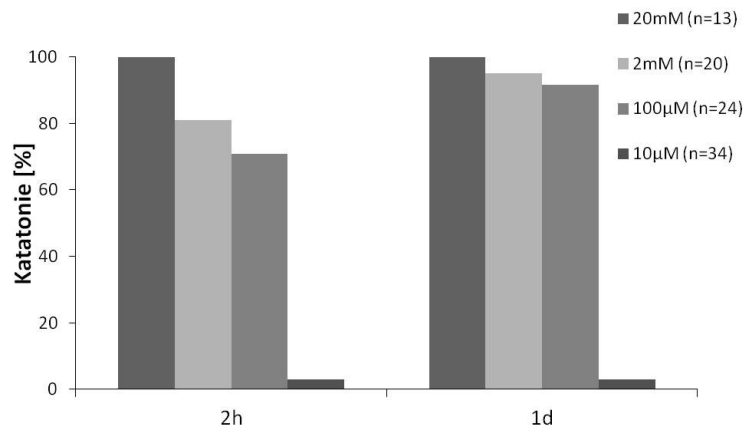


Abb. 5-1: Injektion von 3-APMPA induziert eine Katatonie

Dargestellt ist der prozentuale Anteil an Bienen, die 2 h und 1 d nach der thorakalen Injektion von 1 µl 3-APMPA eine katatonische Starre aufwiesen. Die Legende verweist auf die verwendeten Konzentrationen. Bei Injektion von 20 mM 3-APMPA sind nach 2 h und auch noch nach 1 d alle Bienen katatonisch. Nach Injektion von 2 mM und 100 µM 3-APMPA verringert sich der Anteil katatonischer Bienen. Der Anteil katatonischer Bienen ist hierbei nach 1 d größer als nach 2 h. Nach Injektion von 10 µM 3-APMPA sind nach 2 h und 1 d nur noch 3% der Bienen katatonisch. Die Anzahl der verwendeten Bienen ist in Klammern in der Legende vermerkt.

Da nach der Injektion von 10 µM 3-APMPA nur wenige Bienen katatonisch sind, können diese einem schwachen Training unterzogen werden (Abb. 5-2A). Somit lässt sich testen, ob sich die Aktivierung metabotroper GABA-Rezeptoren auf das assoziative Gedächtnis auswirkt. Die Gedächtnisleistung nach der thorakalen Injektion von 10 µM 3-APMPA unterscheidet sich jedoch nicht von der Kontrolle. In einem weiteren unabhängigen Experiment wurde zusätzlich eine Konzentration von 20 µM getestet (Abb. 5-2B).

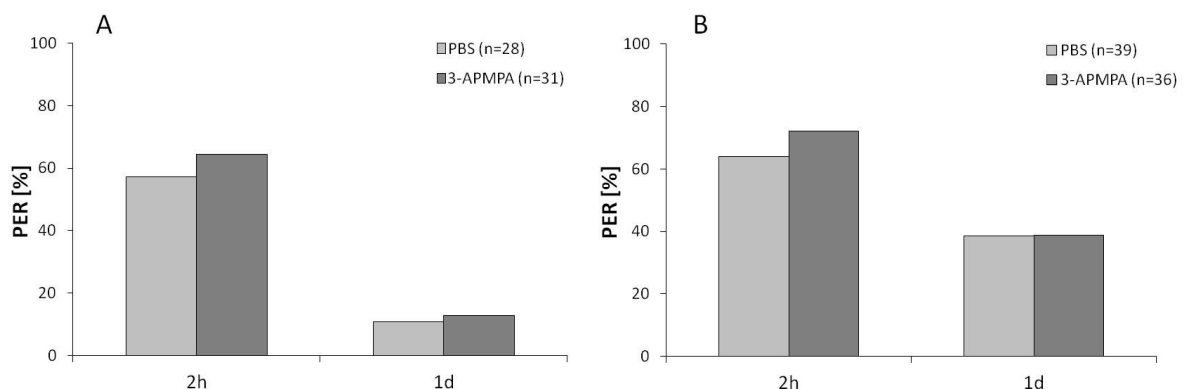


Abb. 5-2: Die thorakale Injektion von 3-APMPA hat keinen Einfluss auf das assoziative Gedächtnis

Dargestellt ist der prozentuale Anteil an Bienen, die auf den CS (Nelkenduft) mit dem PER reagierten. 30 min vor einem schwachen Training (eine CS-US Paarung) wurde den Bienen 1 µl 3-APMPA oder PBS in den Thorax injiziert. Alle Bienen, die 30 min nach der Injektion keine Katatonie aufwiesen (90-97%), wurden dem assoziativen Training und dem Gedächtnisabruf unterzogen.

A, B: Sowohl 10 µM (A), als auch 20 µM 3-APMPA (B) haben keinen Einfluss auf das assoziative Gedächtnis. Die Anzahl der verwendeten Bienen ist in Klammern in der Legende vermerkt. Statistik: exakter Test nach Fisher

Auch diese Konzentration beeinflusst die Gedächtnisleistung jedoch nicht signifikant. Grundlegend kann die durch 3-APMPA hervorgerufene Katatonie zwei Ursachen haben. Zum einen könnten metabotrope Rezeptoren im ZNS aktiviert werden, die direkt oder indirekt den Muskeltonus steuern. Zum anderen könnten auch metabotrope Rezeptoren an den motorischen Endplatten der Muskeln für die Katatonie verantwortlich sein. Um diese Möglichkeiten näher einzugrenzen, wurde den Bienen 100 nl 3-APMPA (100 μ M) direkt in den Kopf injiziert. Der Anteil katatonischer Bienen lag nach 2 h bei 8% (n=50), und fällt somit im Vergleich zu 70% nach der thorakalen Injektion (Abb. 5-1) sehr viel geringer aus. Desweiteren sank der Anteil katatonischer Bienen nach 1 d von 8% auf 2%. Im Gegensatz zur thorakalen Injektion zeigt sich hier, dass die Katatonie reversibel ist. Dieser Befund deutet darauf hin, dass die Katatonie ihren Ursprung an der motorischen Endplatte hat und nicht im ZNS. Nach der Kopfinjektion von 3-APMPA wurden die Bienen einem schwachen assoziativen Training unterzogen. Diesmal wurde beim Gedächtnisabruf nach dem konditionierten Duft (CS+) zusätzlich ein naiver Duft getestet (Abb. 5-3). Auch in diesem Experiment unterscheidet sich die Reaktion auf den konditionierten Duft nicht von der Kontrollgruppe. Interessant ist jedoch, dass die mit 3-APMPA injizierten Bienen nach 2 h signifikant schwächer auf den naiven Duft reagierten.

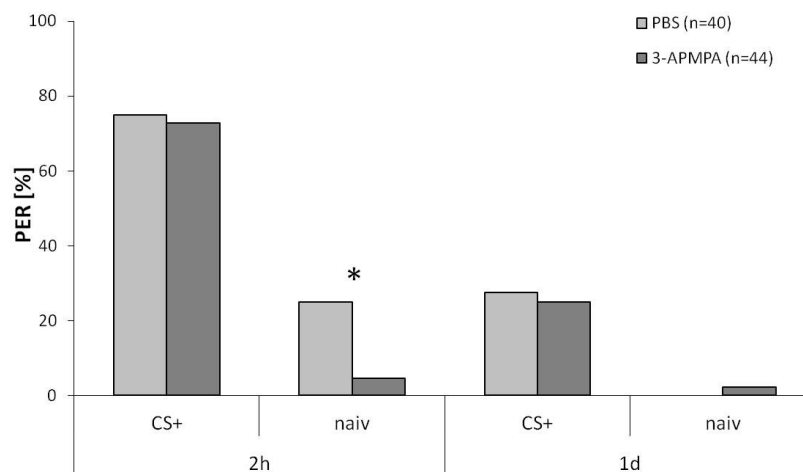


Abb. 5-3: Die Kopfinjektion von 3-APMPA verringert den PER auf einen unbekanntem Duft

Dargestellt ist der prozentuale Anteil an Bienen, die auf den CS (Nelkenduft) und einen naiven Duft (1-octanol) mit dem PER reagierten. 20 min vor einem schwachen Training (eine CS-US Paarung) wurde den Bienen 100 nl 3-APMPA (100 μ M) oder PBS in den Kopf injiziert. Alle Bienen, die 20 min nach der Injektion keine Katatonie aufwiesen (92%), wurden dem assoziativen Training und dem Gedächtnisabruf unterzogen. Während des 2 h-Gedächtnisabrufes wurde zunächst der CS+ getestet, auf den beide Gruppen gleich reagierten. Fünf Minuten später wurde ein naiver Duft getestet (naiv), auf den signifikant mehr Bienen in der Kontrollgruppe (PBS) reagierten. Ein Tag nach dem Training (1 d) ist weder beim CS+, noch beim naiven Duft ein Unterschied zu erkennen. Die Anzahl der verwendeten Bienen ist in Klammern in der Legende vermerkt. *Die zwei Gruppen unterscheiden sich signifikant (exakter Test nach Fisher $p^* < 0,05$).

Dieses Ergebnis deutet darauf hin, dass metabotrope Rezeptoren im ZNS nicht direkt die Bildung des assoziativen Gedächtnisses beeinflussen, aber an der olfaktorischen Diskriminierung beteiligt sind.

5.1.2 Selektive Aktivierung ionotroper GABA-Rezeptoren hemmt die Bildung des assoziativen Gedächtnisses

Um zu untersuchen, welchen Einfluss ionotrope GABA-Rezeptoren auf das assoziative Gedächtnis haben, wurde den Bienen der Agonist Muscimol injiziert. Bei Muscimol handelt es sich um eine Substanz, die unter anderem im Fliegenpilz vorkommt und spezifisch ionotrope GABA-Rezeptoren aktiviert [134]. Die Aktivierung von GABA-Rezeptoren zu unterschiedlichen Zeitpunkten des Lernens oder des Gedächtnisabrufes gibt Hinweise darüber, wann das GABAerge System Auswirkungen auf Lernen und Gedächtnis hat.

In einem ersten Experiment wurde den Bienen 10 mM Muscimol vor dem Training und vor dem 2 h-Gedächtnisabruf in den Thorax appliziert (Abb. 5-4). Die Injektion von Muscimol vor dem Training verschlechtert gravierend die Bildung des assoziativen Gedächtnisses, was die Gedächtnisleistung nach 2 h und nach 1 d signifikant reduziert (Abb. 5-4A). Die Applikation von Muscimol vor dem 2 h-Gedächtnisabruf hat hingegen keine Auswirkungen (Abb. 5-4B).

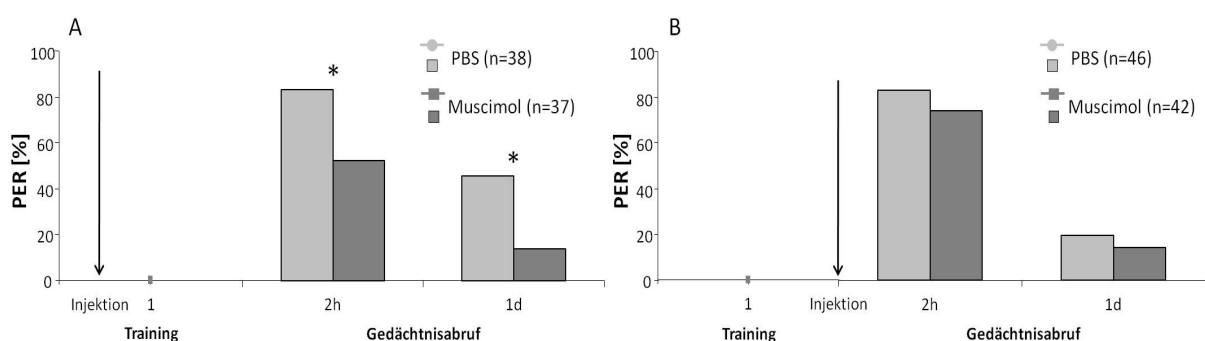


Abb. 5-4: Die thorakale Injektion von Muscimol vor einem schwachen Training verschlechtert das assoziative Gedächtnis

Dargestellt ist der prozentuale Anteil an Bienen, die auf den CS (Nelkenduft) mit dem PER reagierten. Durchgeführt wurde ein schwaches Training (eine CS-US Paarung) mit anschließendem Gedächtnisabruf nach 2 h und 1 d. **A:** Die thorakale Injektion von 2 μ l Muscimol (10 mM) 20 min vor dem Training verschlechtert signifikant den Gedächtnisabruf nach 2 h und 1 d. **B:** Die thorakale Injektion von 2 μ l Muscimol (10 mM) 20 min vor dem 2 h-Gedächtnisabruf hat keine Auswirkungen auf das assoziative Gedächtnis. Die Anzahl der verwendeten Bienen ist in Klammern in der Legende vermerkt. *Die zwei Gruppen unterscheiden sich signifikant (exakter Test nach Fisher $p^* < 0,05$).

Ionotrope GABA-Rezeptoren kommen sowohl im ZNS als auch an der motorischen Endplatte vor [135]. Die Manipulation der Muskelkontraktion könnte den Rüsselreflex beeinflussen und somit eine spezifische Aussage über die Funktion der GABA-Rezeptoren beim Lernen erschweren.

Um die Aktivierung der GABA-Rezeptoren auf das ZNS zu beschränken, wird in den folgenden Experimenten Muscimol in den Kopf injiziert (Abb. 5-5). Wie aus Abb. 5-5A hervorgeht, wurde den Bienen zunächst 5 mM Muscimol 20 min vor einem schwachen Training in den Kopf injiziert. Da dies keine Auswirkungen auf den Gedächtnisabruf hatte, wurde die Muscimol-Konzentration von 5 auf 20 mM erhöht (Abb. 5-5B). Bei dieser Konzentration kommt es zu einem gravierenden Abfall des PER während des 2 h-Gedächtnisabrufes. Der 1 d-Abruf unterscheidet sich nicht von der Kontrolle, da die Gedächtnisleistung der Kontrollgruppe in diesem Experiment sehr schwach war. Injiziert man 20 mM Muscimol 20 min vor dem 2 h-Abruf in den Kopf, so ist ebenfalls ein signifikanter Abfall des PER zu erkennen. Dieser Abfall ist jedoch im Vergleich zum gravierenden Gedächtnisverlust nach der Muscimol-Injektion vor dem Training wesentlich geringer. Zudem unterscheidet sich dieser Befund von der thorakalen Injektion, da diese vor dem Abruf keinen Abfall der Gedächtnisleistung hervorrief (Abb. 5-4B).

Um zu untersuchen, ob sich die Aktivierung ionotroper GABA-Rezeptoren ebenso auf ein stärkeres Training auswirkt, wird 20 mM Muscimol vor einem Zwei-Trial-Training (zwei CS-US Paarungen) injiziert (Abb. 5-6). Trotz der zusätzlichen CS-US-Präsentationen ist der Abfall der Gedächtnisleistung ebenso gravierend wie bei einem schwachen Training. Erhöht man jedoch die Anzahl der CS-US Paarungen auf drei (Abb. 5-7A), so ist sowohl während des Trainings, als auch während des Gedächtnisabrufes, kein Unterschied zur Kontrolle zu erkennen. Auch die Injektion von Muscimol vor dem 2 h-Abruf hat nach einem starken Training keine Auswirkungen mehr (Abb. 5-7B). Die Aktivierung von GABA-Rezeptoren in Zusammenhang mit einem schwachen Training führt also zu einem Abfall der Gedächtnisleistung, wohingegen dieselbe Aktivierung von GABA-Rezeptoren in Zusammenhang mit einem starken Training scheinbar keine Konsequenzen hat.

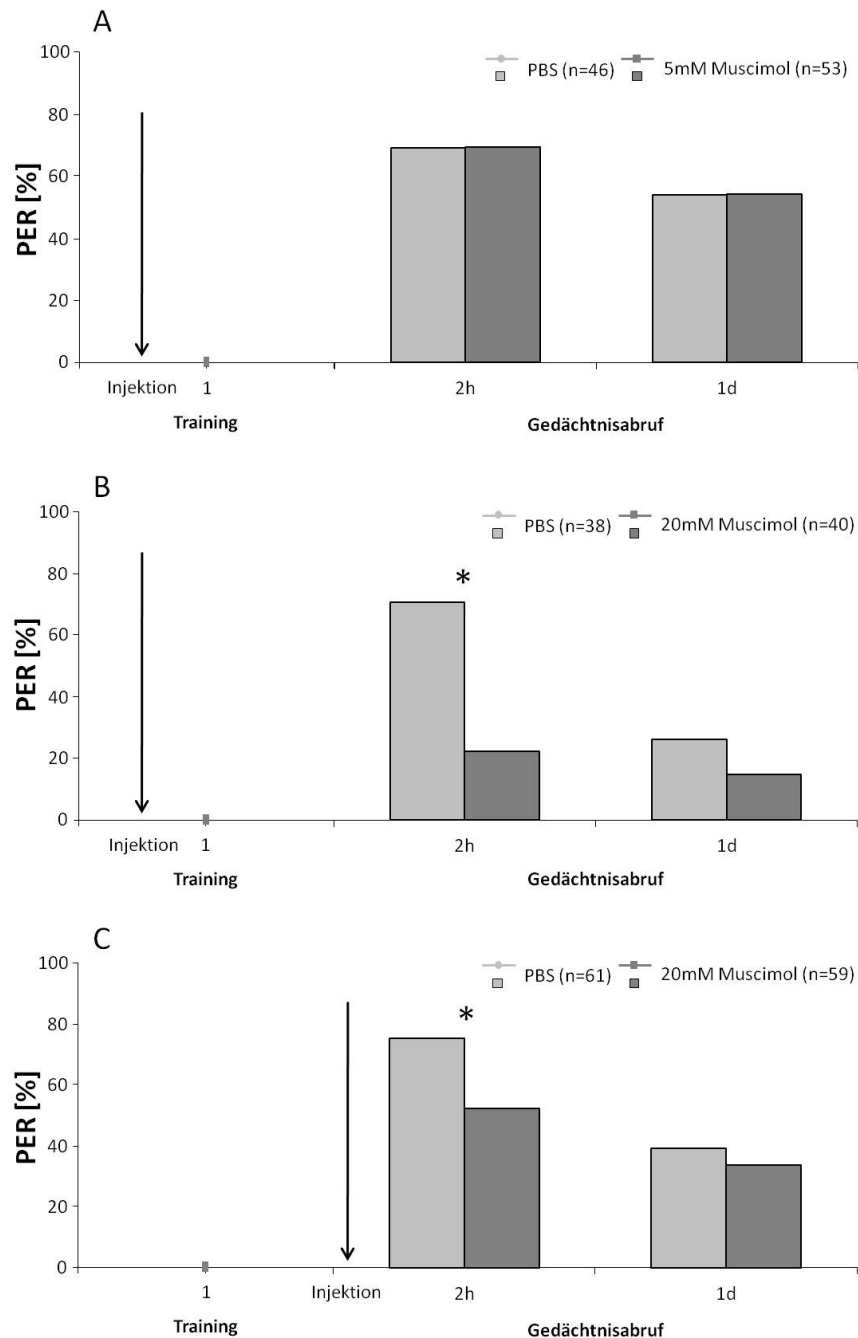


Abb. 5-5: Kopfinjektionen hoher Muscimol-Konzentrationen vor einem schwachen Training und vor dem Abruf verschlechtern das assoziative Gedächtnis

Dargestellt ist der prozentuale Anteil an Bienen, die auf den CS (Nelkenduft) mit dem PER reagierten. Durchgeführt wurde ein schwaches Training (eine CS-US Paarung) mit anschließendem Gedächtnisabruf nach 2 h und 1 d. **A:** 20 min vor dem Training wurde den Bienen 100 nl Muscimol (5 mM) in den Kopf injiziert. Der PER nach 2 h und nach 1 d unterscheidet sich nicht von dem der Kontrollgruppe. **B:** 20 min vor dem Training wurde den Bienen 100 nl Muscimol (20 mM) in den Kopf injiziert. Die höhere Muscimol-Konzentration führt zu einem erheblichen Abfall des PER nach 2 h. Nach 1 d ist dagegen kein signifikanter Unterschied zur Kontrollgruppe zu erkennen. **C:** 20 min vor dem 2 h-Gedächtnisabruf erfolgte die Kopfinjektion von 100 nl Muscimol (20 mM). Der PER nach 2 h ist daraufhin im Vergleich zur Kontrolle signifikant schwächer. Auch hier ist nach 1 d kein Unterschied mehr feststellbar. Die Anzahl der verwendeten Bienen sowie die Muscimol-Konzentrationen sind in der Legende vermerkt. *Die zwei Gruppen unterscheiden sich signifikant (exakter Test nach Fisher, wenn Anzahl der Tiere innerhalb eines Experimentes kleiner als 100; Chi-Quadrat-Test wenn die Anzahl der Tiere innerhalb eines Experimentes größer als 100 ist; $p^* < 0,05$).

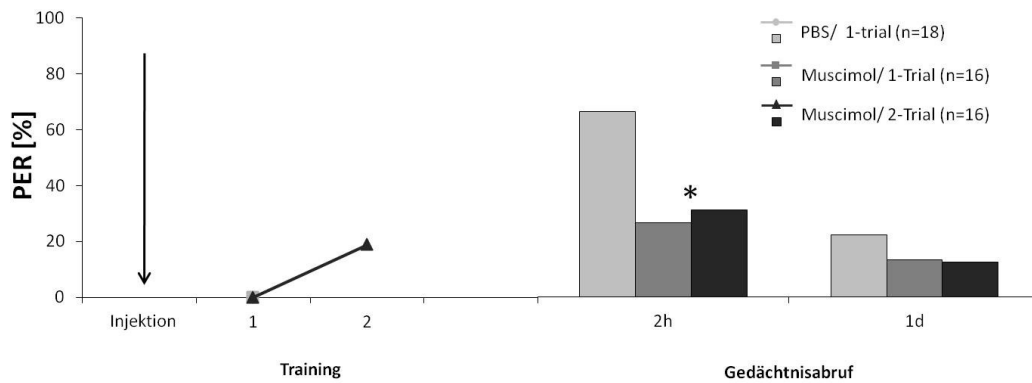


Abb. 5-6: Muscimol-Injektionen vor schwachem und mittelstarkem Training hemmen die Bildung des assoziativen Gedächtnisses

Dargestellt ist der prozentuale Anteil an Bienen, die auf den CS (Nelkenduft) mit dem PER reagierten. 20 min vor einem schwachen Training (eine CS-US Paarung) bzw. einem mittelstarken Training (zwei CS-US Paarungen mit ITI von 4 min) wurde den Bienen 100 nl Muscimol (20 mM) oder PBS in den Kopf injiziert. Der Gedächtnisabruf erfolgte 2 h und 1 d nach dem Training. Muscimol verschlechtert das assoziative Gedächtnis nach einem schwachen und nach einem mittelstarken Training gleichermaßen. *Die Gruppen unterscheiden sich signifikant (exakter Test nach Fisher $p^* < 0,025$).

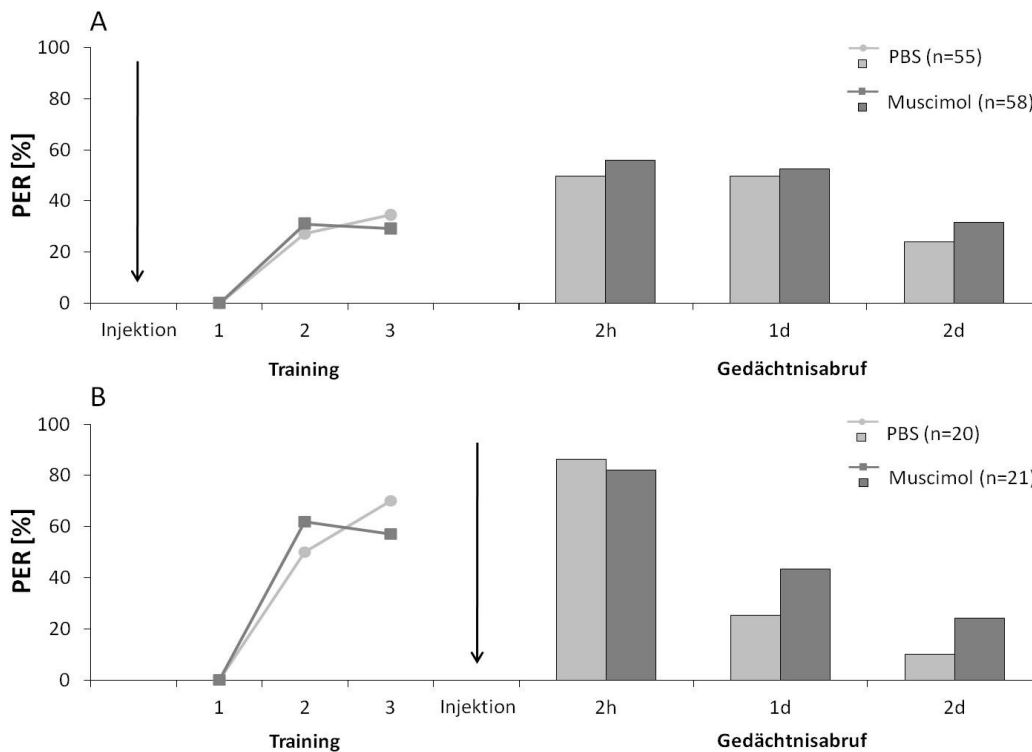


Abb. 5-7: Muscimol-Injektionen vor und nach starkem Training haben keinen Einfluss auf das assoziative Gedächtnis

Dargestellt ist der prozentuale Anteil an Bienen, die auf den CS (Nelkenduft) mit dem PER reagierten. Durchgeführt wurde ein starkes Training (drei CS-US Paarungen mit ITI von 2 min) mit anschließendem Gedächtnisabruf nach 2 h, 1 d und 2 d. **A:** 20 min vor dem Training wurde den Bienen 100 nl Muscimol (20 mM) in den Kopf injiziert. Es sind weder Auswirkungen von Muscimol während des Trainings noch während des Gedächtnisabrufes zu erkennen. **B:** 20 min vor dem 2 h-Gedächtnisabruf erfolgte die Kopfinjektion von 100 nl Muscimol (20 mM). Während des 2 h-Abrufes ist der PER im Vergleich zur Kontrolle unverändert, nach 1 d und 2 d sogar leicht erhöht. Die Anzahl der verwendeten Bienen ist in Klammern in der Legende vermerkt. Statistik: exakter Test nach Fisher, wenn Anzahl der Tiere innerhalb eines Experimentes kleiner als 100; Chi-Quadrat-Test wenn die Anzahl der Tiere innerhalb eines Experimentes größer als 100 ist.

Da die Gedächtnisleistung der Biene abhängig von äußeren Faktoren ist, ist es nur bedingt möglich, Experimente zu vergleichen, die zu unterschiedlichen Zeitpunkten durchgeführt wurden. Um die Auswirkungen von Muscimol auf schwaches und starkes Training korrekt vergleichen zu können, müssen die entsprechenden Experimente möglichst gleichzeitig durchgeführt werden. In Abb. 5-8 sind daher parallel durchgeführte Experimente dargestellt, die die Auswirkungen von Muscimol auf die Gedächtnisleistung nach schwachem bzw. starkem Training zeigen.

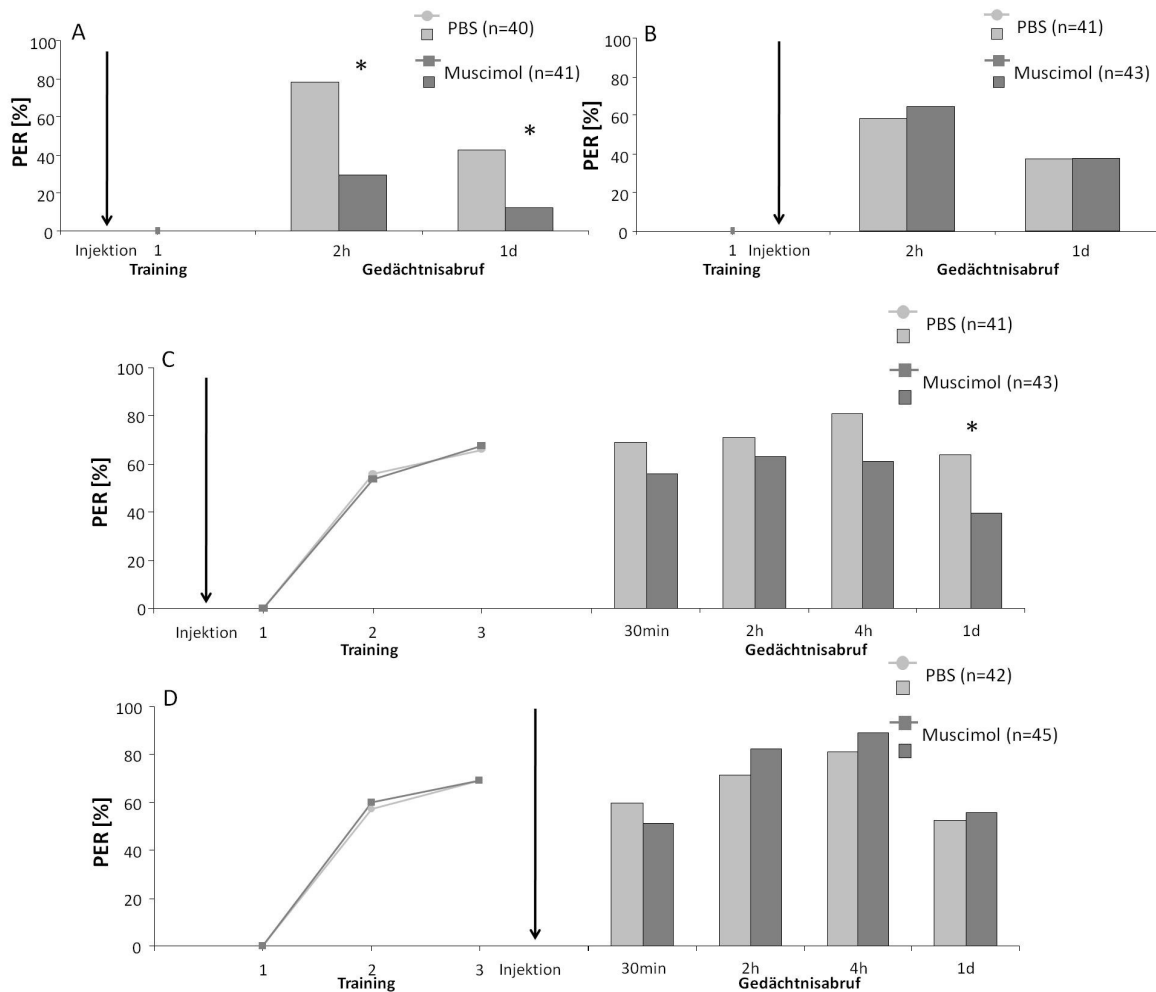


Abb. 5-8: Muscimol-Injektionen vor und nach schwachem bzw. starkem Training im direkten Vergleich

Dargestellt ist der prozentuale Anteil an Bienen, die auf den CS (Nelkenduft) mit dem PER reagierten. Die Bienen wurden entweder 20 min vor (A, C) oder 20 min nach dem Training (B, D) mit 100 nl Muscimol (10 mM) in den Kopf injiziert. Durchgeführt wurde entweder ein schwaches Training (eine CS-US Paarung) oder ein starkes Training (drei CS-US Paarungen mit ITI von 2 min) mit anschließendem Gedächtnisabruf nach 30 min, 2 h, 4 h und 1 d. **A:** Die Injektion von Muscimol vor einem schwachen Training führt zu einem gravierenden Abfall der Gedächtnisleistung. **B:** Die Injektion von Muscimol nach einem schwachen Training hat keinen Einfluss auf das assoziative Gedächtnis. **C:** Die Injektion von Muscimol vor einem starken Training beeinflusst die Acquisition während des Trainings nicht. Der Gedächtnisabruf ist zwischen 30 min und 4 h leicht verschlechtert. Nach 1 d führt die Muscimol-Injektion zu einer signifikant verschlechterten Gedächtnisleistung. **D:** Die Injektion von Muscimol nach einem starken Training hat keine Auswirkungen auf die Gedächtnisleistung. Die Anzahl der verwendeten Bienen ist in Klammern in der Legende vermerkt. *Die zwei Gruppen unterscheiden sich signifikant (exakter Test nach Fisher $p^* < 0,05$).

Wie bereits zuvor gezeigt, führt die Injektion von Muscimol vor einem schwachen Training zu einem gravierenden Abfall der Gedächtnisleistung nach 2 h und 1 d (Abb. 5-8A). In direktem Vergleich dazu, bewirkt die Muscimol-Injektion vor einem starken Training (Abb. 5-8C) keinen signifikanten Abfall der Gedächtnisleistung zwischen 30 min und 4 h. Dennoch nimmt die Gedächtnisleistung mit zunehmender Zeit ab, so dass der Gedächtnisabruf nach 1 d im Vergleich zur Kontrolle signifikant schwächer ist. Desweiteren fällt auf, dass der Lernprozess während des Trainings (Acquisition) durch die Injektion von Muscimol nicht beeinflusst wird. Injiziert man Muscimol nach dem Training, so ist sowohl beim schwachen als auch beim starken Training kein Unterschied zur Kontrolle auszumachen (Abb. 5-8B, D). Diese Experimente zeigen, dass die GABA-Rezeptoren während des Trainings aktiviert werden müssen, um die Gedächtnisleistung zu beeinflussen. Interessanterweise bleibt die Acquisition selbst dabei unbeeinflusst.

5.1.3 Die selektive Aktivierung ionotroper GABA-Rezeptoren hat keinen Einfluss auf die nicht-assoziativen Lernparadigmen

Um festzustellen, wie Muscimol während der Acquisition die Gedächtnisbildung hemmt, wurde untersucht, ob Muscimol die Wahrnehmung des Duftes oder der Belohnung beeinträchtigt. Die Wahrnehmung der Belohnung lässt sich sehr gut über die Zuckerwasserempfindlichkeit testen (Kap. 3.1.5). Dabei testet man den PER auf verschiedene Zuckerkonzentrationen vor und nach der Injektion mit Muscimol. Der Test der Zuckerwasserempfindlichkeit weist keinen Unterschied zur Kontrolle auf (Abb. 5-9A). Somit nehmen die Bienen trotz Muscimol-Injektion die Belohnung unverändert wahr.

Die Wahrnehmung der Duftinformation wird durch die Sensitisierung getestet (Kap. 3.1.3). Bei der Sensitisierung werden die Bienen durch Stimulierung mit einer 1M Zuckerlösung in einen Zustand erhöhter Erregung versetzt. Die anschließende zweite Duftpräsentation ist somit sensitisiert und der PER ist im Vergleich zur ersten Duftpräsentation verstärkt. Die Reaktion auf diese zweite Duftpräsentation bleibt durch die Injektion von Muscimol unverändert (Abb. 5-9B), was darauf schließen lässt, dass die Duftinformation trotz Aktivierung der GABA-Rezeptoren normal wahrgenommen wird.

Bei der Habituation kommt es durch ständige Stimulierung der Antenne mit 1 M Zuckerlösung zu einer Gewöhnung und somit zur Abschwächung bzw. sogar zum Ausbleiben des PER (Kap. 3.1.4). Da Muscimol auch die Habituation nicht signifikant

beeinflusst, gibt es keinerlei Hinweise, dass die Verabreichung von Muscimol das nicht-assoziative Lernen beeinflusst. Wenn weder der CS noch der US alleine durch Muscimol beeinträchtigt werden, so muss der Abfall der Gedächtnisleistung dadurch begründet sein, dass die Integration dieser beiden Signale gestört ist. Diese These wird dadurch gestützt, dass der Abfall der Gedächtnisleistung dann am größten ist, wenn die GABA-Rezeptoren während des Trainings, also während der CS-US-Paarung, aktiviert werden.

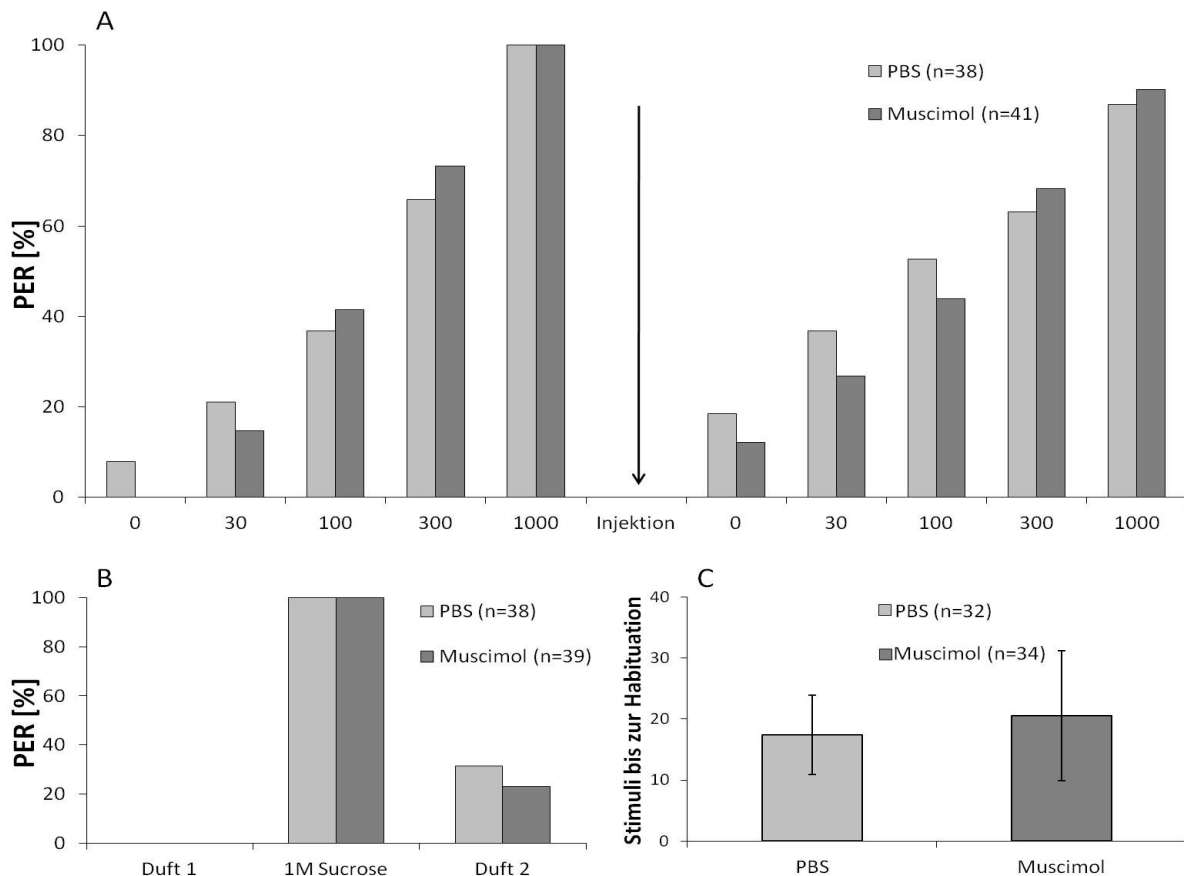


Abb. 5-9: Muscimol hat keinen Einfluss auf Zuckerwasserempfindlichkeit und nicht-assoziative Lernparadigmen

A: Dargestellt ist der prozentuale Anteil an Bienen, die vor und nach der Kopfinjektion mit 100 nl Muscimol (10 mM) auf verschiedene Zuckerkonzentrationen mit dem PER reagierten. Es gibt keinen statistischen Unterschied zwischen PBS- und Muscimol-injizierten Bienen. Statistik: Mann-Whitney Test über gustatory response score [136] ($p=0,69$). **B:** Dargestellt ist der prozentuale Anteil an Bienen, die vor und nach der Sensitisierung mit dem PER auf Nelkenduft reagierten. Die Bienen erhielten 20 min vor der ersten Präsentation des Duftes eine Kopfinjektion mit 100 nl Muscimol (10 mM). Die mit Muscimol injizierten Bienen reagierten leicht schwächer auf die zweite Präsentation des Duftes, der Unterschied ist jedoch nicht signifikant (exakter Test nach Fisher, $p=0,4$). **C:** Dargestellt ist Mittelwert und Standardabweichung der Anzahl der Stimuli, die benötigt wurden, um die Bienen zu habituierten. Die Bienen erhielten 20 min vor der Habituation eine Kopfinjektion von 100 nl Muscimol (10 mM). Die beiden Gruppen unterscheiden sich statistisch nicht voneinander (t-Test, $p=0,15$). Die Anzahl der verwendeten Bienen ist in Klammern in der Legende vermerkt.

5.1.4 Lichtinduzierte lokale Freisetzung von GABA während der Acquisition hemmt die Bildung des assoziativen Gedächtnisses

Die in den vorherigen Kapiteln aufgezeigten Experimente lassen darauf schließen, dass die Aktivierung ionotroper GABA-Rezeptoren die Integration von Duftinformation und Belohnung während des Trainings beeinträchtigt. Um dieses Phänomen eingehender zu studieren, wurde untersucht, wann genau GABA-Rezeptoren aktiviert werden müssen und welche Gehirnregionen dabei eine Rolle spielen. Für eine solche Untersuchung eignet sich CNB-GABA. Hierbei handelt es sich um den Neurotransmitter GABA, der an eine molekulare „Käfiggruppe“ gebunden ist. Dadurch wird das Molekül biologisch inaktiv, die Käfiggruppe lässt sich jedoch durch hochenergetisches Licht entfernen.

In einem ersten Versuch wurde untersucht, ob sich auf diese Weise GABA *in vitro* und *in vivo* im Bienenhirn freisetzen und messen lässt (Abb. 5-10). Dazu wurde eine CNB-GABA-Lösung angesetzt und mittels des Xenon-Blitzlichtsystems, welches hochenergetische Lichtimpulse erzeugt, verschieden oft geblitzt. Die Proben wurden nach dem Blitzen mit Glutardialdehyd fixiert und die Menge an freigesetztem GABA mittels spezifischer Anti-GABA Antikörper über ELISA ermittelt (s. Kap. 3.2.2). Wie sich im Vergleich zu PBS erkennen lässt (Abb. 5-10A), kann man auf diese Weise erfolgreich GABA freisetzen und messen. Dabei steigt die Menge an freigesetztem GABA, je öfter die Probe geblitzt wird.

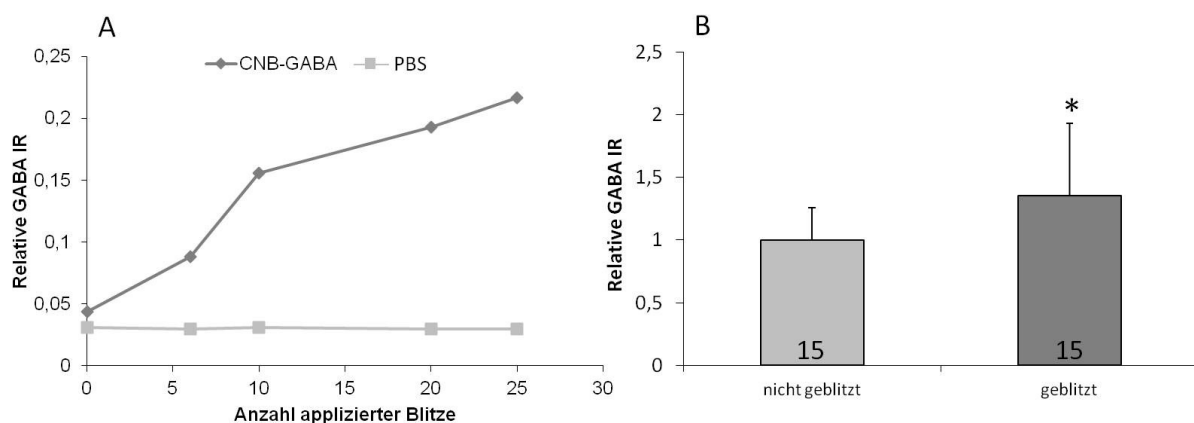


Abb. 5-10: Immunologische Messungen von GABA *in vitro* und *in vivo* nach Licht-induzierter Freisetzung

Dargestellt ist die relative GABA Immunoreaktivität (IR), die mittels ELISA bestimmt wurde. **A, *in vitro*:** CNB-GABA (4 μ M) und PBS (Kontrolle) wurden 0, 6, 10, 20 und 25 Mal geblitzt. **B, *in vivo*:** Zunächst erhielten die Bienen Tiagabin- (200 nl, 10 mM) und CNB-GABA-Injektionen (200 nl, 20 mM) direkt in das Gehirn. 20 min später wurde das Zentralhirn der Bienen sieben bzw. null Mal (Kontrolle) geblitzt. Nach der Präparation des Zentralhirns wurde das Homogenat mit Glutardialdehyd konjugiert und für ELISA verwendet. Zur Normalisierung des Gesamtgehaltes an Homogenat wurde zusätzlich die PKA-Immunoreaktivität bestimmt. Die Anzahl der verwendeten Bienen ist in den jeweiligen Balken vermerkt. *Die zwei Gruppen unterscheiden sich signifikant ($p < 0,05$, t-Test).

Im nächsten Experiment galt es zu untersuchen, ob sich GABA auf diese Weise auch im Gehirn der Honigbiene freisetzen lässt. Um die Wiederaufnahme von freigesetztem GABA zu minimieren, wurde allen Bienen zunächst Tiagabin (s. Kap. 3.2.2) direkt in das offene Gehirn injiziert. Nach der Injektion von CNB-GABA wurde das Zentralhirn sieben Mal geblitzt (Kontrolle wurde nicht geblitzt) und sofort präpariert (s. Kap. 3.2.1). Anschließend wurde das Bienenhirnhomogenat für die Bestimmung der freigesetzten Menge an GABA mittels ELISA mit BSA fixiert (s. Kap. 3.2.2). Wie Abb. 5-10B zu entnehmen ist, führen die Lichtimpulse zu einem signifikanten Anstieg der Menge an freigesetztem GABA.

Um zu untermauern, dass sich mit der hier verwendeten Methode GABA im Bienenhirn freisetzen lässt, wurde ein immunhistologisches Experiment durchgeführt. Wie bereits im vorherigen Experiment erläutert, wurde der lebenden Biene Tiagabin und CNB-GABA in das Bienenhirn injiziert. Diesmal wurde jedoch nur die linke Seite des Bienenhirns auf Höhe der Pilzkörper siebenmal geblitzt (Abb. 5-11).

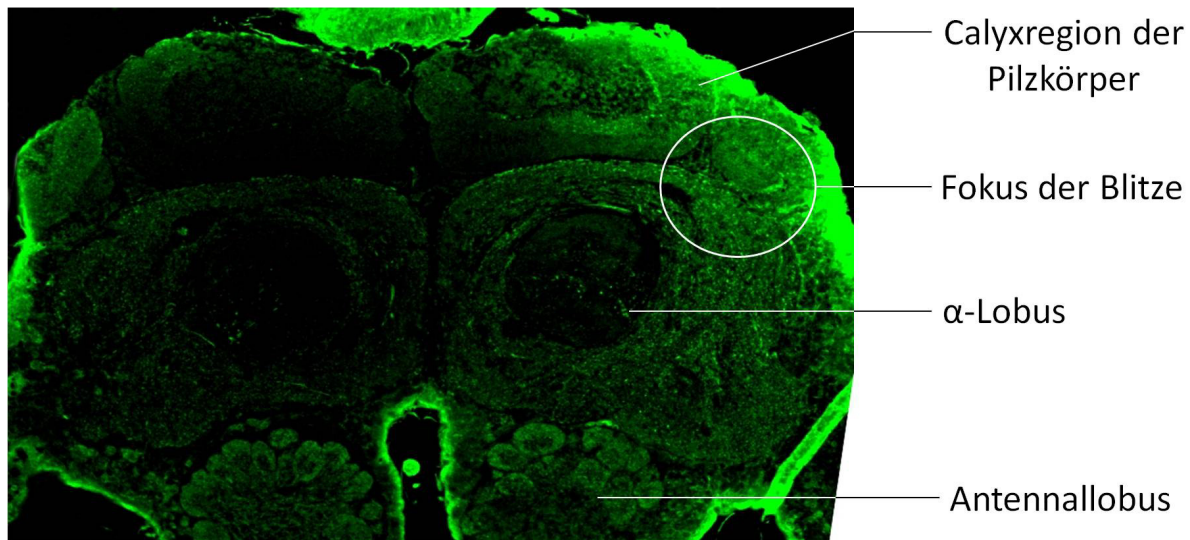


Abb. 5-11: Licht-induziertes Freisetzen von GABA in der linken Hirnhälfte einer Biene

Dargestellt ist ein immunhistologischer Schnitt durch das Bienenhirn, in dem GABA mittels fluoreszierenden Antikörpern detektiert wurde. Zuvor wurde der lebenden Biene Tiagabin (200 nl, 10 mM) und CNB-GABA (200 nl, 20 mM) direkt in das Gehirn injiziert. Nur die linke Seite des Gehirns wurde auf Höhe der Pilzkörper siebenmal geblitzt. Da die Aufnahme des Bildes spiegelverkehrt ist, befindet sich die linke Hirnhälfte hier auf der rechten Seite. Innerhalb des Fokus der Blitze ist eine deutlich erhöhte Fluoreszenz gegenüber der rechten Hirnhälfte zu erkennen. Die erhöhte Fluoreszenz erstreckt sich von dort aus über die laterale Calyxregion und um den α -Lobus herum (β -Lobus). Der Antennallobus zeigt allgemein eine erhöhte Fluoreszenz, die sich aber nicht zwischen den beiden Hirnhälften unterscheidet.

Anschließend wurden histologische Schnitte des Gehirns angefertigt und mit Anti-GABA Antikörpern und einem fluoreszierenden sekundären Antikörper behandelt (s. Kap. 3.2.3). Wie in Abb. 5-11 zu erkennen, ist die Fluoreszenz innerhalb des Fokus der Blitze stark erhöht. Dies zeigt, dass innerhalb dieser Region GABA erfolgreich freigesetzt wurde. Eine erhöhte Fluoreszenz ist zudem in der Region des lateralen Calyx und rund um den α -Lobus der linken Hirnhälfte zu sehen (Aufnahme in Abb. 5-11 ist spiegelverkehrt). Die rechte Hirnhälfte hingegen ist auf Höhe der Pilzkörper gänzlich dunkel, was zeigt, dass sich GABA durch hochenergetische fokale Blitze *in vivo* lokal freisetzen lässt. Eine erhöhte Fluoreszenz zeigen die Antennalloben auf beiden Seiten des Gehirns. Dies ist vermutlich auf einen erhöhten endogenen Gehalt an GABA zurückzuführen.

In diesem Kapitel wurde gezeigt, dass sich die Freisetzung von GABA durch das Blitzen von CNB-GABA mit hochenergetischem Licht *in vitro* und *in vivo* durchführen lässt (Abb. 5-10). Zudem wurde gezeigt, dass sich die Freisetzung von GABA auf den Bereich der geblitzten Region beschränkt (Abb. 5-11). Folglich kann dieses Protokoll genutzt werden, um die Auswirkungen der Aktivierung von GABA-Rezeptoren in den Pilzkörpern (Mushroom bodies, MB), Antennalloben (AL) und optischen Loben (OL) zu studieren. Die Injektionen von Muscimol haben gezeigt, dass sich die Gedächtnisbildung besonders dann manipulieren lässt, wenn die GABA-Rezeptoren während des Trainings aktiviert werden (Abb. 5-8). Da dies darauf hindeutet, dass die modulierende Wirkung von GABA innerhalb des Trainings stattfindet, wurde der zeitliche Bezug der Freisetzung von GABA zur CS-US Paarung während eines schwachen Trainings eingehender untersucht. Dabei konzentrieren wir uns zunächst auf die Pilzkörper (Abb. 5-12), da diese massiv von GABAergen Neuronen innerviert werden (s. Kap. 1.4 und Kap. 1.5).

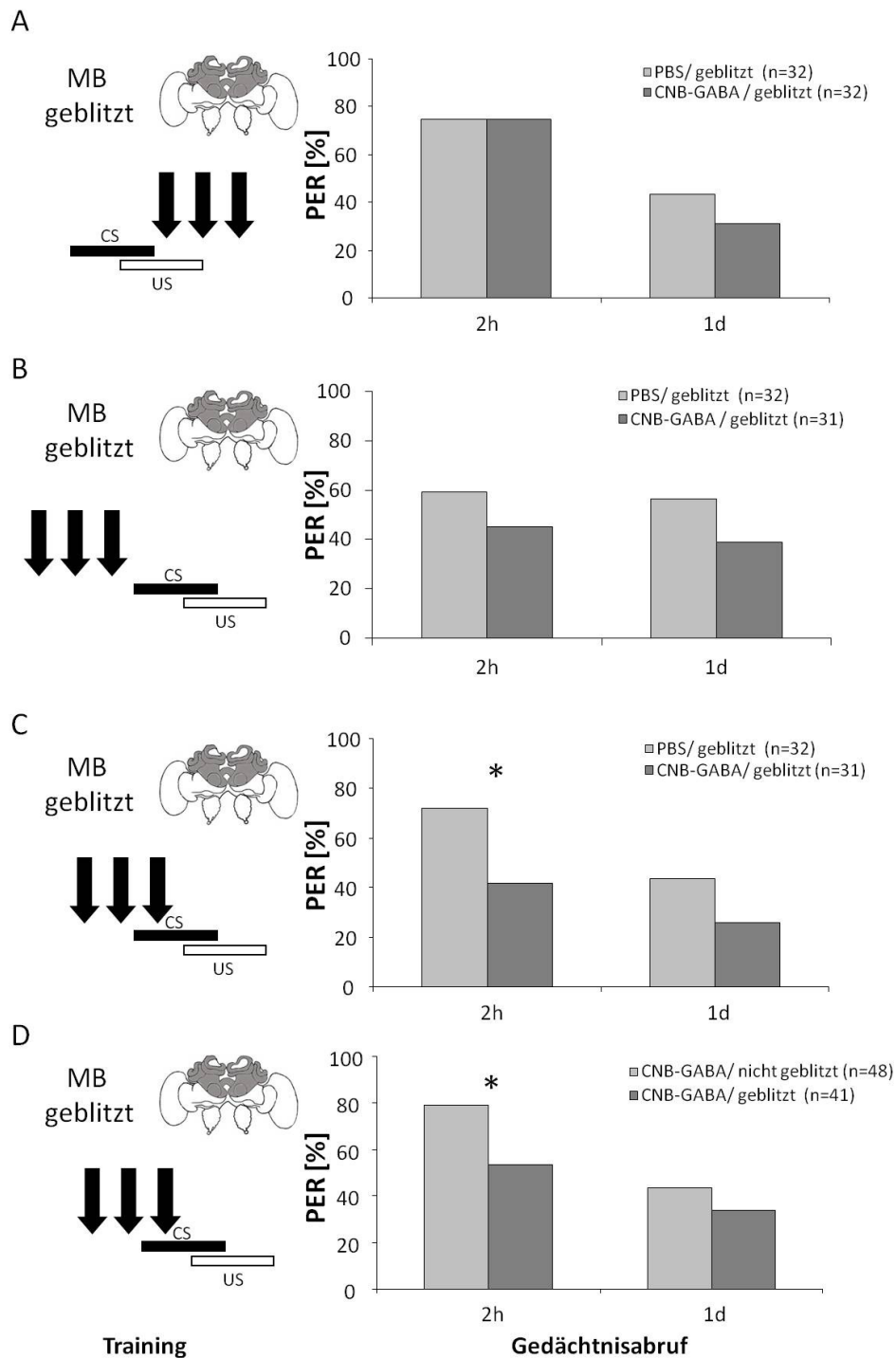


Abb. 5-12: Lokales Freisetzen von GABA im Pilzkörper verschlechtert das assoziative Gedächtnis abhängig vom zeitlichen Bezug zum Training

Dargestellt ist der prozentuale Anteil an Bienen, die auf den CS (Nelkenduft) mit dem PER reagierten. Den Bienen wurde 20 min vor dem schwachen Training (eine CS-US Paarung) 200 nl CNB-GABA in das Gehirn injiziert. Die linke Spalte gibt an, in welchem zeitlichen Bezug zur CS-US Paarung die Pilzkörper (MB) sieben Mal geblitzt wurden. In der schematischen Abbildung des Bienenhirns sind die Pilzkörper grau unterlegt. **A, B:** Die Freisetzung von GABA vor oder direkt nach dem CS hat keinen Einfluss auf das assoziative Gedächtnis. **C, D:** Die Freisetzung von GABA vor und während der Duftpräsentation verschlechtert das assoziative Gedächtnis nach 2 h signifikant. Die Anzahl der verwendeten Bienen ist in Klammern in der Legende vermerkt. *Die zwei Gruppen unterscheiden sich signifikant (exakter Test nach Fisher $p^* < 0,05$).

Setzt man GABA in den Pilzkörpern direkt nach dem CS frei (Abb. 5-12A), so hat dies keinen Einfluss auf die Gedächtnisleistung. Wurde GABA vor der CS-US-Paarung freigesetzt, so zeigt sich ein leichter aber nicht signifikanter Abfall der Gedächtnisleistung (Abb. 5-12B). Erst wenn GABA kurz vor und während der Präsentation des Duftes freigesetzt wurde, kommt es zu einem signifikanten Abfall der Gedächtnisleistung nach 2 h. Um sicherzustellen, dass dieser Abfall nicht durch das injizierte CNB-GABA selbst bedingt ist, wurde eine Gruppe Bienen ebenfalls mit CNB-GABA injiziert, aber nicht geblitzt (Abb. 5-12D). Auch hier zeigt sich ein signifikanter Unterschied nach 2 h, was zeigt, dass CNB-GABA selbst keine schädliche Wirkung besitzt. Die GABA-Rezeptoren im Pilzkörper müssen also in einem engen zeitlichen Kontext zur Duftpräsentation aktiviert werden, um die Gedächtnisleistung zu beeinträchtigen. Ob dies ebenfalls für die Antennalloben und optischen Loben zutrifft, ist in Abb. 5-13 dargestellt.

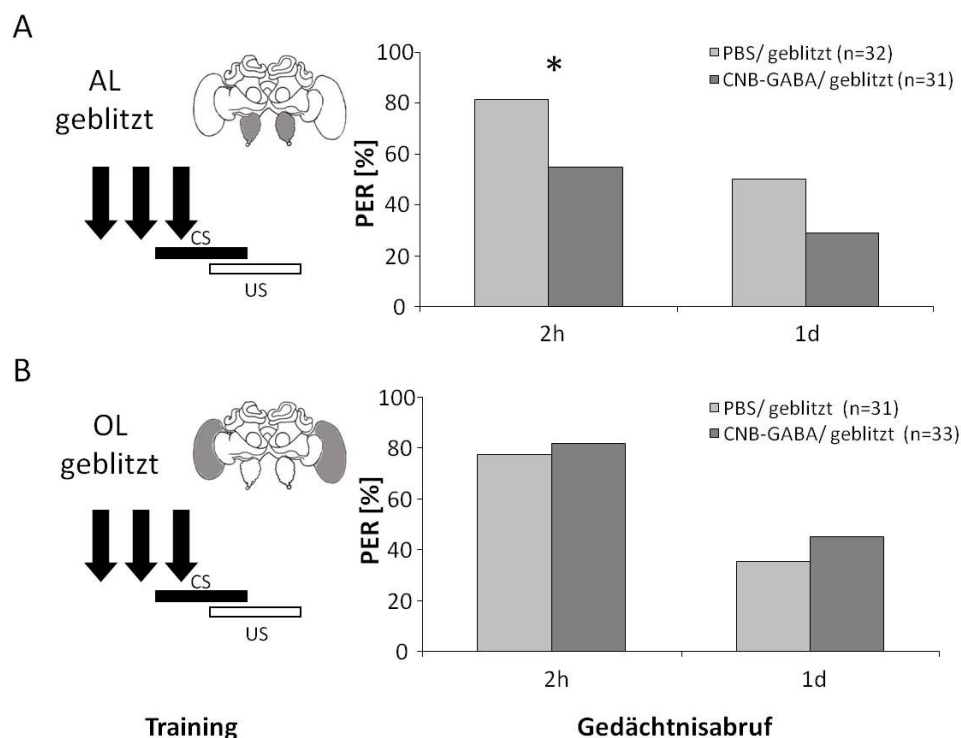


Abb. 5-13: Lokales Freisetzen von GABA in den Antennalloben, aber nicht den optischen Loben, verschlechtert das assoziative Gedächtnis

Dargestellt ist der prozentuale Anteil an Bienen, die auf den CS (Nelkenduft) mit dem PER reagierten. Den Bienen wurde 20 min vor dem schwachen Training (eine CS-US Paarung) 200 nl CNB-GABA direkt in das Gehirn injiziert. Die linke Spalte gibt an, in welchem zeitlichen Bezug zur CS-US Paarung die Antennalloben (AL) bzw. optischen Loben (OL) sieben Mal geblitzt wurden. AL und OL sind in der schematischen Abbildung des Bienenhirns grau unterlegt. **A:** Die Freisetzung von GABA in den Antennalloben vor und während der Duftpräsentation verschlechtert das assoziative Gedächtnis nach 2 h signifikant. **B:** Die Freisetzung von GABA in den optischen Loben vor und während der Duftpräsentation hat keinen Einfluss auf das assoziative Gedächtnis. Die Anzahl der verwendeten Bienen ist in Klammern in der Legende vermerkt. *Die zwei Gruppen unterscheiden sich signifikant (exakter Test nach Fisher $p^* < 0,05$).

Setzt man GABA in den Antennalloben vor und während der Duftpräsentation frei (Abb. 5-13A), so verschlechtert dies ebenfalls die Gedächtnisleistung nach 2 h. Dieses Ergebnis ist nicht überraschend, da die Antennalloben eine Vielzahl GABAerger Interneurone aufweisen, die die Duftprozessierung modulieren [81]. Setzt man GABA im gleichen zeitlichen Schema in den optischen Loben frei (Abb. 5-13B), hat dies keine Auswirkungen auf die Gedächtnisleistung. Obwohl auch die optischen Loben eine Vielzahl an GABA-Rezeptoren besitzen, sind diese nicht an der Prozessierung der Duftinformation oder Belohnung beteiligt. Somit war zu erwarten, dass die Aktivierung dieser GABA-Rezeptoren sich nicht auf das olfaktorische Gedächtnis auswirkt. Das Blitzen der OL beweist zudem, dass die Freisetzung von GABA durch Lichtimpulse lokal begrenzt ist und sich nicht auf benachbarte Hirnregionen ausweitet.

Die vorherigen Experimente haben gezeigt, dass das olfaktorische Gedächtnis beeinträchtigt wird, wenn GABA während des Trainings in MB und AL in einem starken zeitlichen Bezug zum CS freigesetzt wird. Um zu untersuchen, ob GABA generell die Duftprozessierung stört, wurde GABA während der Duftpräsentation des 2 h-Gedächtnisabrufes freigesetzt (Abb. 5-14). Das Freisetzen von GABA während des Gedächtnisabrufes hat jedoch weder in den AL noch in den Pilzkörpern Auswirkungen auf die Gedächtnisleistung (Abb. 5-14A, B).

Da die lokale Aktivierung von GABA-Rezeptoren nur während der CS/US-Paarung die Gedächtnisleistung beeinträchtigte, spricht dies für eine Rolle von GABA während der Koinzidenz von CS und US. Dies ist in Übereinstimmung mit dem Befund, dass Muscimol vor allem durch die Aktivierung während der Acquisition zu Gedächtnisdefiziten führt, während CS und US alleine unverändert wahrgenommen werden.

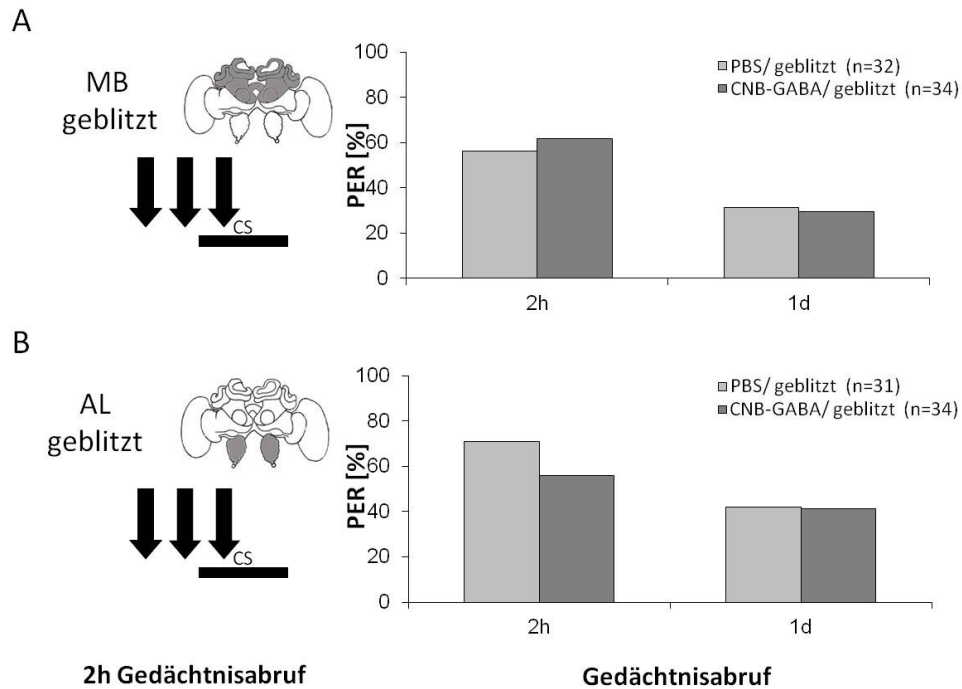


Abb. 5-14: Lokales Freisetzen von GABA während des 2h-Abrufes hat keinen Einfluss auf das assoziative Gedächtnis

Dargestellt ist der prozentuale Anteil an Bienen, die auf den CS (Nelkenduft) mit dem PER reagierten. Nach einem schwachen Training (eine CS-US Paarung) wurde den Bienen 20 min vor dem Gedächtnisabruf 200 nl CNB-GABA direkt in das Gehirn injiziert. Die linke Spalte gibt an, in welchem zeitlichen Bezug zum 2h-Abruf die Pilzkörper (MB) bzw. die Antennalloben (AL) sieben Mal geblitzt wurden. Pilzkörper und AL sind in der schematischen Abbildung des Bienenhirns grau unterlegt. **A, B:** Die Freisetzung von GABA in den Pilzkörpern und Antennalloben vor und während der Duftpräsentation des 2 h-Abrufes hat keinen signifikanten Einfluss auf das assoziative Gedächtnis. Die Anzahl der verwendeten Bienen ist in Klammern in der Legende vermerkt. Statistik: exakter Test nach Fisher.

5.2 GABAerge Modulation neuronaler Aktivität in isolierten Kenyonzellen der Honigbiene

Aus den in Kapitel 5.1 dargestellten Experimenten geht hervor, dass die Gedächtnisbildung nur bei einem bestimmten zeitlichen Zusammenhang zwischen dem Duft und der Freisetzung von GABA in den Pilzkörpern beeinflusst wird. Da die Duftinformation durch Acetylcholin (ACh) vermittelt wird [137], stellt sich die Frage, ob der zeitliche Zusammenhang zwischen ACh und GABA entscheidend für die Modulation neuronaler Aktivität im Pilzkörper ist. Daher wurden die Pilzkörper präpariert und anhand isolierter Neuronen untersucht, wie die Paarung von ACh und GABA die intrazellulären Calciumströme modulieren. Um die lokale Freisetzung von GABA während des Trainings nachzuempfinden, wurde nach der Paarung von ACh und GABA eine zusätzliche Stimulation mit ACh alleine durchgeführt, die den Gedächtnisabruf darstellt.

5.2.1 Stimulation isolierter Kenyonzellen im Durchflusssystem

Um die Integration von ACh und GABA in Kenyonzellen adulter Honigbienen eingehender zu untersuchen, wurden die Pilzkörper präpariert und in Zellkultur gebracht (s. Kap. 3.3). Die mit dem calciumsensitiven Farbstoff Fluo-4 geladenen Kenyonzellen wurden anschließend im Durchflusssystem getestet, welches die schnelle Zugabe und den Austausch von Neurotransmittern erlaubt (s. Kap. 3.3.3). Um verschiedene temporäre Auswirkungen von GABA zu testen und diese korrekt miteinander vergleichen zu können, wurden drei Gruppen gebildet, die jeweils dreimal stimuliert wurden (Abb. 5-15). Die erste Stimulation mit ACh dient als Referenzstimulation, da die nachfolgenden Stimuli anhand des ersten Stimulus normiert werden. Zudem wurden nach der ersten Stimulation alle Kenyonzellen ausgeschlossen, die nicht adäquat auf die Stimulation mit ACh reagierten (ca. 20%). D.h., nur Kenyonzellen, die einen eindeutigen Calciumeinstrom und auch einen Calciumausstrom aufwiesen, wurden für die nächsten Stimulationen weiterverwendet. So wird sichergestellt, dass keine toten oder beschädigten Zellen untersucht werden. Innerhalb einer Messung wurde die Calciumkinetik aller Kenyonzellen, die adäquat reagierten, gemittelt. Anschließend wurde die Amplitude der ersten Stimulation auf 100% gesetzt und die nachfolgenden Stimulationen einer Messung daran normiert. Der Beginn jeder Stimulation wurde auf 0 (Baseline) gesetzt.

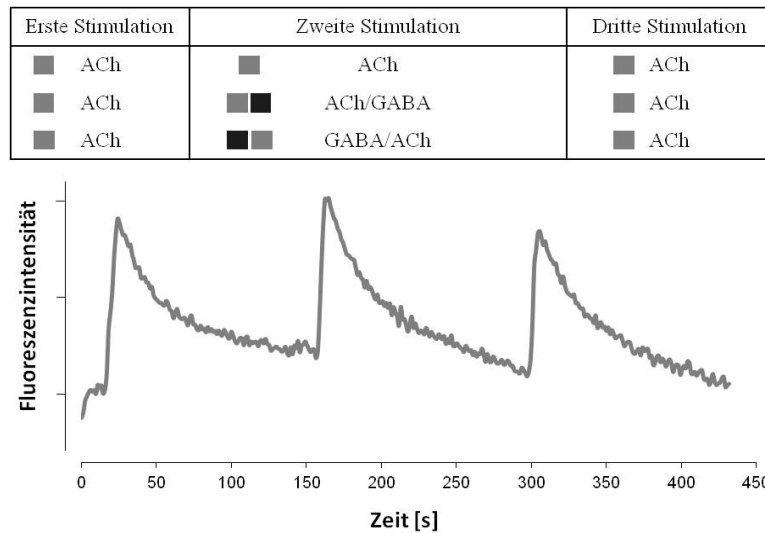


Abb. 5-15: Stimulationsschema der Kenyonzellen im Durchflusssystem

Die Abbildung gibt das Stimulationsschema der drei Gruppen wieder und zeigt beispielhaft, wie die Fluoreszenzintensität der mit Fluo-4 geladenen Kenyonzellen durch Stimulation mit ACh ansteigt und wieder abfällt. In der ersten Stimulation wurden alle drei Gruppen mit ACh stimuliert (3 s). In der zweiten Stimulation wurde nur die Kontrollgruppe mit ACh stimuliert (3 s). In den zwei anderen Gruppen wird ACh mit GABA gepaart (ebenfalls 3 s). Dabei wird GABA entweder direkt nach ACh verabreicht (ACh/GABA) oder direkt vor ACh (GABA/ACh). In der dritten Stimulation wurden alle drei Gruppen nochmal mit ACh alleine stimuliert (3 s). Das Intervall zwischen den Stimulationen betrug 140 s, die Neurotransmitter wurden mit einer Konzentration von 5 μM verwendet.

Bei der zweiten Stimulation handelt es sich um einen gepaarten Stimulus, bei dem GABA direkt nach ACh (ACh/GABA), oder unmittelbar vor ACh (GABA/ACh) verabreicht wurde. Lediglich in der Kontrollgruppe wurde auch während der zweiten Stimulation nur mit ACh stimuliert. Der dritte Stimulus besteht für alle Gruppen wieder aus einer Stimulation mit ACh. Auf diese Weise kann getestet werden, ob die gepaarte Stimulation längerfristige Effekte aufweist, die sich auf die nachfolgende Stimulation auswirken. Die Aktivierung der ACh-Rezeptoren der Kenyonzellen führt zum Calciumeinstrom und somit zum Anstieg der Fluoreszenzintensität, die anschließend wieder abfällt. Einflüsse von GABA auf die durch ACh induzierte Calciumkinetik lassen sich also direkt an der veränderten Kinetik der Fluoreszenzintensität ablesen.

5.2.2 Zeitliche Paarung von ACh und GABA inhibiert die neuronale Aktivität

Die Stimulation der Kenyonzellen mit ACh führt zu einem raschen Anstieg der Fluoreszenzintensität, was gleichbedeutend mit einem raschen Calciumeinstrom ist. Anschließend nimmt die Fluoreszenzintensität langsam ab, es kommt also zu einem langsamen Calciumausstrom. Kombiniert man ACh mit GABA, so lässt sich die durch ACh induzierte Calciumkinetik modulieren. In Abb. 5-16 sind diese Modulationen der unterschiedlichen Paarungen (s. Abb. 5-15) dargestellt. Die erste Stimulation mit ACh ist hierbei nicht gezeigt, da diese sich zwischen den Gruppen nicht unterscheidet. Verabreicht man GABA direkt nach ACh (ACh/GABA, Abb. 5-16A), so ist der Calciumeinstrom im Vergleich zur Kontrolle deutlicher geringer (zweite Stimulation). Der Calciumeinstrom bei der anschließenden Stimulation mit ACh ist jedoch verglichen zur Kontrolle signifikant größer (dritte Stimulation). Verabreicht man GABA direkt vor ACh (GABA/ACh), so fällt auf, dass es in einigen Kenyonzellen nicht zum Calciumeinstrom kommt (ca. 30%; s. Abb. 5-17B), was bei einer regulären zweiten Stimulation mit ACh nicht vorkommt. Diese Gruppe der Kenyonzellen wurde im Folgenden als Non-Responder bezeichnet (Abb. 5-16B). Die Kenyonzellen, die trotz GABA/ACh-Paarung einen Calciumeinstrom aufweisen, werden als Responder bezeichnet (Abb. 5-16C). Der Calciumeinstrom der Responder ist jedoch ebenfalls stark reduziert. Während der dritten Stimulation ist bei Respondern und Non-Respondern der Calciumeinstrom leicht verstärkt und der Calciumausstrom etwas verlangsamt.

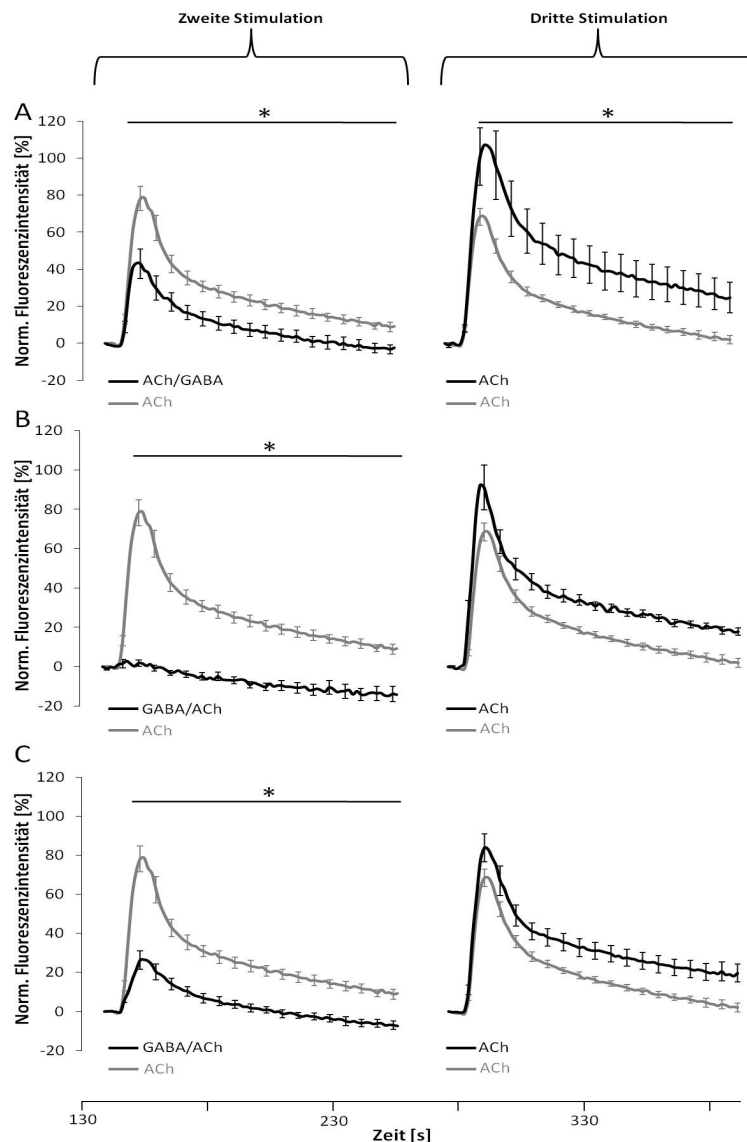


Abb. 5-16: Der durch ACh induzierte Calciumeinstrom lässt sich durch die zeitliche Paarung mit GABA unterschiedlich modulieren

Dargestellt sind die anhand der ersten Stimulation normierten Fluoreszenzintensitäten der mit Fluo-4 geladenen Kenyonzellen nach Stimulation mit ACh und GABA. **A:** Im Vergleich zur Kontrolle (ACh) führt die ACh/GABA Paarung (ACh/GABA) zu einem deutlich reduzierten Calciumeinstrom während der zweiten Stimulation und einem signifikant länger anhaltenden Calciumeinstrom während der dritten Stimulation. **B, Non-Responder:** Die Zellen, die aufgrund der GABA/ACh Paarung bei der zweiten Stimulation nicht reagieren, weisen sich durch einen völlig fehlenden Calciumeinstrom aus. Der Calciumeinstrom der dritten Stimulation ist durch die vorherige Paarung leicht erhöht. **C, Responder:** Die Zellen, die trotz GABA/ACh Paarung auf die zweite Stimulation reagieren, weisen dennoch einen deutlich reduzierten Calciumeinstrom während der zweiten Stimulation auf. Die Calciumkinetik der dritten Stimulation ist ähnlich den Non-Respondern leicht erhöht.

Jeder Neurotransmitter wurde mit einer Konzentration von $5 \mu\text{M}$ für 3 s verabreicht. Für die statistische Auswertung wurden nur Zellen in Betracht gezogen, die auf die erste Stimulation reagierten (ca. 50% aller Kenyonzellen). Der Calciumeinstrom der ersten Stimulation unterscheidet sich zwischen den Gruppen nicht. Zur Normierung wurden die Calciumkinetiken aller Kenyonzellen innerhalb einer Messung gemittelt und anschließend die Amplitude der ersten Stimulation auf 100% gesetzt. Für jede Gruppe wurden 7 unabhängige Präparationen/Messungen durchgeführt (ACh: $n=7$ Messungen/ 113 Zellen; ACh/GABA: $n=7$ Messungen/ 83 Zellen GABA/ACh: Non-Responder: $n=7$ Messungen/ 30 Zellen, Responder: $n=7$ Messungen/ 75 Zellen). Statistik: Alle Gruppen wurden zunächst einer zweifaktoriellen ANOVA unterzogen, gefolgt von einem paarweise durchgeführten Vergleich mittels Fisher's PLSD Test ($p^* < 0,012$).

In Abb. 5-17 ist das Verhältnis zwischen Responder und Non-Responder während der GABA/ACh-Paarung in Abhängigkeit der GABA-Konzentration dargestellt. Interessanterweise reagierten alle Kenyonzellen, die bei der ersten Stimulation auf ACh reagierten, auch auf den zweiten und dritten Stimulus mit ACh. Bei einer GABA/ACh-Paarung mit einem Konzentrationsverhältnis von 1:1 reduziert sich der Anteil der Responder auf 70%. Verdoppelt man die GABA-Konzentration, so sind es nur noch 10% Responder. Unabhängig von der GABA-Konzentration reagieren wieder alle Kenyonzellen auf die dritte Stimulation.

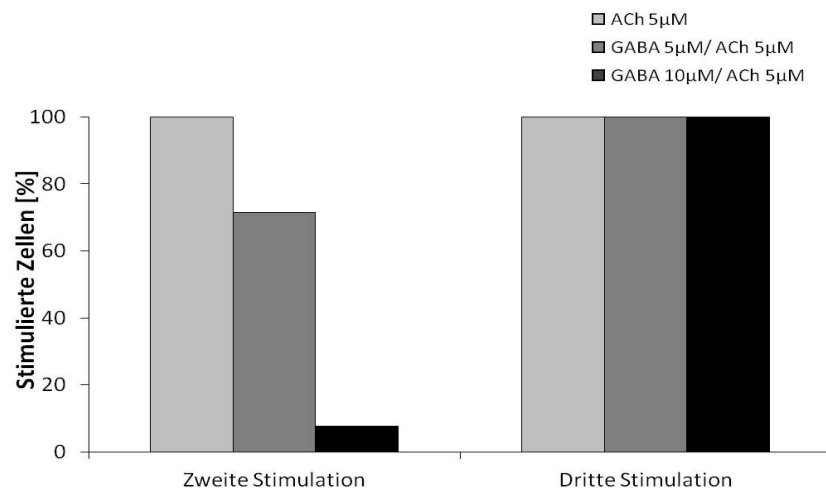


Abb. 5-17: Die GABA/ACh-Paarung verringert abhängig von der Konzentration den Anteil stimulierter Kenyonzellen

Dargestellt ist der Anteil stimulierter Kenyonzellen (Responder) abhängig von Paarung und Konzentration. In der ersten Stimulation wurden alle Gruppen mit ACh stimuliert. Dabei wurden nur stimulierbare Zellen für den weiteren Versuch in Betracht gezogen. In der zweiten Stimulation verringert die GABA/ACh-Paarung den Anteil der Responder. In der dritten Stimulation wurden wieder alle Gruppen mit ACh stimuliert. Jeder Neurotransmitter wurde für 3 s verabreicht. Es wurden für jede Gruppe mindestens 5 unabhängige Präparationen durchgeführt (ACh 5 µM: n=113 Zellen; GABA 5 µM/ ACh 5 µM: n=105 Zellen; GABA 10 µM/ ACh 5 µM: n=39 Zellen). Es wurde keine Statistik durchgeführt.

5.2.3 Gegensätzliche Modulation der neuronalen Aktivität durch ionotrope und metabotrope GABA-Rezeptoren

Die Modulation der von ACh induzierten Calciumströme durch GABA weist zwei grundlegende Eigenschaften auf. Zum einen kommt es bei der direkten Paarung zu einer starken Hemmung des Calciueinstroms. Zum anderen bewirkt die darauf folgende Stimulation mit ACh einen verstärkten Caliumeinstrom und einen verlangsamten Calciumausstrom. Da beide Effekte bei der ACh/GABA-Paarung signifikant waren, wird diese Paarung im Folgenden näher untersucht. Dazu wird GABA durch die spezifischen ionotropen und metabotropen GABA-Agonisten ersetzt (Abb. 5-17). Für einen direkten Vergleich ist auch die ACh/GABA-Paarung aus Abb. 5-16 dargestellt. Die Paarung von ACh mit Muscimol (ACh/Muscimol), welches nur ionotrope Rezeptoren aktiviert, führt im Vergleich zur Kontrolle zu einem signifikant verringerten Calciueinstrom. Die dritte Stimulation mit ACh beeinflusst den Calciueinstrom nicht, der Calciumausstrom ist jedoch verlangsamt (Abb. 5-18B). Im Gegensatz dazu zeigt die Paarung von ACh mit dem metabotropen GABA-Agonisten 3-APMPA (ACh/3-APMPA) keinerlei Veränderung während der zweiten Stimulation. Bei der dritten Stimulation mit ACh ist der Calciueinstrom signifikant erhöht (Abb. 5-18C). Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass an der GABAergen Modulation sowohl ionotrope als auch metabotrope GABA-Rezeptoren beteiligt sind. Dabei bewirken die metabotropen Rezeptoren einen langsamen Anstieg des Calciueinstroms, der bei der dritten Stimulation signifikant ist.

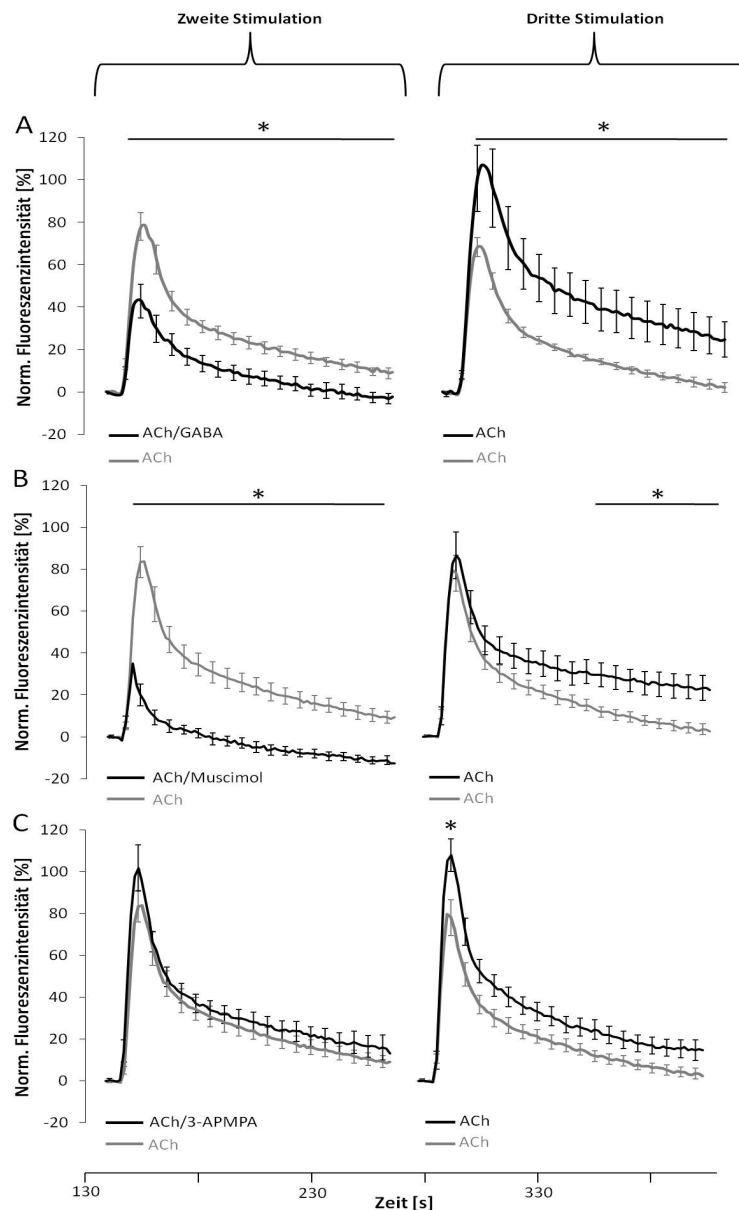


Abb. 5-18: Gegensätzliche Modulation der neuronalen Aktivität durch ionotrope und metabotrope GABA-Rezeptoren

Dargestellt sind die anhand der ersten Stimulation normierten Fluoreszenzintensitäten der mit Fluo-4 geladenen Kenyonzellen nach Stimulation mit ACh und Muscimol bzw. 3-APMPA. **A:** ACh/GABA-Paarung aus Abb. 5-16A **B:** Die Paarung des ionotropen GABA-Agonisten Muscimol mit ACh (ACh/Muscimol) zeigt im Vergleich zur Kontrolle (ACh) einen deutlich reduzierten Calciumeinstrom während der zweiten Stimulation und einen verlangsamten Calciumausstrom während der dritten Stimulation. **C:** Die Paarung des metabotropen GABA-Agonisten 3-APMPA mit ACh (ACh/3-APMPA) zeigt im Vergleich zur Kontrolle (ACh) keinen Unterschied während der zweiten Stimulation, jedoch einen signifikant erhöhten Calciumeinstrom während der dritten Stimulation.

ACh wurde mit einer Konzentration von $5 \mu\text{M}$ für 3 s verabreicht, Muscimol und 3-APMPA wurde mit $10 \mu\text{M}$ für 3 s verabreicht. Für die statistische Auswertung wurden nur Zellen in Betracht gezogen, die auf die erste Stimulation reagierten (ca. 50% aller Kenyonzellen). Der Calciumeinstrom der ersten Stimulation unterscheidet sich zwischen den Gruppen nicht. Zur Normierung wurden die Calciumkinetiken aller Kenyonzellen innerhalb einer Messung gemittelt und anschließend die Amplitude der ersten Stimulation auf 100% gesetzt. Für jede Gruppe wurden mindestens 7 unabhängige Präparationen/Messungen durchgeführt (ACh: $n=12$ Messungen/ 232 Zellen; ACh/Muscimol: $n=7$ Messungen/ 131 Zellen ACh/3-APMPA: $n=7$ Messungen/ 142 Zellen). Statistik: Alle Gruppen wurden zunächst einer zweifaktoriellen ANOVA unterzogen, gefolgt von einem paarweise durchgeführten Vergleich mittels Fisher's PLSD Test ($p^* < 0,012$).

Die faszilitierende Wirkung der metabotropen GABA-Rezeptoren ist nochmals in Abb. 5-19 verdeutlicht. Die wiederholte dreifache Stimulation der Kenyonzellen mit ACh führt zu einer kontinuierlichen Abnahme des Calciumeinstroms bei jeder Stimulation. Durch die Paarung mit 3-APMPA bei der zweiten Stimulation wurde die Abnahme des Calciumeinstroms jedoch verhindert. Der Calciumeinstrom bei der ACh/3-APMPA-Paarung steigt sogar von der ersten bis zur dritten Stimulation an.

Die ionotropen GABA-Rezeptoren sind alleine für die direkte Hemmung des Calciumeinstroms verantwortlich (Abb. 5-18). Zusätzlich bewirken sie einen verlangsamten Calciumausstrom in der nachfolgenden Stimulation mit ACh. Da ionotrope GABA-Rezeptoren Chlorid-Ionen leiten, sollte sich die in Abb. 5-16 beobachtete Hemmung des Calciumeinstroms durch das Blocken von Chlorid-Kanälen aufheben lassen. Chlorid-Kanäle von Insekten lassen sich durch Picrotoxin (PTX) hemmen [138].

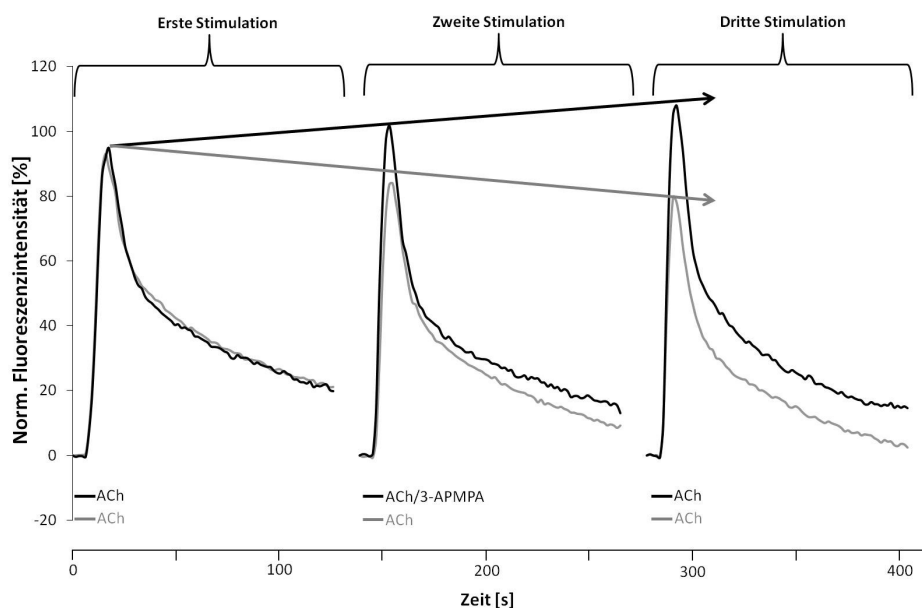


Abb. 5-19: Metabotrope GABA-Rezeptoren verhindern die Abnahme des Calciumeinstroms während wiederholten Stimulationen mit ACh

Dargestellt sind die anhand der ersten Stimulation normierten Fluoreszenzintensitäten der mit Fluo-4 geladenen Kenyonzellen nach Stimulation mit ACh und 3-APMPA. Die wiederholte Stimulation mit ACh (graue Linie) führt zu einer Abnahme des Calciumeinstroms. Die Paarung von ACh mit 3-APMPA während der zweiten Stimulation bewirkt hingegen einen kontinuierlichen Anstieg des Calciumeinstroms (schwarze Linie). Dieser Anstieg ist im Vergleich zur Kontrolle während der dritten Stimulation signifikant stärker (s. Abb. 5-18).

Daher wurde dem Bienenringer im nächsten Experiment PTX hinzugefügt, das somit kontinuierlich über die Zellen fließt (Abb. 5-20). D.h., die Chlorid-Kanäle der Zellen sind über den gesamten Zeitraum der Stimulation gehemmt. Die Wirkung von PTX wurde im Folgenden an der ACh/GABA-Paarung getestet. Eine PTX-Konzentration von 5 μM beeinflusst die Hemmung des von ACh induzierten Calciumeinstroms durch GABA nicht. Die Hemmung wird jedoch durch Erhöhung der PTX-Konzentration auf 10 und 50 μM verringert und schließlich vollständig aufgehoben. Dies zeigt, dass die Hemmung des Calciumeinstroms durch GABA eindeutig auf Chlorid-Kanäle zurückzuführen ist.

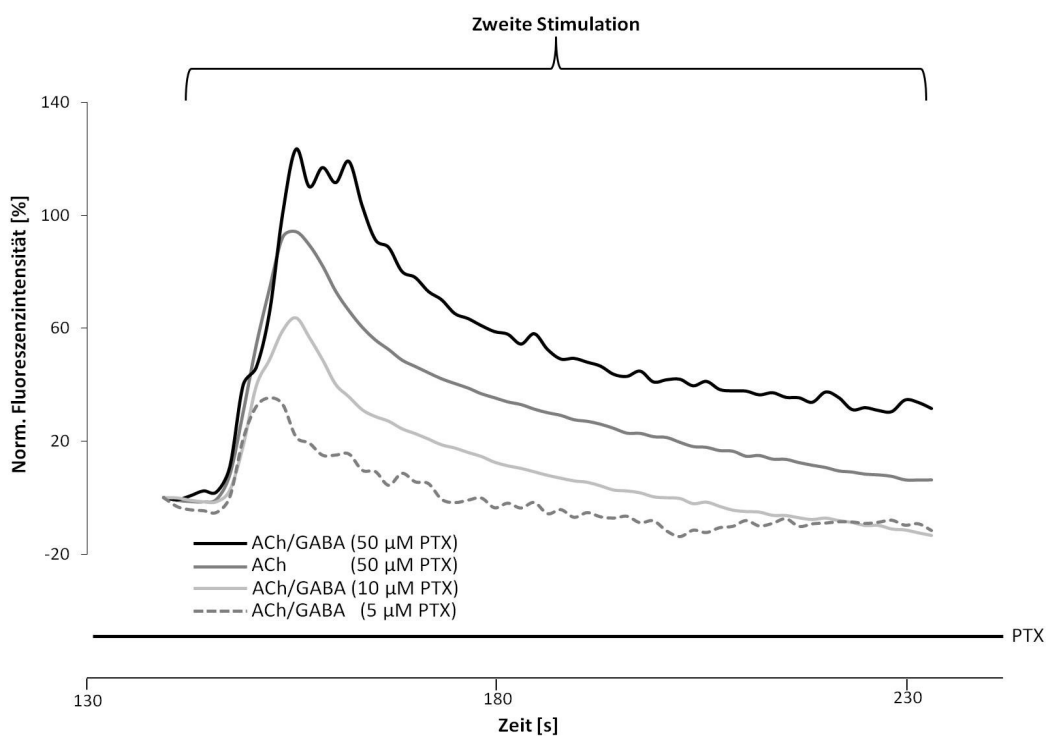


Abb. 5-20: Die Inhibition durch GABA-Rezeptoren lässt sich durch das Blocken von Chlorid-Kanälen aufheben

Dargestellt sind die anhand der ersten Stimulation normierten Fluoreszenzintensitäten der mit Fluo-4 geladenen Kenyonzellen nach Stimulation mit ACh und GABA. Zusätzlich zur ACh/GABA-Paarung wurden unterschiedliche Konzentrationen des Chloridkanalblocker PTX hinzugefügt. Die Zugabe von 5 μM PTX zur ACh/GABA-Paarung (gestrichelte Linie) zeigt noch eine deutliche Inhibition im Vergleich zur Kontrolle (ACh, dunkelgraue Linie). Die Inhibition bei 10 μM PTX ist schon geringer (hellgraue Linie) und bei 50 μM PTX vollständig aufgehoben (schwarze Linie).

Die Neurotransmitter ACh und GABA wurden mit einer Konzentration von 5 μM für 3 s verabreicht. Die unterschiedlichen Picrotoxin-Konzentrationen (PTX) wurden dem Bienenringer und den Neurotransmitterlösungen hinzugefügt. Für die statistische Auswertung wurden nur Zellen in Betracht gezogen, die auf die erste Stimulation reagierten (ca. 50% aller Kenyonzellen). Der Calciumeinstrom der ersten Stimulation unterscheidet sich zwischen den Gruppen nicht. Zur Normierung wurde für jede Messung die Amplitude der ersten Stimulation auf 100% gesetzt. Eine dritte Stimulation wurde nicht durchgeführt. Für jede Gruppe wurden 2 unabhängige Präparationen/Messungen durchgeführt (ACh+50 μM PTX: 36 Zellen; ACh/GABA+50 μM PTX: 29 Zellen; ACh/GABA+10 μM PTX: 28 Zellen; ACh/GABA+5 μM PTX: 22 Zellen. Es wurde keine Statistik angewandt.

5.3 GABAerge Modulation neuronaler Aktivität in einer isolierten Subpopulation des Pilzkörpers von *Drosophila*

Die in Kap. 5.2 dargestellten Experimente haben gezeigt, dass sich die in Kenyonzellen induzierten Calciumströme durch GABA modulieren lassen. Die Frage, wie genau diese Modulationen in Kenyonzellen aussehen, die definitiv an Lernprozessen beteiligt sind, lässt sich mit Hilfe der Honigbiene nicht beantworten. In *Drosophila* jedoch erlaubt es das GAL4/UAS-System [121], Calciumindikatoren gezielt in Neuronen zu exprimieren, von denen man weiß, dass sie unerlässlich für das olfaktorische Gedächtnis sind. Im Folgenden wird genau dieser Vorteil von *Drosophila* genutzt, um zu untersuchen, wie GABA die neuronale Aktivität in diesen Neuronen moduliert.

5.3.1 Der Genotyp 201y-GAL4; UAS-Cameleon

Für alle Messungen an den Kenyonzellen von *Drosophila* wurde der Stamm 201y-GAL4; UAS-Cameleon benutzt. Dieser Stamm ist homozygot für das GAL4- und das UAS-Konstrukt und exprimiert somit stabil das calciumsensitive Fluoreszenzprotein Cameleon in einer Teilmenge des Pilzkörpers (Abb. 5-21A).

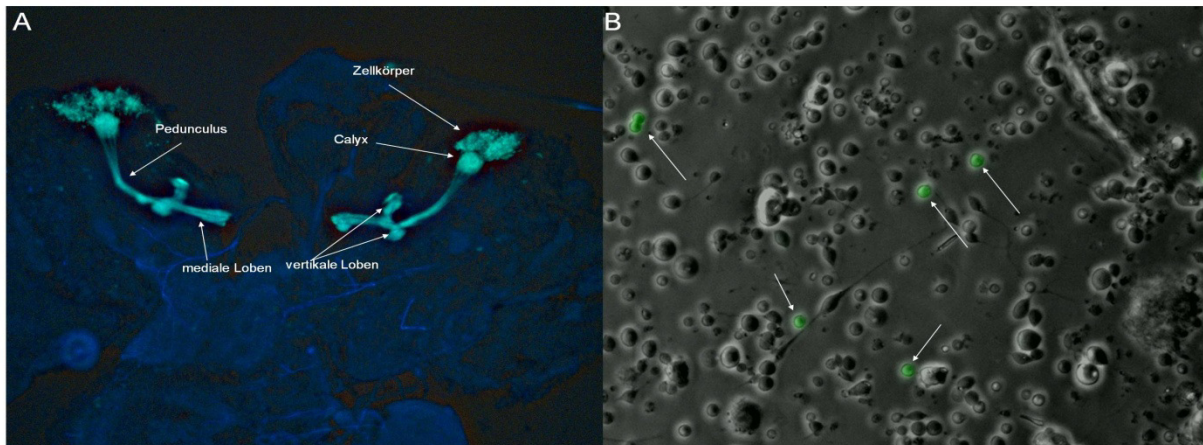


Abb. 5-21: Expressionsmuster und isolierte Neuronen der Linie 201y-GAL4; UAS-Cameleon 2.1
Die Linie 201y-GAL4; UAS-Cameleon 2.1 exprimiert stabil das calciumsensitive Fluoreszenzprotein Cameleon in den Pilzkörpern. **A:** Fluoreszenzaufnahme eines larvalen Gehirns. Der Pilzkörper fluoresziert aufgrund des Cameleonproteins grün. In schwachem Blau ist die Autofluoreszenz des restlichen Gehirns zu erkennen. **B:** Überlagerung einer fluoreszenz- und lichtmikroskopischen Aufnahme der präparierten larvalen Neuronenpopulation. Lediglich die Neuronen des Pilzkörpers exprimieren das Cameleonprotein und fluoreszieren daher (siehe Pfeile).

Im aversiven olfaktorischen Lernparadigma wurde bereits gezeigt, dass diese Teilmenge des Pilzkörpers definitiv an der Gedächtnisbildung beteiligt ist [125]. Nach Präparation des larvalen Gehirns des Stammes 201y-GAL4; UAS-Cameleon (Kap. 3.4.2) lassen sich unter dem Mikroskop die Kenyonzellen anhand ihrer Fluoreszenz erkennen (Abb. 5-21B). Da nur die fluoreszierenden Neuronen gemessen wurden, ist sichergestellt, dass nur diese Kenyonzellen in Betracht gezogen wurden.

5.3.2 Grundlagen neuronaler Aktivität im stationären System

Um die Grundlagen der Stimulierbarkeit der Kenyonzellen (201y) von *Drosophila* zu untersuchen, wurden die ersten Stimulationsexperimente in einem stationären System durchgeführt. D.h., die Neurotransmitter wurden mittels Pipette zu den präparierten Neuronen gegeben (s. Kap. 3.4.4). Um sicherzustellen, dass die Stimulation der Kenyonzellen mit Acetylcholin (ACh) im Rahmen physiologischer Konzentrationen ist, wurden die Kenyonzellen auf ihre Reaktionen hinsichtlich verschiedener ACh-Konzentrationen getestet (Abb. 5-22). Dabei gilt eine Zelle als stimuliert, wenn der Q-Wert (Ratio des Cameleonproteins 10-20 s nach der Stimulation, geteilt durch Ratio des Cameleonproteins vor der Stimulation) größer 1,01 ist (eingehender in Kap. 3.4.4 erläutert).

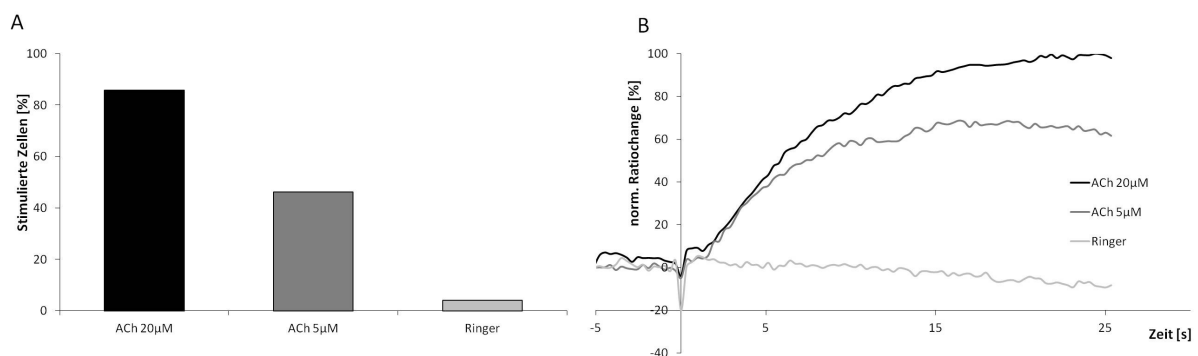


Abb. 5-22: Stimulierung im stationären System in Abhängigkeit der ACh-Konzentration

A: Dargestellt ist der prozentuale Anteil stimulierter Kenyonzellen nach Zugabe von ACh bzw. Ringer. Je höher die verwendete ACh-Konzentration, desto mehr Kenyonzellen wurden stimuliert. Für alle Gruppen wurden 4 unabhängige Messungen durchgeführt (ACh 20 μ M: 35 Zellen; ACh 5 μ M: 26 Zellen; Ringer: 24 Zellen). **B:** Dargestellt ist die Veränderung der Ratio von Cameleon nach Zugabe von ACh bzw. Ringer. Für ACh 20 μ M und 5 μ M wurden nur Zellen betrachtet, die als stimuliert galten. Für Ringer wurden alle Zellen betrachtet. Alle Werte sind prozentual dargestellt und auf den höchsten Wert der Stimulation mit 20 μ M ACh normiert. Die Ratio erhöht sich abhängig von der hinzugefügten ACh-Konzentration. Die Zugabe von Ringer beeinflusst die Ratio dagegen nicht. Für alle Gruppen wurden 4 unabhängige Messungen durchgeführt (ACh 20 μ M: 30 Zellen; ACh 5 μ M: 12 Zellen; Ringer: 24 Zellen). Es wurde keine Statistik durchgeführt.

Der Anteil stimulierter Zellen nach Zugabe von 5 bzw. 20 μM ACh ist in Abb. 5-22A dargestellt. Nach Zugabe von 20 μM ACh wurden über 80% der Kenyonzellen stimuliert, was auf eine sehr gute Vitalität der präparierten Zellen hindeutet. Bei 5 μM ACh wurden nur 45% der Kenyonzellen stimuliert. Der geringe Anteil stimulierter Zellen nach Zugabe von Ringer zeigt, dass der ermittelte Q-Wert eine zuverlässige Aussage über die Stimulierbarkeit erlaubt.

In Abb. 5-22B ist dargestellt, wie sich die Ratio von Cameleon (EYFP/ECFP) nach Zugabe von ACh bzw. Ringer verändert. Für die Veränderung der Ratio nach Zugabe von 20 μM und 5 μM ACh wurden nur stimulierte Zellen betrachtet. Dadurch lassen sich die beiden ACh-Konzentrationen direkt miteinander vergleichen. Für die Stimulation mit Ringer wurden alle Zellen betrachtet. Die Zugabe von Ringer beeinflusst die Ratio nicht. Nach Zugabe von 5 μM ACh steigt die Ratio jedoch deutlich an und zeigt somit, dass es zum Calciumeinstrom kommt. Noch größer ist der Calciumeinstrom nach Zugabe von 20 μM ACh. Der Umstand, dass sich durch die Erhöhung der ACh-Konzentration von 5 auf 20 μM sowohl die Ratiochange, als auch der Anteil stimulierter Zellen erhöht, deutet darauf hin, dass die ACh-Konzentration in diesem Bereich als physiologisch einzustufen ist.

5.3.3 GABAerge Modulation neuronaler Aktivität im stationären System

In den zuvor durchgeführten Experimenten hat GABA den durch ACh induzierten Calciumeinstrom und somit die Stimulierung der Kenyonzellen der Honigbiene verhindert (s. Kap. 5.2.2). Auch in der hier untersuchten Subpopulation der Kenyonzellen von *Drosophila* verringert die gleichzeitige Zugabe von ACh und GABA im Vergleich zu ACh alleine den Anteil stimulierter Zellen (Abb. 5-23A). Die Calciumkinetiken der wenigen Kenyonzellen, die trotz Gabe von ACh und GABA stimuliert waren, sind in Abb. 5-23B dargestellt. Interessanterweise ist in den Kenyonzellen, die trotz der Gabe von ACh und GABA stimuliert wurden, keinerlei Hemmung des Calciumeinstroms zu erkennen. Der Calciumeinstrom nach 12 s ist sogar durch die zusätzliche Gabe von GABA deutlich erhöht. Dieser verlängerte Calciumeinstrom ist umso stärker, je höher die hinzugegebene GABA-Konzentration ist. Somit teilen sich die Kenyonzellen der 201y-Population in diesem Experiment in zwei Teilmengen auf. In der einen Teilmenge wird der Calciumeinstrom durch GABA gehemmt, in der anderen Teilmenge hingegen verstärkt.

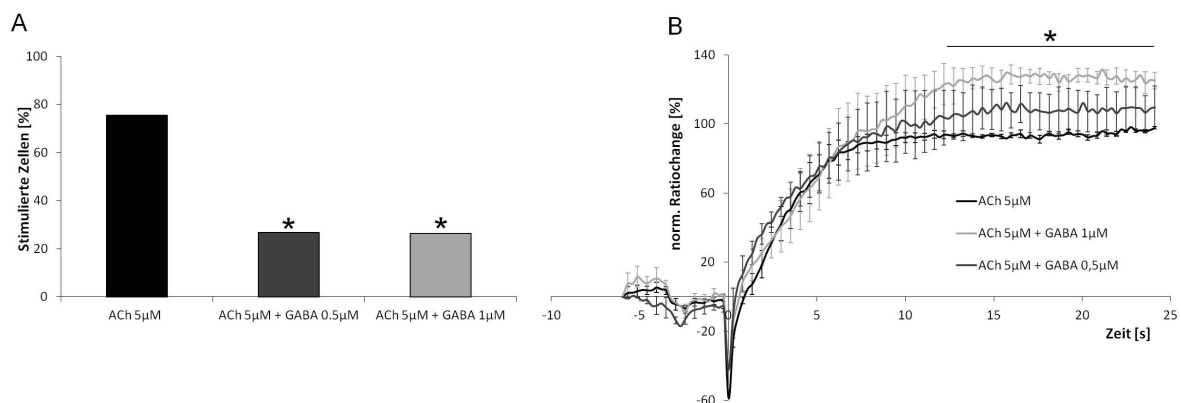


Abb. 5-23: Modulation neuronaler Aktivität durch GABA im stationären System

A: Dargestellt ist der prozentuale Anteil stimulierter Kenyonzellen nach Zugabe von ACh und GABA. Für alle Gruppen wurden mindestens 4 unabhängige Messungen durchgeführt (ACh: n=9 Messungen/143 Zellen; ACh + GABA 0,5 µM: n=4 Messungen/45 Zellen; ACh + GABA 1 µM n=4 Messungen/53 Zellen). Statistik: Chi-Quadrat-Test, $p^* < 0,001$. **B:** Dargestellt ist die Veränderung der Ratio von Cameleon nach Zugabe von ACh und GABA. Es wurden nur die in A stimulierten Zellen betrachtet. Der Calciumeinstrom in den ersten 12 s unterscheidet sich zwischen den drei Gruppen nicht. Nach 12 s kann beobachtet werden, dass der Calciumeinstrom umso größer ist, desto höher die vorhandene GABA-Konzentration ist (ACh: 118 Zellen; ACh + GABA 0,5 µM: 12 Zellen; ACh + GABA 1 µM: 14 Zellen). Statistik: zweifaktorielle ANOVA, ACh und ACh + GABA 1 µM unterscheiden sich signifikant; $p^* < 0,025$.

5.3.4 GABAerge Modulation neuronaler Aktivität im Durchflusssystem

Um zu untersuchen wie der Neurotransmitter GABA den durch ACh induzierten Calciueinstrom beeinflusst, wurden, wie in Kapitel 5.2.1 erläutert, ACh und GABA in zwei verschiedenen zeitlichen Kombinationen miteinander gepaart. Dabei wird zunächst getestet, ob sich die Subpopulation der Kenyonzellen von *Drosophila*, wie die der Honigbiene (s. Abb. 5-17), durch eine GABA/ACh-Paarung deaktivieren lassen (Abb. 5-24).

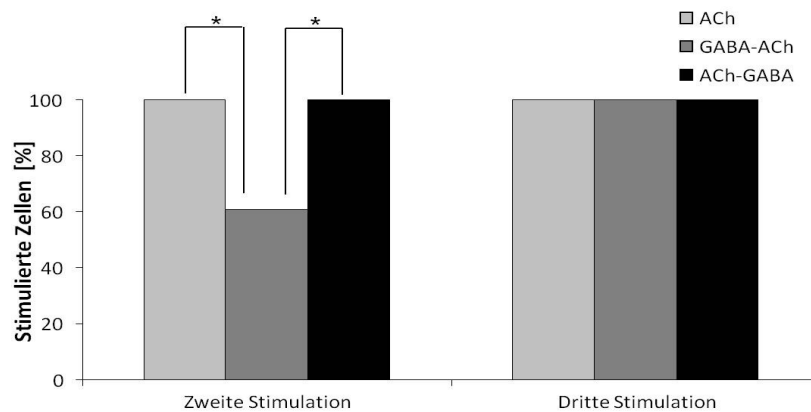


Abb. 5-24: Die GABA/ACh-Paarung verringert den Anteil stimulierter Zellen reversibel

Dargestellt ist der Anteil stimulierter Kenyonzellen abhängig von der Paarung von ACh und GABA. Die GABA/ACh-Paarung (GABA/ACh) verringert im Vergleich zur Kontrollgruppe (ACh) und der ACh/GABA-Paarung (ACh-GABA) den Anteil stimulierter Zellen bei der zweiten, gepaarten Stimulation. Unabhängig von der Paarung lassen sich bei der dritten Stimulation, die für alle Gruppen aus einer Stimulation mit ACh alleine besteht, 100% der Zellen stimulieren. Jeder Neurotransmitter wurde mit einer Konzentration von 10 μM für 3 s verabreicht. Für die statistische Auswertung wurden nur Zellen in Betracht gezogen, die auf die erste Stimulation reagierten (ca. 40%). Es wurden für jede Gruppe mindestens 5 unabhängige Präparationen durchgeführt (ACh: n=22 Zellen; GABA/ACh: n=23 Zellen; ACh/GABA: n=17 Zellen). Statistik: exakter Test nach Fisher; $p^* < 0,025$.

Verabreicht man während der zweiten Stimulation GABA direkt vor ACh, so verringert diese GABA/ACh-Paarung den Anteil stimulierter Zellen auf 60%. Somit spaltet die GABA/ACh-Paarung auch in der 201y-Subpopulation der Kenyonzellen von *Drosophila* in Responder und Non-Responder. Die ACh/GABA-Paarung hingegen beeinflusst den Anteil stimulierter Zellen nicht. In der dritten Stimulation, in der alle Gruppen nur mit ACh stimuliert wurden, liegt der Anteil stimulierter Zellen bei allen drei Gruppen bei 100%. Dies zeigt, dass die durch die GABA/ACh-Paarung hervorgerufene Deaktivierung reversibel ist. Um zu untersuchen, wie GABA die durch ACh induzierte Calciumkinetik moduliert, ist in Abb. 5-25 die Veränderung der Ratio dargestellt. Hierbei wurde für jede einzelne Kenyonzelle die Amplitude der Ratio (EYFP/ECFP) der ersten Stimulation auf 100% gesetzt und die nachfolgenden Stimulationen daran normiert. Zudem wurde der Beginn jeder Stimulation auf 0 (Baseline) gesetzt. Die Calciumkinetiken der Kenyonzellen sind somit als prozentuale

Veränderung der Ratio der Wellenlängen von Cameleon dargestellt. Um die Kurven der Calciumkinetiken zu glätten, wurden zusätzlich die Werte von fünf Einzelbildern (6 s) gemittelt.

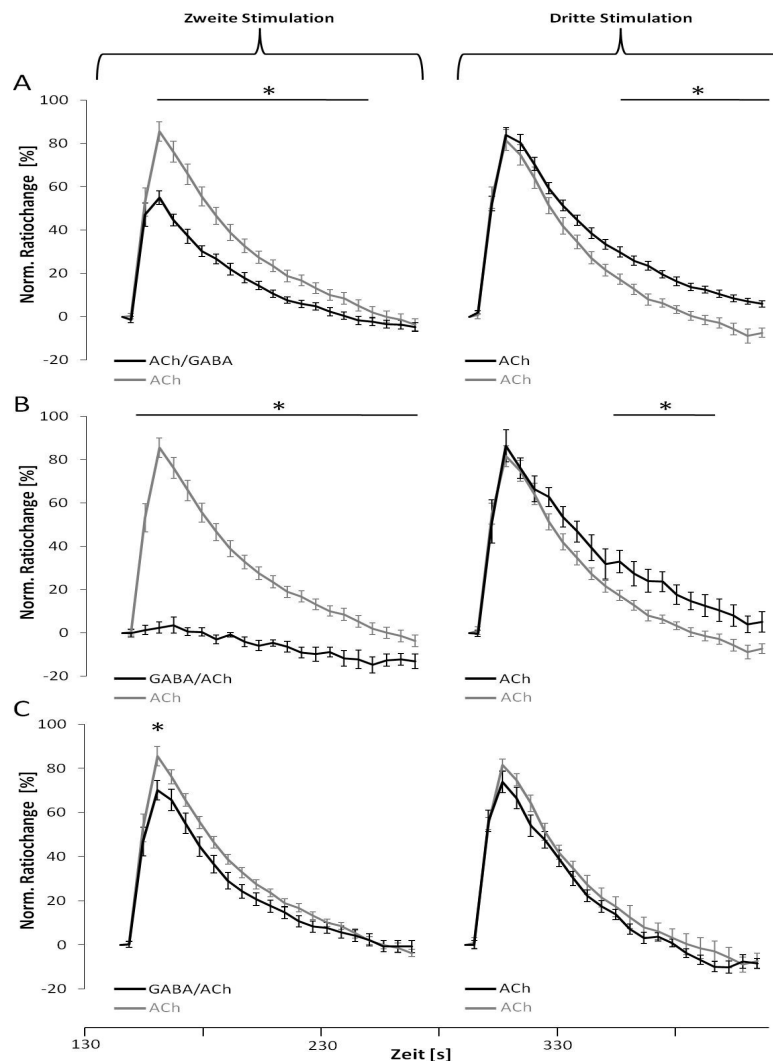


Abb. 5-25: Der durch ACh induzierte Calciumeinstrom lässt sich durch die zeitliche Paarung mit GABA unterschiedlich modulieren

Dargestellt sind die anhand der ersten Stimulation normierten Veränderungen der Ratio der Kenyonzellen nach Stimulation mit ACh und GABA. **A:** Im Vergleich zur Kontrolle (ACh) führt die ACh/GABA-Paarung (ACh/GABA) zu einem deutlich reduzierten Calciumeinstrom während der zweiten Stimulation und einem verlangsamten Calciumausstrom während der dritten Stimulation. **B, Non-Responder:** Die Zellen, die aufgrund der GABA/ACh-Paarung bei der zweiten Stimulation nicht reagierten, weisen sich durch einen völlig fehlenden Calciumeinstrom aus (schwarz). Der Calciumausstrom der dritten Stimulation ist durch die vorherige Paarung leicht verlangsamt. **C, Responder:** Die Zellen, die trotz GABA/ACh-Paarung auf die zweite Stimulationen reagierten, unterscheiden sich von der Kontrolle nur durch einen leicht verringerten Calciumeinstrom während der zweiten Stimulation.

Jeder Neurotransmitter wurde mit einer Konzentration von 10 μM für 3 s verabreicht. Für die statistische Auswertung wurden nur Zellen in Betracht gezogen, die auf die erste Stimulation reagierten (ca. 40%). Der Calciumeinstrom der ersten Stimulation unterscheidet sich zwischen den Gruppen nicht. Zur Normierung wurde für jede einzelne Zelle die Amplitude der ersten Stimulation auf 100% gesetzt. Für jede Gruppe wurden mindestens 5 unabhängige Präparationen/Messungen durchgeführt (ACh: n=22 Zellen; ACh/GABA: n=17 Zellen GABA/ACh, Non-Responder: n=9, Responder n=14 Zellen). Statistik: Alle Gruppen wurden zunächst einer zweifaktoriellen ANOVA unterzogen, gefolgt von einem paarweise durchgeführten Vergleich mittels Fisher's PLSD Test ($p^* < 0,012$).

Verabreicht man direkt nach ACh GABA (ACh/GABA), so verringert dies, im Vergleich zur Stimulation mit ACh alleine, den Calciumeinstrom (Abb. 5-25A). Diese Paarung führt bei der anschließenden dritten Stimulation mit ACh zu einem verlangsamten Calciumausstrom. Die Non-Responder der GABA/ACh-Paarung zeichnen sich durch einen völlig fehlenden Calciumeinstrom während der zweiten Stimulation aus (Abb. 5-25B). Ähnlich der ACh/GABA-Paarung, ist der Calciumausstrom der dritten Stimulation verlangsamt. Die Responder der GABA-ACh Paarung weisen nur eine kleine Verringerung des Calciumeinstroms während der zweiten Stimulation auf. Die dritte Stimulation zeigt keinen Unterschied zur Kontrolle. Um zu untersuchen, ob metabotrope oder ionotrope GABA-Rezeptoren an der Aufteilung in Responder und Non-Responder beteiligt sind, wurde in der GABA/ACh-Paarung GABA durch spezifische Agonisten ersetzt (Abb. 5-26A). 3-APMPA aktiviert nur metabotrope GABA-Rezeptoren, während Muscimol nur ionotrope GABA-Rezeptoren aktiviert.

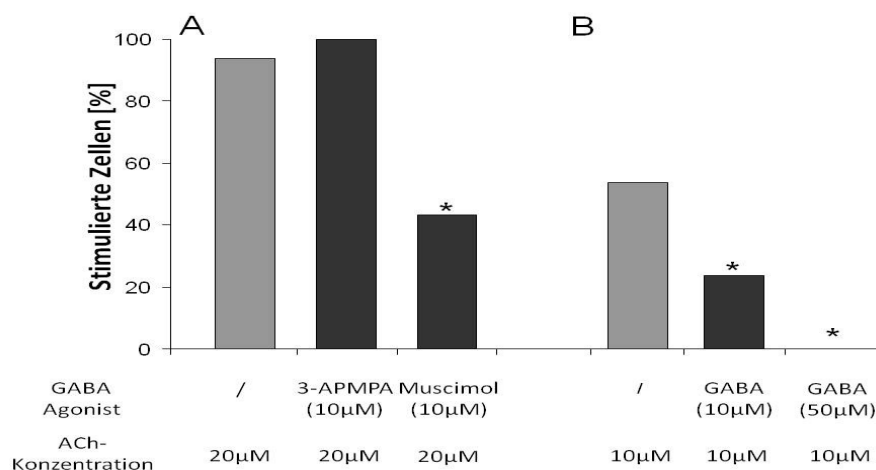


Abb. 5-26: Der Anteil stimulierter Kenyonzellen der GABA/ACh-Paarung ist abhängig vom Konzentrationsverhältnis zwischen ionotropem GABA-Rezeptor-Agonisten und ACh

Dargestellt ist der Anteil stimulierter Kenyonzellen während der GABA/ACh-Paarung abhängig vom spezifischen Agonisten und der GABA-Konzentration. **A:** Die Muscimol/ACh-Paarung verringert den Anteil stimulierter Zellen im Vergleich zur Kontrolle. Die 3-APMPA/ACh-Paarung weist keinen Unterschied auf. **B:** Die GABA/ACh-Paarung in einem Konzentrationsverhältnis von 1:1 verringert den Anteil stimulierter Zellen um die Hälfte. Nach Erhöhung der GABA Konzentration auf 50 μ M sind keine Zellen mehr stimulierbar.

In dieser statistischen Betrachtung wurden alle Kenyonzellen integriert, auch die, die nicht auf den ersten Stimulus reagierten. Jeder Neurotransmitter wurde für 3 s verabreicht. Für jede Gruppe wurden mindestens 4 unabhängige Präparationen/Messungen durchgeführt (ACh 20 μ M: n=32 Zellen; 3-APMPA/ACh: n=28 Zellen; Muscimol/ACh: n=30 Zellen; ACh 10 μ M: n=52 Zellen; GABA (10 μ M)/ACh: n=63 Zellen; GABA(50 μ M)/ACh: n=32 Zellen (exakter Test nach Fisher, wenn Anzahl der Zellen im Vergleich zweier Gruppen kleiner als 100; Chi-Quadrat-Test, wenn Anzahl der Zellen im Vergleich zweier Gruppen größer als 100; $p^* < 0,025$).

Nur die Paarung von ACh mit Muscimol beeinflusst den Anteil stimulierter Zellen, was zeigt, dass nur die ionotropen GABA-Rezeptoren den durch ACh induzierten Calciueinstrom hemmen. Wie in den gesamten Kenyonzellen der Honigbiene ist in der 201y-Subpopulation der Kenyonzellen von *Drosophila* die Hemmung des Calciueinstroms konzentrationsabhängig (Abb. 5-26B). Erhöht man die GABA-Konzentration auf das Fünffache im Vergleich zur ACh-Konzentration, so lassen sich bei einer GABA/ACh-Paarung keinerlei mehr aktivierbare Kenyonzellen feststellen.

6 Diskussion

6.1 Wechselwirkung zwischen Exzitation und Inhibition reguliert Intensität und zeitliche Ausdehnung neuronaler Aktivität

Der inhibitorische Neurotransmitter GABA besitzt die Fähigkeit, grundlegende Eigenschaften neuronaler Aktivität zu verändern [139] und somit auch die Gedächtnisbildung zu beeinflussen. Innerhalb neuronaler Netzwerke reguliert GABA z.B. die Ausschüttung verschiedener Neurotransmitter [140, 141] und schränkt die Reichweite neuronaler Erregung ein [142, 143]. Dieses Kapitel beschäftigt sich mit der Frage, wie GABA die neuronale Aktivität auf der Ebene einzelner Neuronen reguliert. Dazu wurde in dieser Arbeit der zelluläre Mechanismus von GABA in isolierten Neuronen der Pilzkörper von Honigbiene und Fruchtfliege untersucht.

6.1.1 ACh-Rezeptoren induzieren Depolarisation und Öffnung spannungsabhängiger Calcium-Kanäle

Die Stimulation mit ACh induziert in isolierten Kenyonzellen einen Calciumeinstrom. Da sich dieser Calciumeinstrom durch selektive Antagonisten nikotinischer ACh-Rezeptoren (nAChR) verhindern lässt, beruht der Mechanismus des Calciumeinstroms rein auf ionotropen AChR [74, 144, 145]. nAChR sind durchlässig für Na⁺-Ionen, was bei einer Aktivierung zu einer Depolarisation führt und somit spannungsabhängige Calcium-Kanäle öffnet (Abb. 6-1) [146].

In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass 20 µM ACh mehr Kenyonzellen stimuliert und zu einem stärkeren Calciumeinstrom führt als 5 µM ACh (Abb. 5-22). Somit lassen sich manche Kenyonzellen schon bei 5 µM ACh stimulieren und andere hingegen erst bei 20 µM. Dies deutet darauf hin, dass sich die Kenyonzellen in der Anzahl oder auch der Komposition der Untereinheiten der nAChR unterscheiden. Die nAChR setzen sich wie die ionotropen GABA-Rezeptoren (s. Kap. 1.1.2) aus einer Vielzahl unterschiedlicher Untereinheiten zusammen [147-149]. Dabei entscheidet die Komposition dieser Untereinheiten, wie stark die Depolarisation durch ACh ist [150]. Obwohl in der Honigbiene bereits gezeigt wurde, dass sich das Expressionsmuster der Untereinheiten zwischen Antennallobus und Pilzkörper unterscheidet [151], ist noch nicht untersucht worden, ob die Kenyonzellen untereinander verschiedene Kompositionen der Untereinheiten aufweisen. Möglicherweise besitzen

Kenyonzellen, die sich in der Komposition der Untereinheiten der nAChR unterscheiden und somit unterschiedliche Sensitivitäten gegenüber ACh aufweisen, verschiedene Aufgaben während der Gedächtnisbildung. Diese Hypothese wird dadurch gestützt, dass Antagonisten, die ihre Wirkung an verschiedenen Untereinheiten der nAChR entfalten, verschiedene Gedächtnisphasen blockieren. Zum Beispiel hemmt der Antagonist α -Bungarotoxin spezifisch die Konsolidierung des Langzeitgedächtnisses [152, 153], während der Antagonist Mecamylamin die Acquisition und den Abruf eines Kurzzeitgedächtnisses hemmt [152-154]. Diese Ergebnisse sind darauf zurückzuführen, dass α -Bungarotoxin und Mecamylamin an verschiedene Untereinheiten binden [155]. Somit ist es naheliegend, dass Neurone, die aufgrund individueller Komposition der Untereinheiten Unterschiede in ihrer Sensitivität gegenüber ACh aufweisen, auch an unterschiedlichen Prozessen während der Gedächtnisbildung beteiligt sind.

Im Durchflusssystem hat sich gezeigt, dass bei mehrfachen Stimulationen mit ACh, der Calciumeinstrom bei jeder Stimulation abnimmt (Abb. 5-19). Möglicherweise ist die Abnahme des Calciumeinstroms auf die Eigenschaften der calciumsensitiven Fluoreszenzmarker zurückzuführen. Andererseits spricht jedoch gegen diese These, dass die Paarung von 3-APMPA mit ACh die Abnahme des Calciumeinstroms in isolierten Kenyonzellen verhindert (Abb. 5-19). Eine solche Abnahme der neuronalen Aktivität findet sich nicht nur in isolierten Kenyonzellen, sondern auch *in vivo*. *In vivo*-Imaging-Studien in der Honigbiene haben gezeigt, dass die wiederholte Gabe desselben Duftes ebenfalls zu einer Abnahme des Calciumeinstroms im Pilzkörper führt [156]. Interessanterweise lässt sich diese Abnahme durch die Paarung von Duft und Belohnung dauerhaft verhindern [157]. Vermutlich ist die Abnahme der neuronalen Aktivität auf wiederholte Stimuli eine intrinsische Eigenschaft einzelner Neuronen des Pilzkörpers, die durch die Assoziation mit wichtigen Informationen, wie z.B. einer Belohnung, verhindert wird. Da in dieser Arbeit die Abnahme des Calciumeinstroms durch Aktivierung metabotroper GABA-Rezeptoren verhindert wurde, könnten diese Rezeptoren an der Vermittlung der Belohnung an die Pilzkörper beteiligt sein. In Kap. 6.4 wird diese Hypothese eingehender diskutiert.

6.1.2 Ionotrope GABA-Rezeptoren hemmen die Öffnung spannungsabhängiger Calcium-Kanäle

Die zeitliche Paarung von ACh und GABA führte zu einer Inhibition des von ACh induzierten Calciumeinstroms. Lediglich bei Verabreichung von GABA vor ACh wurde die neuronale Aktivität in manchen Kenyonzellen vollständig inhibiert (Abb. 5-16). In dieser Arbeit wurden diese vollständig inhibierten Neuronen als Non-Responder bezeichnet, während die Neuronen, die trotz GABA einen Calciumeinstrom aufwiesen, als Responder bezeichnet wurden. Besonders auffällig war die Aufteilung in Responder und Non-Responder in der 201y-Subpopulation der Fruchtfliege, da die Responder hier nur einen geringfügig inhibierten Calciumeinstrom aufwiesen (Abb. 5-23). Der Anteil der Non-Responder war umso größer, je höher die GABA-Konzentration war. Dies zeigt, dass alle Kenyonzellen sich prinzipiell durch GABA inhibieren lassen, aber sich in ihrer Sensitivität gegenüber GABA unterscheiden. Wie bereits für die ACh-Rezeptoren diskutiert, können die Gründe dafür in einer unterschiedlichen Anzahl an GABA-Rezeptoren oder auch in einer unterschiedlichen Komposition der Untereinheiten der GABA-Rezeptoren liegen. Da die Inhibition über ionotrope GABA-Rezeptoren vermittelt wird (Abb. 5-18), müssen sich die Kenyonzellen in Anzahl und Eigenschaften der ionotropen Untereinheiten unterscheiden.

In *Drosophila* wurde gezeigt, dass die Komposition der Untereinheiten entscheidend für die Affinität gegenüber GABA ist [113, 114]. Die wichtigste Untereinheit ist hierbei RDL, ohne die keine funktionellen ionotropen GABA-Rezeptoren gebildet werden können und die durch alternatives Splicing und RNA editing die Vielfalt möglicher Rezeptoren erhöht [114, 158, 159]. Zudem wurde in *Drosophila* gezeigt, dass die Manipulation des Expressionsniveaus von RDL im Pilzkörper die Bildung des assoziativen Gedächtnisses maßgeblich beeinflusst [117, 118]. Wie bereits für die Sensitivität gegenüber ACh diskutiert, könnten auch Neuronen mit unterschiedlichen Sensitivitäten gegenüber GABA verschiedene Aufgaben während der Gedächtnisbildung besitzen. Die in dieser Arbeit durchgeführten Verhaltensexperimente untermauern diese Hypothese, indem sie zeigen, dass der Agonist Muscimol vor allem während der Acquisition die Bildung des assoziativen Gedächtnisses beeinflusst (eingehender in Kap. 6.3.1 diskutiert).

Die durch GABA vermittelte Inhibition des von ACh induzierten Calciumeinstroms ließ sich durch die zusätzliche Gabe von Picrotoxin (PTX) hemmen (Abb. 5-20). In den Kenyonzellen der Honigbiene wurde gezeigt, dass PTX den Einstrom von Chlorid-Ionen durch ionotrope GABA-Rezeptoren blockiert [160]. In *Drosophila* besitzt PTX eine besondere Affinität zu RDL, was sich dadurch zeigt, dass Mutationen im *rdl*-Gen die durch PTX bedingte Hemmung des Chlorid-Einstroms verringern und sogar vollständig aufheben können [161, 162]. Die Inhibition des Calciumeinstroms durch ionotrope GABA-Rezeptoren hängt also direkt mit dem Chlorid-Einstrom und der damit verbundenen Hyperpolarisation zusammen. Diese Hyperpolarisation verhindert die Aktivierung spannungsabhängiger Calcium-Kanäle, die durch die von nAChR induzierte Depolarisation erfolgen würde (Abb. 6-1).

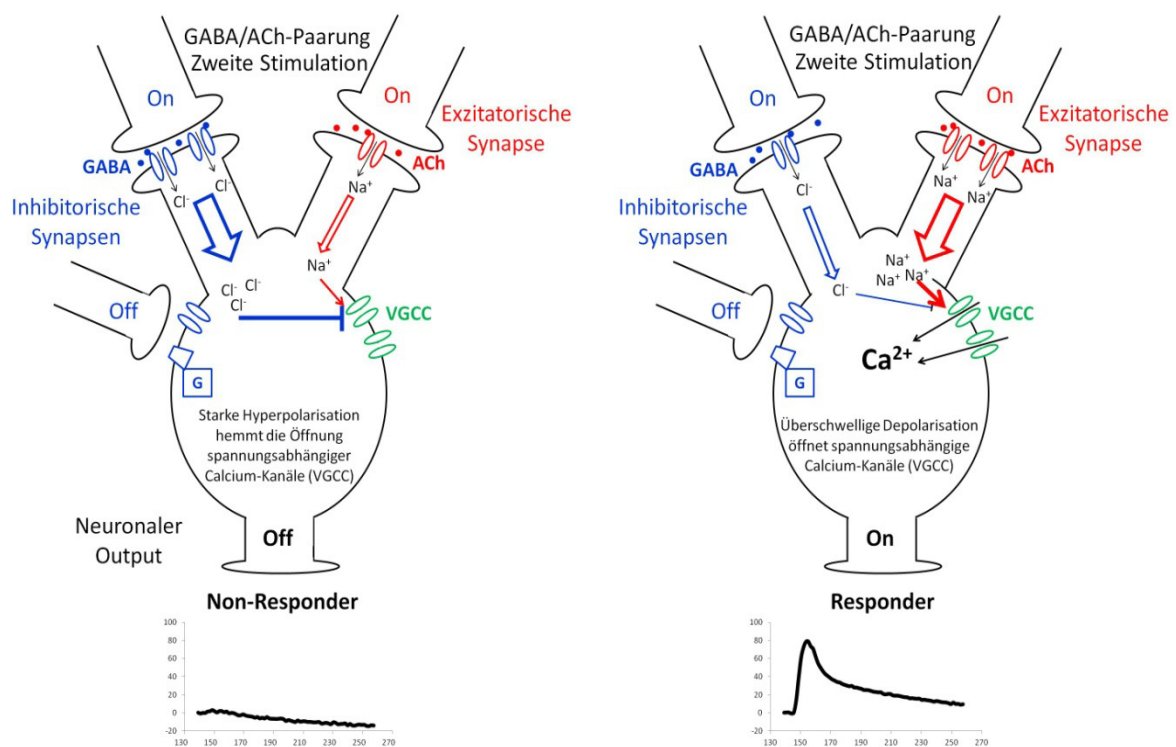


Abb. 6-1: Die Wechselwirkung zwischen Exzitation und Inhibition beeinflusst die Intensität neuronaler Aktivität

Die unterschiedliche Anzahl und Komposition von ACh- und GABA-Rezeptoren charakterisiert Non-Responder und Responder. Bei Non-Respondern (links) überwiegt die durch ionotrope GABA-Rezeptoren (blau) vermittelte Hyperpolarisation gegenüber der durch nAChR (rot) bedingten Depolarisation. Dies führt zu einer Hemmung der spannungsabhängigen Calcium-Kanäle (grün; VGCC, voltage gated calcium channel). Bei Respondern (rechts) hingegen überwiegt die Depolarisation gegenüber der Hyperpolarisation, was zur Öffnung spannungsabhängiger Calcium-Kanäle (grün) und zum Calciumeinstrom führt.

Eine solche Wechselwirkung zwischen Exzitation und Inhibition wurde bereits in anderen Publikationen postuliert und vermittelt einen wichtigen Leitfaden während der Entwicklung des Hippocampus [163, 164]. Über diese Wechselwirkung lässt sich auch die Auftrennung in Responder und Non-Responder erläutern (Abb. 6-1). Bei äquivalenten Konzentrationen von ACh und GABA überwiegt in Non-Respondern die Hyperpolarisation, die die Öffnung spannungsabhängiger Calcium-Kanäle vollständig verhindert. Die Ursache dafür kann in einer erhöhten Sensitivität gegenüber GABA oder auch einer verringerten Sensitivität gegenüber ACh liegen. Im Fall der Responder hingegen, verhält es sich genau entgegengesetzt. Die Sensitivitäten gegenüber ACh und GABA werden dabei von Anzahl und Komposition der jeweiligen Rezeptoren bestimmt und spiegeln so möglicherweise unterschiedliche Subpopulationen von Neuronen wieder. Abb. 6-1 zeigt schematisch die Wechselwirkung zwischen Exzitation und Inhibition, die den Aktivitätsgrad einzelner Neurone reguliert. Diese Wechselwirkung beschränkt sich nicht nur auf einzelne Neurone, sondern lässt sich auch auf neuronale Netzwerke übertragen [165, 166].

6.1.3 Schnelle Inhibition durch ionotrope GABA-Rezeptoren und langsame Faszilitierung durch metabotrope GABA-Rezeptoren

Im Gegensatz zur GABA/ACh-Paarung konnte die ACh/GABA-Paarung den durch ACh induzierten Calciumeinstrom nicht vollständig inhibieren (Abb. 5-16 und Abb. 5-25). Da ACh zuerst verabreicht wurde, führte die dadurch induzierte Depolarisation bereits zur Öffnung spannungsabhängiger Calcium-Kanäle. Die durch GABA hervorgerufene Hyperpolarisation kann jedoch während der ACh/GABA-Paarung die Dauer des Calciumeinstroms kontrollieren (Abb. 6-2). Die zeitliche Einschränkung neuronaler Aktivität durch ionotrope GABA-Rezeptoren wurde vor allem in Säugetieren beschrieben und als feed-forward Inhibition bezeichnet [167, 168]. Dabei wird ein Neuron mit einer kurzen Verzögerung zunächst stimuliert und anschließend inhibiert, womit sich die Dauer der neuronalen Aktivität regulieren lässt [169, 170]. Wie sich diese zeitliche Kontrolle auf das Verhalten auswirkt, ist meist nicht bekannt und hängt vermutlich von der Funktion der jeweiligen Neuronen ab. Während der assoziativen Konditionierung der Honigbiene und der Fruchtfliege könnte eine solche feed-forward Inhibition ein Zeitfenster definieren, in dem sich CS und US miteinander assoziieren lassen [171, 172]. Dass CS und US nahe zusammen liegen müssen, um ein assoziatives Gedächtnis zu bilden, ist bereits mehrfach gezeigt worden [173-175]. Wie jedoch dieses Zeitfenster gebildet und

definiert wird, ist noch weitestgehend unbekannt. Es ist jedoch bekannt, dass der US selbst GABAerge Neurone aktiviert, die den Pilzkörper innervieren und möglicherweise die durch den CS hervorgerufene Exzitation inhibieren [90]. Da das topografische Duftmuster der Pilzkörper abhängig von der assoziierten Erfahrung ist [176, 177], könnte diese Inhibition dem Aktivitätsmuster des Pilzkörpers eine spezifische zeitliche Komponente verleihen, mit der eine Belohnung bzw. Bestrafung assoziiert wird.

Neben der schnellen Inhibition wurde während der ACh/GABA-Paarung deutlich, dass GABA in den Kenyonzellen auch eine langsame Faszilitierung vermittelt, die erst bei der nachfolgenden Stimulation mit ACh auftritt (Abb. 6-2).

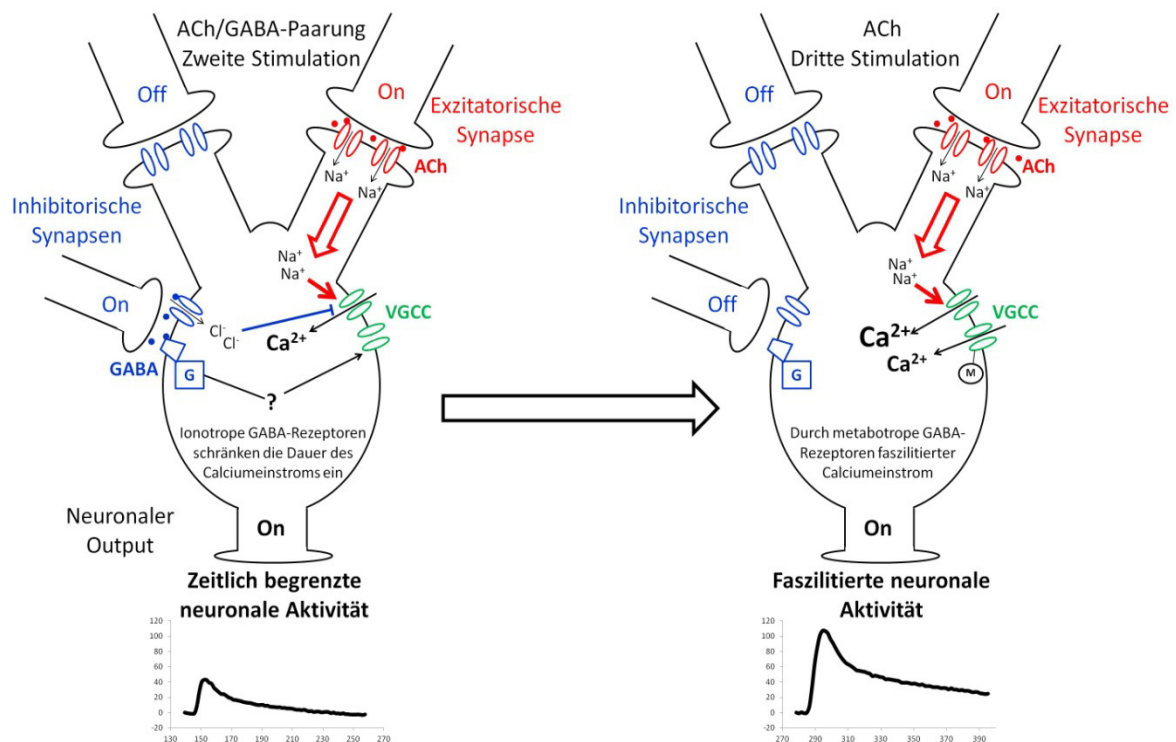


Abb. 6-2: GABA kontrolliert die Dauer neuronaler Erregung und induziert eine aktivitätsabhängige Faszilitierung

Während der ACh/GABA-Paarung (links) aktiviert ACh zunächst nAChR (rot), die eine Depolarisation bewirken und spannungsabhängige Calcium-Kanäle (grün; VGCC, voltage gated calcium channel) öffnen. Anschließend induziert GABA über ionotrope Rezeptoren (blau) eine Hyperpolarisation, die die VGCC hemmt und so die Intensität und Dauer der neuronalen Aktivität einschränkt. Gleichzeitig werden metabotrope GABA-Rezeptoren aktiviert, die über einen unbekanntem Mechanismus die VGCC modifizieren. Diese Modifikation führt in einer weiteren, nicht inhibierten Stimulation (rechts), zu einem verstärkten Calciumeinstrom.

Diese Faszilitierung zeichnet sich zum einen durch die Verstärkung des von ACh induzierten Calciumeinstroms aus und zum anderen durch das Verlangsamen des Calciumausstroms. An diesen beiden Effekten sind sowohl ionotrope als auch metabotrope GABA-Rezeptoren beteiligt (Abb. 5-18). Dabei bewirkt die Aktivität der ionotropen GABA-Rezeptoren den verlangsamten Calciumausstrom. Vermutlich vergrößert die Hyperpolarisation den elektrochemischen Gradienten an der Membran, wodurch bei einer anschließenden, nicht inhibierten Stimulation das Neuron länger depolarisiert wird.

Die Aktivität der metabotropen GABA-Rezeptoren ist für den verstärkten Calciumeinstrom verantwortlich (Abb. 5-18). In *Drosophila* und anderen Insekten wurden bisher nur inhibitorische metabotrope GABA-Rezeptoren beschrieben, die die Depolarisation und somit die Öffnung spannungsabhängiger Calcium-Kanäle hemmen [132, 178]. In Säugetieren wurde jedoch gezeigt, dass sich metabotrope GABA-Rezeptoren in Abhängigkeit verschiedener Faktoren inhibierend oder faszilitierend auswirken. Zum Beispiel begünstigt eine dauerhafte Stimulierung metabotroper GABA-Rezeptoren inhibitorische Mechanismen, während eine kurze Stimulierung die Faszilitierung des Calciumeinstroms begünstigt [179]. Zudem hängen die Auswirkungen metabotroper GABA-Rezeptoren davon ab, welches G-Protein in den untersuchten Neuronen exprimiert wird. Es gibt beispielsweise an metabotrope GABA-Rezeptoren gekoppelte G-Proteine, die über die Phospholipase C Ca^{2+} aus dem ER freisetzen [180]. Besonders interessant sind hippocampale Neurone, in denen metabotrope GABA-Rezeptoren nachgewiesen wurden, die spannungsabhängige Calcium-Kanäle modifizieren und so den Calciumeinstrom faszilitieren [181]. Über den genauen Mechanismus der in dieser Arbeit beobachteten Faszilitierung lässt sich nur spekulieren. Da jedoch die Faszilitierung abhängig von der Depolarisation durch ACh ist, liegt die Vermutung nahe, dass auch hier die Aktivität spannungsabhängiger Calcium-Kanäle modifiziert wurde (Abb. 6-2).

6.2 Metabotrope GABA-Rezeptoren, Katatonie, olfaktorische Diskriminierung

6.2.1 Der selektive Agonist 3-APMPA induziert eine Katatonie

Die durch den selektiven Agonisten 3-APMPA induzierte Aktivierung metabotroper GABA-Rezeptoren führte in der Honigbiene zu Symptomen (s. Kap. 5.1.1), die bereits in der Fruchtfliege beobachtet wurden und als Katatonie bezeichnet werden [133]. Die Ausprägung der Katatonie war abhängig von der Konzentration und dem Ort der Injektion. Da die Katatonie nach Injektion in den Kopf weniger stark ausgeprägt war als nach Injektion in den Thorax, liegt die Schlussfolgerung nahe, dass die Katatonie durch metabotrope GABA-Rezeptoren des peripheren Nervensystems ausgelöst wird.

Die Katatonie ist beim Menschen als neurologisch bedingte Immobilität definiert [182]. Die häufigsten Symptome sind Starre des gesamten Körpers, ein beharrliches Schweigen und die Beibehaltung der Körperstellung nach passiver Bewegung [182]. Verursacht wird die Katatonie meist durch extreme psychische Zustände, wie z.B. Schizophrenie [183], Alkoholentzug [184] oder auch schwere Depressionen [185]. Die Katatonie geht meist mit einer Übererregung neuronaler Netzwerke einher, die durch Fehlfunktionen des inhibitorischen GABAergen Systems bedingt sind [186]. Interessanterweise wirken sich jedoch metabotrope und ionotrope GABA-Rezeptoren gegensätzlich auf die Katatonie aus [187]. Während die Aktivierung metabotroper GABA-Rezeptoren auch in Ratten und Menschen eine Katatonie induziert [188-190], lassen sich die Symptome durch die Aktivierung ionotroper GABA-Rezeptoren mit Benzodiazepinen mildern [191]. Es ist jedoch gänzlich unbekannt, welche molekularen Mechanismen die Katatonie induzieren. Diskutiert werden Modifikationen von Kalium-Kanälen, die zu einer Hyperpolarisation führen [192] oder auch die Hemmung der Ausschüttung des Neurotransmitters Serotonin [188]. Im Gegensatz zu den in dieser Arbeit beobachteten Effekten, deuten diese Hypothesen darauf hin, dass metabotrope GABA-Rezeptoren des ZNS die Katatonie induzieren.

Nach bestem Wissen wurde in dieser Arbeit zum ersten Mal gezeigt, dass die Aktivierung metabotroper GABA-Rezeptoren in der Honigbiene eine Katatonie induziert. Somit kann die Biene als Modellorganismus dienen, um die molekularen Ursachen der Katatonie zu ergründen. Während in Insekten bisher nur inhibitorische

metabotrope GABA-Rezeptoren nachgewiesen wurden [132, 178], deuten die Ergebnisse dieser Arbeit darauf hin, dass in der Honigbiene auch faszilitatorische metabotrope GABA-Rezeptoren vorkommen (Abb. 5-18 und Abb. 5-19). Möglicherweise gibt es in Insekten beide Rezeptoren, die in verschiedenen neuronalen Netzwerken exprimiert werden und unterschiedliche Aufgaben besitzen. Sowohl inhibitorische als auch faszilitatorische Prozesse können theoretisch und abhängig von ihren jeweiligen physiologischen Aufgaben, die Symptome der katatonischen Starre erklären. Zum Beispiel kann eine dauerhafte Inhibition bestimmter neuronaler Netzwerke verhindern, dass sich die Muskulatur kontrahieren lässt, was zu einer Immobilität führen kann [193]. Andererseits kann eine stetige Faszilitierung bzw. Übererregung neuronaler Netzwerke die Muskulatur in einen hohen Spannungszustand versetzen. Dies würde auch die Beibehaltung der Körperstellung nach passiver Bewegung erklären [186]. Die aktivitätsabhängige Faszilitierung würde auch erklären, warum die Aktivierung ionotroper GABA-Rezeptoren die Symptome der Katatonie im Menschen mildert. In Abb. 6-2 ist dargestellt, wie metabotrope GABA-Rezeptoren die neuronale Aktivität faszilitieren, indem sie spannungsabhängige Calcium-Kanäle modifizieren. Demnach wird die Faszilitierung erst wirksam, wenn die spannungsabhängigen Calcium-Kanäle durch eine überschwellige Depolarisation geöffnet werden. Durch ionotrope GABA-Rezeptoren vermittelte Hyperpolarisation kann jedoch die Öffnung der spannungsabhängigen Calcium-Kanäle hemmen (s. Abb. 6-1), wodurch die Symptome der Katatonie gemildert werden könnten.

6.2.2 Die Aktivierung metabotroper GABA-Rezeptoren verbessert die olfaktorische Diskriminierung

Um die Auswirkungen metabotroper GABA-Rezeptoren auf die Gedächtnisleistung zu untersuchen, wurde die Konzentration des Agonisten 3-APMPA soweit verringert, dass max. 10% der Bienen katatonisch waren. Die Injektion von 3-APMPA vor dem Training bewirkte jedoch keine signifikante Veränderung der Gedächtnisleistung. 3-APMPA verbesserte jedoch die Fähigkeit der Bienen, den belohnten Duft von einem unbekanntem Duft zu unterscheiden (Abb. 5-3). D.h., durch Aktivierung der metabotropen GABA-Rezeptoren lässt sich die olfaktorische Diskriminierung verbessern.

Studien in Säugetieren haben deutlich gezeigt, dass die Aktivierung metabotroper GABA-Rezeptoren die Gedächtnisleistung verschlechtert [22], während die Hemmung die Gedächtnisleistung verbessert [194]. Eine Verschlechterung der Gedächtnisleistung konnte jedoch in dieser Arbeit nicht beobachtet werden. Möglicherweise war die Konzentration des Agonisten 3-APMPA zu gering oder die metabotropen GABA-Rezeptoren besitzen in der Honigbiene eine andere Funktion als in Säugetieren.

In Insekten wurde bereits eindrucksvoll demonstriert, dass der Neurotransmitter GABA an der olfaktorischen Diskriminierung beteiligt ist. Im Antennallobus (AL) aktiviert jeder Duft ein spezifisches Set an Glomeruli (s. Kap. 1.4). Dadurch werden auch GABAerge Neurone aktiviert, die die benachbarten Glomeruli hemmen und somit das topografische Duftmuster schärfen [195]. Diese Hemmung wird als laterale Inhibition bezeichnet und wurde vielfach auch im olfaktorischen Bulbus der Säugetiere beschrieben [196, 197]. Die Hemmung ionotroper GABA-Rezeptoren des AL durch PTX zerstört die individuellen Duftmuster [198], was es der Honigbiene unmöglich macht, molekular ähnliche Düfte voneinander zu unterscheiden [199, 200]. Es wurde bereits gezeigt, dass im AL und im olfaktorischen Bulbus auch metabotrope GABA-Rezeptoren an der Vermittlung der lateralen Inhibition beteiligt sind [201-203]. Bisher wurde jedoch nicht gezeigt, dass die Manipulation dieser Rezeptoren die olfaktorische Diskriminierung beeinflusst. Die künstliche Aktivierung der metabotropen GABA-Rezeptoren sollte jedoch die laterale Inhibition fördern, was das Duftmuster im AL schärft und die hier beobachtete Verbesserung der olfaktorischen Diskriminierung in der Honigbiene erklärt. Theoretisch könnte auch die in dieser Arbeit beobachtete Faszilitierung durch metabotrope GABA-Rezeptoren die olfaktorische Diskriminierung verbessern, indem sie die Intensität des Calciueinstroms aktiver Neurone fördert und somit das Aktivitätsmuster innerhalb des Pilzkörpers schärft.

6.3 Ionotrope GABA-Rezeptoren hemmen die Bildung des assoziativen Gedächtnisses

Um zu untersuchen, wie sich die Aktivität ionotroper GABA-Rezeptoren auf die Gedächtnisleistung auswirkt, wurde der Honigbiene der selektive Agonist Muscimol in Thorax und Kopf injiziert. Die Injektion von Muscimol vor einem schwachen Training führte abhängig von der Konzentration zu einem verschlechterten Gedächtnisabruf (Abb. 5-5). Somit wurde in der Honigbiene zum ersten Mal gezeigt, dass die Aktivierung ionotroper GABA-Rezeptoren zu einer verschlechterten Gedächtnisleistung führt. Beobachtet wurde jedoch auch, dass Muscimol die verschiedenen Phasen der Konditionierung unterschiedlich stark beeinflusst. Zudem war das durch Muscimol induzierte Gedächtnisdefizit abhängig von der Trainingsstärke.

6.3.1 Wechselwirkungen zwischen Inhibition und Acquisition

Wurde Muscimol vor einem schwachen Training (1-Trial) injiziert, so kam es zu schweren Gedächtnisdefiziten nach 2 h und 1 d, während Muscimol verabreicht vor einem starken Training (3-Trial) kein Gedächtnisdefizit nach 2 h und nur ein geringfügiges aber signifikantes Gedächtnisdefizit nach 1 d bewirkte (Abb. 5-8). Interessanterweise war die Acquisition selbst während des 3-Trial-Trainings unbeeinflusst. Die Injektion von Muscimol direkt nach dem Training hatte keinen Effekt auf die Konsolidierung bzw. die Gedächtnisleistung. Wurde Muscimol vor dem Gedächtnisabruf injiziert, so ließ sich ein Gedächtnisdefizit nur nach einem schwachen Training, nicht aber nach einem starken Training induzieren (Abb. 5-8). Dieses Gedächtnisdefizit fiel verglichen zur Injektion vor dem Training jedoch wesentlich geringer aus (Abb. 5-5). Insgesamt lässt sich feststellen, dass die Gedächtnisleistung durch die ionotropen GABA-Rezeptoren besonders dann beeinträchtigt wurde, wenn diese während der Acquisition aktiviert wurden.

In der Literatur wurden die Auswirkungen GABAerger Agonisten auf die Gedächtnisbildung vor allem während der Furchtkonditionierung von Säugtieren untersucht [204]. Hierbei wird während des Trainings innerhalb einer Kammer ein Ton (CS) mit einem elektrischen Schock (US) gepaart. Im späteren Gedächtnisabruf führt der Ton oder gar nur der räumliche Kontext der Kammer zu entsprechenden körperlichen Furchtreaktionen. In diesem Lernparadigma führt die Verabreichung GABAerger Agonisten vor dem Training ebenfalls zu einer Verschlechterung der

Gedächtnisleistung [205-207]. Die beobachteten Auswirkungen auf die Acquisition selbst werden jedoch sehr kontrovers diskutiert. In manchen Experimenten ist die Acquisition beeinträchtigt [208-210], in anderen hingegen können keine Auswirkungen auf die Acquisition nachgewiesen werden [211, 212]. Die Auswirkungen auf die Konsolidierung werden ähnlich kontrovers diskutiert. In manchen Studien beeinträchtigen GABAerge Agonisten die Konsolidierung und führen somit zu Gedächtnisdefiziten [213-215]. Andere Studien hingegen bestätigen die Ergebnisse dieser Arbeit, dass die Injektion GABAerger Agonisten vor dem Training zu einem Gedächtnisdefizit führt, jedoch nach dem Training keinerlei Auswirkungen auf die Gedächtnisleistung hat [216, 217]. Der Einfluss GABAerger Agonisten auf den Gedächtnisabruf dieses Lernparadigmas ist unzureichend untersucht [218], scheint aber nur geringen Einfluss zu haben [219].

Aufgrund der konzentrations- und zeitabhängigen Auswirkungen GABAerger Agonisten können geringfügige Unterschiede in der Durchführung der Experimente zu unterschiedlichen Ergebnissen führen (Abb. 5-5) [220, 221]. Dies erklärt auch die kontroversen Ergebnisse während der Furchtkonditionierung von Säugetieren und macht einen Vergleich mit den Ergebnissen dieser Arbeit nur bedingt möglich. Zudem könnten sich auch identische Dosen GABAerger Agonisten im Vergleich zwischen Vertebraten und Invertebraten, sowie abhängig vom jeweiligen Lernparadigma, völlig unterschiedlich auswirken.

Die unterschiedlichen Auswirkungen GABAerger Agonisten während der Furchtkonditionierung der Säugetiere und der appetitiven Konditionierung in der Honigbiene könnten direkt auf eine unterschiedliche Funktion von GABA in diesen beiden Lernparadigmen zurückzuführen sein. Es gibt wenige Studien, die sich mit der Rolle von GABA in der drogeninduzierten Platzpräferenz in Säugetieren beschäftigen. Da Drogen in diesem Lernparadigma als Belohnung eingesetzt werden, entspricht dies eher dem appetitiven Lernparadigma der Honigbiene [222]. Interessanterweise stimmen die Ergebnisse dieser Arbeit mit den Auswirkungen von Muscimol auf das Gedächtnis der drogeninduzierten Platzpräferenz überein. Die Gedächtnisleistung ließ sich in diesen Studien nur dann reduzieren, wenn Muscimol vor dem Training oder vor dem Abruf verabreicht wurde [223, 224]. Die Konsolidierung konnte hingegen nicht beeinflusst werden [223].

In Bezug auf die beobachteten Unterschiede der Gedächtnisdefizite in Abhängigkeit der Trainingsstärke, so gibt es derzeit keine einzige Studie, die systematisch die Auswirkungen GABAerger Agonisten zwischen schwachem und starkem Training analysiert. Es gibt lediglich einige Hinweise, die die Ergebnisse dieser Arbeit bestätigen. So konnte Muscimol in aversiven und belohnten Lernparadigmen in Säugetieren nach starkem Training nur das LTM aber nicht das STM beeinträchtigen [225]. Auch in dieser Arbeit war nach einem starken Training nur die Gedächtnisleistung nach 1 d, nicht aber nach 2 h reduziert. In beiden Experimenten wurde Muscimol vor dem Training injiziert, was wiederum für eine Rolle des GABAergen Inputs während der Acquisition spricht. In einer anderen Studie konnten GABAerge Agonisten die Rekonsolidierung der Gedächtnisbildung nur nach einem schwachen Training, jedoch nicht nach einem starken Training beeinflussen [226]. Die Rekonsolidierung beschreibt das Phänomen, dass ein bereits konsolidiertes Gedächtnis durch den Gedächtnisabruf wieder in einen labilen Zustand gerät [227]. Die Rekonsolidierung ist dadurch charakterisiert, dass eine Proteinsynthese induziert wird, deren Hemmung zum Verlust des assoziativen Gedächtnisses führt [227, 228]. Acquisition und Rekonsolidierung sind Phasen, in denen ein sehr hoher Grad an Plastizität herrscht [227]. Vermutlich lassen sich daher in beiden Phasen durch Aktivierung ionotroper GABA-Rezeptoren Gedächtnisdefizite induzieren, deren Ausprägung abhängig von der Trainingsstärke ist.

In allen diskutierten Lernparadigmen und Modellorganismen führte eine verstärkte Inhibition während der Acquisition zu Gedächtnisdefiziten. In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass sich dieses Gedächtnisdefizit in der Honigbiene durch Erhöhung der Anzahl an CS/US-Paarungen teilweise kompensieren lässt. Diese Wechselwirkung zwischen Trainingsstärke und Inhibition macht deutlich, dass GABA eine wichtige Rolle während der Acquisition besitzt (Abb. 6-3). Da CS und US GABAerge Neurone aktivieren, die die Pilzkörper innervieren [89-91], ist die Inhibition während der Acquisition ein endogener Prozess, der durch die Injektion von Muscimol lediglich verstärkt wird.

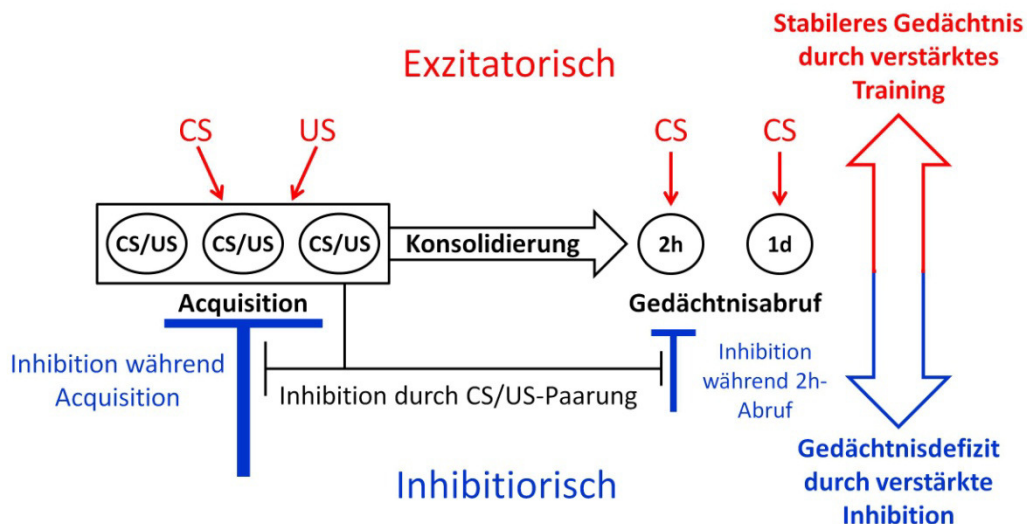


Abb. 6-3: Die Wechselwirkung zwischen Trainingsstärke und Intensität der Inhibition während Acquisition und Gedächtnisabruf definiert die Stabilität des assoziativen Gedächtnisses

Die Verstärkung der Inhibition durch Aktivierung ionotroper GABA-Rezeptoren mittels Muscimol (blau) führt während der Acquisition zu schweren Gedächtnisdefiziten und während des Gedächtnisabrufes zu einem leichten Gedächtnisdefizit. Diese Gedächtnisdefizite lassen sich durch ein verstärktes Training während der Acquisition teilweise kompensieren (Inhibition durch CS/US-Paarung). Gleichzeitig lässt sich die Stabilität des assoziativen Gedächtnisses durch Verstärkung der Inhibition während der Acquisition abschwächen. Dies spiegelt die Wechselwirkung der Integration von CS/US und der Inhibition während der Acquisition wider.

In der Honigbiene und *Drosophila* wurde gezeigt, dass die Paarung von CS und US die Aktivität der GABAergen Neurone innerhalb weniger Sekunden reduziert [91, 111]. Diese Form der präsynaptischen Plastizität schwächt die GABAerge Inhibition der Pilzkörper ab, wodurch sich die Bildung des assoziativen Gedächtnisses in *Drosophila* stabilisiert [111]. Diese präsynaptische Plastizität wird jedoch durch die künstliche Aktivierung der GABA-Rezeptoren mittels Muscimol aufgehoben, was wiederum die Stabilität des assoziativen Gedächtnisses abschwächt und das Gedächtnisdefizit nach dem starken Training erklärt (Abb. 6-3).

Die Paarung von CS und US induziert nicht nur die erläuterte präsynaptische Plastizität, sondern auch Prozesse der postsynaptischen Plastizität (Abb. 6-4). Die durch CS/US-Koinzidenz verstärkt aktivierte PKA phosphoryliert z.B. ionotrope GABA-Rezeptoren und schwächt somit die durch diese Kanäle vermittelte Hyperpolarisation ab [229-231]. Dies reduziert auch die Wirkung von Muscimol und erklärt, warum sich das durch Muscimol induzierte Gedächtnisdefizit sowohl während der Acquisition als auch während des Gedächtnisabrufes durch ein verstärktes Training kompensieren lässt (Abb. 6-3). All diese Befunde demonstrieren deutlich eine Wechselwirkung zwischen Acquisition und GABAerger Inhibition.

6.3.2 GABA beeinflusst die Koinzidenz von CS und US

Wie oben erläutert, führt die Aktivierung ionotroper GABA-Rezeptoren vor allem während der Acquisition, in der die Paarung von CS und US stattfindet, zu Gedächtnisdefiziten. Da Muscimol keine Auswirkungen auf die Zuckerwasserempfindlichkeit sowie die nicht-assoziativen Lernparadigmen hatte (Abb. 5-9), kann das Gedächtnisdefizit nicht durch eine veränderte Wahrnehmung des CS oder des US alleine begründet werden. Auch die unveränderte Acquisition nach Injektion von Muscimol zeigt, dass CS und US normal wahrgenommen wurden. Da sich der Gedächtnisabruf nur in Abhängigkeit von der Trainingsstärke beeinflussen ließ (Abb. 6-3), muss eine Verknüpfung zwischen CS, US und der Inhibition bestehen. Somit deutet alles darauf hin, dass die GABAerge Inhibition die Koinzidenz von CS und US moduliert.

Im Gegensatz zu diesen Ergebnissen stehen Experimente in Säugetieren, in denen die systemische Injektion GABAerger Agonisten vor der Furchtkonditionierung die Wahrnehmung des US beeinträchtigt [232]. Dies ist nicht überraschend, da die analgetischen und anxiolytischen Wirkungen GABAerger Agonisten sehr gut bekannt sind [233-235]. Jedoch scheint die Aktivierung von GABA-Rezeptoren auch die Wahrnehmung des US während der drogeninduzierten Platzpräferenz zu reduzieren [236]. Andere Studien hingegen weisen deutlich daraufhin, dass der GABAerge Input im Hippocampus die Integration von CS und US moduliert, und unterstützen somit die Schlussfolgerungen dieser Arbeit [21]. In *Drosophila* hingegen führt die Manipulation des GABAergen Systems zu der Schlussfolgerung, dass GABA sowohl bei der appetitiven als auch bei der aversiven Konditionierung zu einer veränderten neuronalen Prozessierung des CS führt [117, 118].

Wie in Kap. 6.3.1 diskutiert, zeigt sich auch hier, dass die Effekte GABAerger Agonisten abhängig von Injektionsort, dem Injektionszeitpunkt, dem Organismus und den spezifischen Lernparadigmen sind. Da Honigbiene und *Drosophila* verwandt sind, sollte die Hypothese der Modulation des CS eingehender betrachtet werden. Da sich in dieser Arbeit der Gedächtnisabruf nach einem schwachen Training durch Muscimol beeinflussen ließ, könnte man auch hier argumentieren, dass GABA die Wahrnehmung des CS stört. Diese Vermutung wäre jedoch unzureichend, da sie nicht erklärt, warum die Acquisition dennoch normal war und sich der Gedächtnisabruf nach einem starken Training nicht manipulieren ließ.

Möglicherweise ist die Modulation des CS durch GABA weniger wichtig für die Wahrnehmung des Duftes als vielmehr dafür, wie CS und US miteinander integriert werden und wie stark das entsprechende Gedächtnis dadurch ist. Dies würde auch erklären, warum zusätzliche CS-US-Paarungen das durch Muscimol induzierte Gedächtnisdefizit teilweise aufheben können.

Um diese Hypothese eingehender zu untersuchen, eignet sich die lichtinduzierte Freisetzung von GABA, die erstmals die zeitlich und lokal definierte Aktivierung von GABA-Rezeptoren ermöglicht. Somit lässt sich erstmals eine zeitlich exakt definierte Rolle für GABA während der Acquisition bestimmen.

6.3.3 GABA hemmt die Koinzidenz von CS und US in Antennalloben und Pilzkörper

Die lokale Freisetzung von GABA im Pilzkörper vor der CS-US-Paarung oder auch während des US eines 1-Trial-Trainings hatte keine Auswirkungen auf die Gedächtnisleistung (Abb. 5-12). Jedoch führte die Freisetzung von GABA in Antennallobus und Pilzkörper vor und während der Duftpräsentation der CS-US-Paarung zu einem signifikanten Gedächtnisdefizit (Abb. 5-12 und Abb. 5-13). Wurde GABA jedoch vor und während der Duftpräsentation des 2 h-Abrufes freigesetzt, so konnte weder im AL noch im Pilzkörper die Gedächtnisleistung signifikant beeinträchtigt werden (Abb. 5-14). Somit kann eine schnelle und kurze Aktivierung der GABA-Rezeptoren nur während der CS-US-Paarung, nicht aber während der Präsentation des CS alleine, die Gedächtnisleistung beeinflussen. Da die Aktivierung der GABA-Rezeptoren mit Muscimol die Wahrnehmung der Belohnung nicht beeinträchtigte, unterstützt dies die Hypothese, dass GABA die Koinzidenz von CS und US während der Acquisition moduliert.

Im Vergleich zur Injektion mit Muscimol fallen die Gedächtnisdefizite, die durch die lokale Freisetzung von GABA induziert werden, wesentlich schwächer aus. Dies ist nicht überraschend, da die lokale Freisetzung eine viel physiologischere Manipulation darstellt, in der die GABA-Rezeptoren nicht dauerhaft aktiviert werden. Zudem können sich bei Injektionen von Muscimol in den gesamten Kopf die Effekte verschiedener Hirnareale addieren. Da die lokale Freisetzung von GABA sowohl im AL als auch im Pilzkörper Gedächtnisdefizite induzierte, ist ein solcher Additionseffekt wahrscheinlich für die schweren Gedächtnisdefizite nach der Injektion von Muscimol vor dem 1-Trial-Training verantwortlich.

Durch die lokale Freisetzung von GABA ließ sich die Integration bzw. Koinzidenz von CS und US sowohl in den AL als auch in den Pilzkörpern derart beeinflussen, dass die Gedächtnisleistung signifikant verschlechtert war. Dies ist in Übereinstimmung mit der Literatur, in der die Integration von CS und US sowohl in den AL [37, 97, 98] als auch in den Pilzkörpern postuliert wird [99, 237, 238]. Auf zellulärer Ebene wurde in dieser Arbeit gezeigt, dass ionotrope GABA-Rezeptoren die neuronale Aktivität unterdrücken (Abb. 6-1 und Abb. 6-2). Es stellt sich nun die Frage, wie GABA durch die Hemmung der neuronalen Aktivität nicht die Wahrnehmung von CS oder US alleine, aber wohl die Koinzidenz dieser beiden Signale stört?

Dazu betrachten wir die Ergebnisse der Arbeitsgruppe um Liu und Davis, die zeigen sollen, dass ein verstärkter GABAerger Input in den Pilzkörpern spezifisch die Wahrnehmung des CS beeinträchtigt und somit das assoziative Gedächtnis verschlechtert [117, 118]. Das Hauptargument dafür ist, dass die Überexpression von RDL in den Pilzkörpern zu einem verringerten Calciumstrom nach Präsentation eines unbekanntes Duftes führt, während die neuronale Aktivität auf den US unverändert ist. Es ist jedoch sehr schwer zu zeigen, dass dieser verringerte Calciumstrom wirklich für die verschlechterte Gedächtnisleistung verantwortlich ist.

In dieser Arbeit kam es in der Honigbiene nur dann zu einem Gedächtnisdefizit, wenn GABA direkt vor dem CS aber nicht nach dem CS der CS/US-Paarung freigesetzt wurde. Dieser zeitliche Zusammenhang mit dem CS legt nahe, dass GABA auch in der Honigbiene die neuronale Prozessierung des CS moduliert. Da diese Modulation aber nur während der CS/US-Paarung die Gedächtnisbildung beeinflusst, moduliert GABA den CS in Bezug auf die Paarung mit dem US. Somit hemmt GABA die Koinzidenz zwischen CS und US ohne die Wahrnehmung des Duftes signifikant zu beeinträchtigen. Die Inhibition der CS/US-Koinzidenz durch GABA schwächt dabei die Stabilität des Gedächtnisses in Abhängigkeit der Trainingsstärke ab (Abb. 6-3). Bei schwachem Training tritt das durch Muscimol induzierte Gedächtnisdefizit sehr früh auf (nach 2 h bei 1-Trial), bei stärkerem Training dagegen erst später (nach 1 d bei 3-Trial).

Im nächsten Kapitel werden die wichtigsten Ergebnisse dieser Arbeit integriert, um zu erläutern, wie die GABAerge Inhibition neuronaler Aktivität die Koinzidenz von CS und US moduliert und dennoch die Wahrnehmung beider Signale sicherstellt.

6.4 Die Mechanismen der Wechselwirkung zwischen CS/US-Koinzidenz und der GABAergen Inhibition

Während der appetitiven olfaktorischen Konditionierung der Honigbiene wird die Koinzidenz von CS und US über die Integration von ACh und Octopamin in AL und Pilzkörper vermittelt [237]. Die Ergebnisse dieser Arbeit legen nahe, dass GABAerger Input die Koinzidenz von CS und US hemmt. Dabei kommt es zu einer Wechselwirkung der Anzahl an CS/US-Paarungen und der GABAergen Inhibition, die die Stabilität des assoziativen Gedächtnisses beeinflusst.

Die Duftinformation (CS) wird über ACh an AL und Pilzkörper vermittelt, was in den entsprechenden Neuronen zur Depolarisation und zum Calciumeinstrom führt (Abb. 6-4). Die Belohnung (US) hingegen aktiviert metabotrope Octopamin-Rezeptoren. Die Ca^{2+} -abhängige Adenylylcyclase (Ac) vermittelt die Koinzidenz von CS und US und bildet daraufhin verstärkt den second messenger cAMP. Die Menge an cAMP bzw. die Stärke der Aktivierung der PKA beeinflusst die Stabilität des assoziativen Gedächtnisses (Abb. 1-3). In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass die Aktivierung ionotroper GABA-Rezeptoren zu einer Hyperpolarisation führt, die der von ACh induzierten Depolarisation entgegenwirkt und somit die Öffnung spannungsabhängiger Calcium-Kanäle hemmt (Abb. 6-1). Über diesen Mechanismus kann der GABAerge Input die neuronale Aktivität inhibieren, die durch die Duftinformation induziert wird. Die Verhaltensexperimente dieser Arbeit zeigen jedoch deutlich, dass GABA nicht die Wahrnehmung des Duftes verhindert. Da die Ausprägung des Gedächtnisdefizites durch die künstliche Aktivierung von GABA-Rezeptoren abhängig von der Anzahl der CS/US-Paarungen ist, verringert GABA die Intensität der Integration von CS und US (s. Kap. 6.3). Diese Beobachtungen lassen sich erklären, wenn ein Teil der nAChR sich in direkter Nähe zu den ionotropen GABA-Rezeptoren befinden und diese sich dadurch gegenseitig in ihrer Aktivität regulieren (Abb. 6-4). Die Ausbildung synaptischer Plastizität wird in Neuronen strengstens lokal reguliert und bezieht sich meist auf eine von vielen Synapsen [239]. Somit ist es keine ungewöhnliche Annahme, dass inhibitorische GABA-Rezeptoren sich in der Nähe der exzitatorischen ACh-Rezeptoren befinden, um die neuronale Aktivität lokal zu regulieren und zu begrenzen. Auf diese Weise führt die Duftinformation immer zu einem Calciumeinstrom, deren Menge aber durch den GABAergen Input über den US oder die Feedbackneuronen reguliert wird (Abb. 6-4).

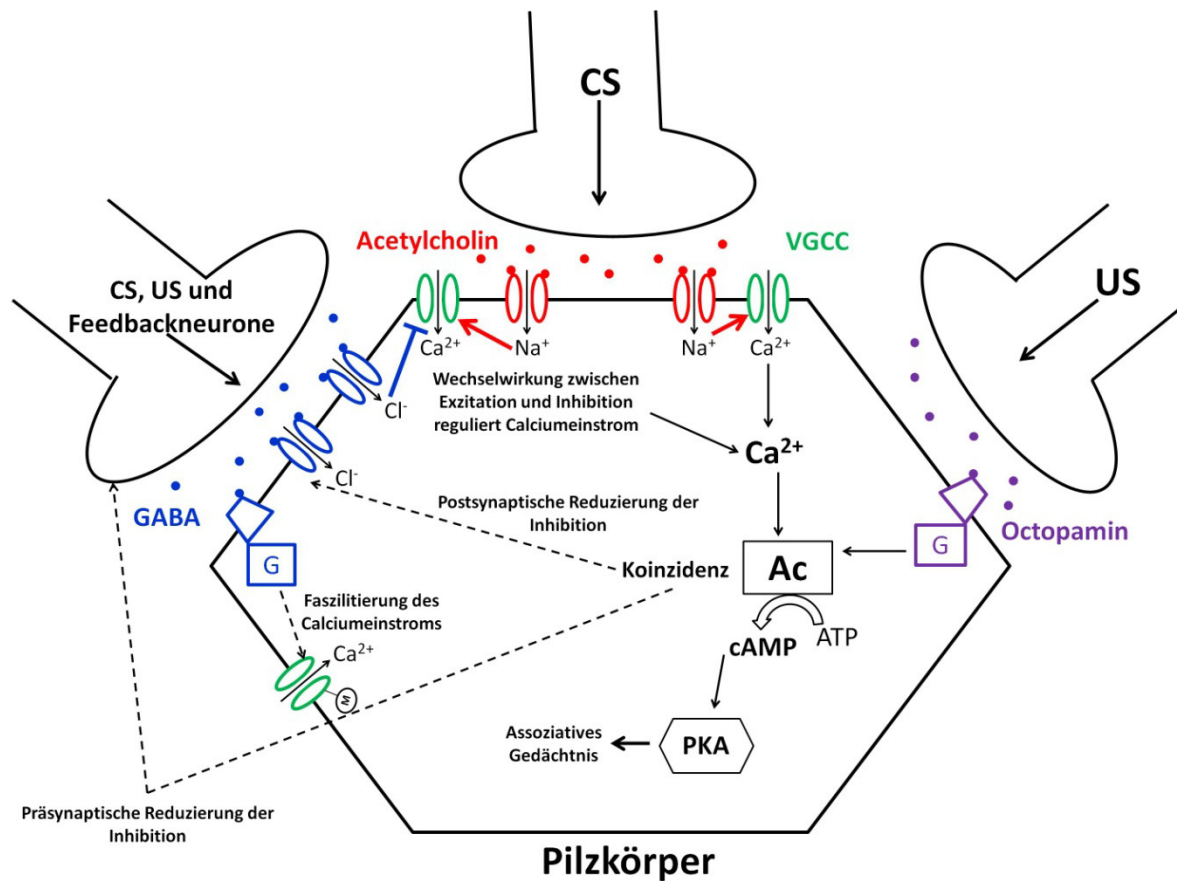


Abb. 6-4: GABAerge Inhibition reguliert die Intensität der Koinzidenz zwischen CS und US und somit die Stabilität des assoziativen Gedächtnisses

Der Duft (CS) wird über den exzitatorischen Neurotransmitter ACh an die Pilzkörper vermittelt. Dadurch werden nAChR (rot) aktiviert, die zu einem Na^+ -Einstrom und zur Depolarisation führen. Diese Depolarisation aktiviert spannungabhängige Calcium-Kanäle (grün; VGCC, voltage gated calcium channel) und führt zum Calciumeinstrom. Ionotrope GABA-Rezeptoren (blau), die über den CS, den US oder Feedbackneurone aktiviert werden, induzieren eine Hyperpolarisation, die die Öffnung der VGCC hemmt. Durch die lokale Nähe ionotroper GABA-Rezeptoren und nAChR entsteht eine Wechselwirkung zwischen der durch den Duft induzierten Depolarisation und der Hyperpolarisation, die die Menge an einströmendem Calcium kontrolliert. Die Menge an Ca^{2+} reguliert, zusammen mit der Aktivierung der metabotropen Octopamin-Rezeptoren (lila) über den US, die Intensität der CS/US-Koinzidenz und somit die Stabilität des assoziativen Gedächtnisses (Abb. 1-3). Über den Calciumeinstrom beeinflusst GABA ebenfalls die Intensität der CS/US-Koinzidenz und somit wie stark die Adenylylcyclase (Ac) und die PKA aktiviert werden. Dies ist der Mechanismus, mit dem die Integration von CS, US und Inhibition die Stabilität des assoziativen Gedächtnisses reguliert.

Durch die CS/US-Koinzidenz werden Prozesse der synaptischen Plastizität eingeleitet, die die GABAerge Inhibition reduzieren und somit die Gedächtnisbildung fördern. Präsynaptisch wird z.B. die Ausschüttung von GABA verringert während postsynaptisch die Anzahl, Komposition und Modifikation ionotroper GABA-Rezeptoren verändert wird.

Durch die reduzierte Hyperpolarisation kommt erst die Faszilitierung des Calciumeinstroms durch VGCC zur Geltung, die durch metabotrope GABA-Rezeptoren induziert wird. Dieser Prozess stabilisiert vermutlich zusätzlich das assoziative Gedächtnis.

So lässt sich auch die Wechselwirkung zwischen Trainingsstärke und Inhibition erklären: Während des 1-Trial-Trainings verringert die künstliche Aktivierung der GABA-Rezeptoren den Calciumeinstrom so stark, dass die Aktivität der Ac zu gering ist, um ein assoziatives Gedächtnis zu bilden. Vermutlich werden jedoch nicht alle spannungabhängigen Calcium-Kanäle durch GABA reguliert, wodurch zusätzliche

CS-US-Paarungen zu einem erhöhten Calciumeinstrom unabhängig vom GABAergen Input führen und die Ac genügend cAMP produziert, um ein normales Kurzzeitgedächtnis zu bilden. Trotz eines starken Trainings kommt es dennoch zu einem Gedächtnisdefizit nach 1d.

Dies lässt sich über die präsynaptische Plastizität erklären, die durch die CS/US-Koinzidenz induziert wird (Abb. 6-4). Sowohl in der Honigbiene als auch in *Drosophila* wurde gezeigt, dass die Paarung von CS und US bereits innerhalb von Sekunden die Aktivität der GABAergen Neurone reduziert, die die Pilzkörper innervieren [91, 111]. Die Reduzierung der Aktivität GABAerger Neurone während der Acquisition wird durch die Injektion von Muscimol maskiert, was zu einem Gedächtnisdefizit nach 1 d führt. Dies legt nahe, dass diese Form der präsynaptischen Plastizität ein essentieller Prozess ist, um stabilere und länger anhaltendere Gedächtnisse zu bilden.

Die abgeschwächte Wirkung von Muscimol während eines starken Trainings lässt sich auch über Prozesse der postsynaptischen Plastizität erklären, die durch die CS/US-Koinzidenz induziert werden (Abb. 6-4). Die PKA phosphoryliert z.B. bestimmte Untereinheiten der ionotropen GABA-Rezeptoren und reduziert somit den Chlorid-Einstrom durch diese Kanäle [229-231]. Die chronische Aktivierung der PKA beeinflusst sogar das Expressionsmuster der Untereinheiten, wodurch sich die Komposition der Untereinheiten verändert und somit auch die Aktivität der ionotropen GABA-Rezeptoren [240, 241]. Andere aktivitätsabhängige Kinasen fördern die Internalisierung, was die Anzahl funktioneller ionotroper GABA-Rezeptoren verringert und somit auch die Inhibition durch GABA [242, 243]. All diese Mechanismen der postsynaptischen Regulation der Inhibition schwächen die durch Muscimol induzierte Hyperpolarisation ab und somit auch die Auswirkungen auf das assoziative Gedächtnis. Zudem liefern diese Mechanismen Erklärungen dafür, warum sich die Kenyonzellen abhängig von ihrer Aktivität und Funktion, in ihrer Affinität gegenüber GABA unterscheiden (s. Kap. 6.1.2).

Die Ergebnisse dieser Arbeit deuten darauf hin, dass die Kenyonzellen der Honigbiene faszilitatorische metabotrope GABA-Rezeptoren besitzen, die den Calciumeinstrom über spannungsabhängige Calcium-Kanäle verstärken (s. Kap. 6.1.3). Diese Modulation würde sich jedoch nur signifikant auswirken, wenn die spannungsabhängigen Calcium-Kanäle nicht von der Hyperpolarisation durch ionotrope GABA-Rezeptoren gehemmt werden. Wie gerade ausführlich erläutert, induziert die CS/US-Koinzidenz Prozesse der prä- und postsynaptischen Plastizität, die die Inhibition und daher auch die Hyperpolarisation durch ionotrope GABA-Rezeptoren reduzieren. Somit könnte die Faszilitierung durch GABA dazu beitragen, zusammen mit Octopamin den US an die Pilzkörper zu vermitteln. Bestärkt wird diese Hypothese dadurch, dass GABAerge Neurone der Honigbiene Octopamin-Rezeptoren aufweisen, die spezifisch von der Belohnung aktiviert werden [244]. Dies deutet auf einen Zusammenhang zwischen Octopamin und GABA hin, der aufgrund der Abschwächung der Ausschüttung von GABA während der Acquisition, vor allem während der ersten CS/US-Paarung, ein molekulares Tor für weitere CS/US-Paarungen öffnen könnte.

Die hier erläuterten vielfachen Wechselwirkungen zwischen Acquisition und Inhibition stellen Prozesse der Feinregulation der Gedächtnisbildung dar. Es ist möglich, dass prä- und postsynaptische Plastizität zu unterschiedlichen Zeitpunkten für verschiedene Gedächtnisphasen benötigt werden. In Zukunft sollte daher der zeitliche Zusammenhang zwischen Inhibition, der Regulation der Inhibition und der Gedächtnisbildung eingehend untersucht werden. Dazu wird es notwendig sein, zu analysieren, wann GABAerge Neurone während der Gedächtnisbildung aktiv sind und durch welche externen Umstände diese Inhibition verringert oder verstärkt wird. Zudem sollte eine Korrelation der Intensität der GABAergen Inhibition und dem Rezeptorstatus während STM, LTM, schwachen und stabilen Gedächtnissen erstellt werden. Die Ergebnisse dieser Studien werden aufzeigen, dass die Stabilität des assoziativen Gedächtnisses nicht nur von Intensität und der zeitlichen Korrelation von CS und US abhängen, sondern auch von anderen externen Signalen und deren Wechselwirkungen mit dem GABAergen System.

6.5 Die biologische Funktion des Neurotransmitters GABA

Die in dieser Arbeit aufgezeigte Wechselwirkung zwischen Acquisition und Inhibition bedeutet, dass GABA den Erwerb neuer Gedächtnisinhalte reguliert. Damit neu erlernte Assoziationen in das Langzeitgedächtnis übergehen, ist es vermutlich notwendig, dass die Inhibition durch GABA reduziert wird. Gleichzeitig führt eine verstärkte Inhibition durch GABA dazu, dass erfahrene Sachverhalte nicht in das Gedächtnis übergehen, sondern vergessen bzw. nie erlernt werden. Welche Funktion hat jedoch das Blockieren der Gedächtnisbildung durch GABA?

In jeder Sekunde trifft eine Menge Informationen auf unsere Sinne. Dabei ist es essentiell, dass wir Wichtiges von Unwichtigem unterscheiden, damit wir uns auf das „Wesentliche“ konzentrieren können. Durch die Eigenschaft von GABA die Intensität von Assoziationen zu reduzieren, kann GABA verhindern, dass bestimmte Sachverhalte in unser Bewusstsein und somit in unser Gedächtnis übergehen. Nur bei Sachverhalten, die mit biologisch relevanten Assoziationen, wie Belohnungen oder Bestrafungen, einhergehen, wird die Inhibition durch GABA reduziert, damit dieser Sachverhalt sich als „Wesentlich“ in unser Gedächtnis einprägen kann. Besonders interessant ist dabei die Verknüpfung mit der Verbesserung der olfaktorischen Diskriminierung in der Honigbiene. Durch Reduzierung der Inhibition und gleichzeitiger Aktivierung metabotroper GABA-Rezeptoren waren die Bienen besser in der Lage, den wichtigen Duft (belohnt) vom unwichtigen Duft (unbekannt) zu unterscheiden.

Auf dieselbe Art, wie die Wechselwirkung zwischen Inhibition und der Integration assoziativer Signale den Erwerb von Gedächtnisinhalten in Pilzkörper bzw. Hippocampus reguliert, reguliert GABA vermutlich auch unsere Emotionen in der Amygdala und unseren Schlafrhythmus im Hypothalamus. Daher ist diese Wechselwirkung für wesentliche Aspekte unseres Verhaltens verantwortlich.

7 Zusammenfassung

Der inhibitorische Neurotransmitter GABA beeinflusst in Säugetieren und Insekten die Gedächtnisbildung. Da die zugrunde liegenden Mechanismen unklar sind, wurde die Funktion ionotroper und metabotroper GABA-Rezeptoren sowohl beim assoziativen olfaktorischen Lernen der Honigbiene als auch an isolierten Neuronen der beteiligten Pilzkörper analysiert.

Die Aktivierung metabotroper GABA-Rezeptoren führt zu einer besseren Unterscheidung von Düften und in den Neuronen des Pilzkörpers zu einer aktivitätsabhängigen Faszilitierung neuronaler Aktivität. Dies deutet auf eine Funktion metabotroper GABA Rezeptoren bei der Schärfung duftspezifischer Aktivitätsmuster während des Lernens hin.

Die Aktivierung ionotroper GABA-Rezeptoren verursacht Gedächtnisdefizite, die sich durch ein verstärktes Training kompensieren lassen. Die Wahrnehmung von Duft (CS) und Belohnung (US) wird nicht beeinflusst. Die lichtinduzierte Freisetzung von GABA, die erstmals eine schnelle, zeitlich und räumlich definierte Aktivierung der GABA-Rezeptoren ermöglicht, führt nur dann zu einem Gedächtnisdefizit, wenn GABA genau zum Zeitpunkt der CS/US-Paarung freigesetzt wird. In den Neuronen des Pilzkörpers führt GABA zur Hyperpolarisation, die der CS/US induzierten Depolarisation entgegenwirkt und dadurch spannungsabhängige Calcium-Kanäle reguliert. Diese Ergebnisse lassen darauf schließen, dass GABA während der Acquisition mit Prozessen der CS/US-Paarung interagiert und somit die Stabilität des Gedächtnisses reguliert.

8 Summary

In mammals and insects the inhibitory neurotransmitter GABA influences memory formation. As the underlying mechanisms are not fully understood, the function of ionotropic and metabotropic GABA receptors has been studied in associative olfactory learning in the honey bee as well as in its isolated neurons of the involved mushroom body.

Activation of metabotropic GABA receptors improves discrimination between odors and induces an activity dependent facilitation of neuronal activity in mushroom body neurons. This indicates a role for metabotropic GABA receptors in sharpening odor-specific activity patterns during learning.

Activation of ionotropic GABA receptors causes memory deficits, which are compensated by an intensified training. However, the perception of the odor (CS) and the reward (US) is unaffected. Light-induced release of GABA, which for the first time offers the opportunity for a fast, temporally and locally restricted activation of GABA receptors, only causes a memory deficit if GABA is released at the exact time during CS/US pairing. In mushroom body neurons GABA causes a hyperpolarization which counteracts the depolarization induced by CS/US and thus regulates voltage gated calcium channels. These results indicate that GABA interacts with processes of the CS/US pairing during acquisition and therefore regulates the stability of memories.

9 Verzeichnisse

9.1 Abbildungsverzeichnis

1. Einleitung

Abb. 1-1: Der ionotrope GABA-Rezeptor.....	3
Abb. 1-2: Der metabotrope GABA-Rezeptor.....	4
Abb. 1-3: Molekulare Mechanismen der Gedächtnisbildung.....	8
Abb. 1-4: Appetitive olfaktorische Konditionierung der Honigbiene	10
Abb. 1-5: Neuronale Netzwerke im Gehirn der Honigbiene	13

3. Methoden

Abb. 3-1: In Plastikröhrchen eingespannte Bienen.....	19
Abb. 3-2: Assoziative olfaktorische Konditionierung der Honigbiene.....	20
Abb. 3-3: Präparation eines Bienenhirns	24
Abb. 3-4: Funktionsweise von Fluo-4, AM	29
Abb. 3-5: Selbstgebaute Durchflusskammer	29
Abb. 3-6: Funktionsweise und Verarbeitung der Signale von Cameleon.....	32

5. Ergebnisse

Abb. 5-1: Injektion von 3-APMPA induziert eine Katatonie	42
Abb. 5-2: Die thorakale Injektion von 3-APMPA hat keinen Einfluss auf das assoziative Gedächtnis.....	42
Abb. 5-3: Die Kopfinjektion von 3-APMPA verringert den PER auf einen unbekanntem Duft.....	43
Abb. 5-4: Die thorakale Injektion von Muscimol vor einem schwachen Training verschlechtert das assoziative Gedächtnis.....	44
Abb. 5-5: Kopfinjektionen hoher Muscimol-Konzentrationen vor einem schwachen Training und vor dem Abruf verschlechtern das assoziative Gedächtnis	46
Abb. 5-6: Muscimol-Injektionen vor schwachem und mittelstarkem Training hemmen die Bildung des assoziativen Gedächtnisses.....	47
Abb. 5-7: Muscimol-Injektionen vor und nach starkem Training haben keinen Einfluss auf das assoziative Gedächtnis.....	47

Abb. 5-8: Muscimol-Injektionen vor und nach schwachem bzw. starkem Training im direkten Vergleich.....	48
Abb. 5-9: Muscimol hat keinen Einfluss auf Zuckerwasserempfindlichkeit und nicht-assoziative Lernparadigmen.....	50
Abb. 5-10: Immunologische Messungen von GABA <i>in vitro</i> und <i>in vivo</i> nach Licht-induzierter Freisetzung	51
Abb. 5-11: Licht-induziertes Freisetzen von GABA in der linken Hirnhälfte einer Biene	52
Abb. 5-12: Lokales Freisetzen von GABA im Pilzkörper verschlechtert das assoziative Gedächtnis abhängig vom zeitlichen Bezug zum Training.....	54
Abb. 5-13: Lokales Freisetzen von GABA in den Antennalloben, aber nicht den optischen Loben, verschlechtert das assoziative Gedächtnis.....	55
Abb. 5-14: Lokales Freisetzen von GABA während des 2h-Abrufes hat keinen Einfluss auf das assoziative Gedächtnis.....	57
Abb. 5-15: Stimulationsschema der Kenyonzellen im Durchflusssystem	59
Abb. 5-16: Der durch ACh induzierte Calciumeinstrom lässt sich durch die zeitliche Paarung mit GABA unterschiedlich modulieren.....	61
Abb. 5-17: Die GABA/ACh-Paarung verringert abhängig von der Konzentration den Anteil stimulierter Kenyonzellen.....	62
Abb. 5-18: Gegensätzliche Modulation der neuronalen Aktivität durch ionotrope und metabotrope GABA-Rezeptoren.....	64
Abb. 5-19: Metabotrope GABA-Rezeptoren verhindern die Abnahme des Calciumeinstroms während wiederholten Stimulationen mit ACh.....	65
Abb. 5-20: Die Inhibition durch GABA-Rezeptoren lässt sich durch das Blocken von Chlorid-Kanälen aufheben.....	66
Abb. 5-21: Expressionsmuster und isolierte Neuronen der Linie 201y-GAL4; UAS-Cameleon 2.1	67
Abb. 5-22: Stimulierung im stationären System in Abhängigkeit der ACh-Konzentration	68
Abb. 5-23: Modulation neuronaler Aktivität durch GABA im stationären System.....	70
Abb. 5-24: Die GABA/ACh-Paarung verringert den Anteil stimulierter Zellen reversibel	71
Abb. 5-25: Der durch ACh induzierte Calciumeinstrom lässt sich durch die zeitliche Paarung mit GABA unterschiedlich modulieren.....	72

Abb. 5-26: Der Anteil stimulierter Kenyonzellen der GABA/ACh-Paarung ist abhängig vom Konzentrationsverhältnis zwischen ionotropem GABA-Rezeptor-Agonisten und ACh 73

6. Diskussion

Abb. 6-1: Die Wechselwirkung zwischen Exzitation und Inhibition beeinflusst die Intensität neuronaler Aktivität 78

Abb. 6-2: GABA kontrolliert die Dauer neuronaler Erregung und induziert eine aktivitätsabhängige Faszilitierung 80

Abb. 6-3: Die Wechselwirkung zwischen Trainingsstärke und Intensität der Inhibition während Acquisition und Gedächtnisabruf definiert die Stabilität des assoziativen Gedächtnisses 88

Abb. 6-4: GABAerge Inhibition reguliert die Intensität der Koinzidenz zwischen CS und US und somit die Stabilität des assoziativen Gedächtnisses 93

9.2 Abkürzungsverzeichnis

(v/v)	volume per volume/ Volumenprozent
(w/v)	weight per volume / Gewichtsprozent
°C	Grad Celsius
3-APMPA	3-Aminopropyl methyl phosphinic acid hydrochloride
Abb.	Abbildung
Ac	Adenylylcyclase
ACh	Acetylcholin
AChR	Acetylcholin-Rezeptoren
AL	Antennallobus/ Antennalloben
APL	anterior paired lateral
ATP	Adenosintriphosphat
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
CaM	Calmodulin
cAMP	cyclisches Adenosinmonophosphat
CB	central body/Zentralkörper

CCD	charge couple device
cm	Zentimeter
CNB	α -carboxy-2-nitrobenzyl ester, trifluoroacetic acid salt
CREB	cAMP response element binding protein
CS	konditionierter Stimulus
d	Tag
d.h.	dass heißt
ECFP	enhanced cyan fluorescent protein
ELISA	Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay
ER	endoplasmatisches Retikulum
EYFP	enhanced yellow fluorescent protein
FRET	fluorescence resonance energy transfer
g	Gramm
G	Guaninnucleotid-bindendes Protein
GABA	γ -aminobutyric acid
Gal4	yeast transcription activator protein 4
GRD	glycine-related receptor of Drosophila
h	Stunde
i.d.R	in der Regel
IgG	Immunglobulin G
ITI	Inter-Trial-Intervall
Kap.	Kapitel
l	Liter
LCCH3	ligand-gated chloride channel homolog
LC	lateraler Calyx
LO	lobula
LP	laterales Protocerebrum
LTM	long-term memory/ Langzeitgedächtnis
m	Milli/ 10^{-3}
M	Molar (Mol pro Liter)

MB	mushroom body/ Pilzkörper
MC	medianer Calyx
ME	Medulla;
min	Minute
n	Stichprobengröße einer Gruppe
nAChR	nikotinische Acetylcholin-Rezeptoren#
NA	numerische apertur
OC	ocelli;
OL	optische Loben
ORN	olfaktorische Rezeptorneurone
PBS	Phosphate buffered saline
Pe	Pedunculus
PER	proboscis extension reflex/ Rüsselreflex
PKA	Proteinkinase A
PN	Projektionsneurone
p-NPP	para-Nitrophenylphosphat-Dinatriumsalz-Hexahydrat
PTX	Picrotoxin
RDL	resistant to dieldrin
RT	Raumtemperatur
s	Sekunde
s.	siehe
SOG	suboesophagales Ganglion
STM	short-term memory/ Kurzzeitgedächtnis
UAS	upstream activation sequence
US	unkonditionierter Stimulus
VGCC	voltage gated calcium channels
VUM _{mx1}	ventral unpaired median neuron maxillare 1
z.B.	zum Beispiel
Z-chem	zentrales Chemikalienlager

9.3 Literaturverzeichnis

1. **Yizhar, O., et al.**, *Neocortical excitation/inhibition balance in information processing and social dysfunction.* **Nature**, 2011.
2. **Zhang, Z. and Q.Q. Sun**, *The balance between excitation and inhibition and functional sensory processing in the somatosensory cortex.* **Int Rev Neurobiol**, 2011. 97: p. 305-33.
3. **Treiman, D.M.**, *GABAergic mechanisms in epilepsy.* **Epilepsia**, 2001. 42 Suppl 3: p. 8-12.
4. **Sanders, S.K., S.L. Morzorati, and A. Shekhar**, *Priming of experimental anxiety by repeated subthreshold GABA blockade in the rat amygdala.* **Brain Res**, 1995. 699(2): p. 250-9.
5. **Wu, L.J., S.S. Kim, and M. Zhuo**, *Molecular targets of anxiety: from membrane to nucleus.* **Neurochem Res**, 2008. 33(10): p. 1925-32.
6. **Szymusiak, R. and D. McGinty**, *Hypothalamic regulation of sleep and arousal.* **Ann N Y Acad Sci**, 2008. 1129: p. 275-86.
7. **Gallopín, T., et al.**, *Identification of sleep-promoting neurons in vitro.* **Nature**, 2000. 404(6781): p. 992-5.
8. **Lin, J.S., et al.**, *A critical role of the posterior hypothalamus in the mechanisms of wakefulness determined by microinjection of muscimol in freely moving cats.* **Brain Res**, 1989. 479(2): p. 225-40.
9. **Nadel, L. and V. Bohbot**, *Consolidation of memory.* **Hippocampus**, 2001. 11(1): p. 56-60.
10. **Klausberger, T.**, *GABAergic interneurons targeting dendrites of pyramidal cells in the CA1 area of the hippocampus.* **Eur J Neurosci**, 2009. 30(6): p. 947-57.
11. **Squire, L.R.**, *The legacy of patient H.M. for neuroscience.* **Neuron**, 2009. 61(1): p. 6-9.
12. **Spiers, H.J., E.A. Maguire, and N. Burgess**, *Hippocampal amnesia.* **Neurocase**, 2001. 7(5): p. 357-82.
13. **Jones, S. and J.L. Yakel**, *Inhibitory interneurons in hippocampus.* **Cell Biochem Biophys**, 1999. 31(2): p. 207-18.
14. **Freund, T.F. and G. Buzsáki**, *Interneurons of the hippocampus.* **Hippocampus**, 1996. 6(4): p. 347-470.
15. **Dawson, G.R., N. Collinson, and J.R. Atack**, *Development of subtype selective GABA_A modulators.* **CNS Spectr**, 2005. 10(1): p. 21-7.
16. **Gottesmann, C.**, *GABA mechanisms and sleep.* **Neuroscience**, 2002. 111(2): p. 231-9.

17. **Hevers, W. and H. Luddens**, *The diversity of GABAA receptors. Pharmacological and electrophysiological properties of GABAA channel subtypes.* **Mol Neurobiol**, 1998. 18(1): p. 35-86.
18. **Pritchett, D.B., et al.**, *Importance of a novel GABAA receptor subunit for benzodiazepine pharmacology.* **Nature**, 1989. 338(6216): p. 582-5.
19. **Tan, K.R., U. Rudolph, and C. Luscher**, *Hooked on benzodiazepines: GABAA receptor subtypes and addiction.* **Trends Neurosci**, 2011. 34(4): p. 188-97.
20. **Thiebot, M.H.**, *Some evidence for amnesic-like effects of benzodiazepines in animals.* **Neurosci Biobehav Rev**, 1985. 9(1): p. 95-100.
21. **Chapouthier, G. and P. Venault**, *GABA-A receptor complex and memory processes.* **Curr Top Med Chem**, 2002. 2(8): p. 841-51.
22. **Zarrindast, M.R., et al.**, *Effects of intrahippocampal injection of GABAergic drugs on memory retention of passive avoidance learning in rats.* **J Psychopharmacol**, 2002. 16(4): p. 313-9.
23. **DeLorey, T.M., et al.**, *Mice lacking the beta3 subunit of the GABAA receptor have the epilepsy phenotype and many of the behavioral characteristics of Angelman syndrome.* **J Neurosci**, 1998. 18(20): p. 8505-14.
24. **Collinson, N., et al.**, *Enhanced learning and memory and altered GABAergic synaptic transmission in mice lacking the alpha 5 subunit of the GABAA receptor.* **J Neurosci**, 2002. 22(13): p. 5572-80.
25. **Ng, G.Y., et al.**, *Gamma-aminobutyric acid type B receptors with specific heterodimer composition and postsynaptic actions in hippocampal neurons are targets of anticonvulsant gabapentin action.* **Mol Pharmacol**, 2001. 59(1): p. 144-52.
26. **Oka, M., et al.**, *Functional expression of metabotropic GABAB receptors in primary cultures of astrocytes from rat cerebral cortex.* **Biochem Biophys Res Commun**, 2006. 341(3): p. 874-81.
27. **Kandel, E.R., J.H. Schwartz, and T.H. Jessell**, *Principles of Neural Science.* 2000. p. 187-206
28. **Pawlow, I.P.**, *Lectures on conditioned reflexes.* **International publishers, New York, 1927.**
29. **Hebb, D.**, *The Organization of Behavior: a neuropsychological approach.* **New York: Wiley, 1949.**
30. **Paulsen, O. and E.I. Moser**, *A model of hippocampal memory encoding and retrieval: GABAergic control of synaptic plasticity.* **Trends Neurosci**, 1998. 21(7): p. 273-8.

31. **Bourtchuladze, R., et al.**, *Deficient long-term memory in mice with a targeted mutation of the cAMP-responsive element-binding protein.* **Cell**, **1994**. 79(1): p. 59-68.
32. **Pittenger, C., et al.**, *Reversible inhibition of CREB/ATF transcription factors in region CA1 of the dorsal hippocampus disrupts hippocampus-dependent spatial memory.* **Neuron**, **2002**. 34(3): p. 447-62.
33. **Bacskai, B.J., et al.**, *Spatially resolved dynamics of cAMP and protein kinase A subunits in Aplysia sensory neurons.* **Science**, **1993**. 260(5105): p. 222-6.
34. **Bernier, L., et al.**, *Facilitatory transmitter causes a selective and prolonged increase in adenosine 3':5'-monophosphate in sensory neurons mediating the gill and siphon withdrawal reflex in Aplysia.* **J Neurosci**, **1982**. 2(12): p. 1682-91.
35. **Dash, P.K., B. Hochner, and E.R. Kandel**, *Injection of the cAMP-responsive element into the nucleus of Aplysia sensory neurons blocks long-term facilitation.* **Nature**, **1990**. 345(6277): p. 718-21.
36. **Friedrich, A., U. Thomas, and U. Muller**, *Learning at different satiation levels reveals parallel functions for the cAMP-protein kinase A cascade in formation of long-term memory.* **J Neurosci**, **2004**. 24(18): p. 4460-8.
37. **Muller, U.**, *Prolonged activation of cAMP-dependent protein kinase during conditioning induces long-term memory in honeybees.* **Neuron**, **2000**. 27(1): p. 159-68.
38. **Dudai, Y., et al.**, *dunce, a mutant of Drosophila deficient in learning.* **Proc Natl Acad Sci U S A**, **1976**. 73(5): p. 1684-8.
39. **Levin, L.R., et al.**, *The Drosophila learning and memory gene rutabaga encodes a Ca²⁺/Calmodulin-responsive adenylyl cyclase.* **Cell**, **1992**. 68(3): p. 479-89.
40. **Livingstone, M.S., P.P. Sziber, and W.G. Quinn**, *Loss of calcium/calmodulin responsiveness in adenylyl cyclase of rutabaga, a Drosophila learning mutant.* **Cell**, **1984**. 37(1): p. 205-15.
41. **Yin, J.C., et al.**, *Induction of a dominant negative CREB transgene specifically blocks long-term memory in Drosophila.* **Cell**, **1994**. 79(1): p. 49-58.
42. **Rao, V.R. and S. Finkbeiner**, *NMDA and AMPA receptors: old channels, new tricks.* **Trends Neurosci**, **2007**. 30(6): p. 284-91.
43. **Mons, N., J.L. Guillou, and R. Jaffard**, *The role of Ca²⁺/calmodulin-stimulable adenylyl cyclases as molecular coincidence detectors in memory formation.* **Cell Mol Life Sci**, **1999**. 55(4): p. 525-33.
44. **Tempel, B.L., et al.**, *Reward learning in normal and mutant Drosophila.* **Proc Natl Acad Sci U S A**, **1983**. 80(5): p. 1482-6.

45. **Dudai, Y., G. Corfas, and S. Hazvi**, *What is the possible contribution of Ca²⁺-stimulated adenylate cyclase to acquisition, consolidation and retention of an associative olfactory memory in Drosophila.* **J Comp Physiol [A]**, 1988. 162(1): p. 101-9.
46. **Rall, T.W. and E.W. Sutherland**, *The regulatory role of adenosine-3', 5'-phosphate.* **Cold Spring Harb Symp Quant Biol**, 1961. 26: p. 347-54.
47. **Spatz, H.C.**, *Posttranslational modification of protein kinase A. The link between short-term and long-term memory.* **Behav Brain Res**, 1995. 66(1-2): p. 79-84.
48. **Klein, M. and E.R. Kandel**, *Mechanism of calcium current modulation underlying presynaptic facilitation and behavioral sensitization in Aplysia.* **Proc Natl Acad Sci U S A**, 1980. 77(11): p. 6912-6.
49. **Siegelbaum, S.A., J.S. Camardo, and E.R. Kandel**, *Serotonin and cyclic AMP close single K⁺ channels in Aplysia sensory neurones.* **Nature**, 1982. 299(5882): p. 413-7.
50. **Muller, U. and T.J. Carew**, *Serotonin induces temporally and mechanistically distinct phases of persistent PKA activity in Aplysia sensory neurons.* **Neuron**, 1998. 21(6): p. 1423-34.
51. **Deisseroth, K., H. Bito, and R.W. Tsien**, *Signaling from synapse to nucleus: postsynaptic CREB phosphorylation during multiple forms of hippocampal synaptic plasticity.* **Neuron**, 1996. 16(1): p. 89-101.
52. **Silva, A.J., et al.**, *CREB and memory.* **Annu Rev Neurosci**, 1998. 21: p. 127-48.
53. **Yin, J.C. and T. Tully**, *CREB and the formation of long-term memory.* **Curr Opin Neurobiol**, 1996. 6(2): p. 264-8.
54. **Minichiello, L.**, *TrkB signalling pathways in LTP and learning.* **Nat Rev Neurosci**, 2009. 10(12): p. 850-60.
55. **Frisch, K.v.**, *The dance language and orientation bees.* **Belknap Press, Cambridge**, 1967.
56. **Farina, W.M., et al.**, *Honeybees learn floral odors while receiving nectar from foragers within the hive.* **Naturwissenschaften**, 2007. 94(1): p. 55-60.
57. **Gil, M. and R.J. De Marco**, *Olfactory learning by means of trophallaxis in Apis mellifera.* **J Exp Biol**, 2005. 208(Pt 4): p. 671-80.
58. **Menzel, R.**, *Learning in honey bees in an ecological and behavioral context.* In: **Holldöbler B., Lindauer M. (eds) Experimental behavioral ecology and sociobiology 1985**(Fischer, Stuttgart,): p. 55-74.
59. **Giurfa, M.**, *Behavioral and neural analysis of associative learning in the honeybee: a taste from the magic well.* **J Comp Physiol A Neuroethol Sens Neural Behav Physiol**, 2007. 193(8): p. 801-24.

60. **Kuwabara, M.**, *Bildung des bedingten Reflexes von Pavlovs Typus bei der Honigbiene, Apis mellifera.* **J Fac Sci Hokkaido Univ** 1957. Ser IV Zool(13): p. 458-464.
61. **Bitterman, M.E., et al.**, *Classical olfactory conditioning of proboscis extension in honeybees.* **J Comp Physiol** 1983(97): p. 107-119.
62. **Takeda, K.**, *Classical conditioned response in the honey bee.* **J Insect Physiol**, 1961(6): p. 168-179.
63. **Menzel, R. and U. Muller**, *Learning and memory in honeybees: from behavior to neural substrates.* **Annu Rev Neurosci**, 1996. 19: p. 379-404.
64. **Menzel, R.**, *Searching for the memory trace in a mini-brain, the honeybee.* **Learn Mem**, 2001. 8(2): p. 53-62.
65. **Hammer, M. and R. Menzel**, *Learning and memory in the honeybee.* **J Neurosci**, 1995. 15(3 Pt 1): p. 1617-30.
66. **Grunbaum, L. and U. Muller**, *Induction of a specific olfactory memory leads to a long-lasting activation of protein kinase C in the antennal lobe of the honeybee.* **J Neurosci**, 1998. 18(11): p. 4384-92.
67. **Wustenberg, D., B. Gerber, and R. Menzel**, *Short communication: long- but not medium-term retention of olfactory memories in honeybees is impaired by actinomycin D and anisomycin.* **Eur J Neurosci**, 1998. 10(8): p. 2742-5.
68. **Erber, J.**, *Neural correlates of learning in the honeybee.* **Trends in Neuroscience**, 1981. 4(1981): p. 270-273.
69. **Muller, U. and H. Hildebrandt**, *Nitric oxide/cGMP-mediated protein kinase A activation in the antennal lobes plays an important role in appetitive reflex habituation in the honeybee.* **J Neurosci**, 2002. 22(19): p. 8739-47.
70. **Scheiner, R.**, *Responsiveness to sucrose and habituation of the proboscis extension response in honey bees.* **J Comp Physiol A Neuroethol Sens Neural Behav Physiol**, 2004. 190(9): p. 727-33.
71. **Lessing, D. and J.R. Carlson**, *Chemosensory behavior: the path from stimulus to response.* **Curr Opin Neurobiol**, 1999. 9(6): p. 766-71.
72. **Vosshall, L.B., et al.**, *A spatial map of olfactory receptor expression in the Drosophila antenna.* **Cell**, 1999. 96(5): p. 725-36.
73. **Leech, C.A. and D.B. Sattelle**, *Acetylcholine receptor/channel molecules of insects.* **Exs**, 1993. 63: p. 81-97.
74. **Su, H. and D.K. O'Dowd**, *Fast synaptic currents in Drosophila mushroom body Kenyon cells are mediated by alpha-bungarotoxin-sensitive nicotinic acetylcholine receptors and picrotoxin-sensitive GABA receptors.* **J Neurosci**, 2003. 23(27): p. 9246-53.

-
75. **Dubnau, J., et al.**, *Disruption of neurotransmission in Drosophila mushroom body blocks retrieval but not acquisition of memory.* **Nature**, **2001**. 411(6836): p. 476-80.
 76. **Vosshall, L.B., A.M. Wong, and R. Axel**, *An olfactory sensory map in the fly brain.* **Cell**, **2000**. 102(2): p. 147-59.
 77. **Gao, Q., B. Yuan, and A. Chess**, *Convergent projections of Drosophila olfactory neurons to specific glomeruli in the antennal lobe.* **Nat Neurosci**, **2000**. 3(8): p. 780-5.
 78. **Fishilevich, E. and L.B. Vosshall**, *Genetic and functional subdivision of the Drosophila antennal lobe.* **Curr Biol**, **2005**. 15(17): p. 1548-53.
 79. **Galizia, C.G., et al.**, *The glomerular code for odor representation is species specific in the honeybee Apis mellifera.* **Nat Neurosci**, **1999**. 2(5): p. 473-8.
 80. **Sachse, S., A. Rappert, and C.G. Galizia**, *The spatial representation of chemical structures in the antennal lobe of honeybees: steps towards the olfactory code.* **Eur J Neurosci**, **1999**. 11(11): p. 3970-82.
 81. **Ng, M., et al.**, *Transmission of olfactory information between three populations of neurons in the antennal lobe of the fly.* **Neuron**, **2002**. 36(3): p. 463-74.
 82. **Menzel, R. and M. Giurfa**, *Cognitive architecture of a mini-brain: the honeybee.* **Trends Cogn Sci**, **2001**. 5(2): p. 62-71.
 83. **de Belle, J.S. and M. Heisenberg**, *Associative odor learning in Drosophila abolished by chemical ablation of mushroom bodies.* **Science**, **1994**. 263(5147): p. 692-5.
 84. **Heimbeck, G., et al.**, *A central neural circuit for experience-independent olfactory and courtship behavior in Drosophila melanogaster.* **Proc Natl Acad Sci U S A**, **2001**. 98(26): p. 15336-41.
 85. **Ito, K., et al.**, *The organization of extrinsic neurons and their implications in the functional roles of the mushroom bodies in Drosophila melanogaster Meigen.* **Learn Mem**, **1998**. 5(1-2): p. 52-77.
 86. **Heisenberg, M.**, *What do the mushroom bodies do for the insect brain? an introduction.* **Learn Mem**, **1998**. 5(1-2): p. 1-10.
 87. **Jortner, R.A., S.S. Farivar, and G. Laurent**, *A simple connectivity scheme for sparse coding in an olfactory system.* **J Neurosci**, **2007**. 27(7): p. 1659-69.
 88. **Rehder, V.**, *Sensory pathways and motoneurons of the proboscis reflex in the suboesophageal ganglion of the honey bee.* **J Comp Neurol**, **1989**. 279(3): p. 499-513.
 89. **Grunewald, B.**, *Morphology of feedback neurons in the mushroom body of the honeybee, Apis mellifera.* **J Comp Neurol**, **1999**. 404(1): p. 114-26.

90. **Gronenberg, W.**, *Anatomical and physiological properties of feedback neurons of the mushroom bodies in the bee brain.* **Exp Biol**, 1987. 46(3): p. 115-25.
91. **Grünewald, B.**, *Physiological properties and response modulations of mushroom body feedback neurons during olfactory learning in the honeybee, *Apis mellifera*.* **J Comp Physiol A** 1999(185): p. 565-576.
92. **Schwarzel, M. and U. Müller**, *Dynamic memory networks: dissecting molecular mechanisms underlying associative memory in the temporal domain.* **Cell Mol Life Sci**, 2006. 63(9): p. 989-98.
93. **Hammer, M. and R. Menzel**, *Multiple sites of associative odor learning as revealed by local brain microinjections of octopamine in honeybees.* **Learn Mem**, 1998. 5(1-2): p. 146-56.
94. **Hammer, M.**, *An identified neuron mediates the unconditioned stimulus in associative olfactory learning.* **Nature**, 1993(366): p. 59-63.
95. **Blenau, W. and A. Baumann**, *Molecular and pharmacological properties of insect biogenic amine receptors: lessons from *Drosophila melanogaster* and *Apis mellifera*.* **Arch Insect Biochem Physiol**, 2001. 48(1): p. 13-38.
96. **Evans, P.D. and B. Maqueira**, *Insect octopamine receptors: a new classification scheme based on studies of cloned *Drosophila* G-protein coupled receptors.* **Invert Neurosci**, 2005. 5(3-4): p. 111-8.
97. **Yu, D., A. Ponomarev, and R.L. Davis**, *Altered representation of the spatial code for odors after olfactory classical conditioning; memory trace formation by synaptic recruitment.* **Neuron**, 2004. 42(3): p. 437-49.
98. **Erber, J., T. Masuhr, and R. Menzel**, *Localization of short term memory in the brain of the bee.* **Physiol Entomol**, 1980(5): p. 343-358.
99. **McGuire, S.E., P.T. Le, and R.L. Davis**, *The role of *Drosophila* mushroom body signaling in olfactory memory.* **Science**, 2001. 293(5533): p. 1330-3.
100. **Pitman, J.L., et al.**, *There are many ways to train a fly.* **Fly (Austin)**, 2009. 3(1): p. 3-9.
101. **McGuire, S.E., M. Deshazer, and R.L. Davis**, *Thirty years of olfactory learning and memory research in *Drosophila melanogaster*.* **Prog Neurobiol**, 2005. 76(5): p. 328-47.
102. **Davis, R.L.**, *Olfactory memory formation in *Drosophila*: from molecular to systems neuroscience.* **Annu Rev Neurosci**, 2005. 28: p. 275-302.
103. **Margulies, C., T. Tully, and J. Dubnau**, *Deconstructing memory in *Drosophila*.* **Curr Biol**, 2005. 15(17): p. R700-13.
104. **Keene, A.C. and S. Waddell**, **Drosophila* olfactory memory: single genes to complex neural circuits.* **Nat Rev Neurosci**, 2007. 8(5): p. 341-54.

105. **Skoulakis, E.M. and S. Grammenoudi**, *Dunces and da Vincis: the genetics of learning and memory in Drosophila*. **Cell Mol Life Sci**, 2006. 63(9): p. 975-88.
106. **Jellies, J.**, *Associative Olfactory Conditioning in Drosophila Melanogaster and Memory Retention Through Metamorphosis*. 1981, Illinois State Univ. p. 83.
107. **Tully, T. and W.G. Quinn**, *Classical conditioning and retention in normal and mutant Drosophila melanogaster*. **J Comp Physiol A**, 1985. 157(2): p. 263-77.
108. **Schwaerzel, M., et al.**, *Dopamine and octopamine differentiate between aversive and appetitive olfactory memories in Drosophila*. **J Neurosci**, 2003. 23(33): p. 10495-502.
109. **Kitamoto, T.**, *Conditional modification of behavior in Drosophila by targeted expression of a temperature-sensitive shibire allele in defined neurons*. **J Neurobiol**, 2001. 47(2): p. 81-92.
110. **Kim, Y.C., H.G. Lee, and K.A. Han**, *D1 dopamine receptor dDA1 is required in the mushroom body neurons for aversive and appetitive learning in Drosophila*. **J Neurosci**, 2007. 27(29): p. 7640-7.
111. **Liu, X. and R.L. Davis**, *The GABAergic anterior paired lateral neuron suppresses and is suppressed by olfactory learning*. **Nat Neurosci**, 2009. 12(1): p. 53-9.
112. **Buckingham, S.D., et al.**, *Insect GABA receptors: splicing, editing, and targeting by antiparasitics and insecticides*. **Mol Pharmacol**, 2005. 68(4): p. 942-51.
113. **Hosie, A.M., et al.**, *Molecular biology of insect neuronal GABA receptors*. **Trends Neurosci**, 1997. 20(12): p. 578-83.
114. **Zhang, H.G., et al.**, *Subunit composition determines picrotoxin and bicuculline sensitivity of Drosophila gamma-aminobutyric acid receptors*. **Mol Pharmacol**, 1995. 48(5): p. 835-40.
115. **French-Constant, R.H. and T.A. Rocheleau**, *Drosophila gamma-aminobutyric acid receptor gene Rdl shows extensive alternative splicing*. **J Neurochem**, 1993. 60(6): p. 2323-6.
116. **Harrison, J.B., et al.**, *Immunocytochemical mapping of a C-terminus anti-peptide antibody to the GABA receptor subunit, RDL in the nervous system in Drosophila melanogaster*. **Cell Tissue Res**, 1996. 284(2): p. 269-78.
117. **Liu, X., W.C. Krause, and R.L. Davis**, *GABAA receptor RDL inhibits Drosophila olfactory associative learning*. **Neuron**, 2007. 56(6): p. 1090-102.
118. **Liu, X., et al.**, *The GABAA receptor RDL suppresses the conditioned stimulus pathway for olfactory learning*. **J Neurosci**, 2009. 29(5): p. 1573-9.
119. **Enell, L., et al.**, *gamma-Aminobutyric acid (GABA) signaling components in Drosophila: immunocytochemical localization of GABA(B) receptors in relation*

- to the GABA(A) receptor subunit RDL and a vesicular GABA transporter. **J Comp Neurol**, 2007. 505(1): p. 18-31.
120. **Manev, H. and N. Dimitrijevic**, *Drosophila model for in vivo pharmacological analgesia research*. **Eur J Pharmacol**, 2004. 491(2-3): p. 207-8.
121. **Duffy, J.B.**, *GAL4 system in Drosophila: a fly geneticist's Swiss army knife*. **Genesis**, 2002. 34(1-2): p. 1-15.
122. **Gustafson, K. and G.L. Boulianne**, *Distinct expression patterns detected within individual tissues by the GAL4 enhancer trap technique*. **Genome**, 1996. 39(1): p. 174-82.
123. **Fiala, A., et al.**, *Genetically expressed cameleon in Drosophila melanogaster is used to visualize olfactory information in projection neurons*. **Curr Biol**, 2002. 12(21): p. 1877-84.
124. **Miyawaki, A., et al.**, *Dynamic and quantitative Ca²⁺ measurements using improved cameleons*. **Proc Natl Acad Sci U S A**, 1999. 96(5): p. 2135-40.
125. **Zars, T., et al.**, *Localization of a short-term memory in Drosophila*. **Science**, 2000. 288(5466): p. 672-5.
126. **Locatelli, F., G. Bundrock, and U. Muller**, *Focal and temporal release of glutamate in the mushroom bodies improves olfactory memory in Apis mellifera*. **J Neurosci**, 2005. 25(50): p. 11614-8.
127. **Menzel, R., et al.**, *Pharmacological dissociation between the reinforcing, sensitizing, and response-releasing functions of reward in honeybee classical conditioning*. **Behav Neurosci**, 1999. 113(4): p. 744-54.
128. **Soudijn, W. and I. van Wijngaarden**, *The GABA transporter and its inhibitors*. **Curr Med Chem**, 2000. 7(10): p. 1063-79.
129. **Guo, A., et al.**, *Conditioned visual flight orientation in Drosophila: dependence on age, practice, and diet*. **Learn Mem**, 1996. 3(1): p. 49-59.
130. **Yang, M.Y., et al.**, *Subdivision of the Drosophila mushroom bodies by enhancer-trap expression patterns*. **Neuron**, 1995. 15(1): p. 45-54.
131. **Fiala, A. and T. Spall**, *In vivo calcium imaging of brain activity in Drosophila by transgenic cameleon expression*. **Sci STKE**, 2003. 2003(174): p. PL6.
132. **Mezler, M., T. Muller, and K. Raming**, *Cloning and functional expression of GABA(B) receptors from Drosophila*. **Eur J Neurosci**, 2001. 13(3): p. 477-86.
133. **Dzitoyeva, S., N. Dimitrijevic, and H. Manev**, *Gamma-aminobutyric acid B receptor 1 mediates behavior-impairing actions of alcohol in Drosophila: adult RNA interference and pharmacological evidence*. **Proc Natl Acad Sci U S A**, 2003. 100(9): p. 5485-90.

134. **Krogsgaard-Larsen, P. and E. Falch**, *GABA agonists. Development and interactions with the GABA receptor complex*. **Mol Cell Biochem**, 1981. 38 Spec No(Pt 1): p. 129-46.
135. **Dudel, J., H. Adelsberger, and M. Heckmann**, *Neuromuscular glutamatergic and GABAergic channels*. **Invert Neurosci**, 1997. 3(2-3): p. 89-92.
136. **Scheiner, R., R.E. Page, Jr., and J. Erber**, *Responsiveness to sucrose affects tactile and olfactory learning in preforaging honey bees of two genetic strains*. **Behav Brain Res**, 2001. 120(1): p. 67-73.
137. **Oleskevich, S.**, *Cholinergic synaptic transmission in insect mushroom bodies in vitro*. **J Neurophysiol**, 1999. 82(2): p. 1091-6.
138. **Barbara, G.S., et al.**, *Acetylcholine, GABA and glutamate induce ionic currents in cultured antennal lobe neurons of the honeybee, Apis mellifera*. **J Comp Physiol A Neuroethol Sens Neural Behav Physiol**, 2005. 191(9): p. 823-36.
139. **Madsen, K.K., O.M. Larsson, and A. Schousboe**, *Regulation of excitation by GABA neurotransmission: focus on metabolism and transport*. **Results Probl Cell Differ**, 2008. 44: p. 201-21.
140. **Gupta, A., Y. Wang, and H. Markram**, *Organizing principles for a diversity of GABAergic interneurons and synapses in the neocortex*. **Science**, 2000. 287(5451): p. 273-8.
141. **Heistek, T.S., et al.**, *GABAergic inhibition shapes frequency adaptation of cortical activity in a frequency-dependent manner*. **Brain Res**, 2011. 1321: p. 31-9.
142. **Contreras, D. and R. Llinas**, *Voltage-sensitive dye imaging of neocortical spatiotemporal dynamics to afferent activation frequency*. **J Neurosci**, 2001. 21(23): p. 9403-13.
143. **Huang, X., et al.**, *Spiral waves in disinhibited mammalian neocortex*. **J Neurosci**, 2004. 24(44): p. 9897-902.
144. **Gu, H. and D.K. O'Dowd**, *Cholinergic synaptic transmission in adult Drosophila Kenyon cells in situ*. **J Neurosci**, 2006. 26(1): p. 265-72.
145. **Cayre, M., et al.**, *Cultured insect mushroom body neurons express functional receptors for acetylcholine, GABA, glutamate, octopamine, and dopamine*. **J Neurophysiol**, 1999. 81(1): p. 1-14.
146. **Campusano, J.M., et al.**, *nAChR-mediated calcium responses and plasticity in Drosophila Kenyon cells*. **Dev Neurobiol**, 2007. 67(11): p. 1520-32.
147. **Sattelle, D.B., et al.**, *Edit, cut and paste in the nicotinic acetylcholine receptor gene family of Drosophila melanogaster*. **Bioessays**, 2005. 27(4): p. 366-76.

148. **Jones, A.K., L.A. Brown, and D.B. Sattelle**, *Insect nicotinic acetylcholine receptor gene families: from genetic model organism to vector, pest and beneficial species*. **Invert Neurosci**, 2007. 7(1): p. 67-73.
149. **Jones, A.K., et al.**, *The nicotinic acetylcholine receptor gene family of the honey bee, *Apis mellifera**. **Genome Res**, 2006. 16(11): p. 1422-30.
150. **Lansdell, S.J. and N.S. Millar**, *The influence of nicotinic receptor subunit composition upon agonist, alpha-bungarotoxin and insecticide (imidacloprid) binding affinity*. **Neuropharmacology**, 2000. 39(4): p. 671-9.
151. **Dupuis, J.P., M. Gauthier, and V. Raymond Delpech**, *Expression patterns of nicotinic subunits {alpha}2, {alpha}7, {alpha}8 and {beta}1 affect the kinetics and pharmacology of ACh-induced currents in the adult bee olfactory neuropiles*. **J Neurophysiol**, 2011.
152. **Gauthier, M., et al.**, *Involvement of alpha-bungarotoxin-sensitive nicotinic receptors in long-term memory formation in the honeybee (*Apis mellifera*)*. **Neurobiol Learn Mem**, 2006. 86(2): p. 164-74.
153. **Dacher, M., A. Lagarrigue, and M. Gauthier**, *Antennal tactile learning in the honeybee: effect of nicotinic antagonists on memory dynamics*. **Neuroscience**, 2005. 130(1): p. 37-50.
154. **Lozano, V.C., et al.**, *Mecamylamine-induced impairment of acquisition and retrieval of olfactory conditioning in the honeybee*. **Behav Brain Res**, 1996. 81(1-2): p. 215-22.
155. **Zhou, X., et al.**, *Pharmacological properties of nicotinic acetylcholine receptors expressed by guinea pig small intestinal myenteric neurons*. **J Pharmacol Exp Ther**, 2002. 302(3): p. 889-97.
156. **Szyszka, P., A. Galkin, and R. Menzel**, *Associative and non-associative plasticity in kenyon cells of the honeybee mushroom body*. **Front Syst Neurosci**, 2008. 2: p. 3.
157. **Haehnel, M. and R. Menzel**, *Sensory representation and learning-related plasticity in mushroom body extrinsic feedback neurons of the protocerebral tract*. **Front Syst Neurosci**, 2011. 4: p. 161.
158. **Hosie, A.M., et al.**, *Alternative splicing of a *Drosophila* GABA receptor subunit gene identifies determinants of agonist potency*. **Neuroscience**, 2001. 102(3): p. 709-14.
159. **Jones, A.K., et al.**, *Splice-variant- and stage-specific RNA editing of the *Drosophila* GABA receptor modulates agonist potency*. **J Neurosci**, 2009. 29(13): p. 4287-92.
160. **Grunewald, B. and A. Wersing**, *An ionotropic GABA receptor in cultured mushroom body Kenyon cells of the honeybee and its modulation by intracellular calcium*. **J Comp Physiol A Neuroethol Sens Neural Behav Physiol**, 2008. 194(4): p. 329-40.

161. **Le Goff, G., et al.**, *Resistance to fipronil in *Drosophila simulans*: influence of two point mutations in the RDL GABA receptor subunit.* **J Neurochem**, **2005**. 92(6): p. 1295-305.
162. **Ffrench-Constant, R.H., et al.**, *A point mutation in a *Drosophila* GABA receptor confers insecticide resistance.* **Nature**, **1993**. 363(6428): p. 449-51.
163. **Albuquerque, E.X., et al.**, *Mammalian nicotinic acetylcholine receptors: from structure to function.* **Physiol Rev**, **2009**. 89(1): p. 73-120.
164. **Liu, Z., R.A. Neff, and D.K. Berg**, *Sequential interplay of nicotinic and GABAergic signaling guides neuronal development.* **Science**, **2006**. 314(5805): p. 1610-3.
165. **Marino, J., et al.**, *Invariant computations in local cortical networks with balanced excitation and inhibition.* **Nat Neurosci**, **2005**. 8(2): p. 194-201.
166. **Torborg, C.L., et al.**, *Control of CA3 output by feedforward inhibition despite developmental changes in the excitation-inhibition balance.* **J Neurosci**, **2010**. 30(46): p. 15628-37.
167. **Luna, V.M. and N.E. Schoppa**, *GABAergic circuits control input-spike coupling in the piriform cortex.* **J Neurosci**, **2008**. 28(35): p. 8851-9.
168. **Higley, M.J. and D. Contreras**, *Balanced excitation and inhibition determine spike timing during frequency adaptation.* **J Neurosci**, **2006**. 26(2): p. 448-57.
169. **Mittmann, W., U. Koch, and M. Hausser**, *Feed-forward inhibition shapes the spike output of cerebellar Purkinje cells.* **J Physiol**, **2005**. 563(Pt 2): p. 369-78.
170. **Gabernet, L., et al.**, *Somatosensory integration controlled by dynamic thalamocortical feed-forward inhibition.* **Neuron**, **2005**. 48(2): p. 315-27.
171. **Pouille, F. and M. Scanziani**, *Enforcement of temporal fidelity in pyramidal cells by somatic feed-forward inhibition.* **Science**, **2001**. 293(5532): p. 1159-63.
172. **Blitz, D.M. and W.G. Regehr**, *Timing and specificity of feed-forward inhibition within the LGN.* **Neuron**, **2005**. 45(6): p. 917-28.
173. **Giurfa, M., et al.**, *Olfactory conditioning of the sting extension reflex in honeybees: Memory dependence on trial number, interstimulus interval, intertrial interval, and protein synthesis.* **Learn Mem**, **2009**. 16(12): p. 761-5.
174. **Batson, J.D., J.S. Hoban, and M.E. Bitterman**, *Simultaneous conditioning in honeybees (*Apis mellifera*).* **J Comp Psychol**, **1992**. 106(2): p. 114-9.
175. **Marcos, J.L. and J. Redondo**, *Effects of CS-US interval modification on diminution of the unconditioned response in electrodermal classical conditioning.* **Biol Psychol**, **1999**. 50(3): p. 191-201.
176. **Rybak, J. and R. Menzel**, *Integrative properties of the Pe1 neuron, a unique mushroom body output neuron.* **Learn Mem**, **1998**. 5(1-2): p. 133-45.

177. **Christensen, T.A., B.R. Waldrop, and J.G. Hildebrand**, *Multitasking in the olfactory system: context-dependent responses to odors reveal dual GABA-regulated coding mechanisms in single olfactory projection neurons*. **J Neurosci**, 1998. 18(15): p. 5999-6008.
178. **Hamasaka, Y., C. Wegener, and D.R. Nassel**, *GABA modulates Drosophila circadian clock neurons via GABAB receptors and decreases in calcium*. **J Neurobiol**, 2005. 65(3): p. 225-40.
179. **Fujikawa, S., et al.**, *GABAB-mediated upregulation of the high-voltage-activated Ca²⁺ channels in rat dorsal root ganglia*. **Pflugers Arch**, 1997. 434(1): p. 84-90.
180. **New, D.C., et al.**, *GABAB heterodimeric receptors promote Ca²⁺ influx via store-operated channels in rat cortical neurons and transfected Chinese hamster ovary cells*. **Neuroscience**, 2006. 137(4): p. 1347-58.
181. **Carter, T.J. and M. Mynlieff**, *Gamma-aminobutyric acid type B receptors facilitate L-type and attenuate N-type Ca(2+) currents in isolated hippocampal neurons*. **J Neurosci Res**, 2004. 76(3): p. 323-33.
182. **Pommepuy, N. and D. Januel**, *[Catatonia: resurgence of a concept. A review of the international literature]*. **Encephale**, 2002. 28(6 Pt 1): p. 481-92.
183. **Huang, T.L. and Y.Y. Hung**, *Lorazepam reduces the serum brain-derived neurotrophic factor level in schizophrenia patients with catatonia*. **Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry**, 2009. 33(1): p. 158-9.
184. **Muralidharan, K., et al.**, *Catatonia as a presenting feature of alcohol withdrawal: a case report*. **Prim Care Companion J Clin Psychiatry**, 2007. 9(6): p. 465.
185. **Cupello, A., et al.**, *Catatonic features in major depression relieved by electroconvulsive treatment: parallel evaluation of the status of platelet serotonin transporter*. **Int J Neurosci**, 2008. 118(10): p. 1460-6.
186. **Iseki, K., et al.**, *Impairment of the cortical GABAergic inhibitory system in catatonic stupor: a case report with neuroimaging*. **Epileptic Disord**, 2009. 11(2): p. 126-31.
187. **Carroll, B.T.**, *GABA_A versus GABA_B hypothesis of catatonia*. **Mov Disord**, 1999. 14(4): p. 702-3.
188. **Kasture, S.B., S.N. Mandhane, and C.T. Chopde**, *Baclofen-induced catatonia: modification by serotonergic agents*. **Neuropharmacology**, 1996. 35(5): p. 595-8.
189. **Mehta, A.K. and M.K. Ticku**, *Baclofen induces catatonia in rats*. **Neuropharmacology**, 1987. 26(9): p. 1419-23.
190. **Lee, T.H., et al.**, *Baclofen intoxication: report of four cases and review of the literature*. **Clin Neuropharmacol**, 1992. 15(1): p. 56-62.

191. **England, M.L., et al.**, *Catatonia in psychotic patients: clinical features and treatment response*. **J Neuropsychiatry Clin Neurosci**, 2011. 23(2): p. 223-6.
192. **Thompson, S.M. and B.H. Gahwiler**, *Comparison of the actions of baclofen at pre- and postsynaptic receptors in the rat hippocampus in vitro*. **J Physiol**, 1992. 451: p. 329-45.
193. **Nishikawa, K.**, *[Roles of glutamatergic and GABAergic nervous system in hypnotic and analgesic actions of general anesthetics]*. **Masui**, 2011. 60(5): p. 534-43.
194. **Helm, K.A., et al.**, *GABAB receptor antagonist SGS742 improves spatial memory and reduces protein binding to the cAMP response element (CRE) in the hippocampus*. **Neuropharmacology**, 2005. 48(7): p. 956-64.
195. **Linster, C. and B.H. Smith**, *A computational model of the response of honey bee antennal lobe circuitry to odor mixtures: overshadowing, blocking and unblocking can arise from lateral inhibition*. **Behav Brain Res**, 1997. 87(1): p. 1-14.
196. **Urban, N.N.**, *Lateral inhibition in the olfactory bulb and in olfaction*. **Physiol Behav**, 2002. 77(4-5): p. 607-12.
197. **Yokoi, M., K. Mori, and S. Nakanishi**, *Refinement of odor molecule tuning by dendrodendritic synaptic inhibition in the olfactory bulb*. **Proc Natl Acad Sci U S A**, 1995. 92(8): p. 3371-5.
198. **Sachse, S. and C.G. Galizia**, *Role of inhibition for temporal and spatial odor representation in olfactory output neurons: a calcium imaging study*. **J Neurophysiol**, 2002. 87(2): p. 1106-17.
199. **Stopfer, M., et al.**, *Impaired odour discrimination on desynchronization of odour-encoding neural assemblies*. **Nature**, 1997. 390(6655): p. 70-4.
200. **Hosler, J.S., K.L. Buxton, and B.H. Smith**, *Impairment of olfactory discrimination by blockade of GABA and nitric oxide activity in the honey bee antennal lobes*. **Behav Neurosci**, 2000. 114(3): p. 514-25.
201. **Olsen, S.R. and R.I. Wilson**, *Lateral presynaptic inhibition mediates gain control in an olfactory circuit*. **Nature**, 2008. 452(7190): p. 956-60.
202. **Wilson, R.I. and G. Laurent**, *Role of GABAergic inhibition in shaping odor-evoked spatiotemporal patterns in the *Drosophila* antennal lobe*. **J Neurosci**, 2005. 25(40): p. 9069-79.
203. **Vucinic, D., L.B. Cohen, and E.K. Kosmidis**, *Interglomerular center-surround inhibition shapes odorant-evoked input to the mouse olfactory bulb in vivo*. **J Neurophysiol**, 2006. 95(3): p. 1881-7.
204. **Maren, S.**, *Pavlovian fear conditioning as a behavioral assay for hippocampus and amygdala function: cautions and caveats*. **Eur J Neurosci**, 2008. 28(8): p. 1661-6.

-
205. **Harris, J.A. and R.F. Westbrook**, *Benzodiazepine-induced amnesia in rats: reinstatement of conditioned performance by noxious stimulation on test.* **Behav Neurosci**, 1998. 112(1): p. 183-92.
206. **Dickinson-Anson, H. and J.L. McGaugh**, *Midazolam administered into the amygdala impairs retention of an inhibitory avoidance task.* **Behav Neural Biol**, 1993. 60(1): p. 84-7.
207. **Pain, L., et al.**, *Mechanisms of action of midazolam on expression of contextual fear in rats.* **Br J Anaesth**, 2002. 89(4): p. 614-21.
208. **Westbrook, R.F., et al.**, *Aversive conditioning in the rat: effects of a benzodiazepine and of an opioid agonist and antagonist on conditioned hypoalgesia and fear.* **J Exp Psychol Anim Behav Process**, 1991. 17(3): p. 219-30.
209. **Cole, B.J. and G.H. Jones**, *Double dissociation between the effects of muscarinic antagonists and benzodiazepine receptor agonists on the acquisition and retention of passive avoidance.* **Psychopharmacology (Berl)**, 1995. 118(1): p. 37-41.
210. **Jensen, R.A., et al.**, *Benzodiazepines alter acquisition and retention of an inhibitory avoidance response in mice.* **Psychopharmacology (Berl)**, 1979. 64(1): p. 125-6.
211. **Tenen, S.S.**, *Recovery time as a measure of CER strength: effects of benzodiazepines, amobarbital, chlorpromazine and amphetamine.* **Psychopharmacologia**, 1967. 12(1): p. 1-17.
212. **Davis, M.**, *Diazepam and flurazepam: effects on conditioned fear as measured with the potentiated startle paradigm.* **Psychopharmacology (Berl)**, 1979. 62(1): p. 1-7.
213. **Rossato, J.I., et al.**, *Retrograde amnesia induced by drugs acting on different molecular systems.* **Behav Neurosci**, 2004. 118(3): p. 563-8.
214. **Introini-Collison, I.B., C. Castellano, and J.L. McGaugh**, *Interaction of GABAergic and beta-noradrenergic drugs in the regulation of memory storage.* **Behav Neural Biol**, 1994. 61(2): p. 150-5.
215. **Brioni, J.D., A.H. Nagahara, and J.L. McGaugh**, *Involvement of the amygdala GABAergic system in the modulation of memory storage.* **Brain Res**, 1989. 487(1): p. 105-12.
216. **Bustos, S.G., H. Maldonado, and V.A. Molina**, *Midazolam disrupts fear memory reconsolidation.* **Neuroscience**, 2006. 139(3): p. 831-42.
217. **Pereira, M.E., et al.**, *Inhibition by diazepam of the effect of additional training and of extinction on the retention of shuttle avoidance behavior in rats.* **Behav Neurosci**, 1989. 103(1): p. 202-5.

-
218. **Makkar, S.R., S.Q. Zhang, and J. Cranney**, *Behavioral and neural analysis of GABA in the acquisition, consolidation, reconsolidation, and extinction of fear memory*. **Neuropsychopharmacology**, 2011. 35(8): p. 1625-52.
219. **Ribeiro, A.M., et al.**, *Basolateral amygdala inactivation impairs learned (but not innate) fear response in rats*. **Neurobiol Learn Mem**, 2011. 95(4): p. 433-40.
220. **Chrobak, J.J., R.W. Stackman, and T.J. Walsh**, *Intraseptal administration of muscimol produces dose-dependent memory impairments in the rat*. **Behav Neural Biol**, 1989. 52(3): p. 357-69.
221. **Harris, J.A. and R.F. Westbrook**, *The benzodiazepine midazolam does not impair Pavlovian fear conditioning but regulates when and where fear is expressed*. **J Exp Psychol Anim Behav Process**, 1999. 25(2): p. 236-46.
222. **Tzschentke, T.M.**, *Measuring reward with the conditioned place preference (CPP) paradigm: update of the last decade*. **Addict Biol**, 2007. 12(3-4): p. 227-462.
223. **Meyers, R.A., et al.**, *Dorsal hippocampus inhibition disrupts acquisition and expression, but not consolidation, of cocaine conditioned place preference*. **Behav Neurosci**, 2006. 120(2): p. 401-12.
224. **Rezayof, A., et al.**, *GABA(A) receptors of hippocampal CA1 regions are involved in the acquisition and expression of morphine-induced place preference*. **Eur Neuropsychopharmacol**, 2007. 17(1): p. 24-31.
225. **Nagahara, A.H. and J.L. McGaugh**, *Muscimol infused into the medial septal area impairs long-term memory but not short-term memory in inhibitory avoidance, water maze place learning and rewarded alternation tasks*. **Brain Res**, 1992. 591(1): p. 54-61.
226. **Robinson, M.J. and K.B. Franklin**, *Reconsolidation of a morphine place preference: impact of the strength and age of memory on disruption by propranolol and midazolam*. **Behav Brain Res**, 2010. 213(2): p. 201-7.
227. **Nader, K. and O. Hardt**, *A single standard for memory: the case for reconsolidation*. **Nat Rev Neurosci**, 2009. 10(3): p. 224-34.
228. **Riccio, D.C., E.W. Moody, and P.M. Millin**, *Reconsolidation reconsidered*. **Integr Physiol Behav Sci**, 2002. 37(4): p. 245-53.
229. **Cai, X., et al.**, *Activity-dependent bidirectional regulation of GABA(A) receptor channels by the 5-HT(4) receptor-mediated signalling in rat prefrontal cortical pyramidal neurons*. **J Physiol**, 2002. 540(Pt 3): p. 743-59.
230. **Yan, Z.**, *Regulation of GABAergic inhibition by serotonin signaling in prefrontal cortex: molecular mechanisms and functional implications*. **Mol Neurobiol**, 2002. 26(2-3): p. 203-16.

-
231. **McDonald, B.J., et al.**, *Adjacent phosphorylation sites on GABAA receptor beta subunits determine regulation by cAMP-dependent protein kinase.* **Nat Neurosci**, 1998. 1(1): p. 23-8.
232. **Scaife, J.C., et al.**, *Diazepam-induced disruption of classically-conditioned fear-potential of late-latency auditory evoked potentials is prevented by flumazenil given before, but not after, CS/US pairing.* **J Psychopharmacol**, 2007. 21(1): p. 93-101.
233. **Blair, H.T., et al.**, *The lateral amygdala processes the value of conditioned and unconditioned aversive stimuli.* **Neuroscience**, 2005. 133(2): p. 561-9.
234. **Klerman, G.L.**, *Treatments for panic disorder.* **J Clin Psychiatry**, 1992. 53 Suppl: p. 14-9.
235. **Mirza, N.R. and G. Munro**, *The role of GABA(A) receptor subtypes as analgesic targets.* **Drug News Perspect**. 23(6): p. 351-60.
236. **Salinas, J.A. and J.L. McGaugh**, *Muscimol induces retrograde amnesia for changes in reward magnitude.* **Neurobiol Learn Mem**, 1995. 63(3): p. 277-85.
237. **Strube-Bloss, M.F., M.P. Nawrot, and R. Menzel**, *Mushroom body output neurons encode odor-reward associations.* **J Neurosci**, 2011. 31(8): p. 3129-40.
238. **Smith, D., J. Wessnitzer, and B. Webb**, *A model of associative learning in the mushroom body.* **Biol Cybern**, 2008. 99(2): p. 89-103.
239. **Bramham, C.R.**, *Local protein synthesis, actin dynamics, and LTP consolidation.* **Curr Opin Neurobiol**, 2008. 18(5): p. 524-31.
240. **Ives, J.H., D.L. Drewery, and C.L. Thompson**, *Differential cell surface expression of GABAA receptor alpha1, alpha6, beta2 and beta3 subunits in cultured mouse cerebellar granule cells influence of cAMP-activated signalling.* **J Neurochem**, 2002. 80(2): p. 317-27.
241. **Thompson, C.L., et al.**, *Cyclic AMP-mediated regulation of GABA(A) receptor subunit expression in mature rat cerebellar granule cells: evidence for transcriptional and translational control.* **J Neurochem**, 2000. 74(3): p. 920-31.
242. **Jacob, T.C., S.J. Moss, and R. Jurd**, *GABA(A) receptor trafficking and its role in the dynamic modulation of neuronal inhibition.* **Nat Rev Neurosci**, 2008. 9(5): p. 331-43.
243. **Luscher, B., T. Fuchs, and C.L. Kilpatrick**, *GABAA receptor trafficking-mediated plasticity of inhibitory synapses.* **Neuron**, 2011. 70(3): p. 385-409.
244. **Sinakevitch, I., J.A. Mustard, and B.H. Smith**, *Distribution of the octopamine receptor AmOA1 in the honey bee brain.* **PLoS One**, 2011. 6(1): p. e14536.

10 Danksagung

Ich bedanke mich bei Prof. Dr. Uli Müller, der mir in den letzten vier Jahren die Möglichkeit gegeben hat, meine eigenen Gedanken und Ideen in meinen Experimenten zu verwirklichen. Danke auch für die stetige Bereitschaft zur Diskussion und die tatkräftige Unterstützung. Danke für alle Anregungen, Ideen und Vorschläge.

Bei Prof. Dr. Frank Kirchhoff möchte ich mich für die reibungslose Übernahme der Zweitkorrektur, sowie das schnelle Erstellen des Gutachtens bedanken.

Mein Dank geht an alle Mitglieder der Arbeitsgruppe für anregende Diskussionen, gemeinsame Ausflüge, Weihnachtsessen und die angenehm entspannte Arbeitsatmosphäre. Dank an Bärbel Heidtmann, Fabian Büttner, Katja Merschbächer, Tina Martin, Iris Fuchs und vor allem Kathy Rether, mit der es über die ganzen Jahre hinweg sehr angenehm war, sich ein Büro zu teilen.

Besonderer Dank an Dr. Helmut Kallenborn für Diskussionen über den adäquaten Gebrauch statistischer Methoden und denn ach so begehrenswerten Sternchen.

Spezial-Dank an Michael Glander, oder auch bekannt als Super-Glander, für seinen maßgeblichen MacGyver-mäßigen Beitrag zum Durchflusssystem, dem Injektionssystem und der überhaupt immer dann zur Stelle ist, wenn der begrenzte technische Verstand eines Biologen an seine Grenzen stößt.

Extra-Spezial-Dank an Angelika Gardezi, die einen wesentlichen Beitrag zur Präparation adulter Kenyonzellen geleistet hat, die histologischen Experimente durchgeführt hat, fantastische Fotos macht und überhaupt, unersetzlich ist.

Dank an Susanne Meuser für Ratschläge des englischen Sprachgebrauchs und das Korrekturlesen der Übersetzung.

Dank an Prof. Dr. André Fiala, der den in dieser Arbeit verwendeten Fliegenstamm zur Verfügung gestellt hat.

Ich bedanke und entschuldige mich bei allen Bienen und Fruchtliegen, die im Verlauf der letzten Jahre durch meine Hand ihr Leben ließen. Auf das ihr Tod nicht nur mir alleine nutzt, sondern irgendwann auch der Wissenschaft, hoffentlich.

Auf keinen Fall möchte ich an dieser Stelle Dr. Martin Schwärzel vergessen, der mich zu Beginn meiner Dissertation begleitet hat und der hoffentlich in Berlin seinen wissenschaftlichen Frieden gefunden hat.

Dank und Grüße an Dr. Jakob Hättig, der sich in Kalifornien die Sonne auf den Schädel scheinen lässt und dessen stetige Bereitschaft, mich auf meine Fehlerhaftigkeit hinzuweisen, hoffentlich immer eine Quelle der Inspiration für mich bleiben mag.

Einen riesen Dank an meine Freunde, meine Familie und ganz besonders meine Eltern, ohne deren Hilfe mein Studium, mein Diplom und diese Dissertation nicht möglich gewesen wären.

Zu guter Letzt danke ich meiner besseren Hälfte für eine wunderschöne Zeit und die Unterstützung in den letzten Jahren. Danke für grammatikalische Lektionen in deutscher Sprache, Ratschläge für bessere Formulierungen und das Korrekturlesen dieser Arbeit. Danke auch, dass du unsere Brut neun Monate in dir trägst und trotz voluminösen Ausmaßen mich von der tagtäglichen Arbeit befreist, damit ich diese Dissertation noch rechtzeitig fertigstellen kann.

Dankeschön