

Der Einfluss des Sättigungszustandes
auf appetitive sensorische Prozessierung,
Lernen und Gedächtnisbildung: Die Rolle der
5'-Adenosinmonophosphat-aktivierten Proteinkinase

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

von Thomas Laeger

Saarbrücken, den 15.12.2007

Tag des Kolloquiums: 28. April 2008

Dekan: Prof. Dr. Uli Müller

Prüfungsvorsitzender: Prof. Dr. Manfred Schmitt

1. Gutachter: Prof. Dr. Uli Müller

2. Gutachter: Prof. Dr. Bernhard Möhl

Akademischer Mitarbeiter: Dr. Helmut Kallenborn

Ernst zu nehmende Forschung erkennt man daran, daß plötzlich zwei Probleme existieren, wo es vorher nur eines gegeben hat.

Thorstein Bunde Veblen (1857-1929)

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Lernen und Gedächtnis	1
1.1.1	Assoziative und nicht-assoziative Lernformen	1
1.1.2	Molekulare Grundlagen von Lernen und Gedächtnis	2
1.1.3	Gedächtnisbildung und Belohnung	4
1.1.4	Neuronale Belohnungssysteme	4
1.1.5	Zellulärer Energiehaushalt und Motivation	5
1.2	Die 5'-Adenosinmonophosphat-aktivierte Proteinkinase (AMPK)	6
1.2.1	Nukleotide als Signale des Energiestoffwechsels	7
1.2.2	Struktur der AMPK	8
1.2.3	Regulation der AMPK	9
1.2.4	AMPK-regulierte Stoffwechselprozesse	10
1.2.5	Physiologische Prozesse, an denen AMPK beteiligt ist	11
1.3	Ziel dieser Arbeit	14
2	Methoden und Material	15
2.1	Methoden	15
2.1.1	Larvenfütterungsexperiment mit <i>Drosophila melanogaster</i>	15
2.1.2	Vorbereitung der Versuchstiere (<i>Apis mellifera carnica</i> L.)	16
2.1.2.1	Empfindlichkeit der Rüsselreflexes	17
2.1.2.2	Habituation und Dishabituation des Rüsselreflexes	18
2.1.2.3	Olfaktorische Konditionierung des Rüsselreflexes	18
2.1.2.4	Injektion der Pharmaka und NPE- <i>caged</i> Nukleotide	19
2.1.2.5	Photofreisetzung der <i>caged</i> Nukleotide	20
2.1.3	Immunchemische und immunhistologische Techniken	20
2.1.3.1	Präparation des Bienenhirns	20
2.1.3.2	Immunhistologie	20
2.1.3.3	Proteinquantifizierung mittels ELISA	22
2.1.3.4	Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-Page)	23
2.1.3.5	Westernblot und Immunfärbung von Proteinen	24
2.1.4	Ca ²⁺ -Imaging	25
2.2	Material	27
2.2.1	Chemikalien	27
2.2.2	Puffer und Lösungen	28
2.2.3	Antikörper und Pharmaka	31
2.2.4	Verbrauchsmaterialien	32
2.2.5	Geräte	33

3	Ergebnisse	34
3.1	Einleitende Untersuchungen zur Wirksamkeit von AICAR bei Insekten	34
3.1.1	AICAR erhöht die Nahrungsaufnahme bei Larven von <i>Drosophila melanogaster</i>	34
3.1.2	AICAR verbessert das Lernen bei <i>Apis mellifera</i>	36
3.1.3	AICAR hat keinen Einfluss auf den Gedächtnisabruf bei <i>Apis mellifera</i>	38
3.2	Die AMPK- α -Untereinheit: Detektion und Lokalisation im Gehirn von <i>Apis mellifera</i>	42
3.2.1	Spezifität der verwendeten Antikörper bei <i>Apis mellifera</i>	42
3.2.2	Die Lokalisation der katalytischen α -Untereinheit von AMPK im Gehirn von <i>Apis mellifera</i>	44
3.3	AMPK-Aktivität	51
3.3.1	AMPK-Aktivität: hungrig vs. satt	51
3.3.2	Aktivierung der AMPK durch Photofreisetzung von ADP	51
3.4	P2X/Y-Rezeptoren: Nachweis und Inhibition durch PPADS	56
3.5	Verhaltensuntersuchungen zu den Auswirkungen einer AMPK-Aktivierung / -Deaktivierung durch Photofreisetzung von <i>caged</i> Nukleotiden im Gehirn von <i>Apis mellifera</i>	58
3.5.1	Regulation der Empfindlichkeit des Rüsselreflexes	58
3.5.1.1	Durch ADP aktivierte AMPK erhöht die Empfindlichkeit des Rüsselreflexes	58
3.5.1.2	ATP-Freisetzung reduziert die Empfindlichkeit des Rüsselreflexes	60
3.5.1.3	Gehirnregionen, die die Empfindlichkeit des Rüsselreflexes nach AMPK-Aktivierung erhöhen	63
3.5.1.4	Gehirnregionen, die die Empfindlichkeit des Rüsselreflexes nach ATP-Freisetzung reduzieren	68
3.5.1.5	AMPK-Aktivierung in einer Hemisphäre macht auch die andere Hemisphäre „hungrig“	70
3.5.2	AMPK-Aktivierung verlängert den Vorgang der Habituation des Rüsselreflexes	72
3.5.3	Klassische olfaktorische Konditionierung: Die Rolle der AMPK bei der Gedächtnisbildung	75
3.5.4	CaMKK-Hemmung verhindert die Ausbildung des AMPK-abhängigen 2-Tage-Gedächtnisses	79
4	Diskussion	83
4.1	Manipulation der AMPK-Aktivität: AICAR <i>versus</i> ADP	83
4.2	AMPK-Aktivität reguliert die Zuckerwasserschwelle	86

4.3	Welche Gehirnregionen sind über die AMPK-Aktivität an der Regulation der Zuckerwasserempfindlichkeit beteiligt?	88
4.4	Wird das „Hungersignal“ in die andere Hemisphäre übertragen?	91
4.5	AMPK: Beeinflussung des nicht-assoziativen Lernens von appetitiven Reizen	91
4.6	Welche Gehirnregionen sind über die AMPK-Aktivität an der Habituation beteiligt?	93
4.7	Zusammenhang von Motivation und Lernen: Die Rolle der AMPK	95
4.8	Wie ist das durch AMPK induzierte Gedächtnis mit anderen für die Gedächtnisbildung notwendigen Signalwegen verknüpft?	98
4.9	Die Zuckerwasserempfindlichkeit ist kein Indikator für die Belohnungsstärke beim appetitiven Lernen	99
4.10	AMPK: Beeinflussung der zirkadianen Rhythmik?	101
4.11	Ausblick	102
5	Zusammenfassung	104
6	Summary	105
7	Literatur	106
8	Abkürzungsverzeichnis	124
9	Danksagung	126
10	Lebenslauf und wissenschaftlicher Werdegang	127
11	Eidesstattliche Versicherung	128

1 Einleitung

1.1 Lernen und Gedächtnis

Lernen und Gedächtnisbildung sind evolutionär alte Prozesse, die es Tieren ermöglichen, Informationen über ihre Umwelt zu erhalten und zu speichern. Die beim Lernen erworbenen Informationen stehen auch noch nach längerer Zeit als Gedächtnis für die Regulation des Verhaltens zur Verfügung. Dies ermöglicht es den Tieren, sich an wechselnde Umweltbedingungen anzupassen und ihr Verhalten erfahrungsabhängig zu verändern. Die gedächtnisbildenden Prozesse beruhen dabei auf Veränderungen von Neuronen und ihren Verknüpfungen. Dafür werden unter anderem Ionenkanäle moduliert, Enzymkaskaden aktiviert bzw. inaktiviert oder die Struktur der Verbindungen zwischen Neuronen verändert. Untersuchungen an verschiedenen Modellorganismen wie *Aplysia californica*, *Drosophila melanogaster*, *Apis mellifera* und *Mus musculus* haben gezeigt, dass diese neuronale Plastizität sowohl in Vertebraten als auch in Invertebraten funktionelle Homologien besitzt^[105,109].

1.1.1 Assoziative und nicht-assoziative Lernformen

Bei den Lernformen wird zwischen höheren Lernformen wie kognitiven Leistungen und Spracherwerb des Menschen und den einfachen Lernformen differenziert. Bei letzteren wird grundsätzlich zwischen assoziativen und nicht-assoziativen Lernformen unterschieden.

Zu den nicht-assoziativen Lernformen gehören die Sensitisierung und die Habituation^[80]. Sensitisierung beschreibt die Verstärkung einer Reflexantwort aufgrund eines zusätzlichen starken Reizes. Die Fähigkeit eines Tieres, sich an einen wiederholt auftretenden Reiz, der weder mit positiven noch mit negativen Folgen verbunden ist, zu gewöhnen und nicht mehr darauf zu reagieren, wird als Habituation bezeichnet. Bei den nicht-assoziativen Lernformen wird etwas über einen einzelnen Stimulus gelernt, während es bei dem assoziativen Lernen zur Verknüpfung eines neutralen Reizes mit einem Belohnungs- oder Strafreiz kommt.

Das bekannteste Beispiel für assoziatives Lernen ist die klassische Konditionierung an Hunden, wie sie 1927 von Pawlow untersucht wurde^[141]. Die Hunde sondern beim

Anblick eines Stück Fleisches (US) Speichel ab (UR). Ertönt kurz vor der Darbietung des Futters ein Glockenton (CS), ist dieser Ton nach wiederholten Trainingsdurchläufen ausreichend, um bei dem Hund den Speichelfluss auszulösen (CR).

Dieses Prinzip des assoziativen Lernens - die zeitliche Paarung zweier Reize (CS und US) - ist auch beim appetitiven Duftlernen der Honigbiene *Apis mellifera* vorhanden. Appetitiv bedeutet, dass der US einen positiven Wert besitzt und beispielsweise eine Zuckerwasserbelohnung darstellt. Ist der US von negativer Bedeutung, handelt es sich um eine aversive Konditionierung. Zu beobachten ist dies bei Fruchtfliegen (*Drosophila melanogaster*) oder beim Furchtlernen bei Mäusen (*Mus musculus*), wobei ein Duft bzw. Ton mit einem Elektroschock assoziiert wird.

Bei Lernprozessen wird zwischen dem initialen Lernvorgang selbst, der die Akquisition des Gedächtnisses beinhaltet, und den darauf folgenden unterschiedlichen Phasen der Gedächtnisbildung unterschieden. Das direkt nach der Akquisition vorhandene Kurzzeitgedächtnis (STM) wird über Konsolidierungsprozesse letztlich in ein stabiles Langzeitgedächtnis (LTM) überführt. Beim Kurzzeitgedächtnis, welches sich durch eine begrenzte Speicherkapazität und Störanfälligkeit gegenüber neuen Ereignissen auszeichnet, werden bereits vorhandene Proteine und Signalkaskaden modifiziert. Das Langzeitgedächtnis ist hingegen von der Proteinbiosynthese abhängig^[46], da es u.a. zu einem strukturellen Umbau von bestehenden Synapsen und zu Neubildungen von Synapsen kommt^[12].

1.1.2 Molekulare Grundlagen von Lernen und Gedächtnis

Wie sich in den letzten Jahrzehnten gezeigt hat, sind die molekularen Prozesse, die dem Lernen und der Gedächtnisbildung unterliegen, in den verschiedenen Modellorganismen sehr ähnlich. So konnte bei *Aplysia californica*, *Drosophila melanogaster*, *Apis mellifera* und *Mus musculus* gezeigt werden, dass die cAMP-PKA-Kaskade eine zentrale Rolle spielt^[4,181,174]. Die Hemmung dieses Signalweges führt zu Defekten in der Gedächtnisbildung^[115]. In Abbildung 1 (S. 3) ist zu erkennen, dass die Adenylatzyklase (AC) einen Koinzidenzdetektor darstellt, an dem verschiedene Signale zusammenlaufen. Wird die Aktivität der AC erhöht, steigt der cAMP-Spiegel in der Zelle an und aktiviert die Proteinkinase A (PKA), die daraufhin Zielproteine phosphoryliert.



Abbildung 1: Signalübertragung entlang des cAMP-Weges.

Zum einen werden Gedächtnisse gebildet, die nur von kurzer Dauer sind (STM). Dabei wird die Durchlässigkeit von Ionenkanälen verändert, was zu einer kurzfristigen Modulation der Transmitterauschüttung führt^[30,180,26].

Für einen langzeitigen Gedächtniseffekt (LTM) kommt es zum anderen zu einer Veränderung in der Genexpression. Hierbei findet eine Translokation der PKA in den Zellkern statt. Die Phosphorylierung des Transkriptionsfaktors CREB durch PKA leitet die Genexpression ein^[40,10,76] und führt letztendlich zu einer morphologischen Veränderung der Synapsen. Wird die Induktion der Transkription durch CREB nach dem assoziativen Lernen verhindert, kann kein Langzeitgedächtnis gebildet werden^[220]. Die Expression einer CREB-Aktivator-Isoform führt dagegen nach nur einer Trainingseinheit zur Bildung eines Langzeitgedächtnisses^[219].

Die cAMP-PKA-Kaskade ist jedoch nicht der einzige Signalweg, der für das Lernen essentiell ist. Es hat sich gezeigt, dass auch die Ca^{2+} -CaMK-CREB-Kaskade (Abb. 2) eine wichtige Funktion in der Gedächtnisbildung hat.

Diese verknüpft den bei neuronaler Aktivität auftretenden Ca^{2+} -Anstieg mit der Genexpression^[101,182]. Dabei wird zunächst das in die Zelle einströmende Ca^{2+} von Calmodulin (CaM) gebunden. Dieser Ca^{2+} /Calmodulin-Komplex (Ca^{2+} /CaM) aktiviert daraufhin nicht nur allosterisch die CaMKK, sondern bindet ebenso deren Substrate, z.B. die CaMKIV^[182], um die Phosphorylierungsstelle zugänglich zu machen. Letztendlich kann die CaMKIV als CREB-Kinase die Transkription regulieren. Wie Untersuchungen zeigten, kann der Mangel einer CaMKK im Hippocampus zum Verlust des räumlichen Langzeitgedächtnisses führen^[143].

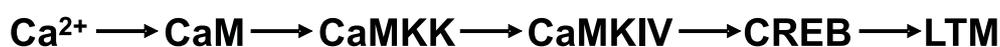


Abbildung 2: Signalübertragung entlang des CaMK-Weges.

1.1.3 Gedächtnisbildung und Belohnung

Bei der appetitiven Konditionierung ist die Gedächtnisbildung nicht nur von der Anzahl der Stimuli abhängig, sondern auch von Faktoren wie Motivation und Belohnung in Nahrungsform. Dies führt dazu, dass hungrige Tiere besser lernen, da bei ihnen der Belohnungswert des Futters höher ist als bei satten Tieren^[63]. Dieses Wissen machen sich die Menschen seit jeher bei der Domestizierung von Tieren zu Nutze.

Die Verknüpfung des Lernprozesses mit dem Sättigungszustand ist ein weit verbreitetes Phänomen im Tierreich. Auch bei Bienen korreliert komplexes Verhalten wie beispielsweise das appetitive olfaktorische Lernen mit dem Sättigungszustand der Tiere^[46]. Bienen, die während einer Konditionierung hungrig sind, sind in der Lage, ein von der Genexpression abhängiges Langzeitgedächtnis zu bilden. Werden die Bienen hingegen vor dem Training gefüttert, wird dieses Gedächtnis nicht ausgebildet^[46].

1.1.4 Neuronale Belohnungssysteme

Bei Vertebraten wird die Belohnungsinformation in bestimmten Gehirnbereichen durch spezielle Neurone, die dopaminergen Neurone, verarbeitet. Obwohl diese Neurone in wenigen Fällen durch aversive Reize erregt werden können, werden sie doch hauptsächlich durch appetitive Reize aktiviert^[113]. Dafür erzeugen sie innere Belohnungssignale, welche dann Gehirnaktivitäten beeinflussen, durch die Entscheidungen und andere Handlungsweisen kontrolliert werden. Die dopaminergen Neurone zeigen beispielsweise eine erhöhte Aktivität als Antwort auf einen Nahrungsreiz, wenn dieser eine Belohnung darstellt^[172]. Fällt diese Belohnung hingegen aus, ist die Aktivität derselben Neurone kurzzeitig unterdrückt^[172]. Gleiches geschieht bei Reizen, die mit einem Ausbleiben der Belohnung verbunden sind^[162,97,112]. Bei satten Tieren zeigen die Neurone, die auf Nahrungsreize als Belohnung reagieren, eine geringere Aktivität^[37,161]. Dies deutet darauf hin, dass die Reaktion der Neurone die Belohnungsstärke und nicht den Futterreiz widerspiegelt. Andere Gehirnregionen reagieren hingegen unabhängig vom Sättigungszustand auf den Futterreiz^[158].

In der Evolution scheint sich die Funktion des dopaminergen Systems interessanterweise verändert zu haben. So konnte bei Invertebraten wie der Fruchtfliege *Drosophila melanogaster* gezeigt werden, dass Dopamin für die aversive, nicht für die appetitive Konditionierung von essentieller Bedeutung ist^[173]. Werden bei Fruchtfliegen die dopaminergen Neurone während des Trainings blockiert, bei dem ein Duft (CS) mit einem

Elektroschock (US) gepaart wird, führt dies zu einem deutlich schlechterem Lernen. Wird die Dopaminfreisetzung hingegen bei der appetitiven Konditionierung unterdrückt, bleibt die Gedächtnisbildung unverändert.

Bei der Honigbiene *Apis mellifera* wird die Belohnungsinformation über ein Neuron, das VUMmx1, vermittelt^[50]. Eine künstliche Depolarisierung dieses Neurons ist in der Lage, die Zuckerbelohnung als US während des Trainings zu ersetzen^[50]. Wie sich herausgestellt hat, ist dieses Neuron octopaminerg^[50]. Wird das octopaminerge System während des Trainings bei Fruchtfliegen abgeschaltet, hat dies bei der aversiven Konditionierung keinen Einfluss auf die Gedächtnisbildung^[173]. Beim belohnungsorientierten Lernen findet hingegen keine Gedächtnisbildung statt. Dies lässt darauf schließen, dass Dopamin für die Vermittlung negativer Reize und Octopamin für die positive Assoziation während des Lernprozesses zuständig ist.

Was die Belohnungsstärke während der appetitiven Assoziation auf molekularer Ebene in den Neuronen festlegt, ist bis heute noch unklar und soll deshalb in dieser Arbeit untersucht werden.

1.1.5 Zellulärer Energiehaushalt und Motivation

Appetitives gustatorisches Lernen findet nur bei ausreichender Motivation statt. Welche Signale sind nun für die erhöhte Motivation bei hungrigen Tieren verantwortlich?

Hungrige Tiere leiden unter einem Energiedefizit. Ausgelöst durch hohe Aktivität und Nährstoffmangel sinkt der Gehalt an zellulärer Energie (ATP), welcher sich in einem Anstieg des AMP-Spiegels äußert. Da Neurone besonders empfindlich auf Energiemangel reagieren, mag es nicht überraschen, dass die 5'-Adenosinmonophosphat-aktivierte Proteinkinase (AMPK) überall im ZNS vorkommt^[198,39]. Hungrige Säugetiere weisen eine höhere AMPK-Aktivität im Hypothalamus auf als satte Tiere^[111]. Außerdem haben Untersuchungen gezeigt, dass die AMPK-Aktivität im Hypothalamus das Verhalten bei der Nahrungsaufnahme beeinflusst, um den gesamten Organismus vor Energiemangel zu schützen. Die künstliche AMPK-Aktivierung im Hypothalamus führt beispielsweise bei Ratten zu einer erhöhten Nahrungsaufnahme^[8].

Nun stellt sich die Frage, ob zwischen der AMPK und dem Lernprozess eine Verbindung besteht. Damit könnte beantwortet werden, warum hungrige Tiere besser lernen als satte Tiere.

1.2 Die 5'-Adenosinmonophosphat-aktivierte Proteinkinase (AMPK)

Die 5'-Adenosinmonophosphat-aktivierte Proteinkinase (AMPK) ist ein entwicklungs- geschichtlich sehr altes und hoch konserviertes Schlüsselenzym im Stoffwechsel der eukaryotischen Zelle. Es reguliert die Energiebalance einerseits auf dem zellulären Niveau und andererseits im gesamten Organismus. Wird es durch einen niedrigen Energie-Niveau, d.h. Erhöhung des AMP : ATP-Verhältnisses in der Zelle, aktiviert, reguliert es den Metabolismus zugunsten der ATP regenerierenden, katabolischen Stoffwechselwege (Abb. 3). Eine Vielzahl von ATP verbrauchenden, anabolischen Stoffwechselwegen wird dagegen eingeschränkt, zum Beispiel Zellwachstum und Biosynthesen von Fettsäuren und Cholesterin. In vielzelligen eukaryotischen Organismen wird AMPK zusätzlich durch Hormone wie zum Beispiel Leptin und Ghrelin reguliert und ist deshalb in der Lage, den zellulären Energiestoffwechsel mit dem des gesamten Organismus zu verknüpfen.

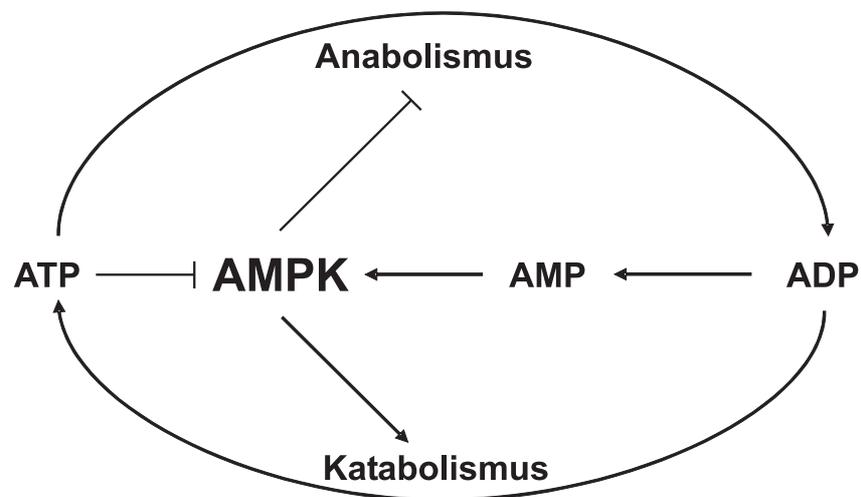


Abbildung 3: Übersicht über die Kontrollfunktion der AMPK.

Wird AMPK durch AMP aktiviert, welches ein Signal für einen niedrigen Energiestatus der Zelle ist, hemmt es ATP verbrauchende Prozesse (Anabolismus) und fördert ATP regenerierende Prozesse (Katabolismus).

1.2.1 Nukleotide als Signale des Energiestoffwechsels

Im Jahr 1964 erkannte Daniel Atkinson, dass Nukleotide diejenigen Signale sind, die die Regulation des Energiestoffwechsels kontrollieren^[148]. Zu dieser Zeit war eine kleine Gruppe von Enzymen bekannt, zum Beispiel die Phosphorylase und Phosphofruktokinase, deren Aktivität allosterisch über die Adenin-Nukleotide AMP und ATP wechselseitig reguliert wird. Atkinson überdachte diese anfänglichen Ergebnisse und schlug die Adenin-Nukleotide als Regulationssignale für alle Verzweigungsstellen zwischen anabolischen und katabolischen Stoffwechselwegen vor. Er formulierte dies als Hypothese der „Adenylat-Kontrolle“.

Warum ist AMP und nicht ADP das Signalmolekül für die Regulation des Energiestoffwechsels? Eukaryotische Zellen besitzen eine sehr aktive Adenylat-Kinase, welche ATP, ADP und AMP ineinander umwandelt ($2 \text{ ADP} \leftrightarrow \text{ATP} + \text{AMP}$) und diese Reaktion im Gleichgewicht hält^[51]. Unter idealen Bedingungen halten gesunde Zellen mit Hilfe der ATP-Synthase ($\text{ADP} + \text{P}_i \rightarrow \text{ATP}$) ein ADP : ATP-Verhältnis von 1:10 aufrecht. In diesem Fall arbeitet die Adenylat-Kinase von rechts nach links und hält AMP niedrig ($\text{AMP} : \text{ATP} = 1:100$). Wenn die ATPase ($\text{ATP} \rightarrow \text{ADP} + \text{P}_i$) bedingt durch zellulären Stress den Umsatz der ATP-Synthase übersteigt, steigt das ADP : ATP-Verhältnis an und die Adenylat-Kinase arbeitet von links nach rechts und erzeugt AMP. Steigt beispielsweise das ADP : ATP-Verhältnis auf das 5fache (5:10) an, wird das AMP : ATP-Verhältnis auf das 25fache (25:100) erhöht. Deshalb ist es für jedes System zur Überwachung des zellulären Energiestatus sinnvoll, auf AMP oder das AMP : ATP-Verhältnis zu reagieren, da dies, wie von Hans Krebs im Jahr 1963 dargelegt wurde^[89], für eine stärkere Veränderung der AMP-Konzentration als für ATP oder ADP sorgt.

Die AMPK wurde zuerst als ein Enzym beschrieben, welches in der Lage ist, die Hydroxymethylglutaryl-CoA (HMG-CoA)-Reduktase und die Acetyl-CoA-Carboxylase (ACC) zu phosphorylieren und zu inaktivieren^[16,29]. Beides sind Schlüsselenzyme in der Synthese von Cholesterin und Fettsäuren. 1980 wurde von Kim's Forschungsgruppe herausgefunden, dass die ACC durch AMP stimuliert wird. Sie kamen zu dem Schluß, dass die Fettsäuresynthese aufgrund des fallenden Energieniveaus in der Zelle gehemmt wird^[218]. Fünf Jahre später wurde von Hegardt's Gruppe berichtet, dass die HMG-CoA-Reduktase-Kinase ebenso durch AMP stimuliert werden kann^[43]. Kurz darauf lieferte die Arbeitsgruppe von Hardie den Beweis, dass es sich hier um ein und dasselbe Enzym handelt^[28]. Als sich herausstellte, dass diese Kinase verschiedenste

physiologische Substrate hat, wurde sie nach ihrem allosterischen Aktivator AMP als AMP-aktivierte Proteinkinase (AMPK) benannt^[56].

1.2.2 Struktur der AMPK

Die AMPK ist ein heterotrimeres Enzym, das aus einer katalytischen α -Untereinheit und zwei regulatorischen β - und γ -Untereinheiten besteht^[184]. Orthologien aller drei Untereinheiten wurden bis heute in allen eukaryotischen Arten gefunden, deren Genomsequenz verfügbar ist^[53,55]. Auch das AMPK-Ortholog in *Drosophila melanogaster* ist durch AMP aktivierbar^[136], was zeigt, dass dieser regulatorische Mechanismus auch bei Insekten und Säugern konserviert ist. Ebenso weist es darauf hin, dass dieses System der Energieregulation schon sehr früh in der eukaryotischen Evolution auftrat.

Bei Säugetieren wird jede Untereinheit durch mehrere Gene verschlüsselt ($\alpha 1, \alpha 2, \beta 1, \beta 2, \gamma 1, \gamma 2, \gamma 3$), was zu 12 verschiedenen heterotrimeren $\alpha\beta\gamma$ -Kombinationen führt^[55]. Die α -Untereinheit beinhaltet am N-Terminus eine herkömmliche Serin/Threonin-Kinase-Domäne, welche die Threonin-Struktur besitzt, deren Phosphorylierung für die Aktivierung notwendig ist^[57]. Der C-Terminus der α -Untereinheit ist für die Komplexbildung mit der β - und γ -Untereinheit notwendig^[38]. Die β -Untereinheit beinhaltet einen C-Terminus, welcher für die Komplexbildung zuständig ist, und eine Glycogen bindende N-Isoamylase-Domäne^[69,144]. Obwohl diese Struktur die erste Region des AMPK-Komplexes war, deren Kristallstruktur aufgeklärt wurde^[145], ist ihre physiologische Rolle noch unklar. Die γ -Untereinheit besitzt eine variable N-Terminale Region, gefolgt von vier „Tandem-Repeats“, einer Sequenz, die als CBS-Motiv bekannt ist^[14]. Diese treten in Paaren auf und formen zwei Module, die als Bateman-Domäne bezeichnet werden und als AMP-Bindestellen dienen^[81].

Die Regulation der AMPK durch AMP geschieht auf drei verschiedenen Wegen^[52]: a) allosterische Aktivierung durch AMP, b) Phosphorylierung von Thr 172 durch eine „upstream“-Kinase und c) Hemmung der Dephosphorylierung von Thr 172 durch Phosphatasen. Dieser dreifache Mechanismus macht das AMPK-System hochempfindlich, um auf kleinste Änderungen in der AMP-Konzentration zu reagieren^[52]. Der Effekt der allosterischen Aktivierung durch AMP allein ist sehr gering. Je nach AMPK-Isoformen steigt sie maximal auf das Fünffache oder weniger an^[53]. Auf das 50- bis 100fache steigt die Aktivität, wenn die α -Untereinheit am Thr 172 phosphoryliert ist^[53], was aber eine Bindung von AMP an der γ -Untereinheit voraussetzt. Gehemmt wird

die Dephosphorylierung durch Protein-Phosphatasen am Thr 172, wenn AMP an der γ -Untereinheit gebunden ist^[41,163]. Diese Phosphorylierungsstelle am Thr 172 bietet die Möglichkeit zur Regulation und ist in dieser Arbeit Angriffspunkt für die künstliche Modulierbarkeit.

Darüber hinaus ist die Bateman-Domäne in der Lage, ATP zu binden. Die Affinität dieser Domäne zu AMP ist aber deutlich höher als zu ATP, wobei sich ein gleichzeitiges Binden von AMP und ATP gegenseitig ausschließt^[175]. Obwohl die ATP-Bindung zu keiner der drei aktivierenden Effekte durch AMP führt, können hohe ATP-Konzentrationen zu einer Hemmung der Aktivierung von AMPK führen, indem die Phosphorylierung am Thr 172 unterbunden wird^[57].

1.2.3 Regulation der AMPK

Für die Phosphorylierung am Thr 172, die für die Aktivierung der AMPK notwendig ist, kommen vier Kinasen (AMPKKs) in Frage (Abb. 4, S. 10): LKB1^[58,178,212], CaMKK α , CaMKK β ^[59,64,71,211] und TAK1^[120].

Die LKB1-vermittelte Phosphorylierung findet während eines Energiedefizites in der Zelle statt, indem AMP an der γ -Untereinheit bindet^[209]. Die CaMKK vermittelte Aktivierung wird durch verschiedene Zelloberflächen-Liganden initiiert, die zu einer intrazellulären Ca²⁺-Konzentrationserhöhung führen^[209,59].

Neben Thr 172 wurden noch weitere Phosphorylierungsstellen an der α - und β -Untereinheit identifiziert. Ihre Funktion ist bis heute allerdings noch nicht vollständig aufgeklärt^[114,185,203,213]. AMPK- α 1 Ser 485 (äquivalent zu AMPK- α 2 Ser 491) wurde als Autophosphorylierungsstelle identifiziert^[67], die eine überhöhte AMPK-Aktivität verhindert und als Ziel für die Proteinkinase B (PKB/Akt) dient^[67,183]. Die Phosphorylierung von AMPK- α Ser 485/491 durch PKB/Akt ist voraussichtlich an der durch Insulin vermittelten AMPK-Hemmung beteiligt^[15,48,87,208].

Viele Studien zeigen, dass extrazelluläre Liganden wie Leptin, Adiponektin, Ghrelin, Bradykinin und Katecholamine die AMPK-Aktivität regulieren können^[85]. Dies verdeutlicht, in welchem Maße der zelluläre Energiestoffwechsel mit der Stoffwechselregulation des gesamten Organismus verknüpft ist. Viele metabolische Stoffwechselwege wie zum Beispiel der Kohlenhydrate, Fette und Eiweiße werden ebenfalls über cAMP-Signalwege reguliert. Bewegung oder Hungern führen zu einer Anregung der cAMP-abhängigen Proteinkinase (PKA) und der AMPK wie auch hormonelle Stimu-

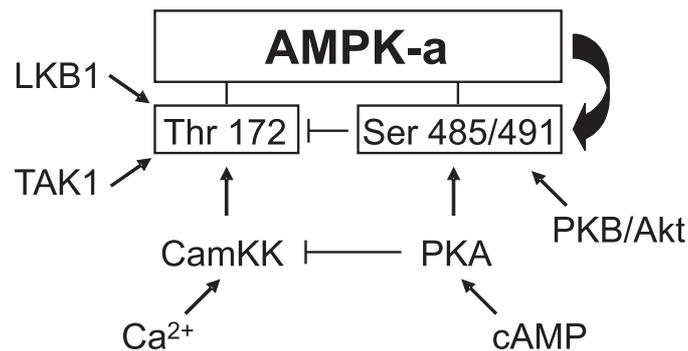


Abbildung 4: Regulation der AMPK.

lation über β -adrenerge Rezeptoren.^[33,77,99] Beide Kinasen können in Zusammenarbeit Enzyme regulieren, die im Glycogen-Stoffwechsel, in der Cholesterin-Synthese und im Fettsäure-Metabolismus eine Schlüsselrolle einnehmen^[22,33,42,127,205]. Ebenso können beide Kinasen antagonistisch arbeiten, zum Beispiel bei der Regulation von Hormonsensiblen Lipasen (HSL), welche die Lipolyse im Fett- und Muskelgewebe regulieren^[204]. Zudem wurde eine direkte Verbindung von PKA zu AMPK^[72] und eine PKA-vermittelte CamKK-Hemmung nachgewiesen, die wiederum zu einer reduzierten Phosphorylierung am Thr 172 der α -Untereinheit führt^[72].

1.2.4 AMPK-regulierte Stoffwechselprozesse

Welche Proteine werden von der AMPK phosphoryliert? Um diese Proteine zu identifizieren, machte man sich einen Wirkstoff namens AICAR zu nutze, der in der Lage ist, AMPK zu aktivieren. AICAR, ein Adenosin-Analogon wird über einen Adenosin-Transporter in die Zellen aufgenommen^[47] und von einer Adenosin-Kinase in ein monophosphoryliertes Nukleotid, das ZMP, umgewandelt^[201]. Diese Möglichkeit der AMPK-Aktivierung wurde von van den Berghe entwickelt^[60]. Seine Arbeitsgruppe fand heraus, dass ZMP fähig ist, alle drei durch AMP verursachten Auswirkungen auf das AMPK-System zu simulieren, einschließlich der erhöhten Phosphorylierung am Thr 172^[35]. AICAR ist allerdings nicht ganz spezifisch für AMPK, da ZMP auch andere AMP-sensiblen Enzyme wie Fruktose-1,6-Bisphosphatase^[201] und die Glykogen-Phosphorylase im Muskel reguliert^[100]. Deshalb sollten alle durch AICAR erlangten Rückschlüsse durch zusätzliche molekulare Methoden abgesichert werden, zum Beispiel durch AMPK-Knockouts oder siRNAs. Außerdem ist es möglich, einen AMPK-Inhibitor (Compound C) zu nutzen^[224]. Dieser kann zwar auch andere Kinasen in ihrer Wirkung regu-

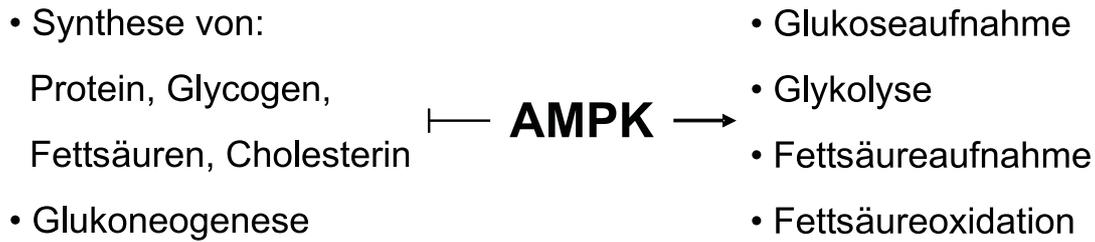


Abbildung 5: AMPK-regulierte Schlüsselprozesse des Energiestoffwechsels.

lieren (Hardie, unveröffentlicht), dennoch liefert er einen guten Beweis für eine AMPK-Funktion, wenn einem AICAR-Effekt entgegengewirkt werden kann, da nicht bekannt ist, dass AICAR andere Proteinkinasen aktiviert.

Die aktivierte AMPK hemmt eine Vielzahl von ATP verbrauchenden anabolischen Stoffwechselwegen. Durch AMPK kontrollierte Schlüsselprozesse des Energiestoffwechsels sind die Synthesen von Fettsäuren^[187,35,60,45,94], Proteinen^[21,73,83,88,66], Cholesterin^[35,60] und Glykogen^[27,75]. Ebenso kann die Glukoneogenese durch erhöhte AMPK-Aktivität auf dem Wege der Genexpression herunterreguliert werden^[98].

AMPK kann nicht nur anabolische Stoffwechselwege hemmen, um ATP zu konservieren, sondern auch katabolische Stoffwechselwege fördern, die ATP regenerieren, beispielsweise die Fettsäure-Oxidation^[110,200]. Darüber hinaus ist AMPK fähig, die Aufnahme der Fettsäuren in die Zellen zu erhöhen^[102] und die Glukoseaufnahme zu stimulieren^[110,91]. Abbildung 5 zeigt eine Zusammenfassung dieser Funktionen der AMPK.

1.2.5 Physiologische Prozesse, an denen AMPK beteiligt ist

Bei Säugetieren kontrolliert der Hypothalamus die Nahrungsaufnahme und den Energieverbrauch des Organismus, indem er Informationen über den Ernährungszustand und den Energiebedarf integriert und verarbeitet. Dies wird durch Signale wie zirkulierende Nährstoffe (Glukose, Fettsäuren) und Hormone wie Leptin, Insulin und Ghrelin ermöglicht. Es hat sich herausgestellt, dass AMPK die Nahrungsaufnahme durch Integration verschiedener hormoneller Signale im Hypothalamus regulieren kann. Leptin, ein anorexigenes Hormon, ist in der Lage, die hypothalamische AMPK-Aktivität herunterzuregulieren^[111,8], während das orexigene Hormon Ghrelin die AMPK-Aktivität im Hypothalamus erhöht^[8,86]. Ebenso wird bei Hunger die hypothalamische AMPK-Aktivität erhöht, während eine Nahrungsaufnahme diese senkt^[111]. Darüber hinaus führt die direkte Aktivierung der AMPK im Hypothalamus zu einer gesteigerten Nah-

rungsaufnahme mit einer Zunahme der Körpergewichtes^[8,111]. Eine Hemmung dagegen reduziert die Nahrungsaufnahme und als Folge das Körpergewicht^[82,111].

Da die Nahrungsaufnahme an den Hell-Dunkel-Zyklus gebunden ist, wurde untersucht, ob die AMPK ebenso die zirkadiane Rhythmik beeinflussen kann^[199]. Der Hauptschrittmacher für das rhythmische Verhalten befindet sich bei Säugetieren im Suprachiasmatischen Nucleus (SCN) des Hypothalamus^[152]. Dieser enthält einen wichtigen Regulator für die 24-Stunden-Periode, die Casein-Kinase I ϵ (CKI ϵ)^[44]. AMPK ist in Fibroblasten der Zelllinie Rat1 in der Lage, die CKI ϵ durch Phosphorylierung zu aktivieren und die zirkadiane Dauer zu verkürzen^[199]. Ebenso wurde gezeigt, dass eine Veränderung im Essverhalten die zirkadiane Rhythmik beeinflussen kann. So neigen Mäuse mit einem Leptinmangel dazu, sich nicht nur zu überfressen und eine Fettleibigkeit auszubilden, sondern auch dazu, das Schlafverhalten und die zirkadiane Dauer zu verändern^[93].

Eine verkürzte Tageslänge oder zunehmende Dunkelheit ist ein möglicher Signalgeber für die Einleitung des Winterschlafes. Durch Untersuchungen an Mäusen, die nur im Dunkeln gehalten wurden, wurde herausgefunden, dass der AMP-Spiegel unter zirkadianer Kontrolle liegt^[223]. Der AMP-Gehalt ist im Blut von im Dunkeln gehaltenen Mäusen höher als bei Mäusen, die einem Hell-Dunkel-Zyklus ausgesetzt sind^[223]. In diesem Fall ist die AMPK indirekt an der zirkadianen Rhythmik beteiligt und hilft eine Dunkelphase zu überdauern, indem etwa Fettreserven verbraucht werden, um Energie zu gewinnen.

Im Nervensystem trägt AMPK zur Neuroprotektion bei, indem sie durch Phosphorylierung von GABA_B-Rezeptoren die Erregbarkeit der Neurone herunterreguliert^[54]. γ -Aminobuttersäure (GABA) ist ein wichtiger inhibitorischer Neurotransmitter im ZNS. Dieser bindet an GABA_A- (ionotrop) oder GABA_B- (metabotrop) Rezeptoren. Die Bindung an GABA_B-Rezeptoren vermittelt eine postsynaptische Öffnung der Kaliumkanäle, die zu einer Hyperpolarisation der Zellmembran führt. Zudem wird vermutet, dass die Transmitterausschüttung präsynaptisch gehemmt wird, indem das Öffnen von Kalziumkanälen verhindert wird^[54].

Durch starke neuronale Aktivität kommt es zu einem Anstieg der inneren Ca²⁺-Konzentration und des AMP-Spiegels. Das Ca²⁺ aktiviert die CaMKK β , die wiederum AMPK aktivieren kann. Ein AMP-Anstieg in der Zelle sorgt für die Aktivierung

der AMPK durch LKB1. Beides läuft letztendlich darauf hinaus, dass AMPK die R2-Untereinheit des GABA_B-Rezeptors phosphoryliert und dadurch die Wirkung von GABA am Rezeptor fördert.

Desweiteren spielt AMPK in der Individualentwicklung eine Rolle. In Abhängigkeit vom Energiestatus beeinflusst sie die Zellstruktur und die Mitose^[96,84]. Bei Larven von *Drosophila melanogaster* führt der AMPK-Verlust zu Störungen in der Zellpolarität, die von einem desorganisierten Aktin-Zytoskelett begleitet werden^[96]. Bei der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* wurde gezeigt, dass das AMPK-Homolog SNF1 bei Glukosemangel für die Segregation der Chromosomen während der Zellteilung verantwortlich ist^[65].

1.3 Ziel dieser Arbeit

Im vorhergehenden Abschnitt wurde dargelegt, wie stark physiologische Prozesse wie Nahrungsaufnahme, zirkadiane Rhythmik und Entwicklung von der Aktivität der AMPK abhängen. Bis heute ist allerdings unbekannt, ob diese hochkonservierte Kinase einen Einfluss auf das Lernen, die Gedächtnisbildung oder die Belohnungsinformation hat. Die AMPK nimmt in der Regulation des Zellenergiehaushaltes und bei der Steuerung des Verhaltens während der Nahrungsaufnahme eine Schlüsselrolle ein. Aufgrund dieses Verhaltensaspekts ist es möglich, dass die AMPK beim appetitiven gustatorischen Lernen eine ebenso große Rolle spielt, indem sie die Belohnungsstärke in Abhängigkeit vom Energiezustand des Organismus reguliert. Dies würde einen Zusammenhang zwischen dem zellulären Energiespiegel und dem Lernen herstellen und die Frage klären, warum hungrige Tiere besser lernen als satte Tiere.

Diese Frage soll zu Beginn dieser Arbeit am Beispiel der Fruchtfliege *Drosophila melanogaster* und später im Hauptteil dieser Arbeit mit der Honigbiene *Apis mellifera* beantwortet werden. Da für Verhaltensexperimente die schnelle Manipulation von Enzymaktivitäten äußerst wichtig ist, war es erstrebenswert die AMPK-Aktivität gezielt im Gehirn oder in einzelnen Regionen und zeitlich zu modulieren. Um dies zu erreichen, wurden in dieser Arbeit Methoden entwickelt, die eine schnelle Regulation gestatten und eine schnelle Aktivitätsmessung der AMPK erlauben.

Mit dieser gezielten Manipulation konnte gezeigt werden, dass Verhaltensreaktionen aufgrund sensorischer Wahrnehmungen bei Bienen von der Aktivität der AMPK abhängen. Dabei schließen sich folgende Fragen an:

Welche Gehirnregionen sind an der Regulation der Zuckerwasserempfindlichkeit aufgrund des Sättigungszustandes beteiligt?

Welchen Einfluss hat eine Aktivitätsveränderung der AMPK während des Lernprozesses auf das Gedächtnis?

Spielt der zelluläre Energiesensor AMPK eine Schlüsselrolle bei der Verknüpfung von Motivation und Prozessen des appetitiven Lernens?

2 Methoden und Material

2.1 Methoden

2.1.1 Larvenfütterungsexperiment mit *Drosophila melanogaster*

Bei diesem Experiment soll untersucht werden, inwieweit die Menge in der Nahrungsaufnahme durch Zusatzstoffe bei Fruchtfliegenlarven-L3 (*Drosophila melanogaster*, Wildtyp Canton S) beeinflusst werden kann. Zunächst werden Fliegen in einem Plastik-Röhrchen mit Maismehl-Fliegenfutter gehalten, wo sie einen Tag lang Eier ablegen können. Die Larven, die aus diesen Eiern schlüpfen, entwickeln sich im Fliegenfutter. Aus einem Röhrchen mit fünf Tage alten Larven (3. Larvenstadium) wird ein Löffel entnommen und das restliche Futter in einem Sieb mit Hilfe einer mit Wasser gefüllten Spritzflasche abgewaschen. Diese Larven werden nun mit einem Pinsel auf eine Agaroseplatte (3 %) gesetzt, auf der sich eine Futterpaste befindet, in die sie sich hineinfressen.

Die erste Futterpaste hat folgende Zusammensetzung:

0,8 g Trockenhefe; 0,2 g Tafelzucker; 1,1 ml Wasser +/- 52 mg AICAR (0,1 M)

Diese Menge ergibt drei haselnussgroße Stücke Paste. Die Larven bleiben 25 Minuten in diesem Futter, wobei sich die verdeckelten Agarose-Schälchen in einer dunkel gehaltenen Schale über einem Wasserbad befinden, damit die Luftfeuchtigkeit hoch genug ist und die Larven nicht austrocknen. Nach dieser Zeit werden die Larven erneut mit Wasser in ein Sieb gespült, um die Futterreste zu entfernen. Mit einem Pinsel werden die gewaschenen Larven in den Deckel eines Eppendorfgefäßes gesammelt, um dann zusammen in eine neue Futterpaste gesetzt zu werden, die dieses Mal rot gefärbt und mit NaCl versetzt ist.

Die darauffolgende zweite Futterpaste hat folgende Zusammensetzung:

0,8 g Trockenhefe; 0,2 g Tafelzucker; 1 ml NaCl-Lösung (0,1 g NaCl auf 1 ml, ca. 2 M); 0,1 ml E 124-Lösung (0,2 g E 124/1 ml Wasser) +/- 52 mg AICAR (0,1 M)

Das Salz soll die Bereitschaft zur Nahrungsaufnahme verringern, um die Wirkung des AICAR deutlich demonstrieren zu können. In einer Kontrollgruppe wird in beiden Futterpasten kein AICAR verwendet. Nach 20 bzw. 40 Minuten werden die Larven zunächst wieder gewaschen und anschließend mit dem Pinsel aus dem Sieb in Eppendorfgläser überführt (je 7 Larven pro Gefäß), die sich in einem Kühlblock auf Eis befinden. Auf diese Weise erfolgt ein schnelles Immobilisieren der Larven, damit die Tiere nicht ihren Darminhalt entleeren.

Zur Anfertigung der Homogenate werden je 7 Larven in 100 μ l PBS homogenisiert, da der Lebensmittelfarbstoff E 124 im alkalischen Milieu instabil ist. Die Homogenate werden auf Eis gelagert, bis sie für 7,5 Minuten bei 16300 g zentrifugiert werden können. Danach werden 70 μ l vom Überstand entnommen und in die Vertiefung einer transparenten 96iger Zellkulturplatte mit flachem Boden pipettiert. Um den restlichen Farbstoff aus dem Pellet zu lösen, werden 70 μ l PBS ins Eppendorfglas pipettiert und das Pellet suspendiert. Anschließend erfolgt eine zweite Zentrifugation mit den gleichen Parametern wie zuvor. Zuletzt werden wieder 70 μ l Überstand entnommen und in die entsprechende Vertiefung pipettiert. Danach erfolgt die Messung der Absorption des roten Farbstoffes bei 510 nm vs. 640 nm mit dem Tecan safire². Zum statistischen Vergleich zweier unterschiedlich behandelte Gruppen wurde der T-Test angewandt. Das Experiment wurde im Zeitraum 12.2005 bis 01.2006 durchgeführt.

2.1.2 Vorbereitung der Versuchstiere (*Apis mellifera carnica* L.)

Für die Untersuchungen an der Honigbiene *Apis mellifera carnica* L. dienten ausschließlich Sammlerbienen. Diese wurden etwa 15 Minuten nach dem Abfangen vom Stock mit Hilfe einer Plexiglaspyramide in Plastikröhrchen mit Schaumpfropfen auf Eis bis zur Bewegungsunfähigkeit gekühlt. Die immobilisierten Tiere wurden per Hand mit Textilklebeband in Metallröhrchen so fixiert, dass die Mundwerkzeuge freilagen und dass das Abdomen eine gewisse Bewegungsfähigkeit hatte. Der Kopf wurde zusätzlich mit Hilfe von Dentalwachs auf dem Textilklebeband fixiert, um ein späteres Öffnen der Schädelkapsel zu erleichtern und eine gezielte Photofreisetzung von Nukleotiden zu ermöglichen (s. Kap. 2.1.2.5). Die Schädelkapsel wurde mit Hilfe einer Rasierklinge soweit geöffnet, dass Antennen, Komplexaugen und die Ocellen nicht verletzt wurden (Abb. 6, S. 17). Dabei war darauf zu achten, dass die Antennen ihre Bewegungsfreiheit behielten. Bienen, bei denen die durch die Kasten bedingten Futterdrüsen das Ge-



Abbildung 6: Biene mit geöffneter Schädelkapsel.

hirn verdeckten, wurden vom Experiment ausgeschlossen, da bei ihnen keine gezielte Photofreisetzung von Pharmaka im Gehirn möglich ist. Die Bienen wurden in einem dunklen und mit feuchtem Papier ausgelegten Behälter aufbewahrt (70 % rel. Luftfeuchtigkeit, 20-25°C). Als Futter diente eine 1 M Sucroselösung, die mit einer Spritze in Tröpfchenform verabreicht wurde. Pro Tag wurden 6 Tropfen auf den Morgen und Abend verteilt gefüttert.

2.1.2.1 Empfindlichkeit der Rüsselreflexes

Um die Empfindlichkeit auf einen Zuckerwasserstimulus zu testen, wurden die Antennen der Bienen mit einem in Sucroselösung getauchten Zahnstocher berührt, wobei beobachtet wurde, ob der Rüssel herausgestreckt wird.

Die Zuckerempfindlichkeit wurde einerseits bei satten und andererseits bei hungrigen Bienen getestet. Für das erste Experiment wurden die Tiere bis zur Sättigung gefüttert (1 M Sucrose) bevor ihnen NPE-caged ADP oder NPE-caged ATP injiziert wurde. Vor der Freisetzung von Nukleotiden im Gehirn mit Hilfe von Licht (s. Kap. 2.1.2.5) wurden die Tiere mit einer Sucroselösung (0,3 M) getestet. Die Bienen, die den Rüssel herausstreckten, wurden vom Experiment ausgeschlossen. Nach der Photofreisetzung wurde die Empfindlichkeit der Bienen wiederholt zu bestimmten Zeiten getestet.

Im zweiten Versuch sollte bei hungrigen Tieren die Empfindlichkeit nach Freisetzung von ATP im Gehirn getestet werden. Dafür wurden die Bienen vor der Injektion nur mit zwei bis drei Zuckertropfen (1 M Sucrose) gefüttert. Genau wie beim ersten Versuch wurde die Empfindlichkeit der Bienen wiederholt nach der Freisetzung der Nukleotide getestet: zunächst mit verschiedenen Zuckerkonzentrationen (30 mM, 100 mM,

300 mM und 1000 mM Sucrose), später dann mit 30 mM Sucrose. Die Experimente wurden größtenteils im Winter 06/07 (Bienen aus dem Winterquartier) und Frühling/Sommer 2007 durchgeführt. Zur statistischen Analyse wurde der Exakte Fisher-Test angewandt.

2.1.2.2 Habituation und Dishabituation des Rüsselreflexes

Zur Habituation des Rüsselstreckreflexes (PER) wurden die Bienen im Abstand von einer Sekunde mit einem vorher in Sucroselösung (1 M) getauchten Zahnstocher wiederholt an derselben Antenne berührt. Dabei wurde beobachtet, ob der Rüssel herausgestreckt wird. Wird der Rüssel bei fünfmaliger Stimulation der Antenne hintereinander nicht mehr herausgestreckt, gilt der Rüsselreflex als habituiert^[117]. Berücksichtigt wurden nur die Tiere, die bei der ersten Stimulation einen Rüsselreflex zeigten und sich durch anschließende einmalige Stimulation der kontralateralen Antenne dishabituierten ließen, also den Rüssel wieder herausstreckten.

Damit die Tiere einen relativ konstanten Sättigungszustand aufweisen, wurden die Bienen einen Tag vor der Habituation gefangen, an dem Abend und 25 Minuten vor der ersten Habituation mit vier Tropfen Sucroselösung (1 M) gefüttert. Zur statistischen Analyse wurde für jedes Tier die Anzahl der Stimulationen gezählt, die zu einer Habituation des Reflexes führten. Jede Biene wurde einmal vor und einmal nach einer Freisetzung von Nukleotiden im Gehirn (s. Kap. 2.1.2.5) habituiert und dishabituiert. Aus der Anzahl der für die Habituation notwendigen Stimuli wurde für jedes Tier ein Quotient berechnet (notwendige Stimulation nach Behandlung / notwendige Stimulation vor Behandlung). Die Bienen für diese Experimente stammten aus dem Sommer 2006. Zum statistischen Vergleich zweier unterschiedlich behandelter Gruppen wurde der Wilcoxon Rang-Test angewandt.

2.1.2.3 Olfaktorische Konditionierung des Rüsselreflexes

Bei der klassischen olfaktorischen Konditionierung wurde ein Duftreiz als zu konditionierender Stimulus (CS) mit einem belohnenden Zuckerwasserreiz als unconditioniertem Stimulus (US) gepaart. Für den Duftreiz wurde Nelkenöl (Apotheke) benutzt, welches zunächst auf ein Filterpapier getropft, über eine Plastikspritze an beide Antennen geblasen und über einen Abzug direkt hinter der Biene rasch abgesaugt wurde. Der Zuckerwasserreiz (0,3 oder 1 M Sucrose) wurde mit Hilfe eines Zahnstochers an bei-

de Antennen (Reizdauer 0,5 s) gegeben und anschließend an den herausgestreckten Rüssel appliziert. Der Duft (CS) wurde für fünf Sekunden präsentiert. Drei Sekunden nach Beginn des Duftreizes wurde der US für fünf Sekunden appliziert. Je nach Konditionierungsprozedur wurden eine oder drei CS-US-Paarungen durchgeführt, letztere mit einem zeitlichen Intervall von zwei Minuten.

Zum Gedächtnisabruf wurden die Bienen wieder vor den Abzug gestellt und ihnen der Duftreiz für fünf Sekunden präsentiert. Dann wurde beobachtet, ob der Rüssel herausgestreckt wird. Für die Auswertung wurden auch die Bienen berücksichtigt, die während des Trainings nicht auf den Zuckerwasserreiz reagierten, da je nach Experiment die Tiere teilweise 35 Minuten vor dem Training satt gefüttert wurden (1 M Sucrose). Diesen Tieren wurde dennoch das Zuckerwasser auf dem Zahnstocher auf den nicht ausgestreckten Rüssel appliziert. Ausgeschlossen wurden die Tiere, die schon bei der ersten CS-US-Paarung positiv auf den Duft reagierten. Zur statistischen Analyse der Akquisition und des Gedächtnisabrufes wurde die Anzahl der Reaktionen jedes Tieres gezählt. Für den Vergleich mehrerer unterschiedlich behandelter Gruppen wurde der Exakte Fisher-Test angewandt. Die AICAR-Experimente wurden mit Bienen aus dem Sommer 2005/2006 durchgeführt, alle weiteren Experimente erfolgten im Sommer 2007.

2.1.2.4 Injektion der Pharmaka und NPE-caged Nukleotide

Alle Substanzen wurden manuell mit spitz ausgezogenen 5 μ l Glaskapillaren in den Thorax injiziert. AICAR (1 μ l, 0,2 M) wurde in PBS gelöst und 30 Minuten vor der Konditionierung injiziert. Das NPE-caged ADP (5 bzw. 10 mM) bzw. NPE-caged ATP (10 mM) wurde in PBS gelöst, wovon 1 μ l 30 Minuten vor der Photofreisetzung injiziert wurde (s. Kap. 2.1.2.5). Je nach Experiment wurden mit den Nukleotiden gleichzeitig verschiedene Pharmaka injiziert. Genutzt wurden der AMPK-Blocker Compound C (3,5 mM in PBS und DMSO, 1:1), der P2X/Y-Rezeptor-Antagonist PPADS (2 mM in PBS), der CaMKK-Blocker KN-93 (1 mM in PBS und DMSO, 1:1), der PKA-Blocker KT5720 (0,1 mM in PBS und DMSO, 1:1) und der PKA-Aktivator BrcAMP (1 mM in PBS).

2.1.2.5 Photofreisetzung der *caged* Nukleotide

Die Freisetzung der Nukleotide (ADP und ATP) wurde mit Hilfe eines Xenon-Blitzlampen-Systems über ein Binokular durchgeführt. Geblitzt wurden entweder das ganze Gehirn (jeweils sechsmal pro Hemisphäre) oder ausgewählte Bereiche wie Pilzkörper, Antennalloben, optische Loben und das laterale Protozerebrum (zehnmals durch eine Blende). Die Energie pro Blitz betrug 12,5 mJ. Bei Experimenten, in denen eine Gruppe geblitzt wurde, war darauf zu achten, dass nicht nur die zu blitzende Gruppe Bienen keine kastenbedingten Futterdrüsen über dem Gehirn besaß, sondern auch die anderen Gruppen in dem Experiment drüsenfrei waren.

2.1.3 Immunchemische und immunhistologische Techniken

2.1.3.1 Präparation des Bienengehirns

Für die Entnahme des Gehirns wurde der Kopf mit einem Skalpell abgeschnitten und mit Hilfe eines LötKolbens in ein Schälchen mit Wachs eingebettet und sofort auf Eis gekühlt. Die Kopfkapsel wurde dann mit einer Rasierklinge geöffnet. Der Schnitt erfolgte waagrecht, vor den Antennen beginnend bis zu den Ocellen. Anschließend konnten die Tracheen und Drüsen mit einer feinen Pinzette entfernt werden. Zur Anfertigung von Gehirnhomogenaten wurde das Gehirn nach dem Abschneiden der Ocellen und Retinae innerhalb von 30 Sekunden herausgeholt und in Homogenisationspuffer auf Eis überführt. In einem 1 ml Glas-Glashomogenisator wurde das Gewebe auf Eis homogenisiert.

Zur Anfertigung histologischer Präparate wurde das Gehirn in der Kopfkapsel zunächst 30 Minuten in 4 % Formaldehydlösung vorfixiert, dann herauspräpariert und in dieser Lösung nochmals für 3,5 Stunden auf Eis fixiert.

2.1.3.2 Immunhistologie

Die wie im vorherigen Punkt beschriebenen fixierten Bienengehirne wurden anschließend dreimal für 15 Minuten mit 0,1 M Phosphat-Puffer ausgewaschen. Zum Entwässern wurden die Gehirne zunächst mit 60 % Isopropanol behandelt. Dies kann für eine Stunde bei Raumtemperatur oder über Nacht auf einem Schüttler in der Kühlzelle bei 6°C erfolgen.

Anschließend wurden die Gehirne in einer aufsteigenden Isopropanolreihe behandelt (90 %, 100 % für je 1 h). Das absolute Isopropanol wurde in der Zeit zweimal erneuert. Danach wurden die Gehirne für jeweils eine Stunde bei 45°C in absolutem Isopropanol und bei 70°C in einem Paraffin-Isopropanolgemisch (1:1) inkubiert. Anschließend erfolgte die Behandlung der Gehirne über Nacht bei 60°C mit Paraffin. Am nächsten Morgen wurde das Paraffin erneuert und nach zwei Stunden konnten die Gehirne ausgeblockt werden.

Für die Mikrotom-Paraffinschnitte wurden kleine Paraffinblöcke zurechtgetrimmt 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 fand die Inkubation der Schnitte über Nacht bei 45°C im Trockenschrank statt.

Um eine Antikörperfärbung durchzuführen, mussten die Schnitte auf dem Objektträger zunächst entparaffiniert werden. Zunächst wurden die Objektträger in Xylol (2 mal 5 min), dann in eine absteigende Ethanolreihe überführt (96 %, 90 %, 80 %, 70 %, 50 % für je 2 min). Anschließend erfolgte die Demaskierung. Dafür wurden die Objektträger eine Minute in 0,1 M Na-Citratpuffer (pH 6) gekocht und weitere neun Minuten unter dem Siedepunkt inkubiert. Nach 20minütigem Abkühlen wurden die Objektträger fünf Minuten in Aqua dest. gewaschen und anschließend für 30 Minuten mit Blockpuffer-Tx behandelt. Daraufhin wurde der primäre Antikörper (P-AMPK-α Thr 172, AMPK-α) in Blockpuffer-Tx (1:200) aufgetragen und die Schnitte bei 4°C über Nacht inkubiert. Nach Abspülen des ersten Antikörpers wurden die Schnitte mit PBS-Tx gewaschen (3 mal 5 min) und anschließend mit dem sekundären Antikörper Anti-Rabbit IgG Alkaline Phosphatase in Blockpuffer-Tx (1:400) für 1,5 Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurde noch einmal alles mit PBS-Tx gewaschen (3 mal 5 min) und dann die Färbelösung aufgetragen. Nach erfolgreicher Färbung erfolgte ein erneutes Waschen mit PBS-Tx (3 mal 5 min).

Sämtliche Behandlungen ab der „Blockierung“ der Schnitte erfolgten in einer dunklen Schale. Zum Eindecken und Konservieren der gefärbten Schnitte wurden diese kurz mit Aqua dest. gewaschen und in einer Ethanolreihe hochgeführt (50 %, 70 %, 80 %, 96 %, 100 % für je 2 min). Zum Schluss wurden sie für fünf Minuten in Rotihistol inkubiert. Dann wurde ein Tropfen Roti-Histokitt mit Hilfe einer Glaspipette auf die Schnitte gebracht und schließlich alles mit einem Deckgläschen abgedeckt.

2.1.3.3 Proteinquantifizierung mittels ELISA

Die zu testenden Gehirnhomogenatproben wurden in die Vertiefungen der ELISA-Platte pipettiert und mit Hilfe einer Multikanal-Pipette wurde für jede Probe auf der Platte eine Verdünnungsreihe angefertigt, so dass jede Probe in fünf verschiedenen Verdünnungsschritten aufgetragen wurde. Anschließend wurden alle Reaktionsvertiefungen mit 100 μ l Homogenisationspuffer aufgefüllt. Nach einer Inkubationszeit von einer Stunde im Kühlschrank, in der die Proteine der Probe an die Kammerwände binden konnten, wurden die Proben ausgeschüttet und alle Vertiefungen komplett mit Blockpuffer befüllt, um die restlichen freien Stellen der Kammerwände zu blockieren (1,5 h im Kühlschrank). Nach dem Ausschütten des Blockpuffers wurden je 50 μ l des primären Antikörpers, gelöst in Blockpuffer (1:1000), in jede Vertiefung gegeben und über Nacht bei 6°C inkubiert.

Am nächsten Morgen wurden nach dem Waschen mit PBS (3 mal 3 min) 100 μ l des Biotin-gekoppelten sekundären Antikörpers Antirabbit IgG, gelöst in Blockpuffer (1:4000), aufpipettiert. Nach einstündiger Inkubation bei Raumtemperatur wurde wiederum drei mal drei Minuten mit PBS gewaschen und in jede Vertiefung 100 μ l Avidin-gekoppelte alkalische Phosphatase pipettiert (1:10.000 in Blockpuffer). Nach 45 Minuten bei Raumtemperatur wurde nochmals drei mal drei Minuten mit PBS gewaschen und jeweils 200 μ l ELISA-Färbelösung pro Vertiefung aufpipettiert. Anschließend wurden die Platten mit Alufolie vor Licht geschützt und bei 37°C im Wärmeschrank über Nacht inkubiert. Während dieser Zeit setzte die Phosphatase das in der Färbelösung vorliegende para-Nitrophenylphosphat als Substrat um, was zu einer Gelbfärbung führte.

Am nächsten Tag wurde die optische Dichte jeder Vertiefung mit Hilfe eines ELISA-Readers bei 405 nm gegenüber 640 nm Hintergrund gemessen, da die Intensität der Färbung Aufschluss über die Menge der zu detektierenden Proteine gibt. Als Kontrolle wurden Proben ohne Homogenat aufgetragen. Die Verdünnungsstufen der Gehirnhomogenate wurden so gewählt, dass die Messergebnisse einen linearen Zusammenhang zwischen dem Wert für die optische Dichte und der Verdünnungsstufe ergaben. So war es möglich, die Steigungen jeder Verdünnungsreihe zueinander in Beziehung zu setzen und die Antigen-Mengen einer getesteten Platte relativ zueinander zu quantifizieren. Um Steigungen von verschiedenen Platten miteinander vergleichbar zu machen oder zusammenzufassen, mussten diese zuvor auf die Platte normiert werden.

Schließlich wurde das Verhältnis zwischen phosphorylierten Antigenen und der Gesamtmenge der Antigene (P-AMPK- α Thr 172 / AMPK- α) berechnet, um Änderungen im Phosphorylierungszustand des Enzyms festzustellen. Dieses Verhältnis ist aussagekräftiger als die alleinige Analyse der einzelnen Antikörper und die daraus folgende relative Mengenbestimmung, da diese von der präparierten Gehirngröße abhängt. Zur statistischen Analyse zweier Gruppen wurde der T-Test angewandt. Die ELISA-Experimente wurden im Sommer 2006 und 2007 durchgeführt.

2.1.3.4 Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-Page)

Als Gelelektrophorese bezeichnet man die Wanderung elektrisch geladener Teilchen in einer Trägermatrix im Gleichstromfeld. Dabei wandern die Proteine mit unterschiedlicher Geschwindigkeit, da die Wanderungsgeschwindigkeit eines Proteins von der Molekülgröße und der Ladung abhängt. Wird ein Proteingemisch einer Elektrophorese unterzogen trennen sich die verschiedenen Proteine in einzelne Banden auf.

Im Rahmen dieser Arbeit erfolgte die Auftrennung der Proteine in SDS-Gelen. Die Seife SDS (Sodiumdodecylsulfat), mit der die Homogenate im Probenpuffer behandelt werden, bindet Proteine zu negativ geladenen SDS-Protein-Komplexen mit konstantem Ladungs-zu-Masse-Verhältnis. SDS denaturiert die Proteine, insbesondere nach vorheriger Reduktion mit Disulfidbrücken aufspaltendem Mercaptoethanol, und unterbindet Protein-Protein-Wechselwirkungen (Quartärstrukturen). Zusätzlich enthält der Probenpuffer die Puffersubstanz Tris und Bromphenolblau, das als wasserunlöslicher Farbstoffmarkierer fungiert. Im Unterschied zu den ELISA-Homogenaten wurde dem Homogenisationspuffer kein Harnstoff zugefügt. Dieser würde aus konzentrierten Lösungen und auch unter Raumtemperatur auskristallisieren, zudem carbamylt er Proteine und stört die Bindung von SDS. Das im Homogenisationspuffer gelöste EDTA dient als Komplexbildner für zweiwertige Kationen (Ca^{2+} , Mg^{2+}).

Die Elektrophoreseapparatur besteht aus zwei Glasplatten (10 x 10 cm). Zwischen diese wird an die seitlichen Ränder und an den unteren Rand ein 0,5 mm dicker Teflonstreifen als Abstandshalter gelegt. Die Platten werden mit Buchhalterklammern zusammengepresst und die Ränder mit erhitzter Agarose (0,5 % mit 0,1 % SDS) abgedichtet. Bei der angewandten diskontinuierlichen Gelelektrophorese (nach Laemmli 1970) wurde ein Trenngel mit 10 % Acrylamid (pH 8,8) von einem Sammelgel mit 4 % Acrylamid (pH 6,8) überschichtet. Dazu wurde das Trenngel zunächst bis zu einer Höhe von 3 cm

eingefüllt und mit wassergesättigtem n-Butanol überschichtet. Nach der Polymerisation des Gels wurde das n-Butanol mit Aqua dest. ausgespült und das Spülwasser mit Filterpapier aufgesogen. Anschließend wurde das Sammelgel eingefüllt und eine Schablone in Form eines Kammes aus Teflon eingesetzt, um im Sammelgel zehn „Taschen“ für die Proben zu erzeugen. Nachdem das Sammelgel auspolymerisiert war, wurden die Buchhalterklammern, der untere Abstandshalter und die Schablone entfernt. Die Geltaschen und die untere Öffnung wurden mit Laufpuffer gespült, um Agarsereste zu entfernen. Nachdem das Gel in eine Elektrophoreseapparatur eingesetzt wurde, konnten jeweils 20 μl Probe bzw. 5 μl des Molekulargewichtsmarkers (SeeBlue Plus2 Pre-Stained) pro Tasche eingefüllt werden.

Die Proben wurden zuvor mit Probenpuffer (5:1) behandelt und für fünf Minuten bei 95°C erhitzt, um die Proteine vollständig zu denaturieren, wobei Proteasen inaktiviert und Sekundär- und Tertiärstrukturen zerstört werden, da die Wasserstoffbrücken aufbrechen. Die Elektrophorese erfolgte bei Raumtemperatur und konstanter Stromstärke (20 mA/Gel). Dafür wurden die denaturierten Proteine auf der Katodenseite in die Geltaschen pipettiert, so dass sie beim Anlegen des Stroms aufgrund ihrer negativen Ladung zur Anode hin wanderten. Sobald die Farbstofffront (Bromphenolblau) das untere Ende des Gels erreichte, wurde die Gelelektrophorese gestoppt und das Gel geblottet.

2.1.3.5 Westernblot und Immunfärbung von Proteinen

Beim Westernblot werden Proteine von einem SDS-Gel elektrophoretisch auf eine Membran aus Nitrocellulose übertragen. Dazu wurden das Trenngel, die Nitrocellulosemembran und sechs Lagen Whatman-Papier in Blotpuffer überführt. In einer semi-dry-Transferzelle wurde das Gel unter die Membran gelegt und mit jeweils drei Lagen Whatman-Papier über- und unterschichtet. Nachdem der überflüssige Blotpuffer vorsichtig herausgepresst wurde, konnte der Transfer der Proteine vom Gel in die Membran beginnen (U=20 V, I=0,4 A, P=8 W, T=40 min).

Anschließend wurde die Membran für eine Stunde bei Raumtemperatur auf einem Schüttler in Blockpuffer, dem 0,1 % Tween 20 (Blockpuffer-Tw) beigemischt war, inkubiert. Diese Lösung diente als Blocker, der die restlichen Proteinbindungstellen der Blotmembran absättigt. Der Blot wurde dann über Nacht bei 6°C mit dem entsprechenden primären Antikörper in Blockpuffer-Tw (1:1000) auf einem Schüttler inkubiert. Am nächsten Morgen wurde der Blot nach dem Waschen mit PBS (3 mal 5 min) für

eine Stunde auf dem Schüttler mit Anti-Rabbit-IgG-Peroxidase (HRP) in Blockpuffer-Tw (1:10.000) inkubiert. Nach dem nochmaligen Waschen mit PBS auf einem Schüttler (3 mal 5 min) konnte die Chemolumineszenz-Detektion begonnen werden. Dafür wurden gleiche Volumina von Luminol-Reagenz und Peroxid-Lösung (Millipore) auf die Blotmembran aufgetragen und für fünf Minuten wirken gelassen. Die Peroxidase katalysiert Luminol in seine oxidierte Form, bei der eine Lumineszenz detektiert werden kann. Das überschüssige Substrat wurde abgegossen und der Blot in einen klaren Plastikbeutel gelegt, um den Röntgen-Film nicht zu befeuchten. Der Röntgen-Film wurde in einer Dunkelkammer auf den Blot gelegt und der Leuchtkraft entsprechend lang belichtet. Danach wurde der Film entwickelt (2 min), kurz mit Wasser gespült und fixiert (5 min). Am Ende wurde dieser nochmals unter fließendem Wasser gewaschen und getrocknet.

2.1.4 Ca²⁺-Imaging

Mit Hilfe des Ca²⁺-Imaging ist es möglich, intrazelluläre Veränderungen der Ca²⁺-Konzentration zu detektieren. Dafür wurden pro Versuchsansatz jeweils drei Bienegehirne präpariert, um einzelne Zellen zu isolieren. Die extrazelluläre Matrix, die bei Tieren aus Kollagenen und Glykoproteinen besteht, musste zunächst entfernt werden. Dazu wurde das isolierte Gehirn für 30 Minuten bei 32°C in 0,5 ml Kollagenase/Dispase-Lösung inkubiert. Um das Ablösen der Zellen zu unterstützen, wurde die Lösung mehrmals während der Inkubation durchgemischt. Nach der Zentrifugation (1400 g für 3 min) wurde das Pellet für 45 Minuten in 0,25 ml Bienenringer/Fluo-4-Lösung im Dunkeln inkubiert. Während dieses Vorgangs wurden die Zellen mit dem Fluoreszenzfarbstoff beladen. Nach erneuter Zentrifugation (1400 g für 3 min) wurde das Pellet einmal in 0,5 ml Bienenringer-Ca²⁺-Lösung gewaschen und anschließend in 0,5 ml Bienenringer-Ca²⁺-Lösung resuspendiert. Von dieser Lösung wurden je 20 µl in die Vertiefungen einer 384-well-Platte pipettiert und den Zellen 30 Minuten Zeit gelassen, um sich abzusetzen. Mit dem Mikroplattenreader wurde dann direkt vor und ca. 30 Sekunden nach einer Stimulation der Zellen mit Transmittern die Fluoreszenz bei λ=516 nm nach einer Anregung mit λ=495 nm gemessen.

Der Kalziumindikator Fluo-4 kann durch die Zellmembran diffundieren. Anschließend wird der Acetoxymethylester des Farbstoffes durch zelleigene Esterasen gespalten. In diesem Zustand ist der Farbstoff für die Membran undurchlässig geworden und kann

intrazelluläres Kalzium binden, wobei dies die optischen Eigenschaften des Farbstoffes verändert.

Die Stimulation der Zellen wurde mit ATP (10 μM) bzw. Acetylcholin (10 μM) durchgeführt, indem 1 μl einer Stammlösung (dH₂O und Bienenringer-Ca²⁺-Lsg., 1:4) dazupipettiert wurde. Um die inhibitorische Wirkung von PPADS mit einer Endkonzentration von 2,5 μM (IC₅₀=0,1-5 μM) zu untersuchen, wurde auch hier 1 μl einer Stammlösung (dH₂O und Bienenringer-Ca²⁺-Lsg., 1:4) dazupipettiert. Als negative Kontrolle wurde nur Bienenringer-Ca²⁺-Lösung benutzt.

Für die Auswertung wurden pro Vertiefung je fünf Emissionswerte vor und nach der Stimulation gemessen. Aus diesen wurde der Mittelwert berechnet und anschließend ein Verhältnis gebildet (nach Stimulation / vor Stimulation). Für den Vergleich der unterschiedlichen Gruppen wurden diese auf die Kontrolle normiert und zuerst mit dem Kruskal-Wallis-Test und danach mit dem Wilcoxon Rang-Test ausgewertet. Das Experiment wurde mit Bienen aus dem Sommer 2007 durchgeführt.

2.2 Material

2.2.1 Chemikalien

1-Butanol (wassergesättigt)	Z-Chem
2-Mercaptoethanol	Merck
Acetylcholin	Sigma
Agar Agar	Z-Chem
APS (Ammoniumperoxodisulfat)	Z-Chem
ATP (Adenosintriphosphat)	Sigma
BCIP (5-Brom-4-Clor-3-Indolylphosphat)	Appli Chem
Bromphenolblau (3',3'',5',5''-Tetrabromphenolsulfonphthalein-Na-Salz)	Appli Chem
BSA (Rinder Albumin Fraktion V)	Roth
CaCl ₂ (Calciumchlorid)	Z-Chem
Chemolumineszenz-HRP-Substrat (Luminol Reagenz, Peroxid)	Millipore
DMSO (Dimethylsulfoxid)	Z-Chem
E 124 (Lebensmittelfarbstoff)	Z-Chem
EDTA (Dinatriumsalz-Dihydrat)	Z-Chem
Ethanol	Z-Chem
Fluo-4-AM (Fluoreszenzfarbstoff)	Invitrogen
Glucose	Z-Chem
Glycerin	Z-Chem
Glycin	Roth
KCl (Kaliumchlorid)	Merck
KH ₂ PO ₄ (Kaliumdihydrogenphosphat)	Merck
Kollagenase/Dispase	Roche
Methanol	Z-Chem
MgCl ₂ 6H ₂ O (Magnesiumchlorid)	Merck
NaCl (Natriumchlorid)	Z-Chem
NaHCO ₃ (Natriumhydrogencarbonat)	Z-Chem
Na ₂ HPO ₄ 2H ₂ O (Dinatriumhydrogenphosphat-2-Hydrat)	Z-Chem
NaOH (Natriumhydroxid)	Z-Chem
NBT (Nitroblue-Tetrazoliumchloride)	Appli Chem
Nelkenöl	Apotheke

para-Formaldehyd	Z-Chem
p-NPP (para-Nitrophenylphosphat-Dinatriumsalz-Hexahydrat)	Appli Chem
Paraffinwachs	Fluka
Poly-L-Lysin	Sigma-Aldrich
Roti-Histokitt	Roth
Rotihistol	Roth
Rotiphorese Gel 30 (0,8 % Bisacrylamid, 30 % Acrylamid)	Roth
SDS (Natriumdodecylsulfat)	Roth
Temed (N,N,N',N'-Tetramethylethylenediamine)	Appli Chem
Tris (Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan)	Sigma
Triton X-100 (Polyethylen-glycol-tert-octylphenylether)	Fluka
Tween 20 (Polyoxyethylensorbitanmonolaurat)	Appli Chem
Urea	Z-Chem
Xylol	Z-Chem

2.2.2 Puffer und Lösungen

Bienenringer-Ca ²⁺ -Lösung:	145 mM NaCl 5,6 mM KCl 1,7 mM CaCl ₂ 2,4 mM NaHCO ₃ 14 mM Glucose
Bienenringer/Fluo-4-Lösung (2 μM):	10 μl Fluo-4 Stammlsg. (s.u.) in Bienenringer-Ca ²⁺ -Lsg.
Blockpuffer: (für ELISA)	0,5 % BSA in PBS (s.u.)
Blockpuffer-Tw: (für Westernblot)	0,5 % BSA 0,1 % Tween 20 in PBS (s.u.)

Blockpuffer-Tx: (für Immunhistologie)	0,5 % BSA 0,1 % Triton X-100 in PBS (s.u.)
Blot-Puffer:	0,2 M Glycin 20 % Methanol 0,25 M Tris
Kollagenase/Dispase-Lösung:	100 μ l Koll./Dis.-Stammlsg. (s.u.) in 9,9 ml PBS
Kollagenase/Dispase-Stammlösung:	10 mg Kollagenase/Dispase in 100 μ l dH ₂ O
Färbelösung: (für ELISA)	1 mM p-NPP in RxN-Puffer (s.u.)
Färbelösung: (für Immunhistologie)	1 mg NBT in 10 ml RxN-Puffer (s.u.) 2 mg BCIP in 50 μ l DMSO
Fluo-4-Stammlösung:	50 μ g Fluo-4 in 45,6 μ l DMSO
Formaldehydlösung: (für Immunhistologie)	50 ml 8 % para-Formaldehyd 50 ml 0,2 M Phosphatpuffer (s.u.) mit 1 M NaOH gelöst
Homogenisationspuffer: (für ELISA)	1 M UREA 1 mM EDTA in PBS (s.u.)

Homogenisationspuffer: (für SDS-Page)	1 mM EDTA in PBS (s.u.)
Laufpuffer (10 x konzentriert): (für SDS-Page)	2 M Glycin 1 % SDS 0,25 M Tris
PBS:	2,7 mM KCl 1,8 mM KH_2PO_4 137 mM NaCl 10,1 mM Na_2HPO_4
Phosphatpuffer: Stammlösung A Stammlösung B 2 Teile Stammlösung A + 8 Teile Stammlösung B	0,2 M KH_2PO_4 0,2 M $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$
Probenpuffer pH 6,8 HCl (5fach konzentriert): (für SDS-Page)	10 mM 2-Mercaptoethanol 0,05 % Bromphenolblau 20 % Glycerin 10 % SDS 0,2 M Tris
R x N-Puffer:	1 mM $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 0,1 M Tris-HCl pH 8,7
Sammelgel 4 % (2 ml): (für SDS-Page)	1,193 ml Aqua dest. 0,010 ml 10 % APS 0,267 ml Rotiphorese Gel 30 0,500 ml Sammelgelpuffer (s.u.) 0,025 ml 20 % SDS 0,005 ml Temed

Sammelgelpuffer pH 6,8 HCl: (für SDS-Page)	0,5 M Tris
Trenngel 10 % (4 ml): (für SDS-Page)	1,617 ml Aqua dest. 0,020 ml 10 % APS 1,333 ml Rotiphorese Gel 30 1,000 ml Trenngelpuffer (s.u.) 0,020 ml 20 % SDS 0,010 Temed
Trenngelpuffer pH 8,8 HCl: (für SDS-Page)	1,5 M Tris

2.2.3 Antikörper und Pharmaka

Primäre Antikörper:

AMPK- α Antibody	Cell Signalling
Phospho-AMPK- α (Thr 172) (40H9) Rabbit mAb Antibody	Cell Signalling

Sekundäre Antikörper:

Anti-Rabbit IgG Biotin Conjugate (ELISA)	Sigma
--	-------

Enzyme:

Anti-Rabbit IgG Alkaline Phosphatase Conjugate (Histo)	Sigma
Anti-Rabbit IgG Peroxidase Conjugate (Westernblot)	Sigma
ExtrAvidin-Alkaline Phosphatase (ELISA)	Sigma

caged Nukleotide:

NPE-caged ADP (Adenosine 5'-diphosphate, P ² -(1-(2-nitrophenyl)ethyl) ester, monopotassium salt)	Invitrogen
NPE-caged ATP (Adenosine 5'-triphosphate, P ³ -1-(2-Nitrophenyl)ethyl Ester, 2Na)	Calbiochem

Molekulargewichtsmarker:

SeeBlue Plus2 Pre-Stained

Invitrogen

Pharmaka:

8-BrcAMP (PKA-Aktivator)

Calbiochem

AICAR (AMPK-Aktivator)

Sigma-Aldrich

Compound C (AMPK-Inhibitor)

Calbiochem

KN-93 (CaMKK-Inhibitor)

Calbiochem

KT5720 (PKA-Inhibitor)

Calbiochem

PPADS (P2X/Y-Purinrezeptorblocker)

Sigma-Aldrich

2.2.4 Verbrauchsmaterialien

384-*well*-Platten (schwarz)

Nunc

96-*well*-Platten Immulon 1B (medium binding)

Thermo Labsystems

Capilettor Stick (1 - 5 μ l)

Selzer

Capilettor Tips Glaskapillaren (1 - 5 μ l)

Selzer

Deckgläser (24 x 50 mm)

Roth

Dentalwachs (medium)

Ubert

Eindeckmedium Roti-Histokitt

Roth

Fliegenfutter

eigene Herstellung

Luminol-Reagenz und Peroxid-Lösung

Millipore

Nitrocellulose-Membran (Optitran BA-S 85)

Schleicher und Schuell

Objektträger Super Frost weiß

Roth

Pasteurpipetten

Roth

Pinsel (klein)

Geschäft

Plastik-Röhrchen (Fliegen)

Greiner

Reaktionsgefäße (1,5 ml)

Eppendorf

Röntgenfilm BioMax Xar Film

Kodak

Röntgenfilm-Entwickler REF 103482

Tetenal

Röntgenfilm-Fixierer REF 103655

Tetenal

Silikon (Baysilone-Paste mittelviskos)

Bayer

Tafelzucker (Sucrose)

Geschäft

Teesieb	Geschäft
Trockenhefe	Drogerie
Whatman-Papier	Schleicher und Schuell
Zahnstocher	Drogerie
Zellkulturplatten (96-well)	TPP

2.2.5 Geräte

1 ml-Glashomogenisator mit Glas-S-Stößel	Braun
Bienenröhrchen (Kupfer)	eigene Herstellung
Bienenracks	eigene Herstellung
Binokular S6D	Leica
Block-Heizgerät (Accu Block)	Labnet
Blotkammer	Owl
ELISA-Reader safire ²	Tecan
Folienschweißgerät	Severin
Gelelektrophoreseapparatur	eigene Herstellung
Kaltlichtquelle KL 1500 LCD	Schott
LötKolben	eigene Herstellung
Mikropipetten Puller Model	P-87 Sutter Instrument Co.
Mikroskop Leitz DMRB	Leica
Mikrotom Autocut 2040	Reichert-Jung
Operation Manual Xenon Flashlamp System JML-C2	Rapp PtoElectronic
pH-Meter (inoLab pH 730)	WTW
Powerstation 300 PLUS	Labnet
Rührheizgerät IKA RCT basic	IKA-Labortechnik
Schüttler KS501 digital	IKA-Labortechnik
Switching Power DPS-4005 PFC	Voltkraft
Vortex VX 100	Labnet
Waage CP3202S und CP225D	Sartorius
Zentrifuge (Spectrafuge 24D)	Labnet

3 Ergebnisse

In dieser Arbeit soll die Rolle des „Zellenergiesensors“ AMPK bei Lern- und Gedächtnisprozessen untersucht werden, um die Ursache für den Zusammenhang zwischen dem Sättigungszustand und dem appetitiven Lernen zu finden.

Bis heute ist nur eine Methode der künstlichen Aktivierung von AMPK bekannt: die Verwendung von AICAR. Damit ist es zum Beispiel bei Ratten gelungen, die AMPK im Hypothalamus zu aktivieren und die Tiere dadurch künstlich „hungrig“ zu machen^[8]. Dafür wird AICAR, ein Adenosin-Analogon, über einen Adenosin-Transporter in die Zellen aufgenommen^[47] und durch die Adenosin-Kinase zu einem AMP-Analogon (ZMP) umgesetzt^[201]. Bei Insekten ist bis dato keine Wirkung durch AICAR bekannt. Aus diesem Grund soll nun untersucht werden, ob AICAR bei Insekten ebenfalls zu einer Veränderung hinsichtlich des Verhaltens bei der Nahrungsaufnahme und der Gedächtnisbildung führt.

3.1 Einleitende Untersuchungen zur Wirksamkeit von AICAR bei Insekten

3.1.1 AICAR erhöht die Nahrungsaufnahme bei Larven von *Drosophila melanogaster*

Ziel des Experimentes war es, durch AICAR verursachte Veränderungen in der Nahrungsaufnahme der *Drosophila melanogaster*-Larven (L3) festzustellen. Dies sollte mit Hilfe rot gefärbter Hefepaste untersucht werden, die mit AICAR behandelt wurde. Dafür wurden die Larven auf das gefärbte Futter gesetzt und nach definierten Zeiten abgesammelt und homogenisiert, um den Farbstoff aus dem Darminhalt herauszulösen. Letztendlich wird die Absorption des roten Farbstoffes gemessen, der ein relatives Maß für den Darminhalt darstellt.

Voruntersuchungen hatten ergeben, dass hungrige Larven (2 h ohne Futter) über einen Zeitraum von zwei Stunden stetig Nahrung zu sich nehmen, wenn sie auf das gefärbte Futter gesetzt werden (ohne Abb.). Damit wurde der Zeitraum festgelegt, in dem eine Veränderung im Fressverhalten detektiert werden kann. Um die Bereitschaft

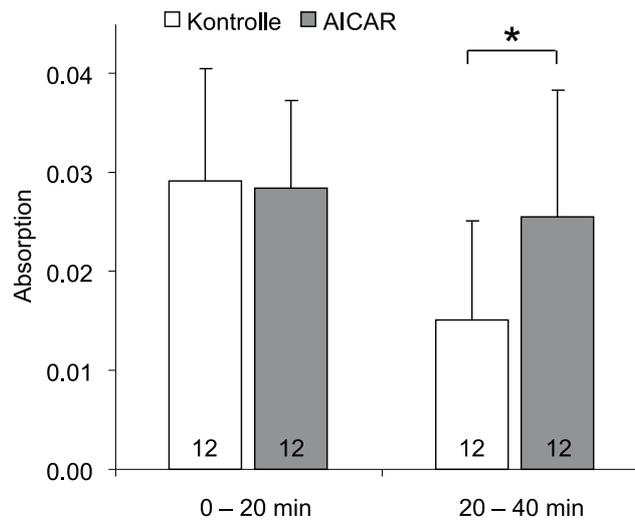


Abbildung 7: Veränderung der Menge des Darminhaltes bei *Drosophila melanogaster* als Veränderung des Absorptionssignals nach Einsatz von AICAR.

Dargestellt ist die relative Veränderung der Menge des Darminhaltes nach 20 Minuten und zwischen 20 und 40 Minuten auf gefärbter und mit 2 M NaCl behandelter Futterpaste. Eine zusätzliche Kontrollgruppe, die nur mit der ersten farblosen und unbehandelten Hefepaste für 25 Minuten behandelt wurde, um ein Maß für die natürliche Absorption der Larven zu erhalten, ist bei den beiden gezeigten Gruppen herausgerechnet. Dargestellt sind die Mittelwerte der Absorptionen und die s.d.. In den Balken ist die Anzahl der Proben für die jeweilige Gruppe angegeben. Mit einem Stern gekennzeichnet sind Werte, die sich signifikant voneinander unterscheiden (T-Test $p < 0,05$).

zur Nahrungsaufnahme zu verringern, wurde den Larven eine salzige Hefepaste vorgesetzt, damit die Wirkung von AICAR, das zur übermäßigen Nahrungsaufnahme führen soll, nachgewiesen werden kann. Zunächst musste die richtige NaCl-Konzentration festgestellt werden, bei der die Larven kaum noch Nahrung zu sich nehmen. Zu diesem Zweck wurden Fütterungsexperimente mit unterschiedlichen Salzkonzentrationen in der gefärbten Futterpaste durchgeführt. Die verschiedenen Pasten enthielten entweder kein Salz oder 1, 2 und 4 M NaCl-Lösung. Es stellte sich heraus, dass die Larven in Abhängigkeit von der jeweiligen NaCl-Konzentration in der Paste unterschiedlich viel von diesem Futter aufnahmen (ohne Abb.). Mit höherem NaCl-Gehalt sank die Nahrungsaufnahme auf dieser Futterpaste innerhalb von 20 Minuten. Die Larven nahmen überhaupt kein Futter mehr auf, wenn die Futterpaste 4 M NaCl enthielt. Aus diesem Grund wurde für anschließende Experimente eine Hefepaste mit 2 M NaCl genutzt.

Im Anschluss an die beschriebenen Vorversuche wurde das AICAR eingesetzt. Dafür wurden die Larven zunächst mit einer neutralen Paste, die weder Farbe noch Salz enthielt, für 25 Minuten vorbehandelt. Da das AICAR nur schlecht in die Larven inji-

ziert werden kann, wurde dieser Wirkstoff bei einer Gruppe sowohl in der ersten als auch in der zweiten Futterpaste gelöst. Das AICAR wurde also nicht injiziert und konnte so nicht sofort ins Gewebe gelangen, sondern musste mit dem Futter aufgenommen werden. Somit hatte der Wirkstoff genügend Zeit, seine Wirkung zu entfalten. Zudem bestand die Möglichkeit, einen erst nach längerer Zeit auftretenden Effekt auf das Fressverhalten zu beobachten. Würden die Tiere von Beginn an gefärbtes Substrat aufnehmen, wäre es nicht mehr möglich, nach längerer Zeit einen Unterschied im Fressverhalten festzustellen, da der Darm bei jedem Tier gleich voll gefüllt wäre.

Aus Abbildung 7 (S. 35) geht hervor, dass es in den ersten 20 Minuten auf der rot gefärbten und salzigen Futterpaste keinen Unterschied in der Aufnahme der Nahrungsmenge zwischen beiden Gruppen gibt. Nach weiteren 20 Minuten ist aber ein großer Unterschied zwischen den beiden Larvengruppen zu erkennen. Die Tiere, die mit den beiden Futterpasten zusätzlich das AICAR aufgenommen hatten, zeigen eine übermäßige Nahrungsaufnahme. Somit ist nachgewiesen, dass das AICAR etwa 45 Minuten nach der Aufnahme zu wirken beginnt und die Nahrungsaufnahme erhöht.

3.1.2 AICAR verbessert das Lernen bei *Apis mellifera*

Im Kapitel zuvor wurde erstmalig gezeigt, dass eine AICAR-Behandlung auch bei Larven von *Drosophila melanogaster* wirkt, indem es ihren „Appetit“ anregt. Bei *Apis mellifera* sollte nun getestet werden, ob eine AICAR-Behandlung und eine dementsprechend erwartete Appetitanregung zu einer Verbesserung des Lernens führt. Schließlich ist das gustatorische Lernen bei der Biene eng mit dem Sättigungszustand verbunden. Dies ist daran zu erkennen, dass hungrige Bienen besser lernen als satte Bienen^[46]. Im folgenden Experiment wurde erwartet, dass gefütterte Bienen, denen AICAR vor dem Training appliziert wurde, ein besseres Gedächtnis bilden als die unbehandelten Tiere.

Die folgende Abbildung 8 (S. 37) erläutert den Versuchsaufbau für die Konditionierung mit AICAR-Behandlung. Die Bienen wurden circa zwei Stunden vor dem Training mit drei Tropfen Zuckerwasser (1 M Sucrose) gefüttert. Etwa eine halbe Stunde vor dem Training wurde eine Hälfte der Bienen mit PBS (Kontrolle), die andere mit in PBS gelöstem AICAR behandelt, welches in den Thorax injiziert wurde.



Abbildung 8: Versuchsaufbau für die klassische Konditionierung des Rüsselreflexes bei *Apis mellifera* mit AMPK-Stimulation durch AICAR vor der Konditionierung.

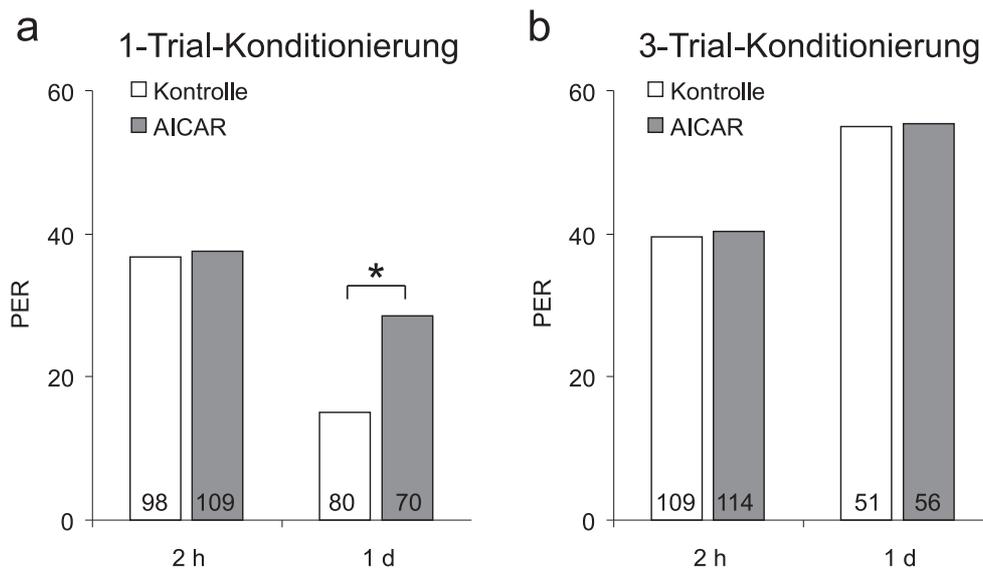


Abbildung 9: 1-Trial-Konditionierung **(a)** und 3-Trial-Konditionierung **(b)** des Rüsselreflexes bei *Apis mellifera* mit und ohne AICAR-Behandlung 30 Minuten vor dem Training bei gefütterten Tieren. **a)** Der Einsatz von AICAR führt einen Tag nach der 1-Trial-Konditionierung zu einem verbesserten Gedächtnis. **b)** Bei der 3-Trial-Konditionierung hingegen führt AICAR zu keiner Gedächtnisverbesserung. Dargestellt ist der PER [%] der Bienen, die auf den Nelkenduft (CS) reagiert haben. In den Balken ist die Anzahl der Bienen für die jeweilige Gruppe angegeben. Mit einem Stern gekennzeichnet sind Werte, die sich signifikant voneinander unterscheiden (Chi-Quadrat-Test $p < 0,05$)

Auf diese Weise hat die Droge Zeit, bis ins Gehirn zu gelangen und die AMPK zu stimulieren. Schließlich wurden die Bienen konditioniert: in einem Experiment nur ein einziges Mal, in einem zweiten wurde dagegen eine 3-Trial-Konditionierung mit einem Trainingsintervall von zwei Minuten durchgeführt. Nach zwei Stunden sowie einen Tag später wurde das Gedächtnis abgerufen.

Abbildung 9a (S. 37) zeigt die Lernquote der Bienen zwei Stunden sowie einen Tag nach der 1-Trial-Konditionierung. Es ist zu erkennen, dass beide Gruppen zwei Stunden nach dem Training ein Gedächtnis von fast 40 % zeigen. Nach einem Tag allerdings weisen die mit AICAR behandelten Bienen eine Lernquote von fast 30 % dieser CS-US-Paarung auf, während bei der Kontrollgruppe nur von 15 % diese Assoziation abgerufen werden kann ($p_{1d} = 0,0481$). Bei der 3-Trial-Konditionierung gibt es keinen Unterschied zwischen den beiden Gruppen (Abb. 9b). Beide Gruppen zeigen nach zwei Stunden eine Lernquote von etwa 40 % und nach einem Tag von etwa 55 %.

Wahrscheinlich ist es sehr schwierig bis gar unmöglich, einen Gedächtniseffekt durch AICAR zu verursachen, wenn die Bienen von vornherein schon ein gutes Gedächtnis bilden würden, wie dies in der 3-Trial-Konditionierung zu beobachten war. Dies ist auch ein Grund dafür, warum die Tiere zwei Stunden vor dem Training gefüttert wurden. Werden beispielsweise hungrige Bienen trainiert und dies erfolgt in einer 3-Trial-Konditionierung, kann kaum ein noch besseres Gedächtnis ausgebildet werden.

3.1.3 AICAR hat keinen Einfluss auf den Gedächtnisabruf bei *Apis mellifera*

Im folgenden Test sollte untersucht werden, ob eine erwartete AMPK-Aktivierung bei gefütterten Bienen einen Einfluss auf den Gedächtnisabruf hat. Dazu fand die AMPK-Behandlung nicht vor dem Training sondern danach statt, und zwar 30 Minuten vor dem 2-Stunden-Gedächtnisabruf. Das Schema (Abb. 10, S. 39) zeigt den Versuchsaufbau. Damit die Bienen gut lernen, wurden sie 16 Stunden lang nicht gefüttert und danach dreimal hintereinander im Abstand von zwei Minuten konditioniert. Nach 90 Minuten erfolgte die AICAR-Behandlung, ein paar Minuten später die Fütterung und anschließend der Gedächtnisabruf. Die Fütterung sollte dabei den Gedächtnisabruf verringern, der dann wiederum mit der AICAR-Behandlung erhöht werden sollte.

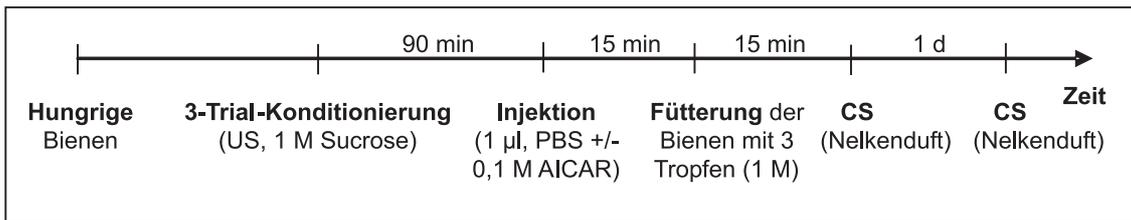


Abbildung 10: Versuchsaufbau für die klassische Konditionierung des Rüsselreflexes bei *Apis mellifera* mit AMPK-Stimulation durch AICAR 30 Minuten vor dem 2-Stunden-Gedächtnisabruf.

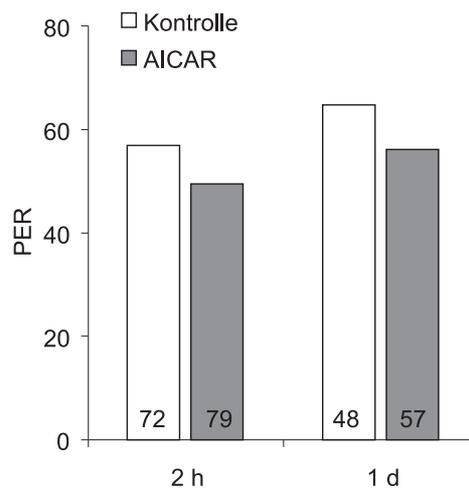


Abbildung 11: 3-Trial-Konditionierung des Rüsselreflexes bei *Apis mellifera* mit AICAR-Behandlung 30 Minuten vor dem 2-Stunden-Gedächtnisabruf bei gefütterten Tieren.

Die Behandlung mit AICAR 30 Minuten vor dem 2-Stunden-Abwurf, führt zu keiner Veränderung im Gedächtnis und hat auch einen Tag nach der Konditionierung keinen weiteren Einfluss auf das Gedächtnis. Dargestellt ist der PER [%] der Bienen, die auf den Nelkenduft (CS) reagiert haben. In den Balken ist die Anzahl der Bienen für die jeweilige Gruppe angegeben. Mit einem Stern gekennzeichnet sind Werte, die sich signifikant voneinander unterscheiden (Chi-Quadrat-Test $p < 0,05$).

Es ist zu erkennen (Abb. 11), dass die AICAR-Behandlung in diesem Fall keinen Einfluss auf das Gedächtnis hat. Weder nach zwei Stunden noch einen Tag später unterscheiden sich die Gedächtnisse der beiden Gruppen voneinander. Dies könnte sogar bedeuten, dass die AMPK-Stimulation während eines Gedächtnisabrufes keinen Einfluss auf den Rekonsolidierungsprozess des Gedächtnisses hat. Um dies zu klären, sind weitere Kontrollexperimente notwendig. Es lässt sich auch noch nicht beurteilen, inwieweit die Gedächtnisverbesserung einen Tag nach der 1-Trial-Konditionierung von der AMPK-Aktivität abhängt.

Jetzt wäre es wünschenswert mit diesem Pharmakon weiterzuarbeiten, um verschiedene Gedächtnisprozesse zu untersuchen. Bei der Beurteilung, ob dies mit AICAR möglich ist, spielen folgende Fragen eine entscheidende Rolle:

Wie soll mit einer AICAR-Injektion in den Thorax ganz gezielt nur das Gehirn behandelt werden? Selbst bei Injektion in den Kopf würde das AICAR nach gewisser Zeit durch den ganzen Bienenkörper diffundieren und die AMPK stimulieren. Außerdem ist diese Methode viel zu langsam, um die Aktivität in kurzer Zeit zu verändern.

Wie soll untersucht werden, zu welchem Zeitpunkt die AMPK-Aktivierung beim Lernen eine wichtige Rolle spielt, wenn es nicht möglich ist, ein genaues Aktivierungsfenster festzulegen? Ob zum Beispiel eine Aktivierung der AMPK während oder nach dem Training notwendig ist, wäre mit dieser Behandlung schwer nachweisbar.

Es ist letztendlich also nicht möglich, die AMPK mit dem gewöhnlichen Einsatz von AICAR gezielt in gewünschten Regionen und zum gewünschten Zeitpunkt - was für Verhaltensexperimente äußerst wichtig ist - zu manipulieren. Aus diesem Grund wurde in dieser Arbeit erstmalig eine Methode angewendet, die es ermöglicht, AMPK am gewünschten Ort und zur geforderten Zeit zu aktivieren: die Freisetzung von Nukleotiden mit Hilfe von Lichtbestrahlung. Dazu wird den Bienen biologisch inaktives ADP (NPE-caged ADP) in den Thorax injiziert, von wo aus es über die Hämolymphe in das Gehirn diffundieren kann. Diese modifizierte Form von ADP ist membrangängig und primär wirkungslos. Durch ein Fenster im Kopf, welches ungehinderten Zugang zum Gehirn ermöglicht, kann das ADP durch Lichtblitze gezielt im Gehirn und sogar in ausgewählten Regionen freigesetzt werden. Dabei wird aus dem inaktiven Nukleotid in der Zelle biologisch aktives ADP, wobei die ADP-Konzentration lokal erhöht wird, was zu einer AMPK-Aktivierung führt. Somit ergibt sich die Möglichkeit, gezielt räumlich und zeitlich die Aktivität der AMPK zu manipulieren und mit dem Verhalten der Tiere zu korrelieren.

Des Weiteren stellt sich die Frage nach der Aktivitätsmessung der AMPK. Es muss möglich sein, kurzfristige Veränderungen in der Aktivität zu detektieren. Die üblichen Methoden der Immunpräzipitation, bei denen zur darauffolgenden AMPK-Aktivitätsmessung ein spezifisches Peptidsubstrat (SAMS) umgesetzt wird^[210], sind zu langwierig. Die AMPK könnte sich während der Messung in ihrer Aktivität verändern, da sie durch andere Kinasen beeinflusst wird. Dies hat dann nichts mehr mit dem ursprünglichen Zustand zur Zeit der gewünschten Messung zu tun.

Um die AMPK-Aktivität zeitlich genau eingrenzen zu können, wurde nicht diese langwierige Methode genutzt, sondern das Gehirn zum fraglichen Zeitpunkt schnell isoliert und sofort in Homogenisationspuffer mit Harnstoff auf Eis überführt, um alle enzymatischen Reaktionen zu stoppen. Die Harnstoffbehandlung würde zudem die gewöhnliche Umsetzung des Peptidsubstrates verhindern. Somit kann der „eingefrorene“ Aktivitätszustand der AMPK bestimmt werden.

Danach ist es mit der ELISA-Technik möglich, mit Hilfe von Antikörpern die Gesamtmenge der AMPK- α -Untereinheit zu bestimmen und den Anteil, der am Threonin 172 phosphoryliert ist. Da der Phosphorylierungszustand dieser Region ein Indikator für die Aktivität des Enzyms ist^[8,53,178], können die beiden Antikörper ins Verhältnis gesetzt (P-AMPK- α (Thr 172) / AMPK- α) genutzt werden, um Aktivitätsunterschiede zu finden. Vor dem Einsatz der Antikörper müssen diese zunächst auf die Spezifität gegen die AMPK- α -Untereinheit getestet werden.

3.2 Die AMPK- α -Untereinheit: Detektion und Lokalisation im Gehirn von *Apis mellifera*

3.2.1 Spezifität der verwendeten Antikörper bei *Apis mellifera*

Um die Spezifität der Antikörper zu testen, wurde zunächst ein Sequenzabgleich durchgeführt. Dabei wird die Aminosäure-Sequenz, die der kommerzielle Antikörper detektiert (zum Beispiel Mensch, Ratte), mit der Aminosäure-Sequenz des Proteins im Zielorganismus, in diesem Fall der Biene, verglichen. Im Folgenden sind die Übereinstimmungsbereiche der Sequenzen für die zwei verwendeten Antikörper aufgeführt. In der obersten Reihe ist die Sequenz zu sehen, die der Antikörper im Menschen detektiert, in der untersten Reihe die zu testende Region in der Biene und dazwischen die Übereinstimmung beider Sequenzen. Der erste Antikörper (Phospho-AMPK- α (Thr 172) (40H9) Rabbit mAb Antibody) ist in der Lage, die AMPK- α -Untereinheit zu detektieren, wenn diese am Threonin 172 phosphoryliert ist. Dies ist im Zustand einer erhöhten Aktivität des Enzyms der Fall. Es ist zu erkennen, dass bei beiden Spezies eine vollständige Übereinstimmung im Bereich des Threonin (T) vorliegt, die der Antikörper detektiert.

Phospho-AMPK- α (Thr 172) (40H9) Rabbit mAb Antibody

<i>H. sapiens</i>	166	DGEFLRTSCGSPNYA	180
Übereinstimmung		DGEFLRTSCGSPNYA	
<i>A. mellifera</i>	169	DGEFLRTSCGSPNYA	183

Ebenso wichtig ist es, einen Antikörper zu verwenden, der die AMPK- α -Untereinheit unabhängig von Phosphorylierungen detektiert, um die Gesamtmenge der AMPK- α bestimmen zu können. Dazu ist der zweite Antikörper (AMPK- α Antibody) in der Lage.

AMPK- α Antibody

<i>H. sapiens</i>	22	VKIGHYILGDTLGVGTFGKVKVKGKHELTGHKVAVKILNR	60
Übereinstimmung		VKIGHY LG TLGVGTFGKVK+G+H LT HKVAVKILNR	
<i>A. mellifera</i>	14	VKIGHYTLGQTLGVGTFGKVKIGEHVLTGHKVAVKILNR	52

Der Vergleich des N-terminalen Endes der AMPK- α des Menschen, die dieser Antikörper detektiert, zeigt ebenfalls eine große Übereinstimmung mit dem N-terminalen Ende der in der Biene gefundenen Sequenz für AMPK- α . Mit Hilfe der beiden Antikörper

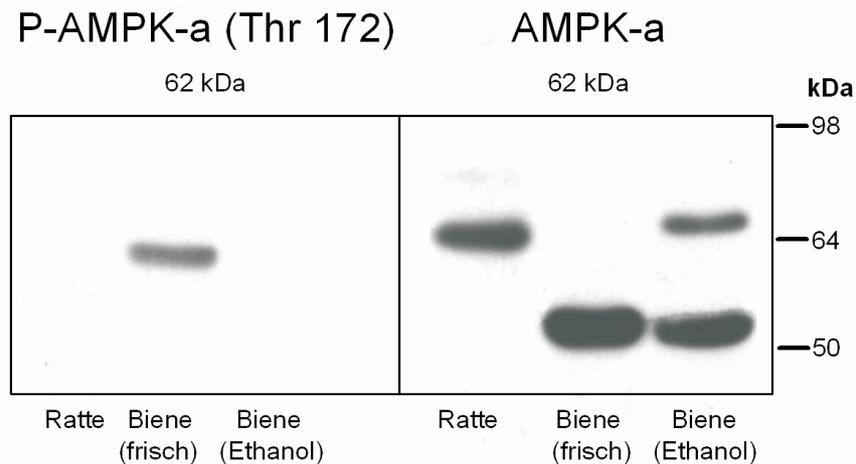


Abbildung 12: Westernblot-Analyse von Gehirnhomogenaten der Ratte (*Rattus norvegicus*) und der Honigbiene (*Apis mellifera*), bei Verwendung von P-AMPK- α (Thr 172) (40H9) Rabbit mAb (links) und AMPK- α -Antikörpern (rechts). Die Proben stammten bei der Ratte aus eingefrorenen Präparaten, bei der Biene einerseits aus frisch präparierten und andererseits aus mit 50 % Ethanol vorfixierten Gehirnen.

per ist es nun möglich festzustellen, wie viel von der Gesamtmenge der α -Untereinheit am Threonin 172 phosphoryliert ist, um Aktivitätsunterschiede zu messen. Allerdings sagt dies noch nichts über die Verwendbarkeit der Antikörper in der Biene aus. Um zu testen, ob die zwei Antikörper auch wirklich die entsprechenden Antigene in der Biene nachweisen können, wurde ein Westernblot durchgeführt. Abbildung 12 zeigt, dass die AMPK- α -Untereinheit im Bienenhirn nachgewiesen werden kann.

Zum einen wurde ein unbehandeltes Bienenhirn-Homogenat als Probe verwendet, welches nur mit dem Homogenisationspuffer behandelt wurde, zu dem sofort nach der Homogenisation der Probenpuffer gegeben wurde. Zum anderen wurden - um eine noch schnellere Fixierungsmethode zu erproben - Bienen vor der Homogenisation einer Ethanolfixierung unterworfen. Dafür wurde das Bienenhirn noch in der Kopfkapsel liegend zunächst für 10 Minuten bei -5°C mit 50 % Ethanol behandelt, anschließend herauspräpariert und ohne Drüsen für weitere 30 Minuten bei -5°C in 50 % Ethanol inkubiert. Als Kontrolle diente das Homogenat eines Rattencortex, welches nur mit dem Homogenisationspuffer und anschließend mit dem Probenpuffer behandelt wurde. Der Rattencortex war eine bei -20°C eingefrorene Gehirnprobe unbekanntes Alters.

Im Westernblot (Abb. 12) ist zu erkennen, dass der Antikörper, der die phosphorylierte AMPK- α am Thr 172 detektiert, bei dem unbehandelten Gehirnhomogenat der Biene nur eine Bande detektiert. Bei dem mit Ethanol behandelten Bienenhirn ist

kein Signal zu erkennen. Für nachfolgende ELISA-Messungen ist diese Fixierungsmethode deshalb ungeeignet, da diese Behandlung das Epitop des Antigens zu stark denaturiert und für den Antikörper unzugänglich macht. Der Rattencortex lieferte aller Wahrscheinlichkeit nach deshalb kein Signal, da er zu alt war. Bei -20°C tiefgefroren, ist es Phosphatasen immer noch möglich, biologisch aktiv zu sein.

Der Antikörper, welcher generell AMPK- α detektiert, zeigt eine Bande für das mit Ethanol unbehandelte Bienenhirn-Homogenat an und kann somit verwendet werden. Bei dem in Ethanol vorfixierten Bienenhirn sind zwei Banden zu erkennen, die zwei verschiedene α -Isoformen nachweisen. Diese Auftrennung fand bei den unbehandelten Bienen nicht statt, was auch an dem stärkeren Signal zu erkennen ist. Auffällig ist, dass die Probe des Rattengehirns eine AMPK- α -Untereinheit von etwa 62 kDa besitzt, während die α -Untereinheit bei der Biene kleiner zu sein scheint (>50 kDa). Diese Abweichung in der Größe der AMPK- α -Untereinheit im Westernblot wird dadurch erklärt, dass das C-terminale Ende bei der Biene kürzer als bei Säugetieren ist, wie ein Vergleich der AS-Sequenzen der AMPK- α -Untereinheit ergeben hat (ohne Abb.).

Selbst beim Vergleich des C-terminalen Endes der AMPK- α -Untereinheit der Biene mit dem des Menschen und des Menschen mit dem der Biene, ist keine Übereinstimmung zu finden. Dies ist ein sehr wichtiger Aspekt, da bei Säugern eine zweite Phosphorylierungsstelle vorhanden ist: Serin 485 bzw. 491, je nach Isoform. Ebenso wie Threonin 172 ist sie in der Lage, die Aktivität der α -Untereinheit zu regulieren.

Da bei den Bienenproben beide Antikörper verwendet werden müssen, um die Gesamtmenge sowie den phosphorylierten Anteil am Thr 172 der α -Untereinheit bestimmen zu können, wurde die Ethanolfixierung aufgrund der Ergebnisse (Abb. 12, S. 43) als Methode abgelehnt, da sie nur bei einem einzelnen Antikörper anwendbar sein würde.

3.2.2 Die Lokalisation der katalytischen α -Untereinheit von AMPK im Gehirn von *Apis mellifera*

Um Informationen über die lokale Verteilung von AMPK im Bienenhirn zu erhalten, wurden Frontalschnitte des Gehirns angefertigt und die AMPK- α - und P-AMPK- α Thr 172-Immunreaktivität über eine enzymatische Farbreaktion sichtbar gemacht. Dafür wurden NBT und BCIP als Färbesubstanzen verwendet, welche zu einer bläulichen Färbung der vom Antikörper markierten Bereiche führen.

Die Abbildungen 13 (S. 46) und 15 (S. 48) zeigen, dass im gesamten Gehirn vor allem die Zellkörper gefärbt sind. Im Neuropil sind nur schwache Färbungen zu erkennen. Das bedeutet, dass die AMPK- α -Untereinheit im gesamten Bienenhirn exprimiert wird. Eine sehr kräftige Färbung weisen die Kenyonzellen der Pilzkörper auf (Abb. 14, S. 47). Die gefärbten Somata sind inner- und außerhalb der Kelche sichtbar und auch im Zytosol und Zellkern angefärbt. Die Kelche der Pilzkörper, die aus den dendritischen Verzweigungen der Kenyonzellen gebildet werden, sind am stärksten in der Lippenregion (olfaktorischer Eingang) und in der Kragenregion (visueller Eingang) gefärbt (Abb. 14 und 15, S. 47 und 48).

Dagegen lassen sich in den α -Loben, einer Ausgangsregion der Pilzkörper, in denen die Kenyonzellaxone terminieren, nur schwach gefärbte Banden unterscheiden. Im Antennallobus treten leichte Färbungen auf, wobei einige Glomeruli stärker gefärbt sind als andere (Abb. 14, S. 47). Das laterale Protozerebrum zeigt ebenfalls nur eine schwache Immunreaktivität. Hingegen gibt es eine sehr starke Färbung weniger Zellen (ca. 15), die zwischen dem lateralen Kelch, dem optischen Lobus und dem lateralen Protozerebrum liegen (weißer Pfeil, Abb. 13, S. 46). In einer tieferen Schnittebene (Abb. 15, S. 48) ist zu sehen, dass auch der Zentralkörper teilweise sehr kräftig gefärbt ist.

Die histologische Färbung bei Verwendung des Antikörpers gegen P-AMPK- α Thr 172 fällt dagegen deutlich schwächer aus (Abb. 16, S. 49). Die Färbung des Neuropils und vor allem der Zellkörper ist deutlich reduziert. Eine starke Färbung liegt im Bereich der Kelche vor. Interessanterweise weisen die Kenyonzellsomata, die im äußeren Bereich der Kelche liegen, eine stärkere Färbung als die innen liegenden auf. Zudem ist im Neuropilbereich der Kelche ausschließlich die Lippenregion gefärbt. Zusätzlich treten schwache Färbungen im Umfeld des lateralen Protozerebrums auf.

Die Immunhistologie zeigt ein Vorkommen von AMPK- α im Zellsomata sowie im Neuropil in fast allen Regionen des Bienenhirns, die darüber hinaus für die olfaktorische Gedächtnisbildung notwendig sind.

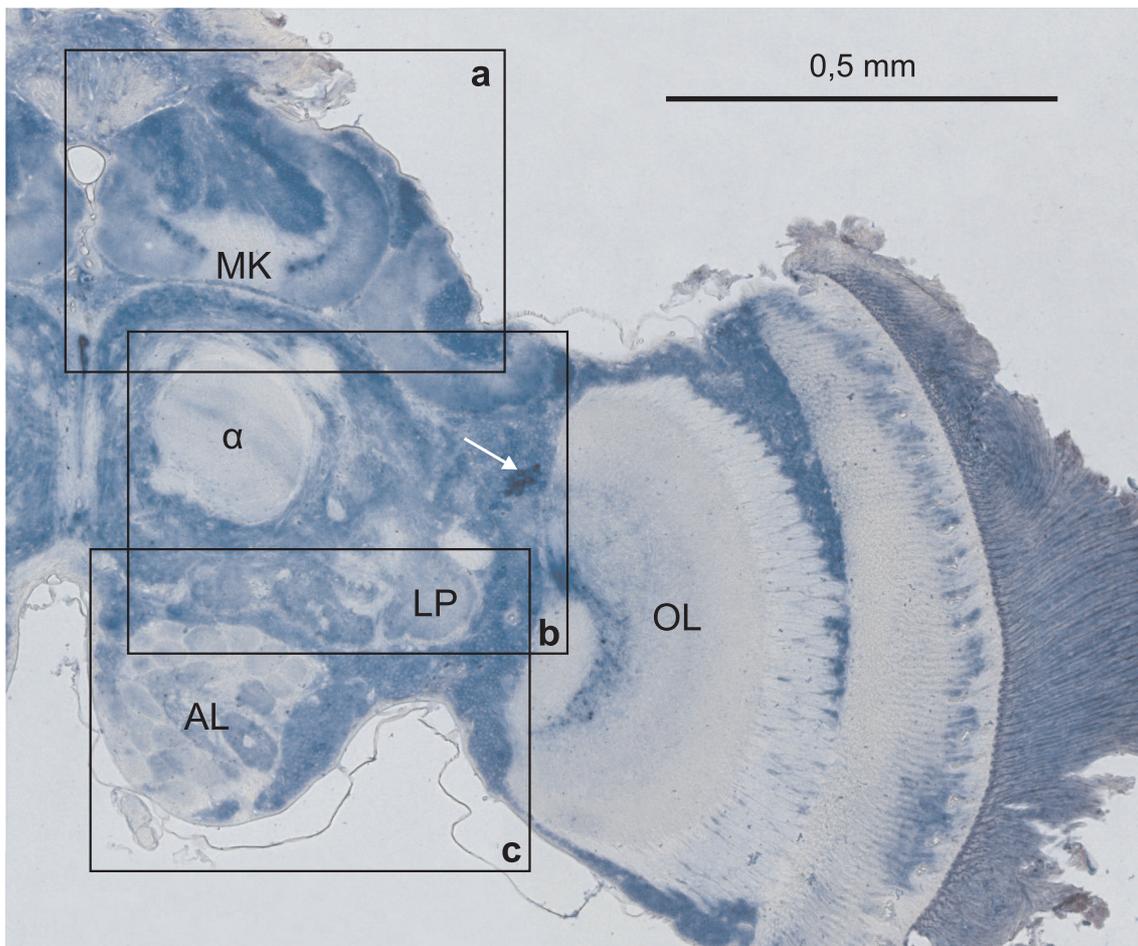


Abbildung 13: Bienenhirn, immunhistologisch gegen AMPK- α gefärbt, frontal geschnitten.

a) medianer Kelch, **b)** α -Lobus und laterales Protozerebrum und **c)** Antennallobus. Detailaufnahmen auf Seite 47.

α : α -Lobus, AL: Antennallobus, LP: laterales Protozerebrum, MK: medianer Kelch, OL: optischer Lobus.

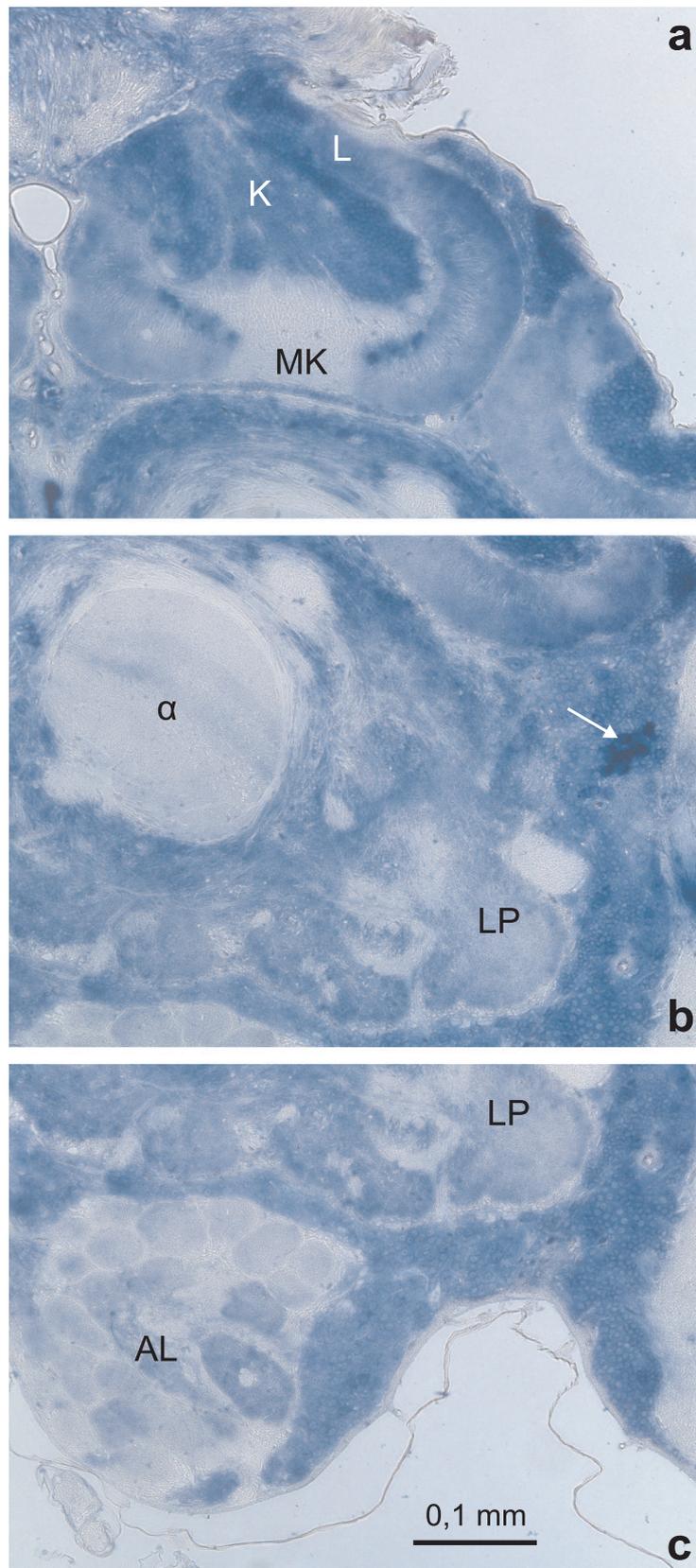


Abbildung 14: Ausschnitte des Bienenhirns aus Abbildung 13.

a) medianer Kelch, **b)** α -Lobus und laterales Protozerebrum und **c)** Antennallobus.

α : α -Lobus, AL: Antennallobus, K: Kenyonzellsomata, L: Lippe, LP: laterales Protozerebrum, MK: medianer Kelch.

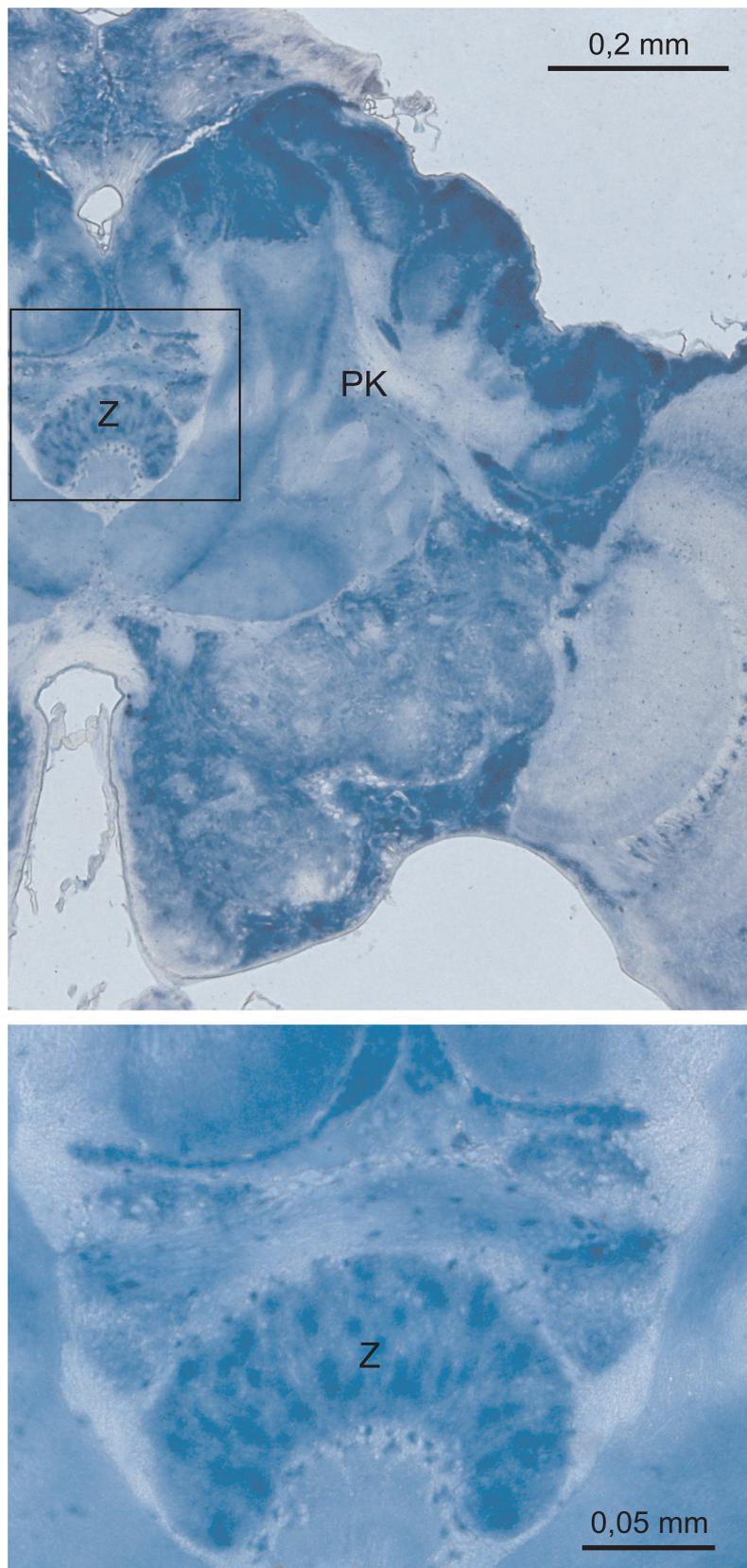


Abbildung 15: Bienegehirn, immunhistologisch gegen AMPK- α gefärbt, frontal geschnitten mit vergrößertem Ausschnitt der Zentralregion.
PK: Pilzkörper, Z: Zentralregion.

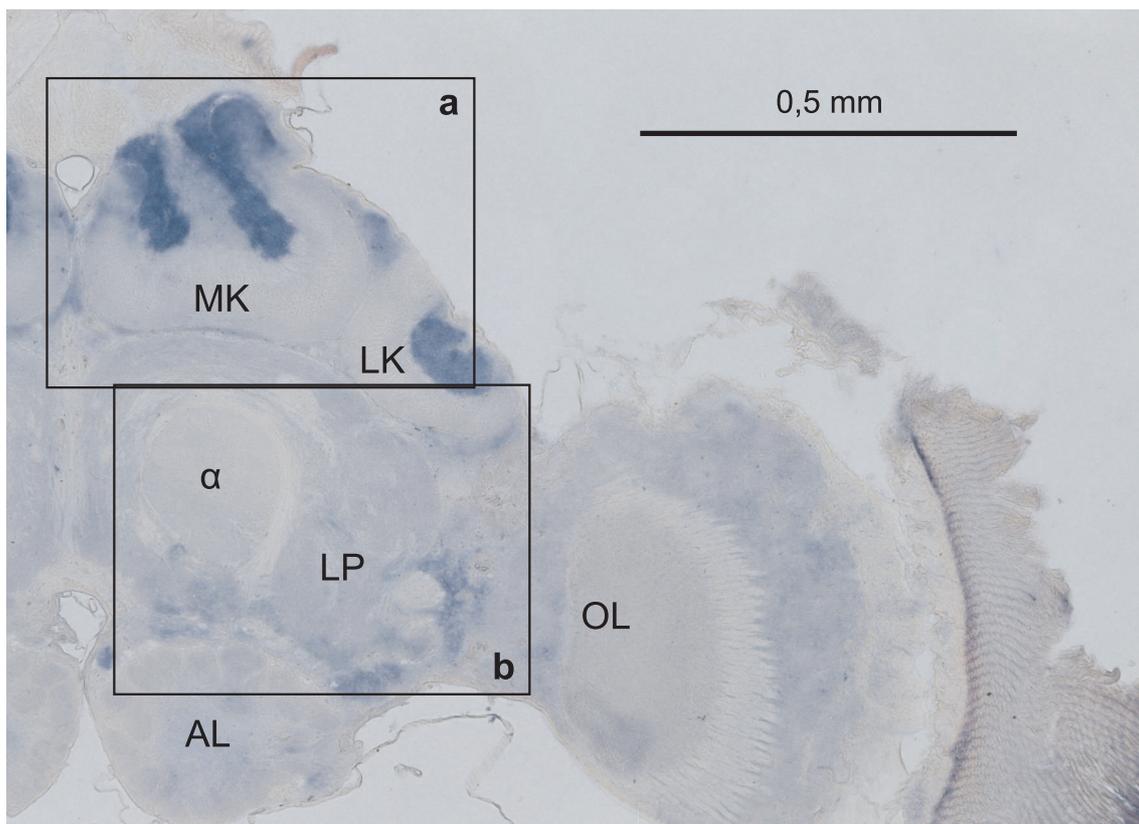


Abbildung 16: Bienenhirn, immunhistologisch gegen P-AMPK- α gefärbt, frontal geschnitten.

a) medianer Kelch und **b)** α -Lobus. Detailaufnahmen auf Seite 50.

α : α -Lobus, AL: Antennallobus, LK: lateraler Kelch, LP: laterales Protozerebrum, MK: medianer Kelch, OP: optischer Lobus.

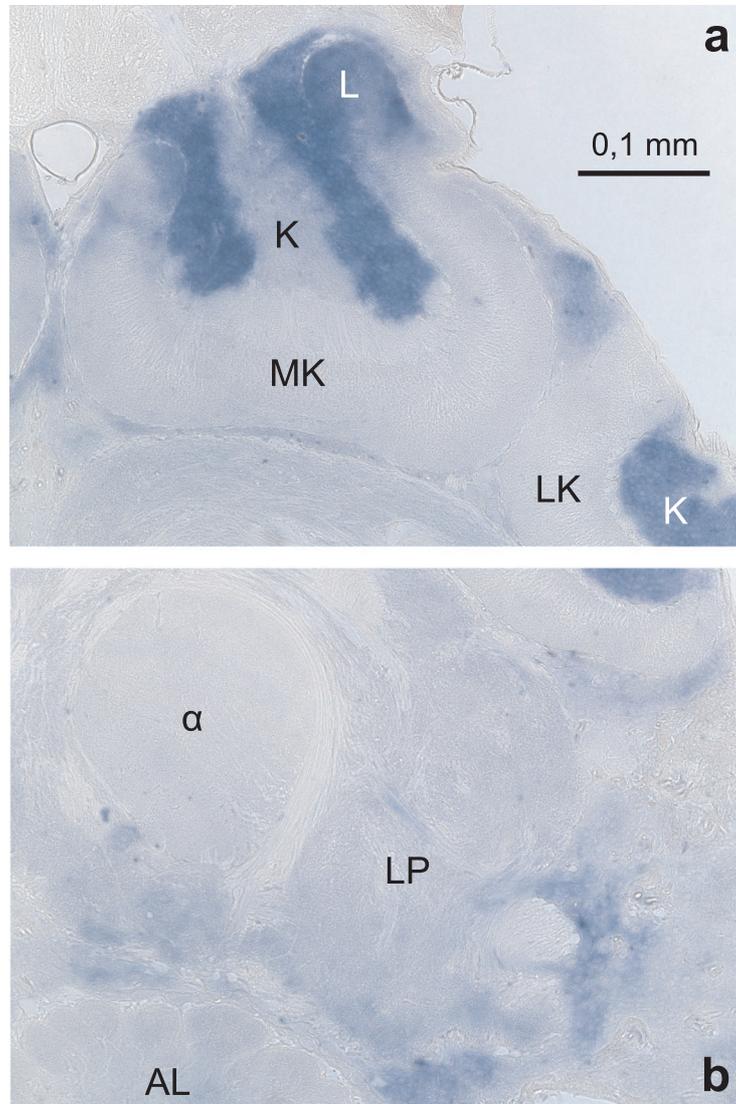


Abbildung 17: Ausschnitte des Bienenhirns aus Abbildung 16.

a) medianer und lateraler Kelch und **b)** α -Lobus und laterales Protozerebrum.

Innerhalb der Kelche liegen die Kenyonzellsomata (K), wobei die äußeren Kenyonzellen eine stärkere Färbung als die inneren aufweisen. Im Neuropilbereich der Kelche zeigt die Lippenregion (L) eine starke Färbung gegenüber dem schwach gefärbten Kragen und dem ungefärbten basalen Ring der Kelche.

α : α -Lobus, AL: Antennallobus, K: Kenyonzellsomata, L: Lippe, LP: laterales Protozerebrum, MK: medianer Kelch.

3.3 AMPK-Aktivität

3.3.1 AMPK-Aktivität: hungrig vs. satt

Da die AMPK-Aktivität im Hypothalamus bei Ratten mit dem Sättigungszustand korreliert^[111], soll in diesem Kapitel dargestellt werden, ob es auch einen Unterschied in der Aktivität von AMPK- α im Gehirn von hungrigen und sattten Bienen gibt. Die ELISA-Technik wird mit den zuvor getesteten Antikörpern aus Kapitel 3.2.1 genutzt, um die relative Aktivität von AMPK zu messen, indem ein Verhältnis zwischen der phosphorylierten AMPK- α -Untereinheit am Thr 172 und der Gesamtmenge der AMPK- α -Untereinheit berechnet wird. Diese Phosphorylierung sorgt für eine Erhöhung der Aktivität^[53] und ist auch von dieser abhängig^[8,178]. Deshalb ist es möglich, vom Verhältnis der phosphorylierten AMPK- α -Untereinheit am Thr 172 zur Gesamtmenge der AMPK- α -Untereinheit auf relative AMPK-Aktivitäten zu schließen.

Eine Gruppe der Bienen hungerte 18 Stunden lang, die andere Gruppe wurde dagegen 30 Minuten vor der Tötung und AMPK-Aktivitätsmessung bis zur Sättigung gefüttert. In Abbildung 18 (S. 52) ist zu sehen, dass der Anteil an phosphorylierter AMPK- α im Gehirn hungriger Bienen signifikant höher ist als bei gesättigten Bienen ($p=0,027$, $\Delta=15\%$). Dies bedeutet, dass die AMPK bei hungrigen Bienen aktiver ist, da die untersuchte Phosphorylierungsstelle Thr 172 in der α -Untereinheit essenziell für den aktivierten Zustand des Enzyms ist. Die Messungen haben ergeben, dass es hinsichtlich der Gesamtmenge an AMPK- α keine Unterschiede zwischen den beiden Bienengruppen gibt (ohne Abb.).

3.3.2 Aktivierung der AMPK durch Photofreisetzung von ADP

Die bisher durchgeführten Experimente haben ergeben, dass es bei Bienen eine mit dem Sättigungszustand korrelierte AMPK-Aktivität im Gehirn gibt. Im folgenden Experiment wurde versucht, die Aktivitätsänderung der AMPK (hungrig vs. satt) künstlich bei gesättigten Tieren herbeizuführen. Ziel war es, die Aktivität in kurzer Zeit zu manipulieren, indem durch Photofreisetzung von ADP ein niedriger zellulärer Energiestatus erzeugt wird, aufgrund dessen AMPK aktiviert wird, obwohl die Bienen zuvor bis zur Sättigung gefüttert wurden. Um den AMPK-Einfluss beim Lernen zu untersuchen, konnten dann Verhaltenstests durchgeführt werden, bei denen eine schnelle und lokale künstliche AMPK-Aktivierung im Bienenhirn durchgeführt wurde.

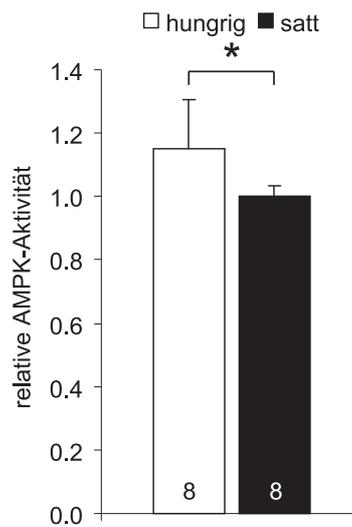


Abbildung 18: Quantifizierung der Aktivität von AMPK (P-AMPK- α (Thr 172) / AMPK- α) im Gehirn von *Apis mellifera* bei hungrigen und gesättigten Tieren. Das Gehirn von hungrigen (18 h ohne Fütterung) und gesättigten Bienen (30 min vor der Tötung gefüttert) wurde homogenisiert und mit Hilfe der ELISA-Technik die P-AMPK- α (Thr 172)- und AMPK- α -Mengen bestimmt. Dargestellt sind die Mittelwerte (auf die Kontrolle „satt“ normiert) und die s.d.. In den Balken ist die Anzahl der Proben für die jeweilige Gruppe angegeben. Mit einem Stern gekennzeichnet sind Mittelwerte, die sich signifikant voneinander unterscheiden (T-Test $p < 0,05$).

In Abbildung 19 (S. 53) ist der Versuchsablauf dargestellt. Die Bienen wurden zunächst mit Sucroslösung gesättigt und bekamen danach eine Injektion mit NPE-*caged* ADP. Nach 30 Minuten fand die Freisetzung des ADP im gesamten Bienenhirn mit Hilfe von Lichtblitzen statt. Zehn Sekunden, drei oder acht Minuten nach der Photofreisetzung wurden die Bienen getötet, um die relative AMPK-Aktivität im Gehirn mit Hilfe der ELISA-Technik zu bestimmen.

Abbildung 20 (S. 53) zeigt die relativen AMPK-Aktivitäten zu unterschiedlichen Zeiten nach der Photofreisetzung des ADP im gesamten Gehirn. Die hellgraue Gruppe kennzeichnet die mit Licht behandelten Tiere, die schwarze Gruppe die Kontrollgruppe ohne Photofreisetzung des ADP. Es ist zu erkennen, dass kurz nach der Photofreisetzung kein Unterschied zwischen beiden Gruppen besteht. Bei den nächsten Versuchen, der Messung drei und acht Minuten nach der Photofreisetzung, stellte sich heraus, dass die Aktivität der AMPK nach der ADP-Freisetzung angestiegen ist. Im ersten Fall ist die Aktivität um ca. 15 %, im zweiten Fall um ca. 10 % gestiegen ($p_{3 \text{ min}} = 0,038$; $p_{8 \text{ min}} = 0,016$). Einen Unterschied in der Gesamtmenge der α -Untereinheit zwischen den jeweiligen Bienengruppen eines gemessenen Zeitpunktes gibt es nicht (ohne Abb.).



Abbildung 19: Versuchsaufbau für die AMPK-Aktivitätsmessung nach Photofreisetzung der *caged* Nucleotide.

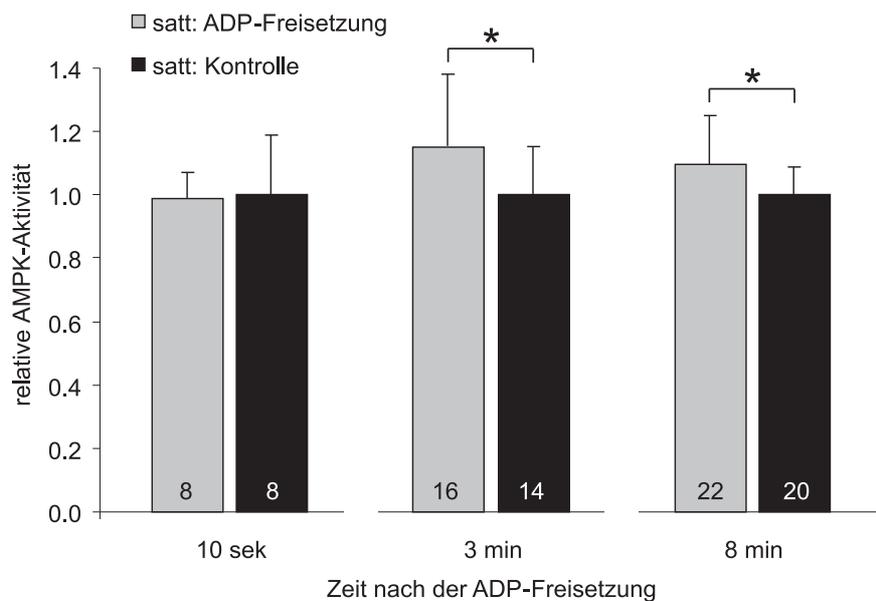


Abbildung 20: Quantifizierung der Aktivität von AMPK (P-AMPK- α (Thr 172) / AMPK- α) im Gehirn von *Apis mellifera* nach der Photofreisetzung von ADP.

Das Gehirn der Bienen wurde zehn Sekunden, drei oder acht Minuten nach der Photofreisetzung des ADP entnommen und homogenisiert, um mit Hilfe der ELISA-Technik die P-AMPK- α (Thr 172)- und AMPK- α -Mengen zu bestimmen. Die Kontrolle wurde auf die gleiche Weise behandelt, aber ohne geblitzt zu werden. Dargestellt sind die Mittelwerte (auf die Kontrolle normiert) und die s.d.. In den Balken ist die Anzahl der Proben für die jeweilige Gruppe angegeben. Mit einem Stern gekennzeichnet sind Mittelwerte, die sich signifikant voneinander unterscheiden (T-Test $p < 0,05$).

Da die Nukleotide intra- sowie extrazellulär freigesetzt werden, konnte zu diesem Punkt noch nicht ausgeschlossen werden, dass die ADP-Freisetzung indirekt zu einer Aktivierung der AMPK führt. Deshalb mussten zusätzliche Kontrollexperimente durchgeführt werden. Es ist möglich, dass das extrazellulär freigesetzte ADP an P2X/Y-Rezeptoren bindet. Dies sind Oberflächenrezeptoren für extrazelluläre Nukleotide, welche sowohl Pyrimidin- als auch Purin-Nukleotide binden. Dabei wird zwischen ionotropen (P2X) und metabotropen (P2Y) purinergen Rezeptoren unterschieden, die weitgehend im ZNS verbreitet und an der Regulierung verschiedener neuronaler Systeme beteiligt sind^[2,25,147]. Um auszuschließen, dass die AMPK-Aktivierung über P2-Rezeptoren gesteuert wird, müssen die P2-Rezeptoren blockiert werden. Dies ist mit Hilfe von PPADS, einem P2X/Y-Antagonisten, möglich^[92]. Sollte trotz der Verwendung von PPADS eine Aktivierung der AMPK messbar sein, geschieht dies ohne Beteiligung der P2-Rezeptoren.

In einem zweiten Kontrollexperiment sollte getestet werden, ob die durch ADP-Freisetzung verursachte AMPK-Aktivierung mit Hilfe des AMPK-Blockers (Compound C) verhindert werden kann. Compound C ist ein starker zellpermeabler, reversibler und ATP-kompetitiver AMPK-Inhibitor ($K_i = 109 \text{ nM}$)^[224]. Er verhindert die Bindung von AMP an der regulatorischen γ -Untereinheit. Infolgedessen wird eine Aktivierung, die Phosphorylierung des Thr 172 an der AMPK- α -Untereinheit, verhindert. Wird nun zusätzlich Compound C in die Biene injiziert und das ADP freigesetzt, sollte keine Erhöhung in der Aktivität der AMPK detektierbar sein.

Abbildung 21 (S. 55) zeigt sehr deutlich die Wirkung des AMPK-Inhibitors Compound C. Trotz der ADP-Freisetzung ist keine Aktivitätssteigerung der AMPK zu verzeichnen. In der ohne Compound C behandelten Gruppe (Ringer) gibt es hingegen eine Erhöhung der Aktivität von über 9 %, verglichen mit der ungeblitzten Kontrolle ($p_{\text{Ringer}} = 0,018$). Ebenso ist in Abbildung 21 (S. 55) eine Aktivitätssteigerung trotz Verwendung des P2-Antagonisten PPADS zu erkennen (ca. 9 %, $p_{\text{PPADS}} = 0,02$). Dies bedeutet, dass die AMPK-Aktivierung nicht unter der Kontrolle von P2X/Y-Rezeptoren liegt. Somit kann die Aktivierung der AMPK als direkte Folge der Photofreisetzung von ADP im Zeitraum von drei und acht Minuten nach der Lichtbehandlung angesehen werden. Wie gezeigt wurde, wird dieser Effekt durch den AMPK-Blocker Compound C spezifisch unterdrückt und ist unabhängig von eventuell vorhandenen P2X/Y-Rezeptoren. Ob diese Rezeptoren im Bienengehirn überhaupt vorkommen und wenn ja durch PPADS gehemmt werden können, wird in Kapitel 3.4 untersucht.

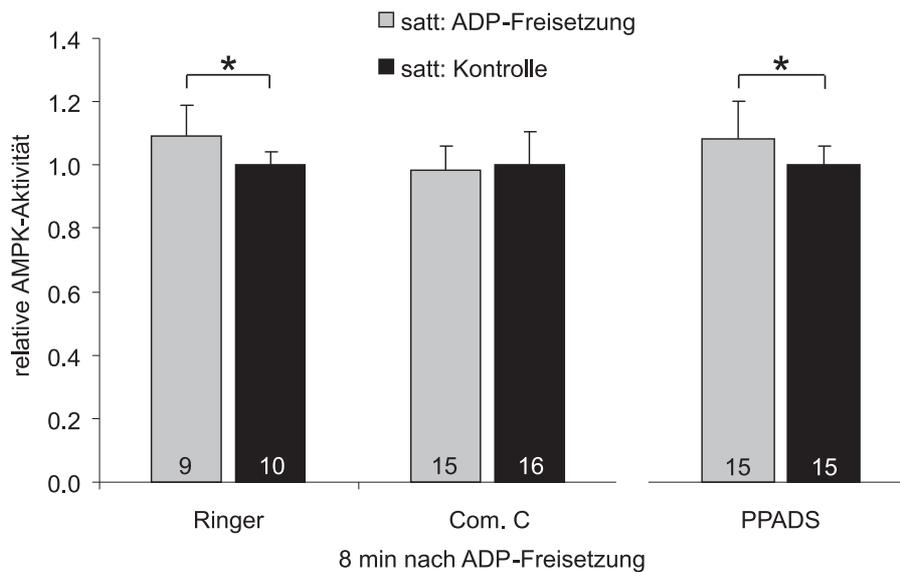


Abbildung 21: Quantifizierung der Aktivität von AMPK (P-AMPK- α (Thr 172) / AMPK- α) im Gehirn von *Apis mellifera* nach der Photofreisetzung von ADP sowie Wirkung von Compound C und PPADS.

Das Gehirn der Bienen wurde acht Minuten nach der Photofreisetzung des ADP entnommen und homogenisiert, um mit Hilfe der ELISA-Technik die P-AMPK- α (Thr 172)- und AMPK- α -Mengen zu bestimmen. Die Kontrolle wurde auf die gleiche Weise behandelt, aber ohne geblitzt zu werden. Dargestellt sind die Mittelwerte (auf die Kontrolle normiert) und die s.d.. In den Balken ist die Anzahl der Proben für die jeweilige Gruppe angegeben. Mit einem Stern gekennzeichnet sind Mittelwerte, die sich signifikant voneinander unterscheiden (T-Test $p < 0,05$).

Es stellt sich also die Frage nach dem Wirkungsmechanismus der ADP-Freisetzung und der AMPK-Aktivierung. Da die AMPK durch AMP und nicht durch ADP aktivierbar gemacht wird, wird vom folgenden Mechanismus ausgegangen:

Das inaktive ADP (NPE-*caged* ADP) dringt durch die Zellmembran in die Zelle ein. Bei Photoaktivierung wird die NPE-Gruppe abgespalten und das ADP liegt biologisch aktiv in der Zelle vor und kann diese nicht mehr verlassen. Die Adenylat-Kinase konvertiert das ADP zu ATP und AMP ($2 \text{ ADP} \leftrightarrow \text{ATP} + \text{AMP}$)^[51]. AMP bindet an die regulatorische γ -Untereinheit. Dadurch wird die Phosphorylierung des Thr 172 an der AMPK- α durch AMPKKs ermöglicht, was die Aktivität steigert.^[8,53,178] Obwohl auch ATP entsteht, kann die AMPK aktiviert werden, da die Kinase wesentlich empfindlicher auf AMP als auf ATP reagiert^[175].

3.4 P2X/Y-Rezeptoren: Nachweis und Inhibition durch PPADS

Im vorherigen Kapitel 3.3.2 wurde PPADS^[92] verwendet, um eine mögliche Beteiligung von P2X/Y-Rezeptoren an der Regulation der AMPK-Aktivität auszuschließen. Um die vorherigen Ergebnisse zu stützen, soll in diesem Kapitel untersucht werden, ob PPADS bei Bienen die Oberflächenrezeptoren blockiert.

Proteinsequenzanalysen (Mensch vs. Biene) haben keine Übereinstimmung für die P2X-Rezeptoren erbracht, die ihre Aktivität als Ca^{2+} -Kanal steuern^[1]. Bei Sequenzvergleichen von P2Y-Rezeptoren gab es hingegen gewisse Ähnlichkeiten^[126]. Dies lässt vermuten, dass diese Rezeptoren, die über G-Protein gekoppelt die Ca^{2+} -Freisetzung aus dem endoplasmatischen Retikulum (ER) steuern^[1], in der Biene vorkommen. Dennoch kann nicht ausgeschlossen werden, dass diese Oberflächenrezeptoren nicht durch PPADS blockierbar sind.

Um nachzuweisen, dass die P2Y-Rezeptoren im Bienenhirn vorkommen, soll ein durch ATP stimulierter Ca^{2+} -Einstrom in das Cytosol aus dem ER mit Hilfe des Ca^{2+} -Imaging sichtbar gemacht werden. Zu diesem Zweck wurden Bienenneurone aus dem Gehirn gewonnen, welche mit Acetylcholin als positive Kontrollgruppe und mit ATP stimuliert wurden. Acetylcholin kann erstens nikotinische (ionotrope) und zweitens muskarinische (metabotrope) Acetylcholinrezeptoren stimulieren. Die metabotropen Rezeptoren wirken über eine IP_3/DAG -Kaskade. Das Inositoltriphosphat (IP_3) bindet an IP_3 -Rezeptoren des endoplasmatischen Retikulums und sorgt für einen Ausstrom des Kalziums ins Cytosol^[222].

Das durch ATP freigesetzte Kalzium soll durch Wirkung des PPADS gehemmt werden. Somit ist die Wirksamkeit des Antagonisten PPADS bewiesen und die Ergebnisse aus Kapitel 3.3.2 sind gestützt.

Die Abbildung 22 (S. 57) zeigt einen intrazellulären Anstieg des Kalzium-Spiegels als Reaktion auf die Acetylcholin-Stimulation ($p_{\text{Ach vs. Ringer}} = 0,001$). Dies bestätigt, dass die ausgewählte Methode für die Detektion des Kalziumanstieges infolge einer Stimulation gut geeignet ist. Werden die Zellen mit ATP stimuliert, ist ebenfalls eine Erhöhung der internen Kalziumkonzentration zu beobachten ($p_{\text{ATP vs. Ringer}} = 0,001$). Dies deutet an, dass die P2Y-Rezeptoren auf der Zellmembran vorhanden und durch ATP stimulierbar sind. Beim Einsatz von PPADS ist zwar ein leichter Anstieg in der Ca^{2+} -Konzentration zu erkennen (Abb. 22), doch der Unterschied zur Kontrolle (Ringer) ist nicht signifikant. Werden die Neurone gleichzeitig mit ATP und dem P2X/Y-

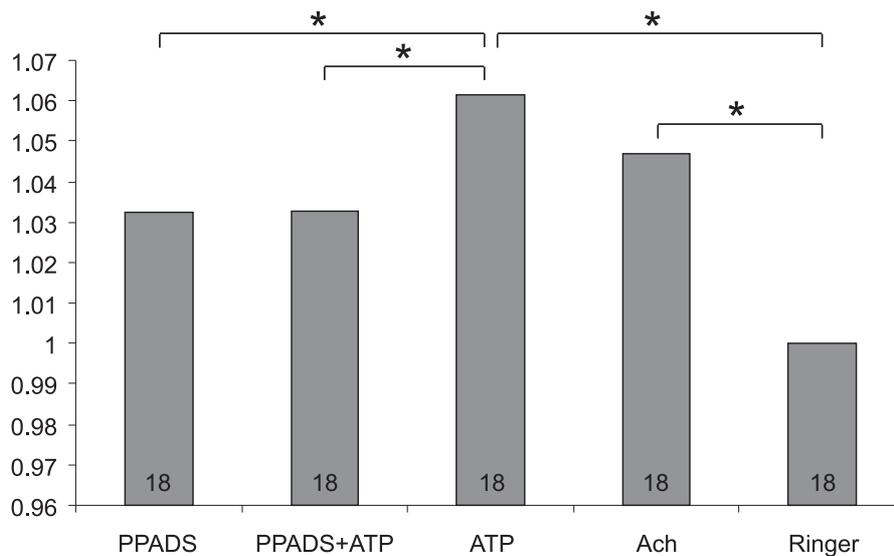


Abbildung 22: Veränderung der intrazellulären Kalziumkonzentration in Gehirneuronen von *Apis mellifera* als Veränderung des Fluoreszenzsignals nach Einsatz von PPADS, ATP und Acetylcholin.

Dargestellt sind die Quotienten der Fluoreszenzsignale (nach Behandlung/vor Behandlung), Werte auf die Kontrolle normiert. In den Balken ist die Anzahl der Proben für die jeweilige Gruppe angegeben. Mit einem Stern gekennzeichnet sind Werte, die sich signifikant voneinander unterscheiden (Wilcoxon Rang-Test $p < 0,05$, Kruskal-Wallis-Test $p = 0,0$).

Antagonisten PPADS behandelt, ist ebenfalls kein Unterschied zur Kontrollgruppe zu erkennen, aber eine signifikante Abnahme des Ca^{2+} -Signals gegenüber der ATP-Stimulation ($p_{\text{PPADS+ATP vs. ATP}} = 0,020$; $p_{\text{PPADS vs. ATP}} = 0,039$). Dies bedeutet, dass PPADS in der Lage ist, die P2Y-Rezeptoren zu blockieren und die stimulierende Wirkung von ATP zu verhindern, durch die eine intrazelluläre Kalziumfreisetzung herbeigeführt wird.

3.5 Verhaltensuntersuchungen zu den Auswirkungen einer AMPK-Aktivierung / -Deaktivierung durch Photofreisetzung von *caged* Nukleotiden im Gehirn von *Apis mellifera*

3.5.1 Regulation der Empfindlichkeit des Rüsselreflexes

3.5.1.1 Durch ADP aktivierte AMPK erhöht die Empfindlichkeit des Rüsselreflexes

Hungrige Bienen haben gewöhnlicherweise in ihrer Verhaltensreaktion eine höhere Empfindlichkeit gegenüber Zuckerwasser als gesättigte Bienen^[130] und weisen gegenüber diesen auch eine höhere AMPK-Aktivität im Gehirn auf. Diese Tatsache wird in Abbildung 18 (S. 52) verdeutlicht. In den folgenden Experimenten sollte überprüft werden, ob die künstliche Aktivierung der AMPK durch ADP-Freisetzung eine Veränderung in der Zuckerwasserempfindlichkeit nach sich zieht. In diesem Zusammenhang stellt sich folgende Frage: Was geschieht, wenn eine Biene „satt“ ist und zusätzlich der Zellenergiesensor AMPK künstlich aktiviert wird? Es ist eine Empfindlichkeitserhöhung zu erwarten, da im Gehirn der Bienen dadurch eine AMPK-Aktivierung erreicht wird, wie sie bei hungrigen Tieren auftritt.

Der Versuchsaufbau (Abb. 23, S. 59) zeigt, wie die Empfindlichkeit des Rüsselreflexes bei gesättigten Bienen nach Freisetzung von ADP im Gehirn der Tiere untersucht wurde. Hierzu wurden die Bienen zunächst bis zur Sättigung mit einer Zuckerlösung gefüttert (1 M Sucrose). Darauf folgte direkt die Injektion des NPE-*caged* ADP in den Thorax. Bevor die Nukleotide mit Hilfe des Lichtes im Gehirn freigesetzt wurden, wurde die Sättigung der Tiere durch das Aufbringen einer Sucroselösung (0,3 M) mit Hilfe eines Zahnstochers auf die beiden Antennen getestet. Diejenigen Bienen, die den Rüssel herausstreckten, wurden vom Experiment ausgeschlossen, um vollkommen gesättigte Tiere zu testen. Zehn Minuten nach der Photofreisetzung wurde die Empfindlichkeit der Bienen erneut getestet, indem ein Zuckerwasserstimulus auf beide Antennen gegeben wurde. Um sicher zu sein, dass dieser Effekt ausschließlich über AMPK reguliert wird, wurde auch hier ein AMPK-Blocker (Compound C) verwendet und ein Antagonist für P2X/Y-Rezeptoren (PPADS) genutzt, um Effekte von extrazellulär freigesetzten Nukleotiden ausschließen zu können.

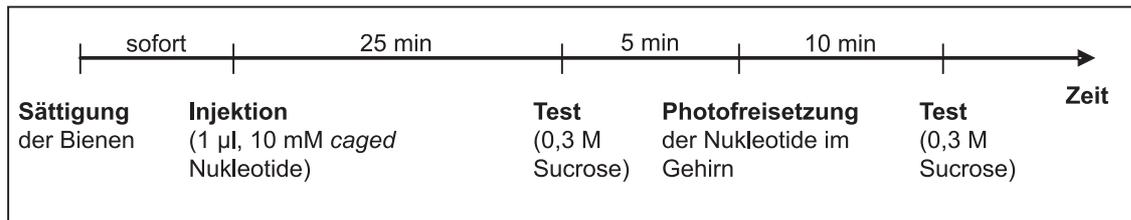


Abbildung 23: Versuchsaufbau für die Messung der Empfindlichkeit des Rüsselreflexes bei gesättigten Bienen nach der Photofreisetzung von ADP.

In Abbildung 24a (S. 60) ist zu erkennen, dass die Tiere ohne ADP-Freisetzung (Kontrolle) kaum auf den angebotenen Zuckerwasserstimulus reagieren. Bienen hingegen, bei denen das ADP im gesamten Gehirn freigesetzt wurde, zeigen eine erhöhte Empfindlichkeit von über 35 % ($p_{Ringer} = 0,037$). Sie wurden somit nicht nur auf zellulärem Niveau im Gehirn hungrig gemacht, sondern reagieren auch in ihrem Verhalten so, als wären sie vorher nicht gesättigt worden. Um auszuschließen, dass dieser Effekt möglicherweise nur durch die Lichtblitze allein ausgelöst wird, wurde in einem Kontrollexperiment weniger NPE-*caged* ADP injiziert, was zu keiner Erhöhung in der Zuckerempfindlichkeit führte (ohne Abb.). Bienen, denen zusätzlich der AMPK-Blocker Compound C injiziert wurde, zeigten keine Veränderung in der Empfindlichkeit, obwohl bei einer Gruppe ADP im Gehirn freigesetzt wurde. Somit kann davon ausgegangen werden, dass diese Verhaltensänderung von der AMPK-Aktivität abhängt. Um auch hier auszuschließen, dass dies über P2X/Y-Rezeptoren vermittelt wird, die durch extrazellulär freigesetztes ADP stimuliert werden, wurde PPADS eingesetzt. In Abbildung 24a ist zu sehen, dass die Anwendung des P2X/Y-Antagonisten zu keiner Verringerung der Empfindlichkeit führt, wenn ADP freigesetzt wird, um AMPK zu aktivieren ($p_{PPADS} = 0,019$). Der Unterschied in der Empfindlichkeitserhöhung nach ADP-Freisetzung mit und ohne PPADS (Abb. 24a, S. 60) könnte darauf zurückzuführen sein, dass im ersten Fall Bienen aus einem Winterquartier im Glashaus (Winter 05/06) genutzt wurden und die mit PPADS behandelten Bienen aus dem Freien stammten (Frühling 2007). Diese Bienen hatten mit dem Trachteintrag begonnen und waren wahrscheinlich von Natur aus sensibler und hungriger. Um die Wirkung von Compound C in Abbildung 24a zu stützen, wurde ein weiteres Experiment durchgeführt. In Abbildung 24b ist zu sehen, dass einerseits die Freisetzung von ADP zu einer Empfindlichkeitserhöhung führt und andererseits bei zusätzlicher Gabe des AMPK-Blockers trotz Freisetzung von ADP dieser Effekt verloren geht ($p_{Com.C} = 0,049$). Somit wurde bestätigt, dass die durch eine ge-

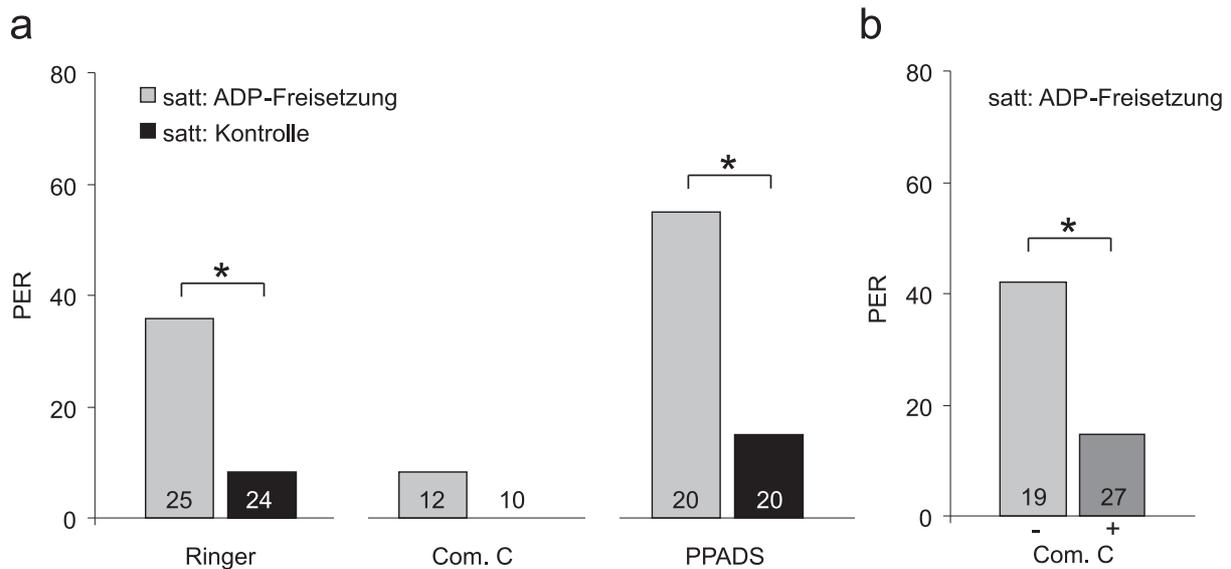


Abbildung 24: Empfindlichkeit des Rüsselreflexes zehn Minuten nach Photofreisetzung von ADP im gesamten Gehirn von gesättigten Bienen.

a) Photofreisetzung von ADP führt zu erhöhter Empfindlichkeit auf den Zuckerwasserstimulus. ADP-induzierte erhöhte Empfindlichkeit wird durch AMPK-spezifischen Inhibitor (Compound C) geblockt, aber nicht durch Behandlung mit PPADS. **b)** ADP-induzierte erhöhte Empfindlichkeit wird durch AMPK-spezifischen Inhibitor (Compound C) geblockt. Dargestellt ist der PER [%] der Bienen, die auf den Zuckerwasserstimulus (0,3 M) reagiert haben. In den Balken ist die Anzahl der Bienen für die jeweilige Gruppe angegeben. Mit einem Stern gekennzeichnet sind Gruppen, die sich signifikant voneinander unterscheiden (Exakter Fisher-Test $p < 0,05$).

zielte ADP-Freisetzung hervorgerufene AMPK-Aktivierung im Bienenhirn zu einer Erhöhung der Zuckerwasserempfindlichkeit der Bienen führt. Im nächsten Kapitel wird der Empfindlichkeitstest bei Bienen nach Freisetzung von ATP beschrieben.

3.5.1.2 ATP-Freisetzung reduziert die Empfindlichkeit des Rüsselreflexes

Hohe Konzentrationen von ATP führen zu einer Hemmung der AMPK-Aktivierung^[57]. In diesem Experiment sollte deshalb die Empfindlichkeit des Rüsselreflexes bei Bienen nach Freisetzung von ATP im Gehirn untersucht werden. Durch die ATP-Freisetzung im Gehirn und die damit verbundene Erhöhung des zellulären Energiegehaltes sollten hungrige Bienen künstlich gesättigt werden. Im Versuchsablauf (Abb. 25, S. 61) ist zu sehen, nach welcher Vorgehensweise die Empfindlichkeit der hungrigen Tiere getestet wurde. Zu Beginn wurden die Tiere mit zwei Zuckertropfen gefüttert (1 M Sucrose). Sie sind danach noch hungrig, reagieren aber nicht mehr auf kleinste Reize. Daraufhin

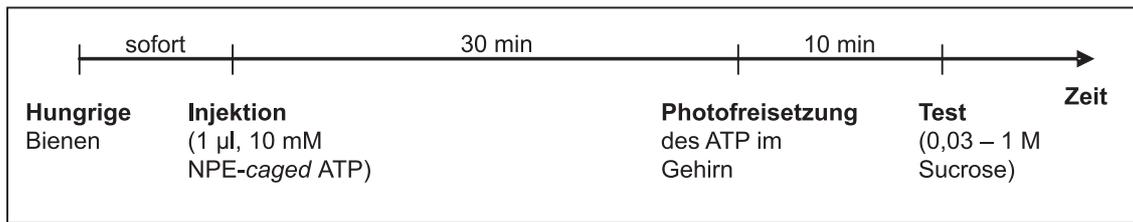


Abbildung 25: Versuchsaufbau für die Messung der Empfindlichkeit des Rüsselreflexes bei hungrigen Bienen nach der Photofreisetzung von ATP.

folgte sofort die Injektion des NPE-caged ATP in den Thorax. Nach 30 Minuten fand die Freisetzung des ATP im Gehirn durch Lichtblitze statt. Zehn Minuten nach der ATP-Freisetzung wurden die Empfindlichkeiten in aufsteigender Zuckerkonzentration (30, 100, 300 und 1000 mM) im zeitlichen Intervall von 30 Sekunden getestet, indem der Zuckerwasserstimulus auf beide Antennen gegeben wurde.

Die Ergebnisse zeigen, dass es möglich ist, die Tiere künstlich zu sättigen (Abb. 26, S. 62). Durch die Freisetzung von ATP ist es bei hungrigen Bienen gelungen, die Reaktion auf einen Zuckerwasserstimulus (30 mM) weitgehend zu unterdrücken (Abb. 26a, S. 62, $p_{30\text{ mM}} = 0,004$). Die Kontrollgruppe ohne ATP-Freisetzung zeigt noch eine Reaktion auf den Zuckerreiz in Höhe von über 40 %. Mit steigender Zuckerkonzentration nimmt der Unterschied zwischen den beiden Gruppen ab. Um zu kontrollieren, ob dieser Effekt möglicherweise durch P2X/Y-Rezeptoren vermittelt wird, wurde PPADS eingesetzt. Es ist zu erkennen (Abb. 26b), dass trotz dieses P2X/Y-Antagonisten die Empfindlichkeit für den 30 mM Zuckerreiz reduziert werden kann ($p_{PPADS} = 0,0$). Somit ist auch dieser Effekt von den ATP-detektierenden P2X/Y-Rezeptoren unabhängig. Der Unterschied zwischen beiden mit 30 mM getesteten Gruppen in Abbildung 26a und b könnte ebenfalls darauf zurückzuführen sein, dass es sich bei der ersten Gruppe um Bienen aus dem Winterquartier handelte und bei der zweiten Gruppe um Tiere aus dem Freien, wo sie die Tracht einholten und aus diesem Grund eine ganz andere natürliche Grenzschwelle zum Zucker hatten.

Als letzte Kontrolle wurde ATP bei gesättigten Bienen im Gehirn freigesetzt (Abb. 26c, S. 62). ATP fungiert als Neurotransmitter und könnte bei den Bienen zu einer Veränderung in der Empfindlichkeit führen. Die Bienen wurden dafür wie in Abbildung 23 (S. 59) dargestellt behandelt. Abbildung 26c zeigt, dass die ATP-Freisetzung im Gegensatz zur ADP-Freisetzung nicht zu einer Veränderung der Zuckerwasserempfindlichkeit bei gesättigten Bienen führt.

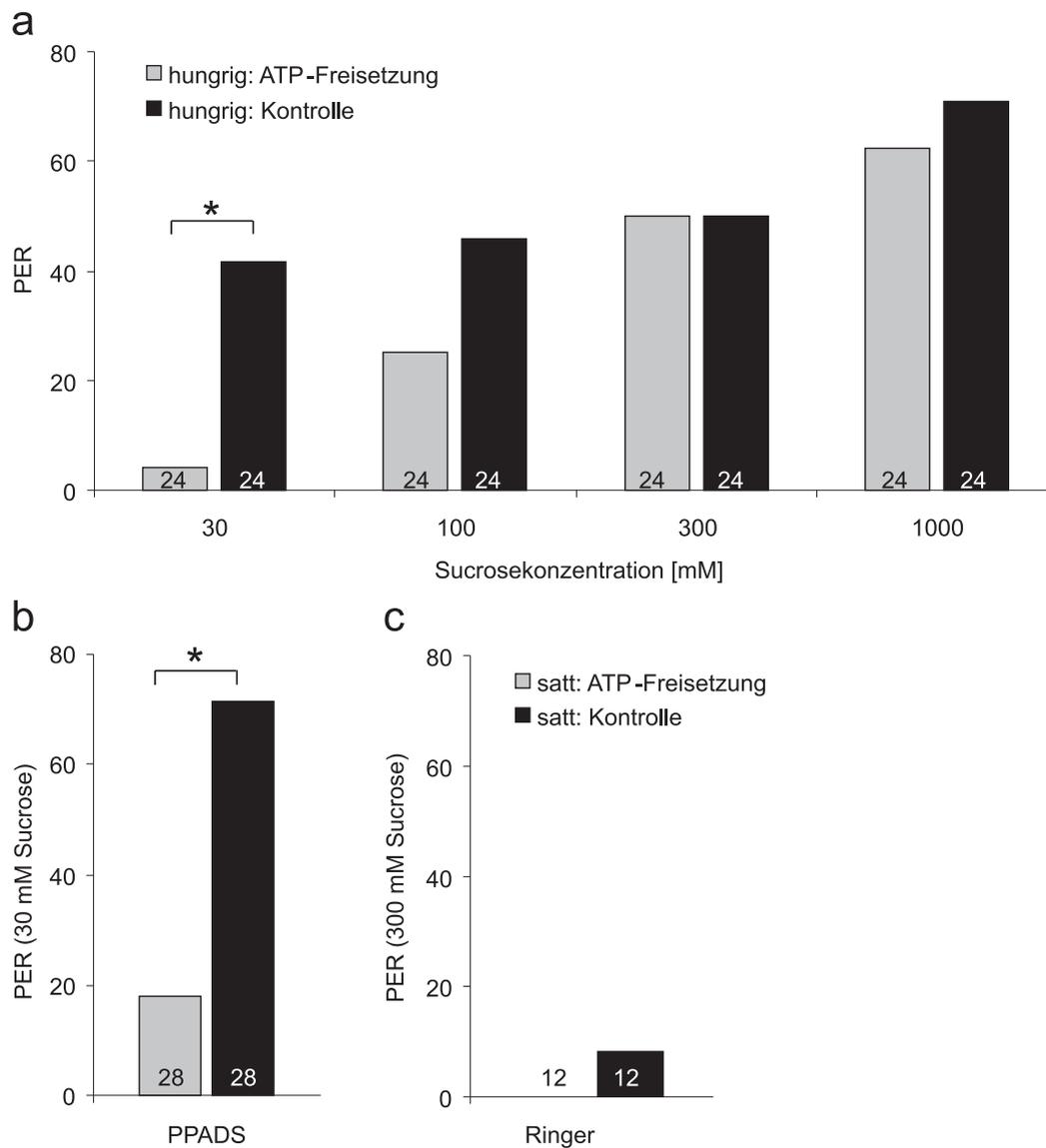


Abbildung 26: Empfindlichkeit des Rüsselreflexes zehn Minuten nach der Photofreisetzung von ATP im gesamten Bienehirn von **a)** hungrigen Tieren mit aufsteigender Sucrosekonzentration, **b)** hungrigen Tieren auf 30 mM Sucroselösung und mit zusätzlicher PPADS-Behandlung und **c)** sattten Tieren auf 300 mM Sucroselösung.

a) Photofreisetzung von ATP führt zu einer reduzierten Empfindlichkeit gegenüber einem niedrigen Zuckerwasserstimulus (30 mM Sucrose), der auf beide Antennen gegeben wird. Bei jeder Biene wurden im Abstand von jeweils 30 Sekunden vier verschiedene Zuckerkonzentrationen von 30 mM bis 1000 mM Sucrose getestet. **b)** Photofreisetzung von ATP führt trotz Verwendung von PPADS zu reduzierter Empfindlichkeit bei hungrigen Bienen. **c)** Photofreisetzung von ATP führt bei gesättigten Bienen zu keiner erhöhten Empfindlichkeit auf den Zuckerwasserstimulus. Dargestellt ist der PER [%] der Bienen, die auf den Zuckerwasserstimulus reagiert haben. „Kontrolle“ kennzeichnet die Biengruppe ohne Photofreisetzung des ATP. In den Balken ist die Anzahl der Bienen für die jeweilige Gruppe angegeben. Mit einem Stern gekennzeichnet sind Gruppen, die sich signifikant voneinander unterscheiden (Exakter Fisher-Test $p < 0,05$).

3.5.1.3 Gehirnregionen, die die Empfindlichkeit des Rüsselreflexes nach AMPK-Aktivierung erhöhen

Die Ergebnisse der zwei vorangehenden Kapitel haben gezeigt, dass Bienen künstlich hungrig (ADP) und satt (ATP) gemacht werden können, wenn die Nukleotide im gesamten Gehirn freigesetzt werden. In diesem Kapitel sollen diejenigen Gehirnregionen ermittelt werden, die daran beteiligt sind. Dazu wird ADP mit Licht gezielt symmetrisch in verschiedenen Gehirnregionen freigesetzt und die Zuckerempfindlichkeit wie in Kapitel 3.5.1.1 beschrieben getestet. Die Tiere, die fünf Minuten vor der Lichtbehandlung positiv auf das Zuckerwasser reagierten, wurden auch in diesem Fall vom Experiment ausgeschlossen. Außerdem wurden die Bienen zu vier verschiedenen Zeitpunkten (5, 10, 15 und 20 min) nach der Photofreisetzung mit 0,3 M Sucrose getestet (Abb. 27, S. 64).

Als Gehirnregionen wurden diejenigen ausgewählt, die durch das VUMmx1-Neuron innerviert werden, welches eine zentrale Rolle in der Belohnungsbewertung während des appetitiven gustatorischen Lernens spielt^[50]. Die künstliche Depolarisierung dieses Neurons kann die Zuckerbelohnung während dieses assoziativen Lernprozesses ersetzen^[50]. Die Dendriten des VUMmx1-Neuron verzweigen sich symmetrisch im Gehirn und laufen mit den olfaktorischen Bahnen zusammen: zunächst mit dem Antennallobus (AL), in dem die Geruchsinformationen der Antennen verarbeitet werden, dann mit der Lippen-Region der Pilzkörper (MB), dem Eingang der MB für die olfaktorischen Informationen, und zuletzt mit dem lateralen Protozerebrum (LP), einer prämotorischen Ausgangsregion des Gehirns^[106]. In der olfaktorischen Konditionierung spielen die Pilzkörper eine zentrale und herausragende Rolle. Sie erhalten die olfaktorischen, visuellen und mechanosensorischen Eingänge getrennt in verschiedene Strukturen^[118] und sind schon deshalb in gewisser Weise für die Gedächtnisbildung verantwortlich. Der zum Pilzkörper gehörige α -Lobus wurde ebenfalls ausgewählt, da diese Ausgangsregion des Pilzkörpers Neurone (PE1) enthält, die in den Peduncle und in das laterale Protozerebrum hinein Verzweigungen zeigen und mit dem olfaktorischen Lernen in Verbindung gebracht wurden^[104]. In Abbildung 28 (S. 64) sind diese Regionen schematisch dargestellt^[107].

Abbildung 29a-d (S. 66) zeigt die Empfindlichkeitsveränderungen nach ADP-Freisetzung in vier verschiedenen Gehirnregionen: a) optische Loben, b) Antennalloben, c) α -Loben und d) laterales Protozerebrum. Es ist eindeutig zu erkennen, dass die ADP-Freisetzung mit anschließender AMPK-Aktivierung im optischen Lobus der Biene keinen Einfluss auf die Zuckerwasserempfindlichkeit hat (Abb. 29a).

Die ADP-Freisetzung im Antennallobus ist hingegen ausreichend, um die Bienen künstlich hungrig zu machen (Abb. 29b). Fünf Minuten nach ADP-Freisetzung ist ein Anstieg der Empfindlichkeit zu erkennen, 10 bis 20 Minuten danach eine eindeutige Empfindlichkeitserhöhung ($p_{10 \text{ min}} = 0,011$; $p_{15 \text{ min}} = 0,0$; $p_{20 \text{ min}} = 0,012$). Während die Kontrollgruppe kaum oder überhaupt nicht auf den Zuckerstimulus reagiert, zeigt die mit Licht behandelte Gruppe einen Anstieg von über 30 %.

Im α -Lobus sieht es ähnlich aus. Die Kontrollgruppe reagiert kaum auf das Zuckerwasser (ca. 10 %), die behandelte Gruppe hingegen zeigt zu allen vier verschiedenen Zeitpunkten eine erhöhte Zuckerempfindlichkeit, die von 30 bis über 46 % reicht (Abb. 29c; $p_{5 \text{ min}} = 0,005$; $p_{10 \text{ min}} = 0,002$; $p_{15 \text{ min}} = 0,031$; $p_{20 \text{ min}} = 0,022$). Während die Empfindlichkeit bei Lichtbehandlung des Antennallobus mit der Zeit zunimmt, fällt diese bei ADP-Freisetzung im α -Lobus ab.

Wird ADP im lateralen Protozerebrum freigesetzt, ist eine Erhöhung in der Zuckerempfindlichkeit nur zu Beginn, und zwar fünf Minuten nach der Photofreisetzung, zu erkennen (Abb. 29d; $p_{5 \text{ min}} = 0,024$). Danach nimmt die Empfindlichkeit wie bei der ADP-Freisetzung im α -Lobus kontinuierlich ab.

In den Pilzkörpern führt die ADP-Freisetzung in den ersten zehn Minuten zu keiner Veränderung in der Empfindlichkeit (Abb. 30a, S. 67). Erst nach 15 Minuten ist ein Anstieg in der Zuckerempfindlichkeit zu erkennen, die nach 20 Minuten auf fast 50 % angestiegen ist ($p_{20 \text{ min}} = 0,035$).

Werden hingegen die medianen oder lateralen Kelche der Pilzkörper gezielt einer ADP-Freisetzung unterworfen, ist nur nach fünf Minuten, aber nicht wie bei Behandlung der gesamten Pilzkörperregion nach 20 Minuten eine Empfindlichkeitserhöhung zu beobachten (Abb. 30b und c, S. 67; $p_{\text{med.}} = 0,01$; $p_{\text{lat.}} = 0,01$).

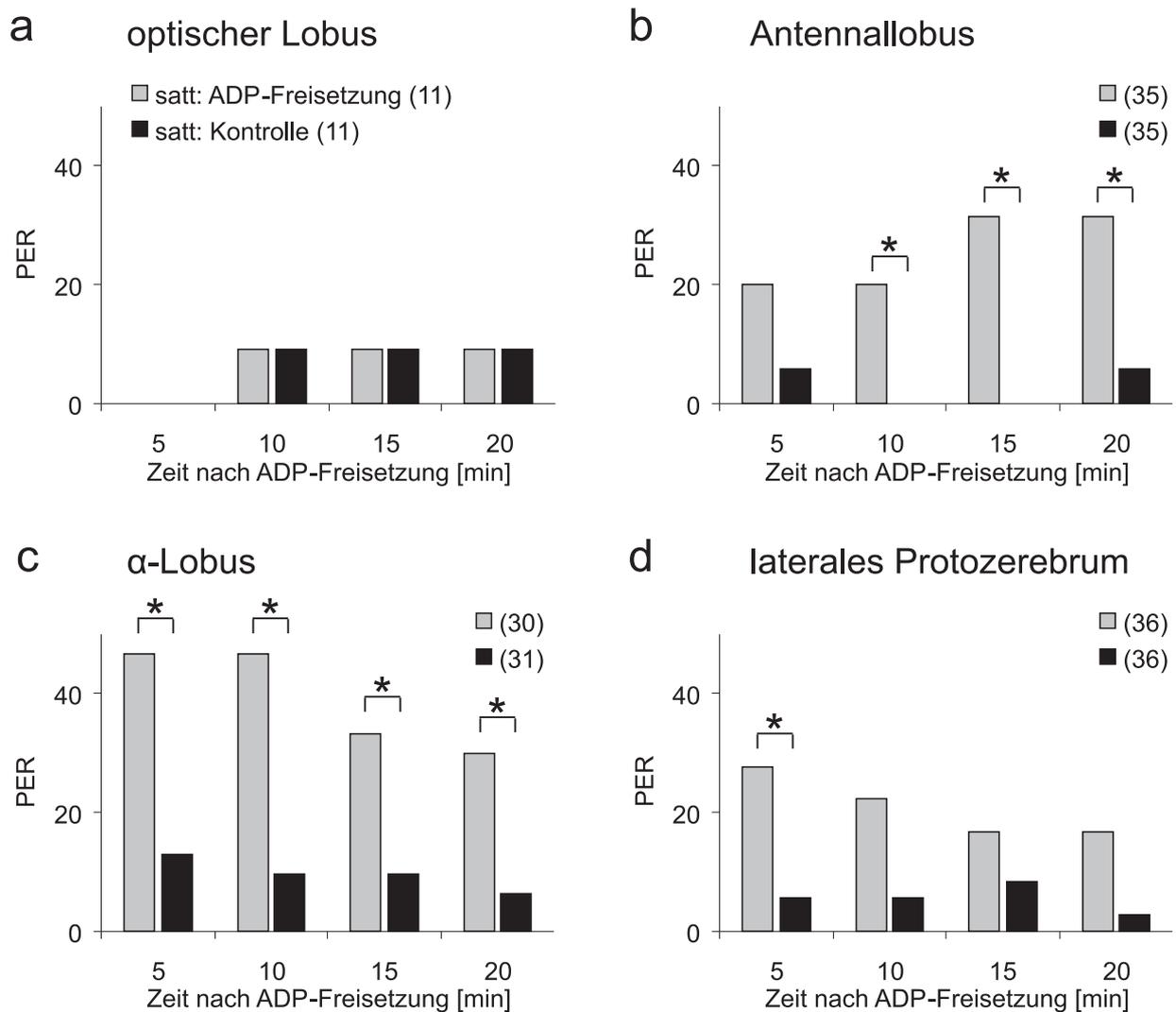


Abbildung 29: Empfindlichkeit des Rüsselreflexes bei gesättigten Bienen nach Photofreisetzung von ADP im **a)** optischen Lobus, **b)** Antennallobus, **c)** α -Lobus und **d)** lateralen Protozerebrum.

a) Photofreisetzung von ADP führt im optischen Lobus zu keiner erhöhten Empfindlichkeit auf den Zuckerwasserstimulus. **b, c und d)** Photofreisetzung von ADP führt im Antennallobus, α -Lobus und im lateralen Protozerebrum zu unterschiedlichen Zeiten zu einer erhöhten Empfindlichkeit auf den Zuckerwasserstimulus. Dargestellt ist der PER [%] der Bienen, die auf den Zuckerwasserstimulus (0,3 M) reagiert haben. „Kontrolle“ kennzeichnet die Bienengruppe ohne Photofreisetzung des ADP. Die Werte in Klammern geben die Anzahl der Bienen in der jeweiligen Gruppe an. Mit einem Stern gekennzeichnet sind Werte, die sich signifikant voneinander unterscheiden (Exakter Fisher-Test $p < 0,05$).

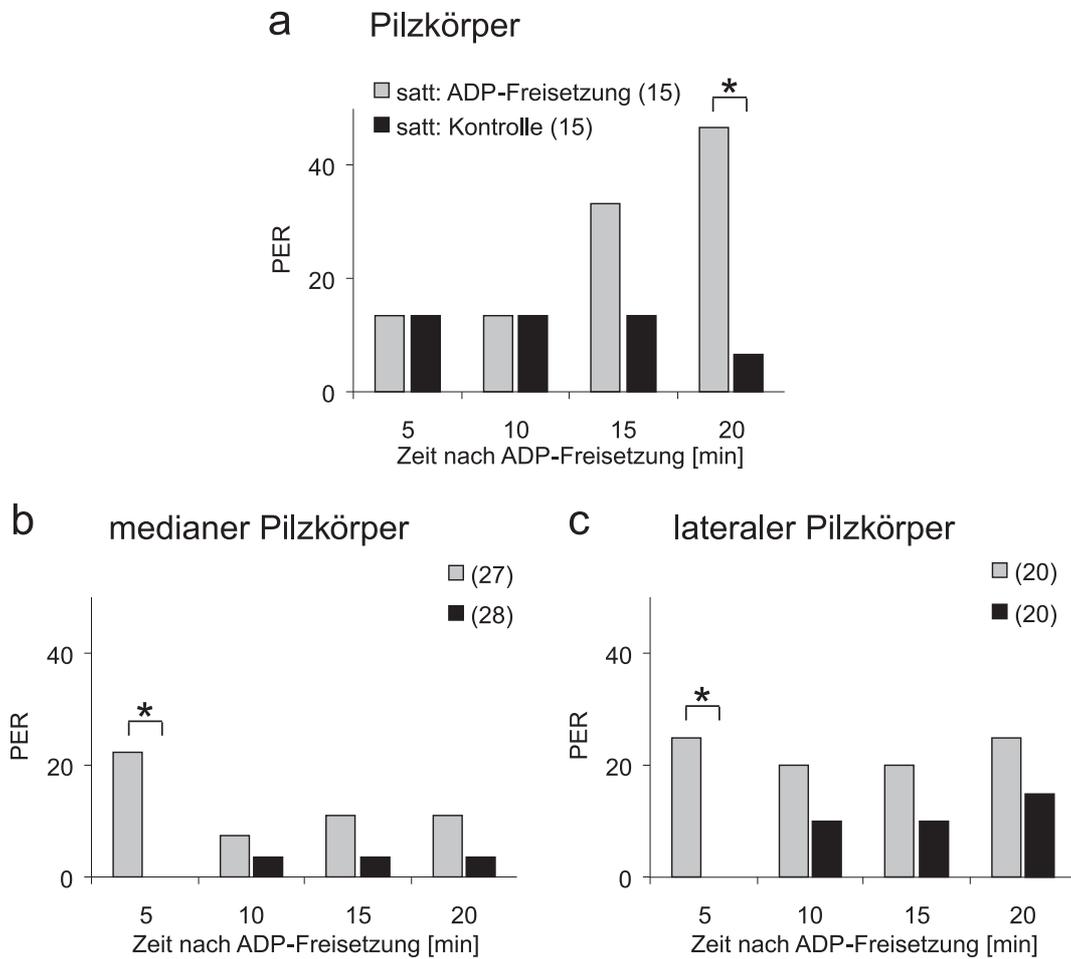


Abbildung 30: Empfindlichkeit des Rüsselreflexes bei gesättigten Bienen nach Photofreisetzung von ADP im **a)** Pilzkörper, **b)** medianen Pilzkörper und **c)** lateralen Pilzkörper.

a) Photofreisetzung von ADP führt im Pilzkörper zu einer erhöhten Empfindlichkeit auf den Zuckerwasserstimulus. **b und c)** Photofreisetzung von ADP führt im medianen und lateralen Kelch der Pilzkörper zu einer erhöhten Empfindlichkeit auf den Zuckerwasserstimulus. Dargestellt ist der PER [%] der Bienen, die auf den Zuckerwasserstimulus (0,3 M) reagiert haben. „Kontrolle“ kennzeichnet die Bienengruppe ohne Photofreisetzung des ADP. Die Werte in Klammern geben die Anzahl der Bienen in der jeweiligen Gruppe an. Mit einem Stern gekennzeichnet sind Werte, die sich signifikant voneinander unterscheiden (Exakter Fisher-Test $p < 0,05$).

3.5.1.4 Gehirnregionen, die die Empfindlichkeit des Rüsselreflexes nach ATP-Freisetzung reduzieren

In Kapitel 3.5.1.2 wurde gezeigt, dass die ATP-Freisetzung im gesamten Bienenhirn nach zehn Minuten zu einer Senkung der Zuckerwasserempfindlichkeit führt. Im Weiteren soll ATP gezielt und symmetrisch in zwei verschiedenen Gehirnregionen hungriger Bienen freigesetzt werden. Dabei handelt es sich um den Antennallobus und das laterale Protozerebrum. Es sollte untersucht werden, ob diese Regionen ebenfalls für eine Verringerung der Zuckerempfindlichkeit verantwortlich sind und nicht nur für die in Kapitel 3.5.1.3 gezeigte Erhöhung der Empfindlichkeit nach ADP-Freisetzung. Die Empfindlichkeiten wurden auch hier zu vier verschiedenen Zeitpunkten (5, 10, 15 und 20 min) nach der Photofreisetzung mit 30 mM Sucrose getestet (Abb. 31, S. 69).

Bei der ATP-Freisetzung im Antennallobus (Abb. 32a, S. 69) ist zehn Minuten nach der Lichtbehandlung eine Verringerung der Zuckerempfindlichkeit zu erkennen ($p_{10 \text{ min}} = 0,021$). 15 und 20 Minuten nach der ATP-Freisetzung tritt kein Unterschied zur Kontrollgruppe, in der kein ATP freigesetzt wurde, auf (ohne Abb.). Wird im Antennallobus gesättigter Bienen ADP freigesetzt, findet ebenfalls nach zehn Minuten eine Veränderung statt. In diesem Fall ist eine Erhöhung der Empfindlichkeit zu beobachten (Abb. 29b, S. 66).

Eine ebenfalls gegenläufige Reaktion ist im Fall des lateralen Protozerebrums zu beobachten. Dort führt die AMPK-Aktivierung durch die ADP-Freisetzung nach fünf Minuten zu einer Erhöhung der Zuckerwasserempfindlichkeit (Abb. 29d, S. 66). Umgekehrt sorgt die ATP-Freisetzung in dieser Region und zum selben Zeitpunkt nach der Photofreisetzung dafür, dass die Bienen weniger auf 30 mM Zuckerwasser reagieren (Abb. 32b, S. 69; $p_5 \text{ min} = 0,01$). Zu späteren Zeitpunkten ist kein Unterschied zwischen beiden hungrigen Bienengruppen festzustellen (15 und 20 min ohne Abb.).

Diese „Kartierungsexperimente“ haben gezeigt, dass die verschiedenen Gehirnregionen die Zuckerwasserempfindlichkeit zu unterschiedlichen Zeiten beeinflussen oder wie im Fall des optischen Lobus gar keinen Einfluss darauf haben. Interessant ist darüber hinaus, dass die ADP- bzw. ATP-Freisetzung in derselben Gehirnregion (Antennallobus und laterales Protozerebrum) zum selben Zeitpunkt zu einer Erhöhung (ADP-Freisetzung) bzw. zu einer Erniedrigung (ATP-Freisetzung) der Zuckerwasserempfindlichkeit führt.

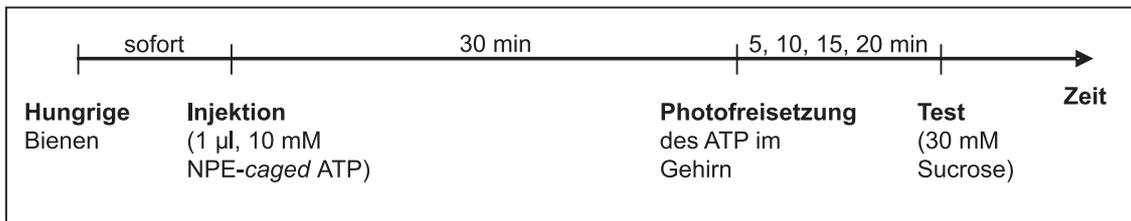


Abbildung 31: Versuchsaufbau für die Messung der Empfindlichkeit des Rüsselreflexes bei hungrigen Bienen nach der Photofreisetzung des ATP.

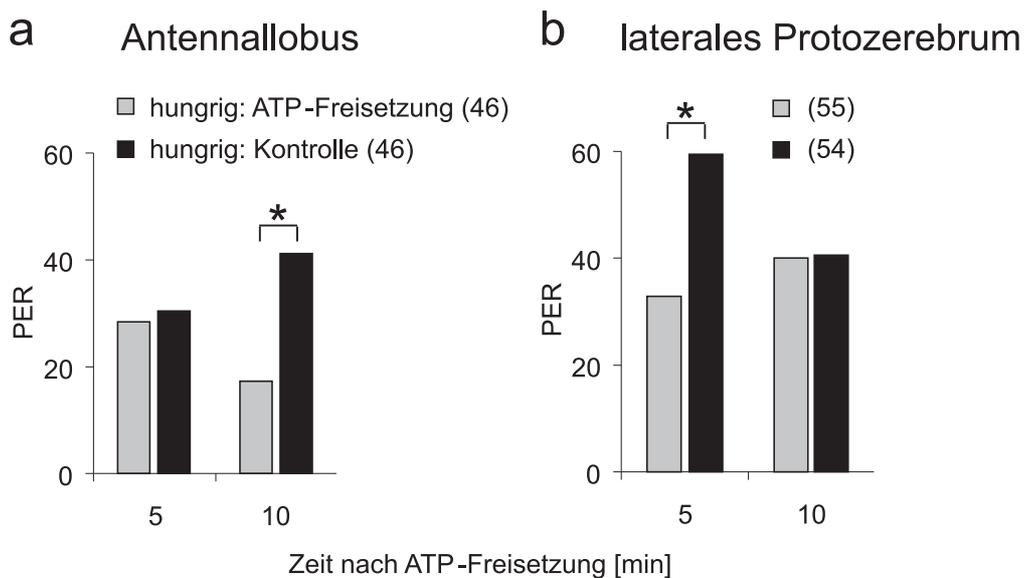


Abbildung 32: Empfindlichkeit des Rüsselreflexes bei hungrigen Bienen nach Photofreisetzung von ATP **a)** im Antennallobus und **b)** im lateralen Protozerebrum.

a und b) Photofreisetzung von ATP im Antennallobus und im lateralen Protozerebrum führt zu einer verringerten Empfindlichkeit für den Zuckerwasserstimulus (30 mM). Dargestellt ist der PER [%] der Bienen, die auf den Zuckerwasserstimulus (30 mM) reagiert haben. „Kontrolle“ kennzeichnet die Bienengruppe ohne Photofreisetzung des ATP. Die Werte in Klammern geben die Anzahl der Bienen in der jeweiligen Gruppe an. Mit einem Stern gekennzeichnet sind Werte, die sich signifikant voneinander unterscheiden (Exakter Fisher-Test $p < 0,05$).

3.5.1.5 AMPK-Aktivierung in einer Hemisphäre macht auch die andere Hemisphäre „hungrig“

Die meisten sensorischen und neuronalen Systeme sind bilateralsymmetrisch angelegt, so dass seitenspezifische und überzählige Informationen erfasst werden. Dennoch werden einige Wahrnehmungsfunktionen vorwiegend oder ausschließlich in einer Gehirnhälfte verarbeitet, obwohl der sensorische Eingang bilateralsymmetrisch vorliegt. Beim Menschen gibt es viele Bereiche, zum Beispiel Sprache, Musik oder Emotionen, bei denen eine Hemisphäre über die andere dominiert^[34,190]. Bei Bienen wurde gezeigt, dass Gedächtnisse von einer Hemisphäre in die andere übertragen werden, wenn sie beispielsweise bei einer Konditionierung nur einseitig mit einem Duft stimuliert werden^[164]. Bienen sind aber auch in der Lage, olfaktorische Informationen seitenspezifisch zu unterscheiden^[164]. Ebenso kann ein einseitiger Zuckerstimulus auf die Antenne eine unilaterale Sensitisierung verursachen, während ein Zuckerstimulus auf den Rüssel der Biene eine bilaterale Sensitisierung bewirkt^[165]. Welche Auswirkungen hat nun die ADP-Freisetzung in nur einer Hemisphäre auf die Zuckerwasserempfindlichkeit? Es soll untersucht werden, ob für dieses Verhalten eine Lateralität existiert und ob eine Übertragung des künstlichen Hungersignals in die jeweils andere Gehirnhälfte stattfindet. Zu diesem Zweck wurde bei gesättigten Bienen das ADP ausschließlich in einer Hemisphäre freigesetzt. Anschließend wurden die Tiere entweder ipsilateral oder kontralateral getestet. Wie in Abbildung 33 zu sehen ist, wurden auch hier diejenigen Tiere aus dem Experiment ausgeschlossen, die schon beim Test fünf Minuten vor der Photofreisetzung des ADP positiv auf den auf beide Antennen gegebenen Zuckerwasserstimulus reagierten.

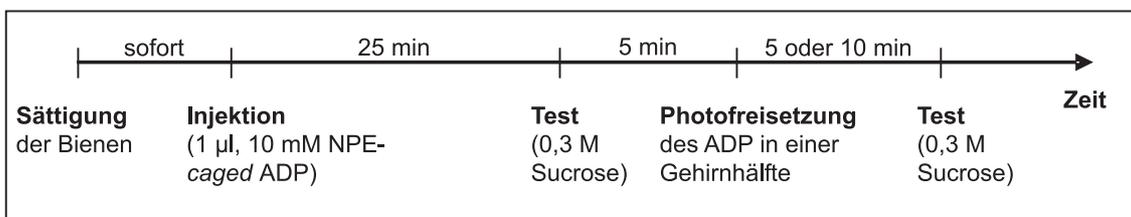


Abbildung 33: Versuchsaufbau für die Messung der Empfindlichkeit des Rüsselreflexes bei gesättigten Bienen nach der Photofreisetzung von ADP in einer Gehirnhälfte.

Abbildung 34 zeigt, dass die ADP-Freisetzung nach fünf Minuten nur dann zu einer Erhöhung (ca. 30 %) der Zuckerwasserempfindlichkeit führt, wenn die Bienen ipsilateral getestet werden, d.h. auf der Seite, auf der auch das ADP im Gehirn freigesetzt wurde ($p_{i \text{ vs. } k} = 0,012$; $p_{i \text{ vs. } K} = 0,013$). Werden die Bienen hingegen auf der kontralateralen Seite getestet, gibt es keinen Unterschied zur Kontrollgruppe, in der kein ADP freigesetzt wurde (beide ca. 5 %). Beim Testen der Bienen zehn Minuten nach der ADP-Freisetzung ist kein Unterschied zwischen der ipsi- und der kontralateral getesteten Gruppe zu beobachten (beide 50 %). Sie unterscheiden sich aber deutlich von der Kontrollgruppe, welche überhaupt nicht auf den Zuckerwasserstimulus reagiert ($p_{i \text{ vs. } K} = 0,002$; $p_{k \text{ vs. } K} = 0,002$). Somit wird deutlich, dass es einen Transfer des „Hungersignals“ von einer Hemisphäre in die andere gibt, und dass es nur eine Frage der Zeit ist, bis dieser stattfindet.

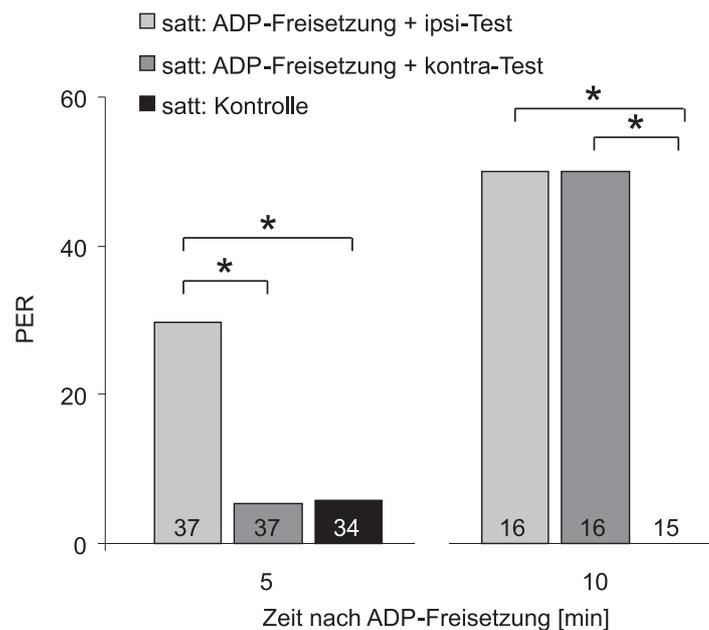


Abbildung 34: Empfindlichkeit des Rüsselreflexes nach Photofreisetzung von ADP in einer Gehirnhälfte. Photofreisetzung von ADP führt nach fünf Minuten im ipsilateralen Test zu einer erhöhten Empfindlichkeit gegenüber dem Zuckerwasserstimulus, verglichen mit der Kontrolle und der kontralateral getesteten Gruppe. Nach zehn Minuten gibt es keinen Unterschied zwischen der ipsi- und der kontralateral getesteten Gruppe. Dargestellt ist der PER [%] der Bienen, die auf den Zuckerwasserstimulus (0,3 M) reagiert haben. „Kontrolle“ kennzeichnet die Bienengruppe ohne Photofreisetzung des ADP. In den Balken ist die Anzahl der Bienen für die jeweilige Gruppe angegeben. Mit einem Stern gekennzeichnet sind Mittelwerte, die sich signifikant voneinander unterscheiden (Exakter Fisher-Test $p < 0,05$).

3.5.2 AMPK-Aktivierung verlängert den Vorgang der Habituation des Rüsselreflexes

Die Habituation, eine Form des nicht-assoziativen Lernens, ist eng mit der Zuckerwasserempfindlichkeit und dem Sättigungszustand der Bienen verknüpft. Bienen mit einer hohen Empfindlichkeit gegenüber Sucrose lassen sich schwieriger habituierten als Bienen mit einer verminderten Zuckerwasserempfindlichkeit^[171], genauso wie sich gesättigte schneller als hungrige Bienen habituierten lassen^[24]. Es soll nun untersucht werden, ob die AMPK-Aktivität, die die Empfindlichkeit modulieren kann, auch die Habituation beeinflusst. Damit sich die Tiere schneller habituierten lassen, wurden sie zuvor mit vier Tropfen Sucroselösung gefüttert. Unmittelbar danach erfolgte die Injektion der NPE-*caged* Nukleotide bzw. PBS als Kontrolle. Nach 25 Minuten wurden die Bienen habituiert und fünf Minuten später bei den gewünschten Gruppen die Nukleotide freigesetzt. Nach weiteren fünf Minuten wurden die Tiere erneut habituiert, um eine mögliche Veränderung im Habituationsvorgang zu erkennen (Abb. 35).

Da hungrige Tiere mehr Stimulation benötigen, um habituiert zu werden^[171], würde man erwarten, dass sich die mit AMPK stimulierten Bienen wie hungrige Tiere verhalten. Schließlich führt bei gesättigten Tieren im gesamten Bienenhirn freigesetztes ADP fünf und zehn Minuten später zu einer Erhöhung der Zuckerwasserempfindlichkeit (s. Abb. 24a, S. 60 und Abb. 34, S. 71). Im Fall von Bienen, bei denen ATP freigesetzt wird, könnte sich dementsprechend die Habituation beschleunigen, da freigesetztes ATP zu einer Erniedrigung der Zuckerempfindlichkeit führt (s. Abb. 26a, S. 62).

Betrachtet man das Habituationsverhalten der Tiere fünf Minuten nachdem ADP im ganzen Gehirn freigesetzt wurde (Abb. 36, S. 74), ist zu erkennen, dass diese Tiere mehr Zuckerwasserstimuli auf die Antenne benötigen um habituiert zu werden, als vor der ADP-Freisetzung. Der Unterschied zur Kontrollgruppe, in der das ADP nicht freigesetzt wurde, beträgt fast 60 % ($p_{ADP} = 0,01$). Wird wiederum ATP freigesetzt, ändert

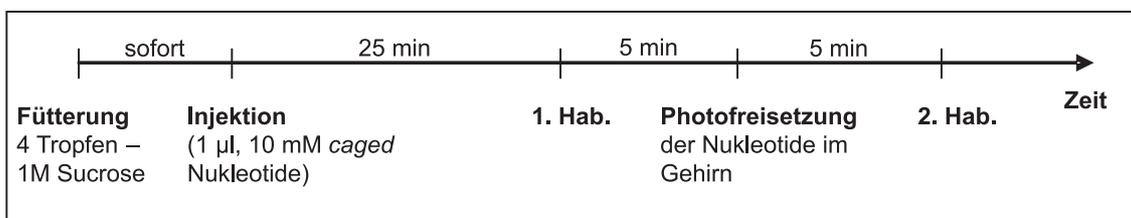


Abbildung 35: Versuchsaufbau für die Habituation des Rüsselreflexes bei *Apis mellifera* nach Photofreisetzung der *caged* Nukleotide.

sich nichts am Habitationsverhalten. Um einen möglichen Einfluss des Lichtes allein auf das Habitationsverhalten auszuschließen, wurde in einem Kontrollexperiment PBS ohne NPE-*caged* Nukleotide injiziert und eine Gruppe mit Licht behandelt. Dabei stellte sich heraus, dass es keinen durch Licht allein hervorgerufenen Effekt gibt. Die Habituation wurde überdies 3, 10 und 20 Minuten nach der ADP-Freisetzung getestet. Zu den ersten beiden Zeiten treten um 40 % erhöhte Habitationsraten auf, die sich aber nicht signifikant von der Kontrollgruppe unterscheiden, nach 20 Minuten ist kein Unterschied mehr zu erkennen (ohne Abb.).

Im nächsten Versuch wurden erneut zwei verschiedene Gehirnstrukturen der Honigbiene ausgewählt, die beim assoziativen und beim nicht-assoziativen Lernen eine wichtige Rolle spielen: der Antennallobus und der mediane Pilzkörper. Der Antennallobus erhält die Duftinformation zuerst und leitet diese „verschlüsselt“ an den Pilzkörper weiter. Hier wird die Duftinformation beispielsweise mit einer Belohnung assoziiert. Um zu testen, ob die Aktivierung der AMPK im Antennallobus genügt, um eine Veränderung in der Habituation hervorzurufen, wurde in dieser Region ADP freigesetzt und fünf Minuten darauf erneut eine Habituation durchgeführt. Wie in Abbildung 37 (S. 74) zu sehen ist, ist kein signifikanter Unterschied im Habitationsverhalten erkennbar. Wird das ADP dagegen nur in den medianen Pilzkörperregionen freigesetzt, müssen die Bienen häufiger mit dem Zuckerwasser stimuliert werden, um sich habituieren zu lassen (Abb. 37, S. 74; $p_{mMB} = 0,023$). Zusätzlich wurden die Tiere zehn Minuten nach der Freisetzung des ADP habituieren. Hier trat jedoch weder bei der Behandlung der Antennalloben noch der medianen Pilzkörper eine signifikante Habitationsveränderung auf, es war lediglich eine ansteigende Tendenz bei der mit Licht behandelten Gruppe festzustellen (ohne Abb.).

In Hinblick auf den medianen Pilzkörper bedeutet dies, dass eine Korrelation mit der Zuckerwasserempfindlichkeit existiert. Wie Abbildung 30b (S. 67) zeigt, führt die ADP-Freisetzung in dieser Region nach fünf Minuten zu einer Empfindlichkeitszunahme, bei zehn Minuten allerdings nicht mehr. Im Falle des Antennallobus ist zu erkennen, dass die ADP-Freisetzung nach zehn Minuten zu einer Erhöhung der Empfindlichkeit führt (Abb. 29b, S. 66), dies aber keinen Einfluss auf das Habitationsverhalten hat.

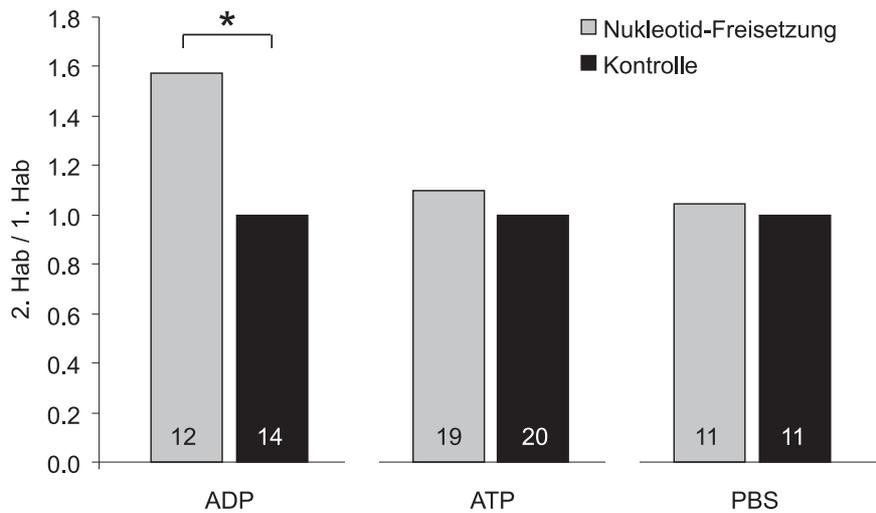


Abbildung 36: Habituation des Rüsselreflexes nach Injektion der *caged* Nukleotide mit bzw. ohne Photofreisetzung im gesamten Gehirn von *Apis mellifera*.

ADP-Freisetzung führt nach fünf Minuten zu einer Erhöhung der Habituationsrate. ATP-Freisetzung und nukleotidfreies PBS zeigen trotz Lichteinwirkung keine Veränderung in der Habituation. Dargestellt sind die Mittelwerte des Ratio (2.Hab./1.Hab.), normiert auf die Kontrolle (ohne Photofreisetzung). In den Balken ist die Anzahl der Tiere für die jeweilige Gruppe angegeben. Mit einem Stern gekennzeichnet sind Mittelwerte, die sich signifikant voneinander unterscheiden (Wilcoxon Rang-Test $p < 0,05$).

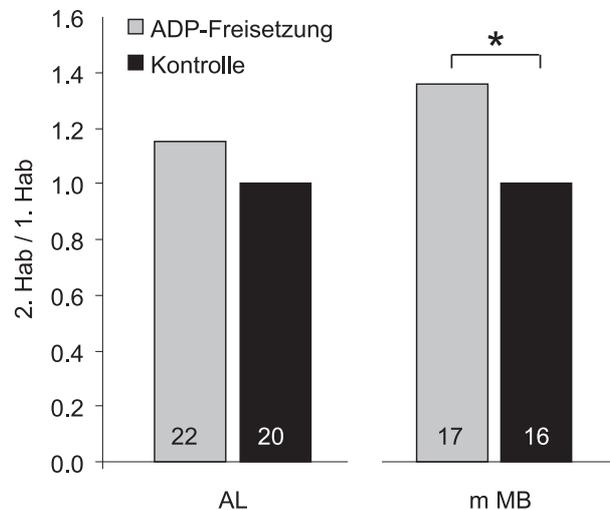


Abbildung 37: Habituation des Rüsselreflexes nach Injektion der *caged* Nukleotide mit und ohne Photofreisetzung im Antennallobus (AL) und im medianen Pilzkörper (m MB).

ADP-Freisetzung führt nach fünf Minuten zu einer Erhöhung der Habituationsrate, wenn sie in den medianen Pilzkörpern erfolgt. Wird ADP im Antennallobus freigesetzt, ist trotz Lichteinwirkung keine Veränderung in der Habituation zu erkennen. Dargestellt sind die Mittelwerte des Ratio (2.Hab./1.Hab.) normiert auf die Kontrolle (ohne Photofreisetzung). In den Balken ist die Anzahl der Tiere für die jeweilige Gruppe angegeben. Mit einem Stern gekennzeichnet sind Mittelwerte, die sich signifikant voneinander unterscheiden (Wilcoxon Rang-Test $p < 0,05$).

3.5.3 Klassische olfaktorische Konditionierung: Die Rolle der AMPK bei der Gedächtnisbildung

Bei Bienen korreliert komplexes Verhalten wie das assoziative Lernen mit dem Sättigungszustand der Tiere. Gesättigte Bienen haben einen niedrigeren Lernindex als hungrige Tiere^[108]. Darüber hinaus sind Bienen, die während einer 3-Trial-Konditionierung hungrig sind, in der Lage, translations- (nach 1 bis 2 Tagen) und transkriptionsabhängige (ab 3 Tagen) Gedächtnisse zu bilden^[46]. Werden die Bienen hingegen vier Stunden vor dem Training gefüttert, werden diese Gedächtnisse nicht ausgebildet^[46].

In diesem Kapitel soll untersucht werden, ob die Aktivierung der AMPK während des Trainings bei gesättigten Bienen zu einer Gedächtnisverbesserung führt, um eine Verbindung zwischen der AMPK und dem appetitiven gustatorischen Lernen zu finden. Schließlich zeigen hungrige Bienen verglichen mit gesättigten eine erhöhte AMPK-Aktivität im Gehirn, wie in Abbildung 18 (S. 52) dargestellt wird.

Um dies zu zeigen, wurde eine schwache Trainingsprozedur gewählt, die 1-Trial-Konditionierung. Dies war sinnvoll, da in vorangegangenen Experimenten nach einer 3-Trial-Konditionierung keine Unterschiede im Gedächtnisabruf gefunden wurden, wie Abbildung 9b (S. 37) zeigt.

Zunächst soll der Unterschied beim Lernen und dem Gedächtnis von Bienen dargestellt werden, die während des Trainings hungrig bzw. satt sind. In einem zweiten Experiment wurden gesättigte Bienen trainiert, bei denen die AMPK vor oder nach dem Training aktiviert wurde. Damit kann getestet werden, ob eine AMPK-Aktivierung während der Gedächtnisbildung oder erst in der Konsolidierungsphase notwendig ist. Die Abbildungen 38 und 39 (S. 76) zeigen, wie die jeweiligen Versuche durchgeführt wurden.



Abbildung 38: Versuchsaufbau für die klassische Konditionierung des Rüsselreflexes bei *Apis mellifera* mit Photofreisetzung des ADP vor der Konditionierung.

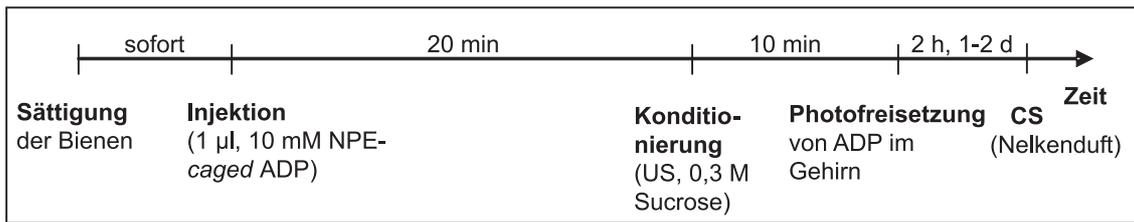


Abbildung 39: Versuchsaufbau für die klassische Konditionierung des Rüsselreflexes bei *Apis mellifera* mit Photofreisetzung des ADP nach der Konditionierung.

In Abbildung 40a (S. 77) wird verdeutlicht, dass gesättigte Bienen während des Trainings kein Gedächtnis bilden, da diese Tiere ein und zwei Tage später nicht auf den Duft reagieren, obwohl sie zum Zeitpunkt des Gedächtnisabrufes hungrig sind. Bei den hungrigen Bienen hingegen führt die 1-Trial-Konditionierung zur Ausbildung eines Kurzzeitgedächtnisses (2 h) von über 43 %, welches nach zwei Tagen auf 16 % abfällt, wobei diese Gruppe sich nicht mehr von der gesättigten Bienengruppe unterscheidet ($p_{2h} = 0,0$; $p_{1d} = 0,0$). Es ist zu erkennen, dass die hungrigen Tiere während des Trainings sehr stark (80 %) auf die Zuckerwasserbelohnung (US, 0,3 M Sucrose) reagieren, während die 30 Minuten vor dem Training gesättigten Tiere wesentlich geringer auf den Zuckerreiz antworten (34 %; $p_{US} = 0,0$).

Wie verhält sich nun die Gedächtnisbildung bei gesättigten Bienen, bei denen zehn Minuten vor und zehn Minuten nach dem Training im gesamten Gehirn ADP freigesetzt wird, um die AMPK zu aktivieren? Aus Abbildung 40b (S. 77) geht hervor, dass diejenigen Tiere, bei denen die AMPK nach dem Training aktiviert wurde, genausowenig ein Gedächtnis bilden wie die gesättigte Bienengruppe aus Abbildung 40a (S. 77). Die Gruppe hingegen, bei der die AMPK vor dem Training durch die Freisetzung von ADP aktiviert wurde, zeigt nach zwei Stunden ein Gedächtnis von 23 %, welches nach zwei Tagen auf 47 % ansteigt ($p_{2h} = 0,002$; $p_{1d} = 0,039$; $p_{2d} = 0,001$). Bemerkenswerterweise unterscheiden sich die beiden Gruppen nicht hinsichtlich der Reaktion auf die Zuckerwasserbelohnung während des Trainings: die Empfindlichkeit, auf den Zucker zu reagieren, beträgt bei beiden etwa 45 % (US, 0,3 M Sucrose). Warum gibt es in diesem Fall keinen Unterschied in der Zuckerwasserempfindlichkeit, der doch zuvor nachgewiesen wurde? Eine mögliche Erklärung ist die Tatsache, dass bei den Konditionierungsexperimenten nicht wie bei den Empfindlichkeitstests diejenigen Tiere vom Experiment ausgeschlossen wurden, die schon vor dem Freisetzen der Nukleotide auf das Zuckerwasser reagierten (s. Abb. 23, S. 59).

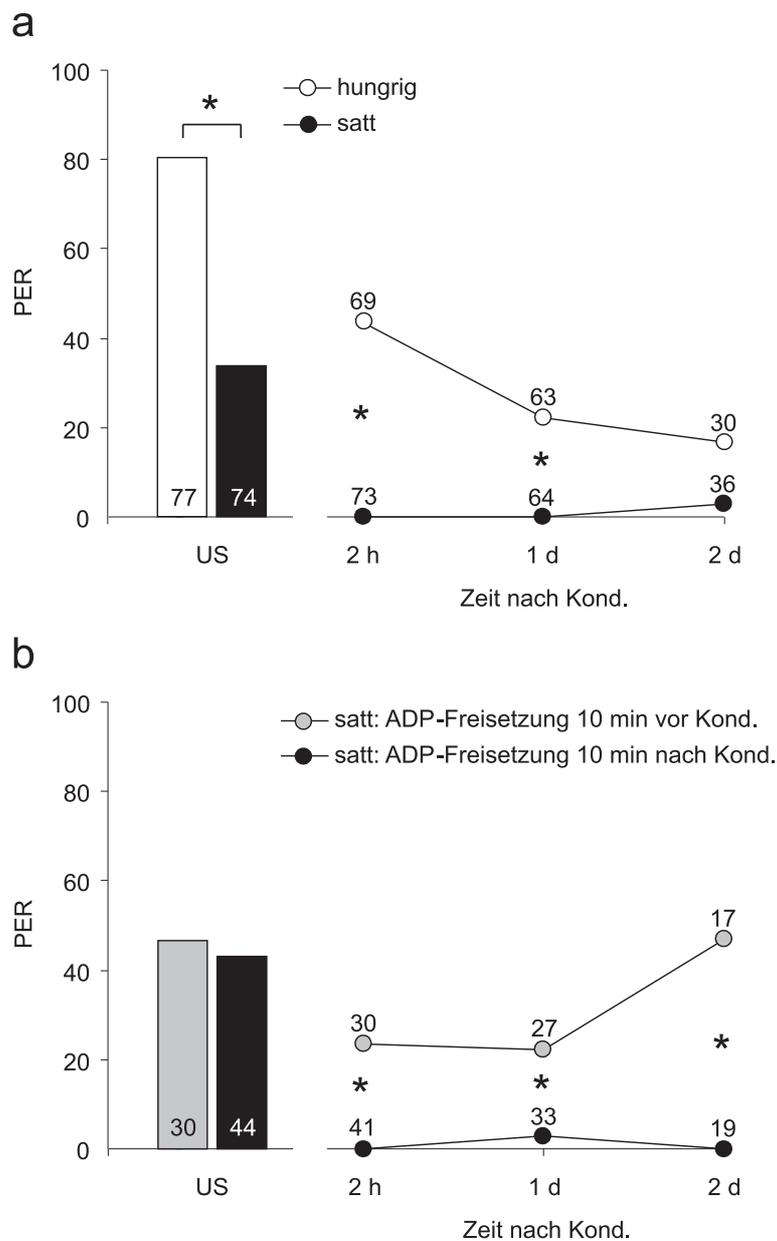


Abbildung 40: 1-Trial-Konditionierung des Rüsselreflexes bei **a)** hungrigen und gesättigten Bienen und **b)** mit Photofreisetzung von ADP im gesamten Gehirn von *Apis mellifera* bei gesättigten Tieren zehn Minuten vor bzw. nach der Konditionierung.

a) Die 1-Trial-Konditionierung führt bei hungrigen Tieren zur Ausbildung eines Kurzzeitgedächtnisses (2 h) von über 43 % und fällt nach zwei Tagen auf 16 % ab. **b)** Die ADP-Freisetzung zehn Minuten vor dem Training führt zu einem Anstieg in der Gedächtnisbildung (von 23 % auf über 47 % nach 2 d). Die ADP-Freisetzung zehn Minuten nach dem Training führt zu keiner Gedächtnisbildung. Dargestellt ist der PER [%] der Bienen, die auf den Zuckerwasserstimulus (0,3 M) im Falle des US sowie auf den Nelkenduft (CS) reagiert haben. In den Balken ist die Anzahl der Bienen für die jeweilige Gruppe angegeben. Mit einem Sternchen gekennzeichnet sind Werte, die sich signifikant voneinander unterscheiden (Exakter Fisher-Test $p < 0,05$).



Abbildung 41: Versuchsaufbau für die klassische Konditionierung des Rüsselreflexes bei *Apis mellifera* mit Photofreisetzung des ADP vor der Konditionierung inkl. verschiedener Inhibitoren oder Stimulanzen von Kinasen.

Dies bedeutet, dass während der Gedächtnisbildung AMPK-abhängige Prozesse in Gang gesetzt werden müssen, um einen Langzeiteffekt im Gedächtnis auszubilden. Eine Aktivierung der AMPK kurz nach dem Training führt zu keinen gedächtnisfördernden Prozessen und scheint deshalb während der Konsolidierung keine Rolle zu spielen. Dies wird dadurch gestützt, dass die AMPK-Aktivierung durch AICAR vor einem 2-Stunden-Gedächtnisabruf bei gefütterten Bienen ebenso wenig zu einer Verbesserung des Gedächtnisses führt (s. Abb. 11 auf S. 39).

Um zu testen, ob dieser Effekt tatsächlich über die AMPK gesteuert wird, wurde auch hier der AMPK-Blocker Compound C eingesetzt. Der Versuchsaufbau wird in Abbildung 41 verdeutlicht. Eine Gruppe der Bienen wurde während der Injektion von NPE-caged ADP zusätzlich mit Compound C behandelt. Dieser blockiert wie bereits gezeigt (s. Abb. 21 auf S. 55) die Phosphorylierung der Aktivierungsstelle (Thr 172) an der α -Untereinheit.

Bei Verwendung des AMPK-Blockers Compound C wird die Empfindlichkeit gegenüber der Zuckerwasserbelohnung während des Trainings vermindert ($p_{US} = 0,043$), obwohl das ADP im gesamten Gehirn freigesetzt wird. Diese beträgt dennoch über 40 % (Abb. 42, S. 79) und unterscheidet sich nicht von der Reaktion der gesättigten Bienen aus den Versuchen zuvor (Abb. 40b, S. 77). Trotz der Reaktion auf den Zucker wird eine Gedächtnisbildung zwei Tage nach dem Training verhindert, während die ohne Compound C behandelte Bienengruppe ein Gedächtnis von 50 % ausbildet ($p_{2d} = 0,0$). Dies bedeutet, dass dieses Gedächtnis von der AMPK-Aktivität zur Zeit des Trainings abhängt.

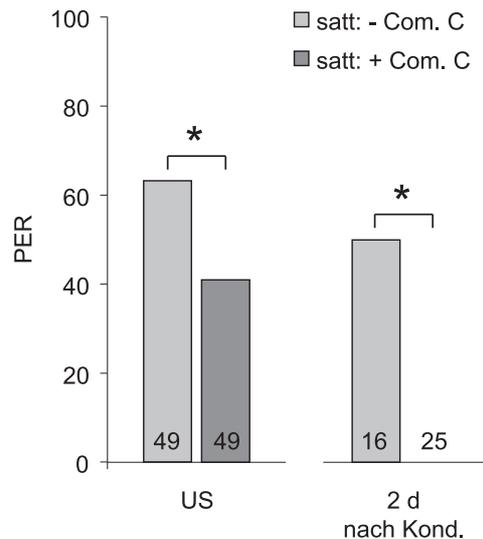


Abbildung 42: 1-Trial-Konditionierung des Rüsselreflexes bei *Apis mellifera* mit bzw. ohne AMPK-Blocker Compound C und mit Photofreisetzung von ADP im gesamten Gehirn gesättigter Tiere zehn Minuten vor der Konditionierung.

Der Einsatz von Compound C führt zu einer verminderten Empfindlichkeit gegenüber der Zuckerwasserbelohnung während des Trainings und verhindert die Gedächtnisbildung durch Hemmung der AMPK nach zwei Tagen. Dargestellt ist der PER [%] der Bienen, die auf den Zuckerwasserstimulus (0,3 M) im Falle des US sowie auf den Nelkenduft (CS) reagiert haben. In den Balken ist die Anzahl der Bienen für die jeweilige Gruppe angegeben. Mit einem Stern gekennzeichnet sind Werte, die sich signifikant voneinander unterscheiden (Exakter Fisher-Test $p < 0,05$).

3.5.4 CaMKK-Hemmung verhindert die Ausbildung des AMPK-abhängigen 2-Tage-Gedächtnisses

In diesem Kapitel soll sich damit auseinandergesetzt werden, wie das AMPK-abhängige 2-Tage-Gedächtnis mit anderen bekannten Signalkaskaden während der Gedächtnisbildung verknüpft ist.

In Frage kommen die an der Regulation der AMPK beteiligten Kinasen CaMKK und PKA (s. Abb. 4, S. 10). Die PKA fungiert im Zellkern als Aktivator für den Transkriptionsfaktor CREB. Diese Signaltransduktion über den „second messenger“ cAMP und PKA zur Aktivierung von CREB ist bedeutsam für die Langzeiterinnerung in Nervenzellen, wie bereits in Kapitel 1.1.2 erläutert wurde. Dabei kommt es zur Genexpression, welche eine Modifikation der Synapsenmorphologie nach sich zieht (synaptische Plastizität). Wie die PKA ist auch CaMKK fähig, CREB zu phosphorylieren^[11], wird aber von PKA durch Phosphorylierung herunterreguliert^[195]. Die CaMKK wird aktiviert, nachdem sie Ca^{2+} gebundenes Calmodulin (Ca^{2+} -CaM) detektiert hat. Ca^{2+} wird eng mit neurona-

ler Aktivität in Verbindung gebracht, da es bei Depolarisierung in Neurone einströmt und als intrazellulärer zweiter Botenstoff wirkt, indem es Lernvorgänge einleitet. Es ist nicht nur in der Lage, die CaMKK zu aktivieren sondern auch die NOS (NO-Synthase), welche als Signal NO produziert und retrograd auf die Präsynapse wirkt.

Um die Vernetzung zwischen dem Zellenergiesensor AMPK und PKA bzw. CaMKK in gedächtnisbildenden Prozessen zu untersuchen, wurden verschiedene Inhibitoren und Stimulanzen der zu untersuchenden Kinasen eingesetzt. Verwendet wurde der CaMKK-Blocker KN-93 ($K_i = 370$ nM), welcher zellpermeabel ist und die PKA-Aktivität nicht beeinflusst^[117]. KT5720, ein zellpermeabler Inhibitor für PKA ($K_i = 56$ nM), beeinträchtigt ebenfalls nicht die Aktivitäten von verschiedenen Kinasen wie PKC und PKG^[117,115,168]. Als Stimulanz für die PKA diente 8-BrcAMP, ein zellpermeables cAMP Analogon mit einer größeren Phosphodiesteraseresistenz als cAMP^[117,168]. Außerdem beeinflusst keines der drei genannten Pharmaka die Vitalität der Honigbiene. Dies trifft ebenso für die Freisetzung von ADP und die Anwendung von Compound C zu.

Der Versuch lief entsprechend der Darstellung in Abbildung 41 (S. 78) ab. Bei allen gesättigten Bienen wurde ADP im Gehirn freigesetzt, zusätzlich wirkten in ausgewählten Gruppen die entsprechenden Drogen, während die 1-Trial-Konditionierung durchgeführt wurde.

In Abbildung 43a (S. 81) ist zu erkennen, dass weder CaMKK- und PKA-Blocker noch PKA-Stimulanzen die Zuckerwasserempfindlichkeit während der 1-Trial-Konditionierung bei den gesättigten Bienen verändert haben, obwohl die ADP-Freisetzung mit einer KN-93-Behandlung zu einer verminderten Zuckerwasserempfindlichkeit führt (o. Abb.), wenn der Versuch wie in Abbildung 23 (S. 59) durchgeführt wird. Bemerkenswerterweise gibt es aber in einem Fall einen Unterschied in dem Gedächtnisabruf zwei Tage nach dem Training (Abb. 43b, S. 81). Durch den CaMKK-Blocker KN-93 wurde AMPK-abhängige Gedächtnisbildung verhindert. Die Bienen ohne die KN-93-Behandlung zeigen ein Langzeitgedächtnis von ca. 30 %, während bei der mit KN-93 behandelten Gruppe kein Gedächtnis abrufbar ist ($p_{KN-93} = 0,002$). Die Hemmung oder die Stimulation von PKA während des Trainings verändert nicht den Gedächtnisabruf nach zwei Tagen. Daraus lässt sich schließen, dass die PKA-Aktivität keinen Einfluss auf das durch AMPK induzierte Gedächtnis hat.

Um diesen Sachverhalt zu stützen, wurde das in Abbildung 44 (S. 82) beschriebene Experiment durchgeführt. Bei den gesättigten Bienen wurde in diesem Experiment kein ADP freigesetzt, stattdessen wurde die PKA mit Hilfe von BrcAMP stimuliert und

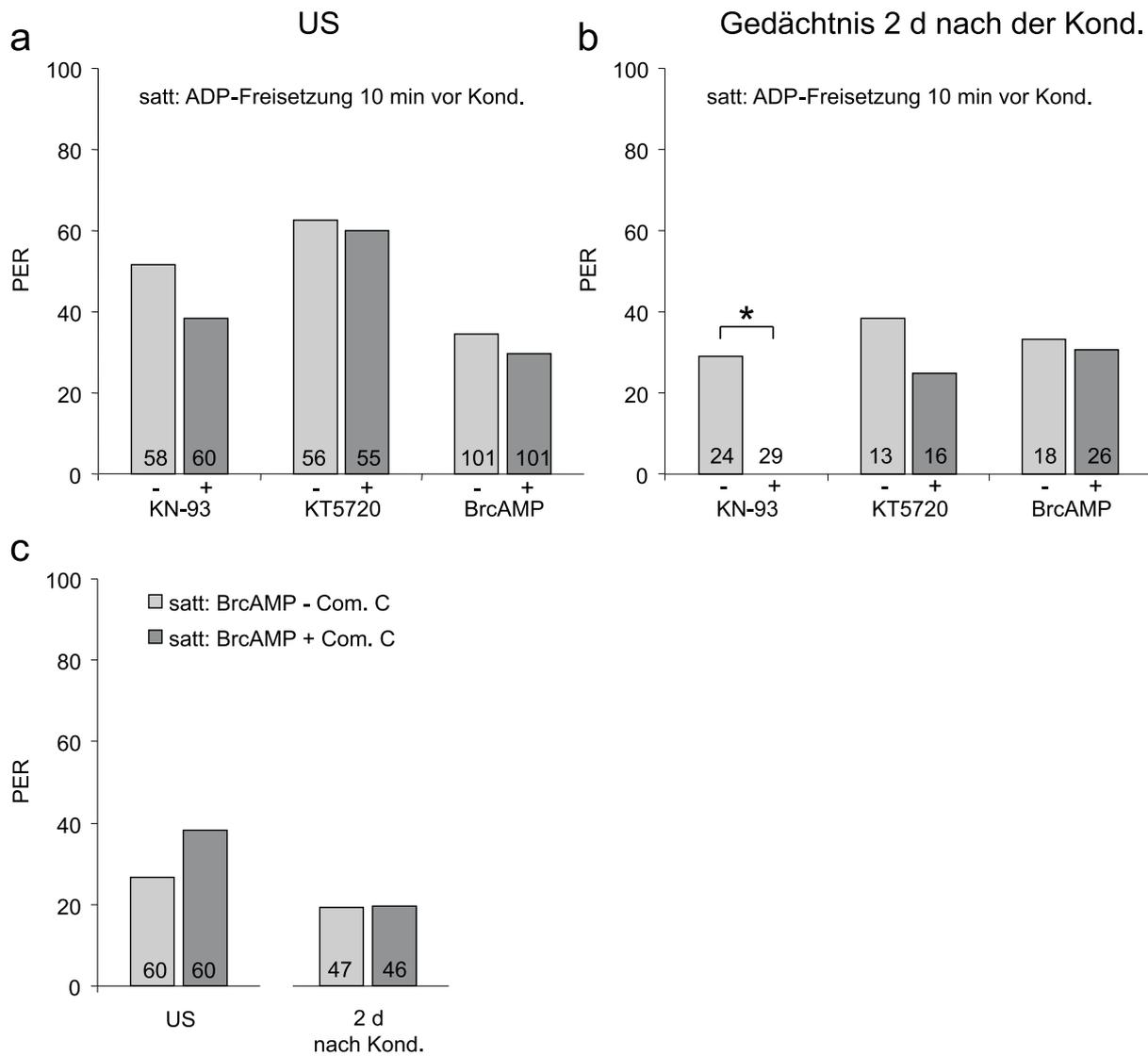


Abbildung 43: 1-Trial-Konditionierung des Rüsselreflexes bei gesättigten Bienen mit Photofreisetzung von ADP zehnte Minuten vor der Konditionierung inkl. verschiedener Inhibitoren oder Stimulanzen von Kinasen (**a und b**), bzw. ohne Photofreisetzung von ADP mit Behandlung von BrcAMP +/- Compound C (**c**).

a) Die Reaktion auf den Zuckerwasserstimulus (US, 0,3 M Sucrose) während des Trainings ändert sich nicht durch die CaMKK-Hemmung (KN-93), PKA-Hemmung (KT5720) oder PKA-Stimulation (BrcAMP). **b)** Die Gedächtnisbildung wird zwei Tage nach dem Training durch die Behandlung mit dem CaMKK-Blocker KN-93 verhindert, nicht aber durch die PKA-Hemmung oder die PKA-Stimulation beeinflusst. **c)** PKA-Stimulation mit BrcAMP führt zur Gedächtnisbildung nach zwei Tagen und ist von AMPK unabhängig. Es gibt weder einen Unterschied in der Belohnungsstärke, noch im Gedächtnisabruf nach zwei Tagen. Dargestellt ist der PER [%] der Bienen, die auf den Zuckerwasserstimulus (0,3 M) im Falle des US sowie auf den Nelkenduft (CS) reagiert haben. In den Balken ist die Anzahl der Bienen für die jeweilige Gruppe angegeben. Mit einem Stern gekennzeichnet sind Gruppen, die sich signifikant voneinander unterscheiden (Exakter Fisher-Test $p < 0,05$).

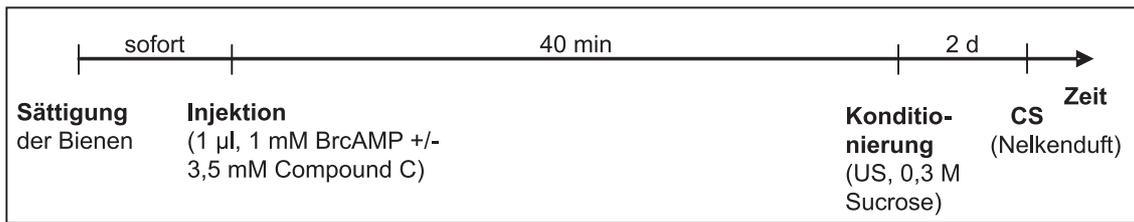


Abbildung 44: Versuchsaufbau für die klassische Konditionierung des Rüsselreflexes bei *Apis mellifera* mit Wirkung von BrcAMP +/- Compound C.

bei einer Bienengruppe die AMPK-Aktivität mit Compound C gehemmt. Da bekannt ist, dass die PKA-Stimulation durch BrcAMP während einer 3-Trial-Konditionierung bei gefütterten Bienen zur Etablierung eines Langzeitgedächtnisses führt^[46], sollte untersucht werden, ob dieses Gedächtnis durch eine AMPK-Hemmung verhindert werden kann.

Die Ergebnisse zeigen (Abb. 43c, S. 81), dass die AMPK-Hemmung nicht zu einem Verlust des 2-Tage-Gedächtnisses führt, wenn dessen Ausbildung durch das BrcAMP begünstigt wird. Normalerweise führt die Compound C-Behandlung zu einer Unterdrückung der Gedächtnisbildung (Abb. 42, S. 79). Somit muss davon ausgegangen werden, dass es sich um zwei unabhängige Signalwege handelt. Einerseits wird ein Gedächtnis gebildet, das von der Aktivität der AMPK während der Konditionierung abhängt, und andererseits ist eine PKA-Stimulation allein für die Gedächtnisbildung ausreichend.

4 Diskussion

In dieser Arbeit sollte untersucht werden, ob der zelluläre Energiesensor AMPK eine Schlüsselrolle bei der Verknüpfung von Motivation und Prozessen des appetitiven Lernens spielt. Damit sollte die Frage beantwortet werden, warum hungrige Tiere während des appetitiven Lernens die besseren Lerner sind. Da die AMPK in der Regulation des Energiehaushaltes der einzelnen Zelle und des gesamten Organismus durch Steuerung des Verhaltens bei der Nahrungsaufnahme eine wichtige Funktion einnimmt, liegt die Vermutung nahe, dass die AMPK beim appetitiven gustatorischen Lernen ebenfalls eine große Rolle spielt, indem sie die Belohnungsstärke in Abhängigkeit vom Energiezustand des Organismus reguliert.

4.1 Manipulation der AMPK-Aktivität: AICAR *versus* ADP

Bekannt ist, dass hungrige Säugetiere eine höhere AMPK-Aktivität im Hypothalamus aufweisen als satte Tiere^[111]. Diese Gehirnregion kontrolliert die Nahrungsaufnahme und den Energieverbrauch des Organismus, indem er Signale wie zirkulierende Nährstoffe und Hormone verarbeitet. Durch Hemmung der hypothalamischen AMPK-Aktivität ist es möglich, die Nahrungsaufnahme bei Säugetieren zu reduzieren^[82,111]. Dies kann zum einen mit Hilfe rekombinanter Adenoviren erzielt werden, die in den Hypothalamus injiziert zu einer dominant-negativen AMPK-Expression führen, wobei die AMPK sowohl in der katalytischen α -Untereinheit als auch in der regulatorischen γ -Untereinheit Mutationen aufweist^[111]. Zum anderen ist die Hemmung durch einen spezifischen AMPK-Blocker, das Compound C, möglich^[82]. Dieser bindet an die γ -Untereinheit und verhindert die Aktivierung durch Phosphorylierung des Threonin 172 an der α -Untereinheit^[224].

Um AMPK künstlich zu aktivieren, ist bisher nur eine Möglichkeit der pharmakologischen Aktivierung bekannt: die Verwendung von AICAR. Dieses Adenosin-Analogon wird in die Zellen aufgenommen und von einer Adenosin-Kinase in AICAR-Monophosphat umgewandelt, welches in der Lage ist die AMPK zu aktivieren^[47,201]. Bei Säugetieren wie beispielweise Ratten ist es möglich, mit Hilfe dieser Methode die Nahrungsaufnahme zu erhöhen, indem das AICAR direkt in den Hypothalamus injiziert wird und

dort die AMPK pharmakologisch aktiviert^[8]. Da in dieser Arbeit ebenfalls eine erhöhte AMPK-Aktivität bei hungrigen gegenüber gesättigten Bienen nachgewiesen wurde, ergab sich die Gelegenheit, vom Sättigungszustand und möglicherweise von der AMPK abhängige Lernprozesse mit Hilfe der pharmakologischen Aktivierung bzw. Hemmung der AMPK zu untersuchen.

In dieser Arbeit wurde zum ersten Mal gezeigt, dass der bei Säugetieren verwendete AMPK-Aktivator AICAR auch bei Insekten zu Verhaltensänderungen führt. Nehmen *Drosophila melanogaster*-Larven das AICAR mit der Nahrung auf, führt dies zu einer erhöhten Nahrungsaufnahme. Bei der Honigbiene *Apis mellifera* wird darüber hinaus durch AICAR-Injektionen eine Gedächtnisverbesserung erzielt.

Leider ist AICAR für Verhaltensexperimente, in denen Lernprozesse untersucht werden, nicht gut geeignet, da die AMPK-Aktivierung nur schlecht zeitlich und räumlich zu kontrollieren ist. Nach der Injektion von AICAR verteilt sich dieses im gesamten Organismus und aktiviert die AMPK nicht nur in den gewünschten Regionen. Desweiteren hält der aktivierende Effekt zu lange an. Wie über hypothalamische AICAR-Injektionen bei Ratten gezeigt werden konnte, führt AICAR zu einer über Stunden erhöhten Bereitschaft zur Nahrungsaufnahme^[8]. Dies ist für Verhaltensexperimente äußerst ungünstig, da es darauf ankommt, die Enzymaktivitäten schnell und kurzzeitig zu manipulieren. Es wäre mit AICAR beispielsweise nicht möglich, die AMPK-Aktivität im Gehirn lokal und zeitlich so zu manipulieren, dass keine zusätzlichen Regionen im Organismus beeinflusst werden, und Verhaltensaspekte die nicht von einer pharmakologischen AMPK-Aktivierung betroffen sind, einige Minuten nach der Behandlung zu untersuchen.

Aus diesem Grund wurde in dieser Arbeit eine neue Methode entwickelt, die eine schnelle und gezielte Modulation der AMPK-Aktivität gestattet: die Simulation eines niedrigen zellulären Energiespiegels. Zu diesem Zweck wird zellpermeables, photoaktives ADP (NPE-caged ADP) in die Versuchstiere injiziert, welches durch eine darauffolgende Lichtbehandlung freigesetzt werden kann. Das biologisch aktive ADP kann die Zelle nun nicht mehr verlassen und wird über die Adenylat-Kinase in AMP und ATP umgewandelt ($2 \text{ ADP} \leftrightarrow \text{ATP} + \text{AMP}$)^[51]. Das AMP bindet an die regulatorische γ -Untereinheit der AMPK, wodurch die Phosphorylierung am Threonin 172 der katalytischen α -Untereinheit durch AMPK-Kinasen ermöglicht wird, um die Aktivität von AMPK zu steigern^[8,53,178]. Das ATP kann ebenfalls an die γ -Untereinheit binden, wodurch die

Phosphorylierung an der α -Untereinheit hingegen unterbunden und die AMPK in ihrer Aktivität gehemmt wird^[57]. Die Affinität der Bindestelle ist für AMP jedoch größer als für ATP^[175] und macht es somit möglich, die AMPK durch ADP-Freisetzung zu aktivieren.

Da die Aktivität von AMPK an die Phosphorylierung des Threonin 172 an der α -Untereinheit gebunden ist^[8,53,178], ist es möglich, aus einer Veränderung dieses Phosphorylierungszustandes Rückschlüsse auf die Aktivität zu ziehen. Mit Hilfe der ELISA-Technik und zwei verschiedener Antikörper gegen die α -Untereinheit (AMPK- α und P-AMPK- α Thr 172) konnte die künstlich induzierte Aktivitätsänderung wenige Minuten nach der Photofreisetzung des ADP in fixierten Gehirnhomogenaten nachgewiesen werden. Darüber hinaus wurde mit dieser schnellen Messmethode gezeigt, dass die durch ADP-Freisetzung hervorgerufene Aktivitätserhöhung spezifisch durch den AMPK-Blocker Compound C unterdrückt werden kann. Dabei konnte ausgeschlossen werden, dass diese Aktivitätserhöhung von P2X/Y-Rezeptoren abhängig ist, welche extrazellulär freigesetztes ADP detektieren können. Aus den Untersuchungen wie Empfindlichkeitstests und Habituationen (Kap. 3.5.1.1 und 3.5.2) bei Bienen geht hervor, dass das Verhalten zehn Minuten nach der AMPK-Aktivierung im gesamten Gehirn nicht mehr beeinflusst wird. Deshalb ist es sehr wahrscheinlich, dass der aktivierte Zustand des Enzyms durch ADP-Freisetzung nicht sehr lange anhält, zudem im Zeitraum von drei bis acht Minuten nach der ADP-Freisetzung eine fallende Tendenz im Phosphorylierungszustand des Thr 172 zu verzeichnen ist.

Da der P2X/Y-Rezeptor-Blocker PPADS bisher nicht bei Insekten verwendet wurde, musste zusätzlich gezeigt werden, dass dieser Inhibitor in der Lage ist, die P2X/Y-Rezeptoren in der Biene zu blockieren. Proteinsequenzanalysen haben ergeben, dass aller Wahrscheinlichkeit nach nur die metabotropen P2Y-Rezeptoren in der Biene vorkommen^[126], welche durch Stimulation einen internen Ca^{2+} -Ausstrom hervorrufen können. Aus diesem Grund wurden Ca^{2+} -sensitive Methoden angewendet, um die Wirkung des P2X/Y-Rezeptor-Blockers PPADS nachzuweisen. Dabei wird das Kalzium mit Hilfe eines Farbstoffes detektiert, der daraufhin seine optischen Eigenschaften verändert. In dieser Arbeit konnte bei Neuronen gezeigt werden (Kap. 3.4), dass eine ATP-Stimulation zu einem Anstieg des Ca^{2+} -Spiegels in der Zelle führt. Dies wurde mit einer PPADS-Behandlung unterdrückt und zeigt somit die Wirkung dieses Blockers in der Biene.

Aufgrund dieser neuen Methode zur AMPK-Aktivierung kann nun ganz gezielt im Gehirn gesättigter Bienen und sogar in ausgewählten Regionen des Gehirns eine

AMPK-Aktivität simuliert werden, wie sie bei hungrigen Bienen auftritt, um die Rolle der AMPK bei physiologischen Funktionen zu untersuchen. Damit stellt der zeitliche Aspekt der künstlichen Aktivierung kein Problem mehr dar, so dass es möglich ist, bei Verhaltensexperimenten den Einfluss der AMPK zu beliebigen Zeitpunkten (Training, Gedächtnisabruf etc.) zu untersuchen.

4.2 AMPK-Aktivität reguliert die Zuckerwasserschwelle

Hungrige Tiere haben gewöhnlich eine höhere Empfindlichkeit gegenüber Futterreizen als gesättigte Tiere^[68,90,197]. Bei Säugetieren wurde gezeigt, dass die Erregung der Mitral-Zellen, einem spezialisierten Zelltyp, der die einzige synaptische Schaltstelle zwischen Rezeptorzellen im Riechepithel und der Hirnrinde von Säugetieren darstellt, vom Sättigungszustand der Tiere abhängt^[134]. Während eines Nahrungsmangels ist die Wahrscheinlichkeit einer Erregung dieser Zellen durch von Nahrungsmitteln ausgehende Duftstoffe höher als bei gesättigten Tieren. Im Gegensatz dazu führen unabhängig vom Sättigungszustand nahrungsmittelfremde Düfte zu keiner Erregung der Mitral-Zellen. Darüber hinaus wurde gezeigt, dass ein gefüllter Magen zum einen über Mechanorezeptoren und den Nervus vagus zu einer erhöhten Aktivität des ventromedialen Hypothalamus („Sättigungszentrum“) und zu einer verminderten Aktivität des lateralen Hypothalamus („Hungerzentrum“) führt, was das Einstellen der Nahrungsaufnahme zur Folge hat^[7,74,70,221,177,135]. Zum anderen führt ein gefüllter Magen zu einer Erregungsverminderung der Mitral-Zellen im Riechkolben (Bulbus olfactorius)^[31] und reduziert somit die Empfindlichkeit gegenüber Düften von Nahrungsmitteln.

Auch hungrige Bienen weisen eine höhere Zuckerwasserempfindlichkeit als gesättigte Tiere auf^[130]. Darüber hinaus gestattet die Bestimmung der individuellen Empfindlichkeit gegenüber Sucrose bei Bienen eine Vorhersage über ihre Empfindlichkeit gegenüber Reizen anderer sensorischer Art. So sind Bienen mit einer hohen Empfindlichkeit gegenüber Sucrose beispielsweise sensibler für Pollen^[169]. Die Empfindlichkeit wird somit zu einem bestimmenden Faktor bei der Aufteilung der Arbeiterbienen. Pollensucher sind sehr empfindlich, während Bienen, die nur Nektar suchen, eine geringe Zuckerwasserempfindlichkeit aufweisen und Bienen, die Pollen und Nektar suchen, hinsichtlich ihrer Empfindlichkeit dazwischen liegen^[138,139]. Sogar zwischen Nektarsuchern gibt es individuelle Unterschiede in der Empfindlichkeit. Verglichen mit weniger empfindlichen Bienen sammeln Nektar suchende Bienen mit einer hohen Empfind-

lichkeit gegenüber Sucrose Nektar mit einem niedrigen Zuckergehalt^[137,139]. Dies verdeutlicht, dass sich die Bienen einer Kolonie auch unabhängig von ihrem Ernährungszustand in ihrer Zuckerwasserempfindlichkeit unterscheiden können. Darüber hinaus korreliert nicht nur der soziale Rang im Bienenvolk mit der Empfindlichkeit, sondern auch das Alter der Bienen. Die Zuckerempfindlichkeit steigt mit zunehmendem Alter an^[138]. Wie diese Empfindlichkeit reguliert wird, ist nur teilweise erforscht. Es ist bekannt, dass ein gewisser Teil der Zuckerwasserempfindlichkeit genetisch determiniert ist^[133,132]. Bienen, die über Generationen als sogenannte „high pollen hoarding“ Bienen ausgelesen wurden^[131], sind empfindlicher als die Linie der „low pollen hoarding“ Bienen^[130,138,170]. Insgesamt lässt sich sagen, dass die Zuckerwasserempfindlichkeit von hungrig zu satt, von Pollen- zu Nektarsammlern und von der Linie der „high pollen hoarding“ zu den „low pollen hoarding“ Bienen abnimmt. Aus diesem Grund sind gesättigte Pollensammler immer noch empfindlicher als gesättigte Nektarsammler. Die Änderungen in der Empfindlichkeit für Zucker, die während des Jahres auftreten^[167], mit dem Alter korrelieren^[138] und vom Ernährungszustand sowie von den Erfahrungen abhängen^[140], müssen unterschiedliche Ursachen haben. Eine mögliche Erklärung ist die genannte genetische Determination, eine andere die kovalente Modifikation als Mittel für die Regulation der Enzymaktivität. PKA kann beispielsweise über einen langen Zeitraum aktiviert die Empfindlichkeit von jungen und älteren Bienen erhöhen^[168]. Eine kurzzeitige PKA-Aktivierung hat hingegen keinen Effekt, obwohl empfindlichere Bienen eine höhere PKA-Aktivität in den Antennalloben aufweisen als weniger sensible Bienen^[168].

In dieser Arbeit hat sich herausgestellt, dass eine künstliche AMPK-Aktivierung durch ADP-Freisetzung im Gehirn gesättigter Bienen zu einer Erhöhung der Zuckerwasserempfindlichkeit führt. Diese Verhaltensveränderung wird durch den Einsatz des AMPK-Blockers Compound C unterbunden und ist unabhängig von P2X/Y-Rezeptoren, welche extrazellulär freigesetztes ADP detektieren können. Auf der anderen Seite führt eine ATP-Behandlung zum selben Zeitpunkt, nämlich zehn Minuten nach der Freisetzung, im Gehirn hungriger Bienen zu einem entgegengesetzten Effekt: die Zuckerwasserempfindlichkeit wird reduziert. Diese durch ATP hervorgerufene Verringerung der Empfindlichkeit ist wie die durch ADP hervorgerufene Erhöhung von den P2X/Y-Rezeptoren unabhängig. Damit konnte gezeigt werden, dass die u.a. vom zellulären Energieniveau abhängige AMPK-Aktivität der Schlüssel für die Veränderung in der Zuckerwasserempfindlichkeit der Biene ist.

So hat sich gezeigt, dass unabhängig vom Rang im Bienenvolk oder der Jahreszeit die Bienen eine von der AMPK-Aktivität abhängige, in kurzer Zeit modulierbare Zuckerwasserempfindlichkeit aufweisen, die mit dem Sättigungszustand verbunden ist. Gesättigte Bienen weisen demnach gegenüber hungrigen nicht nur eine verminderte Empfindlichkeit für Zuckerwasser auf^[130], sondern auch eine verringerte AMPK-Aktivität. Wird diese bei gesättigten Bienen künstlich erhöht, führt dies wieder zu einer Erhöhung in der Zuckerwasserempfindlichkeit. Damit ist es möglich, dass die durch AMPK regulierte Zuckerwasserschwelle und die daraus resultierende Veränderung im Fressverhalten den sozialen Rang im Bienenvolk beeinflussen können. Dies könnte zum Beispiel durch eine Veränderung in der Grundaktivität der AMPK festgelegt werden, die wiederum die Empfindlichkeit für die Zuckerwasserschwelle ändern kann. Um dies zu untersuchen, müssten zusätzliche Experimente durchgeführt werden, in denen beispielsweise Bienen aus unterschiedlichen sozialen Kasten und desselben Alters verwendet werden. Bei Säugetieren wäre es möglich, dass die vom Sättigungszustand abhängige Erregbarkeit der Mitral-Zellen im Bulbus olfactorius^[134] durch die Aktivität der AMPK reguliert wird.

4.3 Welche Gehirnregionen sind über die AMPK-Aktivität an der Regulation der Zuckerwasserempfindlichkeit beteiligt?

Wie zuvor beschrieben wurde, existieren bei den bisher untersuchten Tieren Gehirnregionen, die in ihrer Aktivität vom Sättigungszustand abhängig sind. Hierzu gehören die Mitral-Zellen im Riechkolben der Säugetiere^[134]. Darüber hinaus existieren Gehirnregionen wie z.B. der orbitofrontale, prämotorische und präfrontale Cortex, das Corpus striatum, die Amygdala und dopaminerge Neurone des Belohnungssystems, die auf Flüssigkeiten oder Nahrung als Belohnung reagieren^[6,9,23,62,97,103,125,128,146,149,179,194,196]. Eine Sättigung der Tiere vermindert die Antwort auf die Belohnung im orbitofrontalen Cortex^[37] und in der gustatorischen Region des kaudalen Teils des orbitofrontalen Cortex^[161], was darauf hindeutet, dass die Reaktion der Neurone in diesen Regionen die Belohnungsstärke und nicht den Futterreiz widerspiegelt. Regionen im gustatorischen Cortex des Operculum frontale reagieren hingegen unabhängig vom Sättigungszustand auf den Futterreiz^[158].

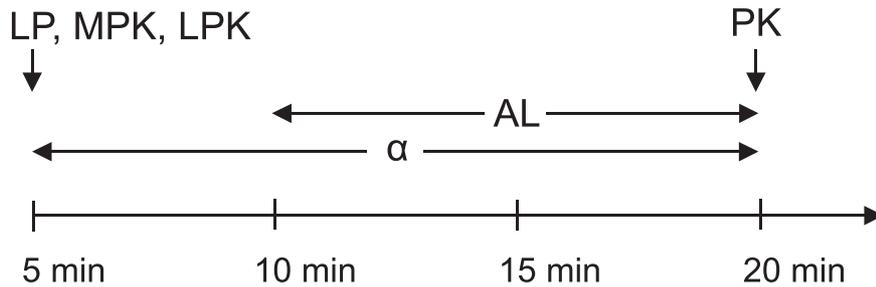


Abbildung 45: Dynamik der Zuckerwasserempfindlichkeit nach Manipulation der AMPK-Aktivität.
 α : α -Lobus, AL: Antennallobus, LP: laterales Protozerebrum, LPK: lateraler Pilzkörper, MPK: medianer Pilzkörper, PK: Pilzkörper

Welche Gehirnregionen sind nun bei den Bienen für eine Veränderung in der Zuckerwasserempfindlichkeit verantwortlich? Um diese Frage zu beantworten wurden die Regionen untersucht, die beim Lernen und bei der Gedächtnisbildung eine wesentliche Rolle spielen: der α -Lobus, der Antennallobus, das laterale Protozerebrum und der Pilzkörper. Diese Regionen sind durch das VUMmx1-Neuron innerviert, welches in der Belohnungsbewertung während des appetitiven gustatorischen Lernens von entscheidender Bedeutung ist^[50]. Eine künstliche Depolarisierung dieses Neurons ersetzt die Zuckerbelohnung während dieses assoziativen Lernprozesses^[50]. Es ist jedoch unklar, ob diese Regionen an den Prozessen der Empfindlichkeitsregulation für belohnende Flüssigkeiten beteiligt sind.

Mit der ADP-Freisetzung ist es möglich, die AMPK in diesen ausgewählten Bereichen zu aktivieren, da keine Diffusion des ADP stattfindet. Mit einer AICAR-Behandlung wäre dies nicht möglich. Wird AMPK bei gesättigten Bienen gezielt in den genannten Gehirnregionen aktiviert, ist zu erkennen, dass die Zuckerwasserempfindlichkeit der Tiere zu unterschiedlichen Zeiten nach der Freisetzung verändert wird (Abb. 45). Beginnend mit dem α -Lobus und dem lateralen Protozerebrum nach fünf Minuten, dauert es zehn Minuten bis die Zuckerwasserempfindlichkeit der Bienen erhöht wird, wenn das ADP ausschließlich in den Antennalloben freigesetzt wird und weitere zehn Minuten, bis eine Veränderung nach Aktivierung der AMPK in den Pilzkörpern stattfindet. Dies bedeutet, dass das „Hungersignal“ am schnellsten in eine Verhaltensveränderung umgesetzt wird, wenn das Signal dem motorischen Zentrum für Mundwerkzeuge im Unterschlundganglion am nächsten liegt. Der α -Lobus als Ausgangsregion der Pilzkörper und das laterale Protozerebrum, eine prämotorische Ausgangsregion des Gehirns^[106], von der absteigende Fasern zum motorischen Zentrum im Unterschlund-

ganglion führen^[107], sind deshalb in ihrem Einfluss sehr schnell. Die Antennalloben liefern Informationen an das laterale Protozerebrum und können erst später die Empfindlichkeit beeinflussen. Darüber hinaus können Informationen aus den Antennalloben über Projektionsneurone direkt in das Unterschlundganglion gelangen^[119], welches die motorischen Regionen des Rüssels beherbergt^[151], oder direkt aus den Antennen über den T6-Trakt zum Unterschlundganglion gelangen ohne mit den Antennalloben zu interagieren^[3]. Warum eine AMPK-Aktivierung in den medianen bzw. lateralen Pilzkörperregionen bereits nach fünf Minuten, aber in den gesamten Pilzkörpern erst nach 20 Minuten zu einer Erhöhung der Zuckerwasserempfindlichkeit führt, ist unklar. Möglicherweise treten antagonistische Interaktionen zwischen diesen beiden Bereichen auf, was zu einer verzögerten Veränderung führt, wenn die gesamte Pilzkörperregion mit ADP behandelt wird. Der Pilzkörper liefert Informationen über den α -Lobus an das laterale Protozerebrum^[107], welches wiederum mehr Zeit in Anspruch nimmt und möglicherweise deshalb die Empfindlichkeit erst nach 20 Minuten verändert. Eine ADP-Freisetzung im optischen Lobus gesättigter Bienen beeinflusst dagegen zu keinem der getesteten Zeitpunkte die Zuckerwasserempfindlichkeit.

Darüber hinaus spielen die untersuchten Gehirnregionen, wie zum Beispiel der Antennallobus und das laterale Protozerebrum, nicht nur bei der Erhöhung der Zuckerwasserempfindlichkeit durch ADP-Freisetzung eine Rolle, sondern auch bei der künstlichen Sättigung durch ATP-Freisetzung und dies sogar zum selben Zeitpunkt nach der Freisetzung der Nukleotide. Dies zeigt, dass vom AMP : ATP-Level und dementsprechender AMPK-Aktivität abhängige Gehirnregionen existieren, die aufgrund des Sättigungszustandes die Empfindlichkeit gegenüber Zuckerwasser regulieren können. Ob nun tatsächlich eine unterschiedliche AMPK-Aktivität bei hungrigen bzw. satten Bienen in den einzelnen Regionen vorliegt und das Verhalten infolgedessen geändert wird, muss in weiteren Untersuchungen geklärt werden. Auf Säugetiere übertragen wäre es denkbar, dass die in ihrer Aktivität vom Sättigungszustand abhängigen Regionen - der orbitofrontale Cortex^[37] und die gustatorische Region des kaudalen Teils des orbitofrontalen Cortex^[161] - unterschiedliche AMPK-Aktivitäten aufweisen und dies zu einer Veränderung in der Aktivität der Regionen führt.

4.4 Wird das „Hungersignal“ in die andere Hemisphäre übertragen?

Obwohl die meisten neuronalen Systeme bilateralsymmetrisch angelegt sind, findet die Verarbeitung vieler Wahrnehmungsfunktionen oder Fähigkeiten wie zum Beispiel Emotionen und Sprache beim Menschen vorwiegend in einer Hemisphäre statt. Wie Untersuchungen bei Bienen gezeigt haben, können auch Gedächtnisse von olfaktorischen Informationen seitenspezifisch unterschieden werden^[164]. Ebenso kann ein einseitiger Zuckerstimulus auf die Antenne eine unilaterale Sensitisierung verursachen, während ein Zuckerstimulus auf den Rüssel der Biene eine bilaterale Sensitisierung bewirkt^[165], da die Reize unilateral über jede Antenne, aber bilateral über den Rüssel detektiert werden. Darüber hinaus sind die Tiere in der Lage, Gedächtnisse von einer Hemisphäre in die andere zu übertragen. Wird das Tier bei einer Konditionierung mit einem Duft auf eine Antenne trainiert, kann das Gedächtnis nach wenigen Stunden auch kontralateral mit einem Duft stimuliert abgerufen werden^[164].

Auf der Grundlage der Tatsache, dass das Bienenhirn wie auch das VUMmx1-Neuron bilateralsymmetrisch angelegt sind, stellt sich die Frage, ob das „Hungersignal“ ebenfalls in die andere Hemisphäre übertragen wird. Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen (Kap. 3.5.1.5) haben ergeben, dass es nur zehn Minuten dauert, bis eine Übertragung des „Hungersignals“ stattfindet und die Zuckerwasserempfindlichkeit auch kontralateral über die Antennen getestet zu einer Erhöhung führt. Fünf Minuten nach der Freisetzung des ADP in einer Hemisphäre zeigt nur ein ipsilateraler Test, d.h. auf der Seite, in der die Freisetzung stattfand, eine erhöhte Empfindlichkeit an. Dies zeigt, dass die Übertragung des „Hungersignals“ in die andere Hemisphäre wesentlich schneller stattfindet als die Übertragung des Gedächtnisses, die einen wesentlich komplexeren Vorgang darstellt und mehrere Stunden benötigt.

4.5 AMPK: Beeinflussung des nicht-assoziativen Lernens von appetitiven Reizen

Bei wiederholter Darbietung des Nahrungsreizes während der Mahlzeit führt dies zu einer Abnahme der Reaktion auf das Nahrungssignal, was als Habituation bezeichnet werden kann und letztendlich auf eine „Sättigung“ gegenüber diesem Stimulus hinausläuft^[188,150]. Die Habituation ist eine einfache Form des Lernens^[186,191], bei der sich

Tiere an einen wiederholt auftretenden Reiz gewöhnen und nicht mehr darauf reagieren^[49]. Nach der Dishabituation oder auch Wiedererlangung des Ansprechverhaltens durch einen neuartigen Reiz löst der zuerst dargebotene Reiz die Reaktion wieder aus. Dies zeigt, dass weder eine Ermüdung im ausführenden Organ noch eine sensorische Adaptation vorliegt^[186,193,214].

Für Tiere ist es dabei besonders sinnvoll, gegenüber den einzelnen Nahrungsreizen (Geschmacksrichtungen) spezifisch zu habituierten, soweit diese differenzierbar sind, ohne sich gleichzeitig an den Nahrungsreiz im Allgemeinen zu gewöhnen, damit die Vielfalt in der Nahrungsaufnahme bestehen bleibt. Bei dieser sensorisch-spezifischen Sättigung nimmt der Anreiz aller Nahrungsmittel somit ein wenig, derjenige des konsumierten Nahrungsmittels allerdings deutlich ab^[61] und begünstigt die Aufnahme der noch nicht konsumierten anderen Nahrungsmittel. Möglicherweise erklärt dies die erhöhte Nahrungsaufnahme bei einem vielfältigen Nahrungsangebot^[154], wodurch die Tiere motiviert werden, die seltenen Zeiten des Nahrungsüberschusses auszunutzen.

Wenn Primaten Nahrung bis zur Sättigung konsumieren, zeigen sie eine verminderte Aktivität einzelner Zellen des Hypothalamus^[157] und des orbitofrontalen Cortex^[37,156,161], die in Folge der Darbietung eines neuen Nahrungsmittels ihre Aktivität zurückerlangen. Dieses Verhalten steht im Einklang mit der Habituation und zeigt, dass der Aktivitätsabfall der einzelnen Neurone nicht das Ergebnis von Ermüdung ist. Die Verminderung der Gehirnaktivität und deren Wiederherstellung nach einem neu präsentierten Nahrungsreiz tritt weder bei Neuronen des Nuclei tractus solitarii^[217], die den Geschmackssinn vermitteln, noch im gustatorischen Cortex des Lobus insularis^[216] und des Operculum frontale auf^[158]. Dies bedeutet, dass die sensorischen Informationen durch diese Regionen laufen, aber die Interpretation der Informationen im Hypothalamus^[157] und orbitofrontalen Cortex^[37,156,161] stattfindet.

Der Grad der Habituation ist dabei von der Intensität des Reizes (schnelle Habituation bei schwachen Reizen) und vom Intervall zwischen den einzelnen Stimuli (schnelle Habituation bei schnell aufeinanderfolgenden Reizen) abhängig^[192]. Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass hungrige Tiere mehr aufeinander folgende Stimuli eines Reizes benötigen als gesättigte Tiere, um zu habituierten. Wird beispielsweise bei Ratten der Magen langsam über einen längeren Zeitraum mit einer Zuckerlösung gefüllt und gleichzeitig die orale Habituation durchgeführt, ist zu sehen, dass sich der Habituationsvorgang verkürzt^[189]. Dabei wird beobachtet, wie oft die Tiere den Mund öffnen und schließen, die Zunge bewegen oder versuchen zu schlucken, wenn ihnen ein sü-

ßer, nicht nahrhafter Reiz angeboten wird. Auch hungrige Bienen benötigen dementsprechend mehr Reize für die Habituation des Rüsselreflexes als gesättigte Bienen^[24]. Bienen mit einer hohen Zuckerwasserempfindlichkeit sind schwieriger zu habituierten, d.h. es dauert bei ihnen länger als bei Bienen mit einer niedrigen Empfindlichkeit^[171]. Da in dieser Arbeit gezeigt wurde, dass die AMPK-Aktivierung im Bienenhirn zu einer Senkung der Zuckerwasserschwelle führt und die Tiere hungriger macht, wurde anschließend untersucht, ob eine künstliche Erhöhung der Empfindlichkeit gegenüber Zuckerwasser das Habitationsverhalten verändern kann.

Dabei hat sich herausgestellt, dass die ADP-Freisetzung den Habitationsvorgang verlängert, d.h. dass die Bienen mehr Stimuli benötigen, um sich habituierten zu lassen, wenn die AMPK im gesamten Gehirn aktiviert wird. Dies führt zu einer Erhöhung der Zuckerwasserempfindlichkeit und zu einer Erniedrigung der Zuckerwasserschwelle, was in enger Beziehung zu dem Habitationsverhalten steht^[171]. Damit wurde gezeigt, dass die Abhängigkeit dieses Verhaltens vom Sättigungszustand und der Zuckerwasserempfindlichkeit über die AMPK vermittelt wird. Aus diesem Grund sollte untersucht werden, ob die AMPK-Aktivität auch bei Säugetieren den Habitationsvorgang beeinflusst und inwieweit die sensorisch-spezifische Sättigung von der Aktivität dieses Zellenergiesensors abhängt.

4.6 Welche Gehirnregionen sind über die AMPK-Aktivität an der Habituation beteiligt?

Da bei Primaten bestimmte Gehirnregionen bei der Habituation gegenüber Futterreizen beteiligt sind (Kap. 4.5), kann man vermuten, dass auch bei der Biene Regionen existieren, die dieses Verhalten aufgrund des Sättigungszustandes regulieren. Um die Regionen ausfindig zu machen, die über eine Manipulation der AMPK-Aktivität die Verhaltensveränderung in der Habituation verursachen, wurde das ADP gezielt in bestimmten Regionen freigesetzt.

Bei Insekten ist bekannt, dass die Pilzkörper und die Antennalloben an der Regulation des Habitationsverhaltens beteiligt sind. Wie zwei Studien mit *Drosophila melanogaster* gezeigt haben, führt die Ausschaltung der Pilzkörperregionen zu einem Rückgang der Habituation^[32]. Die neuesten Untersuchungen, bei denen die Erregungsübertragung zwischen den Nervenzellen in den Pilzkörperregionen verhindert wurde, ha-

ben ergeben, dass sie genauso für die Dishabituation notwendig sind^[5]. Bei Bienen wurde herausgefunden, dass der Antennallobus mit der Habituation in Verbindung gebracht werden kann^[117]. In dieser einzigen bis heute bekannten Arbeit wurde gezeigt, dass der NO/cGMP vermittelte cAMP-PKA-Signalweg in engem Zusammenhang mit der abnehmenden Reaktion (PER) auf den Reiz während der Habituation steht. Eine wiederholte Stimulation der Antennen führt zu einem allmählichen Anstieg der PKA-Aktivität im Antennallobus. Darüber hinaus ist es möglich, mit Hilfe einer künstlichen PKA-Aktivierung bzw. Deaktivierung die Habituation zu beschleunigen bzw. zu verlangsamen^[117]. Die Dishabituation ist allerdings unabhängig von der PKA-Kaskade im Antennallobus^[117], was bedeutet, dass andere Mechanismen oder, wie beschrieben, andere Regionen wie die Pilzkörper an diesem Verhalten beteiligt sind. Darüber hinaus kann der Antennallobus den Rüsselstreckreflex an sich beeinflussen. So führt die Injektion des Schlangengiftes α -Bungarotoxin in einen der beiden Antennalloben durch irreversible Anlagerung an die nikotinischen Acetylcholinrezeptoren zu einer ipsilateralen Hemmung des Reflexes. Ein Test der kontralateralen und unbehandelten Seite zeigt allerdings keine Beeinträchtigung des Reflexes an^[24].

Um zu überprüfen, ob die AMPK-Aktivität in diesen beiden Gehirnregionen ebenfalls einen Einfluss auf das Habitationsverhalten hat, wurde dort gezielt ADP freigesetzt. Eine Verlängerung in der Habitationsrate konnte nur fünf Minuten nach Freisetzung von ADP in den medianen Pilzkörpern nachgewiesen werden. Dies stimmt mit der beobachteten Empfindlichkeitserhöhung in dieser Region zu diesem Zeitpunkt überein. Bei der AMPK-Aktivierung in den Antennalloben hingegen tritt noch nach zehn Minuten keine Veränderung im Habitationsverhalten auf. Da ansteigende Tendenzen bei der Habitationsrate verzeichnet wurden und die Empfindlichkeit noch über zehn Minuten nach der ADP-Freisetzung erhöht ist, wäre es möglich, dass der Verhaltens-effekt erst später auftritt. Darüber hinaus wäre es vorstellbar, dass die sensorische Empfindlichkeit nicht zwangsläufig mit der Habituation verknüpft sein muss, obwohl die Antennalloben in Abhängigkeit von der AMPK-Aktivität an der Regulation der Zuckerwasserempfindlichkeit beteiligt sind. Wie bei Primaten gezeigt wurde, tritt während der Habituation keine Veränderung in der Aktivität der Neurone des Nuclei tractus solitarii auf, obwohl diese den Geschmackssinn vermitteln^[217]. Deshalb wäre es möglich, dass die Antennalloben, die bei den Bienen chemosensorische Informationen aus den Antennen verarbeiten^[107], ebenfalls keinen primären Einfluss auf die Habituation haben, sondern hauptsächlich für den Empfang, die Kodierung und Weiterleitung der Infor-

mationen in andere Gehirnregionen zuständig sind, in denen die Interpretation der Informationen stattfinden muss. Zu diesen Regionen gehören die Pilzkörper. Sie sind für die Habituation und Dishabituation bei *Drosophila melanogaster* unentbehrlich^[32,5] und spielen ebenso bei der Biene eine wichtige Rolle. Wie die Untersuchungen dieser Arbeit gezeigt haben, kann in dieser Region der mit der Habituation korrelierende Sättigungszustand^[24] das Habituationsverhalten beeinflussen. Dies zeigt, dass die Habituation nicht unbedingt an die Empfindlichkeit gebunden sein muss (Antennallobus) und in den Pilzkörpern mit dem Sättigungszustand prozessiert wird, welcher das Habituationsverhalten verändert.

Unbeantwortet bleibt bisher die Frage, ob die AMPK eventuell eine Rolle bei der sensorisch-spezifischen Sättigung bei Primaten einnimmt und in den dafür verantwortlichen Regionen im Hypothalamus^[157] und orbitofrontalen Cortex^[37,156,161] an der Regulation der Aktivität dieser Bereiche beteiligt ist.

4.7 Zusammenhang von Motivation und Lernen: Die Rolle der AMPK

Es ist allgemein bekannt, dass Lernen und Gedächtnisbildung von vielen verschiedenen Faktoren wie Stress und Motivation beeinflusst werden. Ebenso spielt die Sättigung der Organismen eine wesentliche Rolle. Das führt dazu, dass hungrige Tiere die Besseren beim appetitiven Lernen sind. Aufgrund des Hungers steigt die Motivation, was das Lernen und die Gedächtnisbildung positiv beeinflusst. Allerdings sind die zugrunde liegenden molekularen Verbindungen sowie die Zusammenhänge zwischen Sättigungszustand und Motivation auf molekularer Ebene bis heute unbekannt. Mit dieser Arbeit wurde das Ziel verfolgt, zu untersuchen, ob der zelluläre Energiesensor AMPK eine Schlüsselrolle bei der Verknüpfung von Sättigungszuständen und Prozessen des appetitiven Lernens spielt.

Da bekannt ist, dass AMPK u.a. die Nahrungsaufnahme durch Integration verschiedener hormoneller Signale im Hypothalamus regulieren kann^[111,8,86], stellt sich bei Säugetieren die Frage, ob auch das dopaminerge Belohnungssystem von der AMPK-Aktivität beeinflussbar ist und dementsprechend die Motivation verändert werden kann, welche beim Lernen von entscheidender Bedeutung ist. Darüber hinaus wäre es möglich, dass der Hypothalamus als Kontrollinstanz für die Nahrungsaufnahme auf das

Lernverhalten einwirken kann, da der laterale Hypothalamus mit dem Belohnungssystem und dem Geschmackssystem in Kontakt steht^[215].

Zu Beginn der Nahrungsaufnahme werden Informationen über die Nahrung, wie zum Beispiel Qualität und Quantität, auf der Grundlage vieler Sinneseindrücke festgelegt, zu denen der Geschmack gehört, welcher bestimmt, ob wir etwas als wohlschmeckend bewerten oder nicht. Verzweigungen der Gesichtsnerven (Chorda tympani und Nervus petrosus major), des Zungen-Rachen-Nervs (Nervus glossopharyngeus) und des oberen Kehlkopfnerfs (Nervus laryngeus superior), die mit den Rezeptorzellen der Geschmacksknospen (Caliculi gustatori) verbunden sind, übermitteln Geschmacksinformationen zum Nucleus tractus solitarius (NTS). Von dort steigen Fasern zum Parabrachial nucleus (PBN) im Pons des Hirnstammes auf. Der dritte Abschnitt, der die Geschmacksinformationen erhält, ist der parvozelluläre Teil des Nucleus ventralis posteromedialis thalami (NVPT). Von diesem thalamischen Nucleus ziehen Neurone in die gustatorische Region des Lobus insularis (LI). Diese den Geschmack leitenden Signalwege wurden ausführlich bei Affen^[160] und Nagetieren untersucht^[129].

Ebenso gut wurde das dopaminerge Belohnungssystem untersucht. Dieses entspringt in der ventralen tegmentalen Region des Mittelhirns und vermittelt die Motivation zum Verzehr appetitlicher Nahrung über den Nucleus accumbens im ventralen Vorderhirn und den ventralen Pallidum an das Kontrollzentrum für die Nahrungsaufnahme im lateralen Hypothalamus^[18,207]. Der Nucleus accumbens spielt nicht nur eine Rolle bei der Belohnung in Form von Nahrung, sondern auch in Form von Sex und Drogen^[18,207]. Darüber hinaus wurde gezeigt, dass das dopaminerge System das Ernährungsverhalten beeinflusst^[19] und eine gezielte Behandlung des Nucleus accumbens mit einem Opioid-Agonisten zu Hyperphagie führt^[13]. Wie das Geschmackssystem mit dem Belohnungs- und Nahrungsaufnahmesystem interagiert, ist dennoch nicht völlig aufgeklärt. Als Verbindungsstellen kommen die Amygdala, eine Emotionen verarbeitende Region des Limbischen Systems, und der präfrontale Cortex in Frage^[215].

Entsprechend dem gegenwärtigen Konzept, dass Belohnung in Form von Nahrung aus zwei unterschiedlichen funktionellen Bestandteilen besteht, erstens der „Schmackhaftigkeit“ und zweitens dem „Mangel“ an Nährstoffen, der den inneren Antrieb, die Motivation verursacht^[17], würde man dem dopaminergen Belohnungssystem der Säugetiere eher die Prozessierung des „Mangels“ zusprechen^[142].

Beim Menschen konnte gezeigt werden, dass sich hungrige verglichen mit gesättigten Probanden besser an optische Nahrungsmittelreize erinnern können^[124]. An dieser

Vernetzung von wahrnehmenden (Nahrung), motivierenden (Hunger) und kognitiven (Gedächtnis-) Prozessen sind die Amygdala sowie einzelne Regionen des orbitofrontalen Cortex, einem Teil des präfrontalen Cortex, beteiligt^[124]. Wie bereits erwähnt, reagieren die Zellen der Amygdala und des orbitofrontalen Cortex bei Primaten auf das Erblicken, den Geschmack und den Geruch von Nahrung, sowie auf Reize, die mit einer Belohnung in Nahrungsform verbunden sind^[166,128,159]. Die mit Nahrung verbundene Aktivität dieser Regionen ist mit dem aktuellen Sättigungszustand verknüpft: So ist beispielsweise die nach einer Hungerperiode auf ein Nahrungsangebot auftretende Antwort der linken Amygdala und des rechten posterioren orbitofrontalen Cortex nach der Sättigung unterdrückt^[161,176,37], hingegen nicht die des rechten anterioren orbitofrontalen Cortex^[124]. Dies deutet an, dass die Reaktion der ersten beiden Regionen nicht den Futterreiz selbst, sondern die Belohnungsstärke widerspiegelt^[95,155].

Auch hungrige Bienen sind die besseren appetitiven Lerner^[108] und darüber hinaus in der Lage, translations- (nach 1 bis 2 Tagen) und transkriptionsabhängige (ab 3 Tagen) Langzeitgedächtnisse zu bilden^[46]. Bei der Biene hat sich herausgestellt, dass die gustatorische Belohnungsinformation (Zuckerwasser) über das octopaminerge VUMmx1-Neuron vermittelt wird^[50]. Eine künstliche Depolarisierung dieses Neurons ist in der Lage, die Zuckerwasserbelohnung (US) während einer olfaktorischen Konditionierung zu ersetzen^[50]. Was nun die Belohnungsstärke in Abhängigkeit vom Sättigungszustand während der appetitiven Assoziation auf molekularer Ebene in den Neuronen festlegt, ist in allen Systemen unklar.

Da sich herausgestellt hat, dass die AICAR-Behandlung bei gefütterten Bienen zum Zeitpunkt der 1-Trial-Konditionierung eine Gedächtnisverbesserung nach einem Tag verursacht und dies bei einer 3-Trial-Konditionierung nicht der Fall ist, wurde das einfache Training als Methode gewählt, um den Einfluss der AMPK-Aktivierung durch ADP-Freisetzung zu untersuchen.

Bienen, die während der 1-Trial-Konditionierung hungrig sind, bilden im Gegensatz zu gesättigten Bienen ein Kurzzeitgedächtnis aus. Dieses Gedächtnis ist wie bei der gesättigten Gruppe am zweiten Tag nicht mehr nachweisbar. Ein weiterer Unterschied zwischen diesen beiden Gruppen besteht in der Reaktion auf den Zuckerwasserstimulus während des Trainings. Die gesättigte Bienengruppe reagierte wesentlich geringer auf die angebotene Zuckerwasserbelohnung (US).

Wird bei gesättigten Bienen kurz vor dem Training ADP freigesetzt, führt dies zur

Etablierung eines Gedächtnisses, welches innerhalb des untersuchten Zeitraums von zwei Tagen ansteigt. Bienen, bei denen ADP erst nach dem Training freigesetzt wird, verhalten sich hingegen wie gesättigte Bienen ohne ADP-Freisetzung: sie bilden kein Gedächtnis aus. Interessanterweise gibt es zwischen den beiden Gruppen mit der ADP-Behandlung während des Trainings keinen Unterschied hinsichtlich der Reaktion auf den Zuckerwasserstimulus (US). Darüber hinaus wurde gezeigt, dass das ausgebildete Gedächtnis allein von der AMPK-Aktivität abhängt, da die ADP-Freisetzung bei Verwendung des AMPK-Blockers Compound C vor dem Training zu keiner Gedächtnisbildung führt.

Dies zeigt, dass ein niedriger zellulärer Energiespiegel der über den Zellenergiesensor AMPK registriert und „verarbeitet“ wird, genügt, um ein Lernverhalten zu etablieren, wie es normalerweise nur hungrigen Tieren vorbehalten ist. Somit konnte erstmals gezeigt werden, dass AMPK an der Gedächtnisbildung beteiligt ist. Daraufhin wäre es interessant, zu untersuchen, ob diese künstliche AMPK-Aktivierung im Belohnungssystem der Biene (VUMmx1-Neuron) oder in den dopaminergen Systemen, der linken Amygdala oder dem rechten posterioren orbitofrontalen Cortex der Säugetiere ausreichen würde, um einen positiven Lerneffekt zu erzielen.

4.8 Wie ist das durch AMPK induzierte Gedächtnis mit anderen für die Gedächtnisbildung notwendigen Signalwegen verknüpft?

Um Beziehungen des durch AMPK-Aktivierung induzierten Gedächtnisses zu anderen für die Gedächtnisbildung bekannten Kinasen wie beispielsweise CaMKK und PKA zu untersuchen, wurden weitere Konditionierungen mit gesättigten Bienen durchgeführt, bei denen während des Trainings Aktivatoren bzw. Inhibitoren für die letztgenannten Kinasen verwendet wurden.

Die CaMKK- und PKA-Signalwege spielen nicht nur beim Lernen und bei der Gedächtnisbildung eine bedeutsame Rolle, wie in der Einleitung (Kap. 1.1.2) dargelegt wurde, sondern sind auch an der Regulation der AMPK beteiligt (Kap. 1.2.3). Die CaMKK aktiviert AMPK^[59,64,71,211], indem sie die α -Untereinheit am Thr 172 phosphoryliert. Die PKA hemmt AMPK, indem sie die α -Untereinheit am Ser 485/491 phosphoryliert^[72]. Außerdem kann PKA die AMPK-Kinase CaMKK hemmen und somit die Aktivierung der AMPK durch diese verhindern^[72].

Die Verwendung des CaMKK-Blockers KN-93 hat gezeigt, dass die durch AMPK-Aktivierung induzierte Gedächtnisbildung verhindert wird. Ob die Aktivität der AMPK durch Hemmung der CaMKK herunterreguliert wird, muss in zusätzlichen Experimenten untersucht werden. Damit könnte letztendlich geklärt werden, ob CaMKK tatsächlich als AMPK-Kinase fungiert oder im Nachhinein an der Gedächtnisbildung beteiligt ist. Interessant ist, dass während des Trainings bei gleichzeitiger ADP-Freisetzung weder die Aktivierung der PKA durch BrcAMP noch die Hemmung durch KT5720 einen Einfluss auf das 2-Tage-Gedächtnis der Bienen hat. Zum einen wäre es vorstellbar, dass die PKA-Hemmung durch KT5720 trotz AMPK-Aktivierung zu einem Gedächtnisverlust führen könnte, da die PKA-Aktivität essenziell für die Gedächtnisbildung ist^[116]. Zum anderen wäre es möglich gewesen, die AMPK-Aktivität durch eine BrcAMP vermittelte PKA-Aktivierung herunterzuregulieren, was dazu geführt hätte, dass das AMPK-abhängige Gedächtnis nicht ausgebildet wird. Zudem ist die PKA-Aktivierung allein ausreichend, um bei hungrigen Bienen nach einer 1-Trial-Konditionierung ein Langzeitgedächtnis zu induzieren^[116]. Der Befund, dass PKA im Verhalten keinen Einfluss auf die durch Stimulation von AMPK induzierte Gedächtnisbildung hat, wird dadurch gestärkt, dass keine Phosphorylierungsstelle am Ser 485/491 der AMPK- α -Untereinheit für PKA gefunden werden konnte, wie sie bei Säugetieren vorhanden ist.

Darüber hinaus hat sich herausgestellt, dass die durch BrcAMP vermittelte PKA-Aktivierung bei gesättigten Bienen ein 2-Tage-Gedächtnis induziert, welches nicht durch den AMPK-Blocker Compound C beeinflussbar ist. Aus diesem Grund muss davon ausgegangen werden, dass zwei voneinander unabhängige Signalwege über AMPK bzw. PKA für die Gedächtnisbildung vorliegen.

4.9 Die Zuckerwasserempfindlichkeit ist kein Indikator für die Belohnungsstärke beim appetitiven Lernen

In dieser wie auch in anderen Studien^[46] konnte gezeigt werden, dass das Lernen und die Gedächtnisbildung nicht notwendigerweise von der Zuckerwasserempfindlichkeit abhängen, sondern hauptsächlich vom Sättigungszustand des Organismus. Bienen mit verschiedenen Sättigungszuständen weisen im Lernen und in der Gedächtnisbildung Unterschiede auf, obwohl sich die Tiere vor dem Training nicht in ihrer Zuckerwasserempfindlichkeit unterscheiden^[46]. Ebenso können Bienen unabhängig vom Sät-

tigungszustand in der Lernbereitschaft und in der Dauer das Gelernte zu behalten verschieden sein, wenn sie sich in ihrer Zuckerwasserempfindlichkeit unterscheiden^[46]. Eine negative Korrelation zwischen Empfindlichkeit und Lernen tritt bei Bienen auf, die für einige Minuten mit UV-Licht behandelt werden (unveröffentlicht, J. Iqbal). Dies führt trotz einer Erhöhung in der Zuckerwasserempfindlichkeit dazu, dass die Bienen schlechter lernen. Umgekehrt ist es möglich, die Empfindlichkeit zu senken, was zu einer Verbesserung im Lernen führt. Dies macht deutlich, dass die Zuckerwasserempfindlichkeit nicht mit dem Belohnungssystem gleichzusetzen ist. Diese Erkenntnis ist sehr wichtig, da diese Empfindlichkeit sehr häufig als Indikator für die Belohnungsstärke bei Konditionierungsexperimenten verwendet wird.

In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass durch die Verwendung des AMPK-Blockers Compound C sowie des CaMKK-Blockers KN-93 die Zuckerwasserempfindlichkeit bei gesättigten Bienen nach ADP-Freisetzung stark reduziert wird, dies aber bei den Konditionierungen nur in geringem Maße stattfindet. Bei den Konditionierungsexperimenten fand keine Auslese der Bienen hinsichtlich der Reaktion auf einen Zuckerwasserstimulus vor der Photofreisetzung von ADP statt. Die Verwendung des Compound C während des Trainings mit gesättigten Bienen führte zu einer geringen Verminderung der Reaktion auf die Zuckerwasserbelohnung (US) auf das Reaktionsniveau von gesättigten unbehandelten Bienen. Insgesamt zeigen die Ergebnisse, dass es keinen direkten Zusammenhang zwischen der Zuckerwasserempfindlichkeit und der Gedächtnisbildung gibt.

Die Hemmung der CaMKK durch KN-93 führte zu einer leicht abgeschwächten Empfindlichkeit während des Trainings, die aber wie bei der Hemmung von AMPK auf dem Niveau von gesättigten unbehandelten Bienen blieb.

Die Verwendung von BrcAMP sowie KT5720 führte genauso wenig zu einer Veränderung in der Reaktion auf den US während des Trainings bei gleichzeitiger ADP-Freisetzung, wie sie die Gedächtnisbildung nach zwei Tagen beeinflussten.

Da weder die ADP-Freisetzung vor bzw. nach dem Training noch die Verwendung des AMPK-Blockers Compound C zu einem Unterschied in der Zuckerwasserempfindlichkeit während des Trainings gegenüber der ebenso gesättigten aber unbehandelten Gruppe führen, ist daraus zu schließen, dass die AMPK die Regulation des appetitiven gustatorischen Lernens beeinflusst, indem sie in Abhängigkeit vom Energiezustand die Belohnungsstärke reguliert und darüber hinaus auf anderem Wege die sensorische Empfindlichkeit modifiziert.

Wie die in Primaten nachgewiesenen Gehirnregionen, die in ihrer Aktivität vom Sättigungszustand des Organismus abhängig sind^[37,161,158], existieren höchstwahrscheinlich auch in der Biene Gehirnregionen, die zum einen unabhängig vom Sättigungszustand auf den Futterreiz reagieren, und Regionen, deren Aktivität vom Ernährungszustand abhängig ist und somit nicht den Futterreiz, sondern die Belohnungsstärke widerspiegelt. In weiteren Experimenten könnten AMPK-Aktivitätsmessungen in verschiedenen Gehirnregionen der Biene durchgeführt werden, um sättigungsabhängige Bereiche zu finden, die eventuell an der Regulation der Belohnungsstärke beteiligt sind.

Wie sich gezeigt hat, spielen alle Regionen (α -Lobus, Antennallobus, laterales Protozerebrum und Pilzkörper), die mit dem octopaminergen Belohnungssystem der Biene, dem VUMmx1-Neuron, verbunden sind, bei der sensorischen Empfindlichkeit gegenüber Zuckerwasser eine Rolle. Welchen Einfluss haben diese Orte während des Lernprozesses, wenn die AMPK dort gezielt aktiviert wird? Es wäre sehr interessant zu untersuchen, inwieweit die einzelnen Regionen oder das VUMmx1-Neuron allein beim Lernen eine Rolle spielen, wenn die AMPK-Aktivität in diesen Bereichen gezielt moduliert wird.

4.10 AMPK: Beeinflussung der zirkadianen Rhythmik?

Die immunhistologischen Färbungen haben ergeben, dass die katalytische α -Untereinheit der AMPK im gesamten Bienengehirn vorkommt, vor allem in den Zellkörpern und im Neuropil des Zentralgehirns. Es ist aufgefallen, dass eine kleine Gruppe von Zellen (ca. 15), die zwischen dem lateralen Protozerebrum, dem lateralen Kelch und dem optischen Lobus liegen, sehr stark gefärbt wird. Es wurde bei Bienen gezeigt, dass in dieser Region ebenso zirkadiane Schrittmacherzellen liegen^[20]. Ob die AMPK- α -Immunofärbung mit diesen PDH-immunreaktiven Neuronen übereinstimmt, muss mit zusätzlichen Färbungen untersucht werden. Dabei werden PDFs nachgewiesen, denen man eine Beteiligung an der zirkadianen Regulierung bei Insekten zuschreibt^[20]. Wenn diese übereinstimmen sollten, wäre es möglich, dass die Färbung mit Antikörpern gegen die α -Untereinheit der AMPK in diesen Zellen ebenso an das Alter der Bienen und den Tag/Nacht-Zyklus gebunden ist, wie es bei der PDH-Immunreaktivität bei diesen Schrittmacherzellen der Fall ist^[20]. Letzteres hängt mit dem nicht-rhythmischen Verhalten der jungen Bienen im Bienenstock zusammen, die sich um die Versorgung der Brut kümmern. Im Gegensatz dazu weisen Sammlerbienen einen Tagesrhythmus

auf: sie sammeln am Tag und ruhen in der Nacht^[79,123,122,78,36]. Darüber hinaus besitzen die Sammelbienen ein erstaunliches „Zeitgefühl“. So sind sie mit Hilfe der inneren Uhr und der Sonnenkompass-Orientierung dazu in der Lage, je nach Tageszeit unterschiedliche Nahrungsquellen aufzusuchen^[202,121]. Dies kann damit begründet werden, dass sie ihr Sammelverhalten, d.h. die Blütenbesuche, mit dem Rhythmus der Pflanzen synchronisieren müssen, um eine bestmögliche Ausbeute bei der Pollen- und Nektarsuche zu erreichen. Die altersabhängigen Unterschiede in der zirkadianen Rhythmik werden stark durch soziale Faktoren beeinflusst, die mit der Zugehörigkeit zu einer bestimmten sozialen Kaste verknüpft sind. So weisen 3 bis 14 Tage alten Brutpflegerinnen im Gegensatz zu den üblicherweise drei oder mehr Wochen alten Sammlerinnen keinen Tagesrhythmus auf, da die Pflegerinnen mit der permanenten Fütterung der Bienenlarven beschäftigt sind^[206,153].

Ein weiterer Aspekt, der einen Zusammenhang zwischen der AMPK und der zirkadianen Rhythmik in Bienen stützen würde, wäre der Einfluss der AMPK auf CKI ϵ , einem Regulator der 24-Stunden-Periode^[199]. Indem die AMPK diesen durch Phosphorylierung aktiviert, verkürzt sie die zirkadiane Dauer. Darüber hinaus wurde gezeigt, dass eine Veränderung im Fressverhalten die zirkadiane Rhythmik beeinflussen kann^[93]. Aus diesem Grund wäre es möglich, dass auch bei Bienen ein Zusammenhang zwischen der AMPK-Aktivität und den Schrittmacherzellen aufgrund des Einflusses der Nahrungsaufnahme existiert, die an soziale Faktoren (Kastenzugehörigkeit) geknüpft ist.

4.11 Ausblick

In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass die Simulation eines niedrigen zellulären Energiezustandes, wie er bei hungrigen Tieren natürlicherweise vorhanden ist, bei gesättigten Bienen genügt, um die AMPK-Aktivität zu erhöhen und ein Gedächtnis zu etablieren, das normalerweise nur bei hungrigen Tieren vorhanden ist. Dies macht die AMPK zu einem potenziellen Regler für die Belohnungsstärke und die Motivation beim appetitiven gustatorischen Lernen, da sie an der Regulation der Energiebalance des gesamten Organismus beteiligt ist.

Aufgrund des zellulären Energiemangels in Form eines erhöhten AMP-Spiegels im Belohnungssystem wäre es möglich, dass die Motivation bei Wirbeltieren und damit letztendlich auch bei uns Menschen von der Aktivität der AMPK abhängig ist und Hun-

gersignale des Organismus wie die des appetitanregenden Hormones Ghrelin in das Belohnungszentrum übertragen werden können. Dies müsste durch zukünftige Experimente geklärt werden, in denen gezielt der AMPK-Einfluss in den Belohnungssystemen des Menschen untersucht wird.

5 Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurde gezeigt, dass der zelluläre Energiesensor AMPK, der bei der Regulation der Nahrungsaufnahme eine Rolle spielt, zwischen Sättigung und appetitiven Lern- und Gedächtnisprozessen vermittelt. Um die Aktivität der AMPK in neuronalen Netzwerken zeitlich und räumlich schnell zu manipulieren wurde eine neue Methode entwickelt, mit der die Aktivität der AMPK durch Photolyse von ADP schnell erhöht und ein niedriger zellulärer Energiespiegel simuliert werden kann. Mit Hilfe dieser Methode konnte bei der Honigbiene *Apis mellifera* gezeigt werden, dass die AMPK nicht nur die Zuckerwasserempfindlichkeit reguliert, sondern auch das Habitationsverhalten beeinflusst. Damit wurde nachgewiesen, dass die AMPK als genereller Modulator von sättigungsabhängigen Verhaltensänderungen fungiert. Darüber hinaus wurde gezeigt, dass die AMPK-Aktivierung genügt, um bei gesättigten Tieren ein Gedächtnis zu etablieren, welches nur hungrigen Tieren vorbehalten war. Dies zeigt erstmals die Beteiligung der AMPK an der Gedächtnisbildung und macht diese, da sie den Sättigungszustand mit dem Lernprozess verknüpft, zu einem potenziellen Regler für die Belohnungsstärke und Motivation beim appetitiven gustatorischen Lernen. Damit wurde die Grundlage geschaffen, diese Hypothese auch in Vertebraten zu testen.

6 Summary

In this study I identified the AMP-protein kinase (AMPK) that is known as a cellular energy sensor as a molecular mediator between satiation level and satiation-dependent effects on appetitive sensory processing, learning and memory formation. To simulate a low cellular energy level within a part of a neuronal network of satiated animals, I established a method that uses the photo release of caged ADP to spatially and temporally activate AMPK in the nervous system of honeybees in vivo. Using this approach I demonstrated that AMPK mediates the satiation-dependent effect on responsiveness and habituation of appetitive stimuli in honeybee. Moreover, simulation of a low energy level in the brain of satiated animals is sufficient to establish a memory at high level typical for hungry animals. Taken together, these findings provide first evidence that AMPK-dependent processes play a major role in linking the effects of satiation level at the systems level to the well-known satiation-dependent effects in appetitive behavior including associative learning and memory formation.

7 Literatur

- [1] Abbracchio, M.P., Burnstock, G. (1994): Purinoceptors: are there families of P2X and P2Y purinoceptors? *Pharmacol Ther* 64(3): 445–475.
- [2] Abbracchio, M.P., Boeynaems, J.M., Barnard, E.A., Boyer, J.L., Kennedy, C., Miras-Portugal, M.T., King, B.F., Gachet, C., Jacobson, K.A., Weisman, G.A., Burnstock, G. (2003): Characterization of the UDP-glucose receptor (re-named here the P2Y₁₄ receptor) adds diversity to the P2Y receptor family. *Trends Pharmacol Sci* 24(2): 52–55.
- [3] Abel, R., Rybak, J., Menzel, R. (2001): Structure and response patterns of olfactory interneurons in the honeybee, *Apis mellifera*. *J Comp Neurol* 437(3): 363–383.
- [4] Abel, T., Martin, K.C., Bartsch, D., Kandel, E.R. (1998): Memory suppressor genes: inhibitory constraints on the storage of long-term memory. *Science* 279(5349): 338–341.
- [5] Acevedo, S.F., Froudarakis, E.I., Kanellopoulos, A., Skoulakis, E.M.C. (2007): Protection from premature habituation requires functional mushroom bodies in *Drosophila*. *Learn Mem* 14(5): 376–384.
- [6] Amador, N., Schlag-Rey, M., Schlag, J. (2000): Reward-predicting and reward-detecting neuronal activity in the primate supplementary eye field. *J Neurophysiol* 84(4): 2166–2170.
- [7] Anand, B.K., Pillai, R.V. (1967): Activity of single neurones in the hypothalamic feeding centres: effect of gastric distension. *J Physiol* 192(1): 63–77.
- [8] Andersson, U., Filipsson, K., Abbott, C.R., Woods, A., Smith, K., Bloom, S.R., Carling, D., Small, C.J. (2004): AMP-activated protein kinase plays a role in the control of food intake. *J Biol Chem* 279(13): 12 005–12 008.
- [9] Apicella, P., Ljungberg, T., Scarnati, E., Schultz, W. (1991): Responses to reward in monkey dorsal and ventral striatum. *Exp Brain Res* 85(3): 491–500.
- [10] Bacsikai, B.J., Hochner, B., Mahaut-Smith, M., Adams, S.R., Kaang, B.K., Kandel, E.R., Tsien, R.Y. (1993): Spatially resolved dynamics of cAMP and protein kinase A subunits in *Aplysia* sensory neurons. *Science* 260(5105): 222–226.
- [11] Bading, H., Ginty, D.D., Greenberg, M.E. (1993): Regulation of gene expression in hippocampal neurons by distinct calcium signaling pathways. *Science* 260(5105): 181–186.
- [12] Bailey, C.H., Kandel, E.R. (1993): Structural changes accompanying memory storage. *Annu Rev Physiol* 55: 397–426.

-
- [13] Bakshi, V.P., Kelley, A.E. (1993): Feeding induced by opioid stimulation of the ventral striatum: role of opiate receptor subtypes. *J Pharmacol Exp Ther* 265(3): 1253–1260.
- [14] Bateman, A. (1997): The structure of a domain common to archaebacteria and the homocystinuria disease protein. *Trends Biochem Sci* 22(1): 12–13.
- [15] Beauloye, C., Marsin, A.S., Bertrand, L., Krause, U., Hardie, D.G., Vanoverschelde, J.L., Hue, L. (2001): Insulin antagonizes AMP-activated protein kinase activation by ischemia or anoxia in rat hearts, without affecting total adenine nucleotides. *FEBS Lett* 505(3): 348–352.
- [16] Beg, Z.H., Allmann, D.W., Gibson, D.M. (1973): Modulation of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase activity with cAMP and with protein fractions of rat liver cytosol. *Biochem Biophys Res Commun* 54(4): 1362–1369.
- [17] Berridge, K.C. (1996): Food reward: brain substrates of wanting and liking. *Neurosci Biobehav Rev* 20(1): 1–25.
- [18] Berridge, K.C., Robinson, T.E. (1998): What is the role of dopamine in reward: hedonic impact, reward learning, or incentive salience? *Brain Res Brain Res Rev* 28(3): 309–369.
- [19] Blackburn, J.R., Pfaus, J.G., Phillips, A.G. (1992): Dopamine functions in appetitive and defensive behaviours. *Prog Neurobiol* 39(3): 247–279.
- [20] Bloch, G., Solomon, S.M., Robinson, G.E., Fahrbach, S.E. (2003): Patterns of PERIOD and pigment-dispersing hormone immunoreactivity in the brain of the European honeybee (*Apis mellifera*): age- and time-related plasticity. *J Comp Neurol* 464(3): 269–284.
- [21] Bolster, D.R., Crozier, S.J., Kimball, S.R., Jefferson, L.S. (2002): AMP-activated protein kinase suppresses protein synthesis in rat skeletal muscle through down-regulated mammalian target of rapamycin (mTOR) signaling. *J Biol Chem* 277(27): 23 977–23 980.
- [22] Boone, A.N., Rodrigues, B., Brownsey, R.W. (1999): Multiple-site phosphorylation of the 280 kDa isoform of acetyl-CoA carboxylase in rat cardiac myocytes: evidence that cAMP-dependent protein kinase mediates effects of beta-adrenergic stimulation. *Biochem J* 341 (Pt 2): 347–354.
- [23] Bowman, E.M., Aigner, T.G., Richmond, B.J. (1996): Neural signals in the monkey ventral striatum related to motivation for juice and cocaine rewards. *J Neurophysiol* 75(3): 1061–1073.
- [24] Braun, G., Bicker, G. (1992): Habituation of an appetitive reflex in the honeybee. *J Neurophysiol* 67(3): 588–598.
- [25] Burnstock, G. (2001): Purine-mediated signalling in pain and visceral perception. *Trends Pharmacol Sci* 22(4): 182–188.

-
- [26] Carew, T.J. (2001): Behavioral Neurobiology, chapter Learning and memory in simple reflex systems in *Aplysia*, 303–344. T. J. Carew.
- [27] Carling, D., Hardie, D.G. (1989): The substrate and sequence specificity of the AMP-activated protein kinase. Phosphorylation of glycogen synthase and phosphorylase kinase. *Biochim Biophys Acta* 1012(1): 81–86.
- [28] Carling, D., Zammit, V.A., Hardie, D.G. (1987): A common bicyclic protein kinase cascade inactivates the regulatory enzymes of fatty acid and cholesterol biosynthesis. *FEBS Lett* 223(2): 217–222.
- [29] Carlson, C.A., Kim, K.H. (1973): Regulation of hepatic acetyl coenzyme A carboxylase by phosphorylation and dephosphorylation. *J Biol Chem* 248(1): 378–380.
- [30] Castellucci, V.F., Kandel, E.R., Schwartz, J.H., Wilson, F.D., Nairn, A.C., Greengard, P. (1980): Intracellular injection of the catalytic subunit of cyclic AMP-dependent protein kinase simulates facilitation of transmitter release underlying behavioral sensitization in *Aplysia*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 77(12): 7492–7496.
- [31] Chaput, M., Holley, A. (1976): Olfactory bulb responsiveness to food odour during stomach distension in the rat. *Chemical Senses and Flavour* 2: 189–201.
- [32] Cho, W., Heberlein, U., Wolf, F.W. (2004): Habituation of an odorant-induced startle response in *Drosophila*. *Genes Brain Behav* 3(3): 127–137.
- [33] Cohen, P., Hardie, D.G. (1991): The actions of cyclic AMP on biosynthetic processes are mediated indirectly by cyclic AMP-dependent protein kinase. *Biochim Biophys Acta* 1094(3): 292–299.
- [34] Corballis, M.C. (1989): Laterality and human evolution. *Psychol Rev* 96(3): 492–505.
- [35] Corton, J.M., Gillespie, J.G., Hawley, S.A., Hardie, D.G. (1995): 5-aminoimidazole-4-carboxamide ribonucleoside. A specific method for activating AMP-activated protein kinase in intact cells? *Eur J Biochem* 229(2): 558–565.
- [36] Crailsheim, K., Hrassnigg, N., Stabentheiner, A. (1996): Diurnal behavioural differences in forager and nurse honey bees (*Apis mellifera carnica*). *Apidologie* 27: 235–244.
- [37] Critchley, H.D., Rolls, E.T. (1996): Hunger and satiety modify the responses of olfactory and visual neurons in the primate orbitofrontal cortex. *J Neurophysiol* 75(4): 1673–1686.
- [38] Crute, B.E., Seefeld, K., Gamble, J., Kemp, B.E., Witters, L.A. (1998): Functional domains of the alpha1 catalytic subunit of the AMP-activated protein kinase. *J Biol Chem* 273(52): 35347–35354.
- [39] Culmsee, C., Monnig, J., Kemp, B.E., Mattson, M.P. (2001): AMP-activated protein kinase is highly expressed in neurons in the developing rat brain and promotes

- neuronal survival following glucose deprivation. *J Mol Neurosci* 17(1): 45–58.
- [40] Dash, P.K., Hochner, B., Kandel, E.R. (1990): Injection of the cAMP-responsive element into the nucleus of Aplysia sensory neurons blocks long-term facilitation. *Nature* 345(6277): 718–721.
- [41] Davies, S.P., Helps, N.R., Cohen, P.T., Hardie, D.G. (1995): 5'-AMP inhibits dephosphorylation, as well as promoting phosphorylation, of the AMP-activated protein kinase. Studies using bacterially expressed human protein phosphatase-2C alpha and native bovine protein phosphatase-2AC. *FEBS Lett* 377(3): 421–425.
- [42] Dyck, J.R., Kudo, N., Barr, A.J., Davies, S.P., Hardie, D.G., Lopaschuk, G.D. (1999): Phosphorylation control of cardiac acetyl-CoA carboxylase by cAMP-dependent protein kinase and 5'-AMP activated protein kinase. *Eur J Biochem* 262(1): 184–190.
- [43] Ferrer, A., Caelles, C., Massot, N., Hegardt, F.G. (1985): Activation of rat liver cytosolic 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase kinase by adenosine 5'-monophosphate. *Biochem Biophys Res Commun* 132(2): 497–504.
- [44] Fish, K.J., Cegielska, A., Getman, M.E., Landes, G.M., Virshup, D.M. (1995): Isolation and characterization of human casein kinase I epsilon (CKI), a novel member of the CKI gene family. *J Biol Chem* 270(25): 14 875–14 883.
- [45] Foretz, M., Carling, D., Guichard, C., Ferré, P., Foufelle, F. (1998): AMP-activated protein kinase inhibits the glucose-activated expression of fatty acid synthase gene in rat hepatocytes. *J Biol Chem* 273(24): 14 767–14 771.
- [46] Friedrich, A., Thomas, U., Müller, U. (2004): Learning at different satiation levels reveals parallel functions for the cAMP-protein kinase A cascade in formation of long-term memory. *J Neurosci* 24(18): 4460–4468.
- [47] Gadalla, A.E., Pearson, T., Currie, A.J., Dale, N., Hawley, S.A., Sheehan, M., Hirst, W., Michel, A.D., Randall, A., Hardie, D.G., Frenguelli, B.G. (2004): AICA riboside both activates AMP-activated protein kinase and competes with adenosine for the nucleoside transporter in the CA1 region of the rat hippocampus. *J Neurochem* 88(5): 1272–1282.
- [48] Gamble, J., Lopaschuk, G.D. (1997): Insulin inhibition of 5' adenosine monophosphate-activated protein kinase in the heart results in activation of acetyl coenzyme A carboxylase and inhibition of fatty acid oxidation. *Metabolism* 46(11): 1270–1274.
- [49] Groves, P.M., Thompson, R.F. (1970): Habituation: a dual-process theory. *Psychol Rev* 77(5): 419–450.
- [50] Hammer (1993): An identified neuron mediates the unconditioned stimulus in associative olfactory learning in honeybees. *Nature* 366: 59–63.

-
- [51] Hardie, D.G., Hawley, S.A. (2001): AMP-activated protein kinase: the energy charge hypothesis revisited. *Bioessays* 23(12): 1112–1119.
- [52] Hardie, D.G., Salt, I.P., Hawley, S.A., Davies, S.P. (1999): AMP-activated protein kinase: an ultrasensitive system for monitoring cellular energy charge. *Biochem J* 338 (Pt 3): 717–722.
- [53] Hardie, D.G. (2004): The AMP-activated protein kinase pathway—new players upstream and downstream. *J Cell Sci* 117(Pt 23): 5479–5487.
- [54] Hardie, D.G., Frenguelli, B.G. (2007): A neural protection racket: AMPK and the GABA(B) receptor. *Neuron* 53(2): 159–162.
- [55] Hardie, D.G., Scott, J.W., Pan, D.A., Hudson, E.R. (2003): Management of cellular energy by the AMP-activated protein kinase system. *FEBS Lett* 546(1): 113–120.
- [56] Hardie, D., Carling, D., Sim, A. (1989): The AMP-activated protein kinase - a multisubstrate regulator of lipid metabolism. *Trends Biochem Sci* 14: 20–23.
- [57] Hawley, S.A., Davison, M., Woods, A., Davies, S.P., Beri, R.K., Carling, D., Hardie, D.G. (1996): Characterization of the AMP-activated protein kinase from rat liver and identification of threonine 172 as the major site at which it phosphorylates AMP-activated protein kinase. *J Biol Chem* 271(44): 27 879–27 887.
- [58] Hawley, S.A., Boudeau, J., Reid, J.L., Mustard, K.J., Udd, L., Mäkelä, T.P., Alessi, D.R., Hardie, D.G. (2003): Complexes between the LKB1 tumor suppressor, STRAD alpha/beta and MO25 alpha/beta are upstream kinases in the AMP-activated protein kinase cascade. *J Biol* 2(4): 28.
- [59] Hawley, S.A., Pan, D.A., Mustard, K.J., Ross, L., Bain, J., Edelman, A.M., Frenguelli, B.G., Hardie, D.G. (2005): Calmodulin-dependent protein kinase kinase-beta is an alternative upstream kinase for AMP-activated protein kinase. *Cell Metab* 2(1): 9–19.
- [60] Henin, N., Vincent, M.F., Gruber, H.E., den Berghe, G.V. (1995): Inhibition of fatty acid and cholesterol synthesis by stimulation of AMP-activated protein kinase. *FASEB J* 9(7): 541–546.
- [61] Hetherington, M.M., Rolls, B.J. (1996): Why we eat what we eat: The physiology of eating, chapter Sensory-specific satiety: Theoretical frameworks and central characteristics., 267–290. Washington, DC: American Psychological Association.
- [62] Hikosaka, O., Sakamoto, M., Usui, S. (1989): Functional properties of monkey caudate neurons. III. Activities related to expectation of target and reward. *J Neurophysiol* 61(4): 814–832.
- [63] Hoebel, B.G. (1969): Feeding and self-stimulation. *Ann N Y Acad Sci* 157(2):

758–778.

- [64] Hong, S.P., Momcilovic, M., Carlson, M. (2005): Function of mammalian LKB1 and Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase kinase alpha as Snf1-activating kinases in yeast. *J Biol Chem* 280(23): 21 804–21 809.
- [65] Honigberg, S.M., Lee, R.H. (1998): Snf1 kinase connects nutritional pathways controlling meiosis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* 18(8): 4548–4555.
- [66] Horman, S., Browne, G., Krause, U., Patel, J., Vertommen, D., Bertrand, L., Lavoinnie, A., Hue, L., Proud, C., Rider, M. (2002): Activation of AMP-activated protein kinase leads to the phosphorylation of elongation factor 2 and an inhibition of protein synthesis. *Curr Biol* 12(16): 1419–1423.
- [67] Horman, S., Vertommen, D., Heath, R., Neumann, D., Mouton, V., Woods, A., Schlattner, U., Wallimann, T., Carling, D., Hue, L., Rider, M.H. (2006): Insulin antagonizes ischemia-induced Thr172 phosphorylation of AMP-activated protein kinase alpha-subunits in heart via hierarchical phosphorylation of Ser485/491. *J Biol Chem* 281(9): 5335–5340.
- [68] Horn, C.C., Geizhals, C.R., Kupfermann, I. (2001): Further studies of bulk and orosensory decrement in producing satiation of feeding in *Aplysia*. *Brain Res* 918(1-2): 51–59.
- [69] Hudson, E.R., Pan, D.A., James, J., Lucocq, J.M., Hawley, S.A., Green, K.A., Baba, O., Terashima, T., Hardie, D.G. (2003): A novel domain in AMP-activated protein kinase causes glycogen storage bodies similar to those seen in hereditary cardiac arrhythmias. *Curr Biol* 13(10): 861–866.
- [70] Hull, C.L., Livingston, J.R., Rouse, R.O., Barker, A.N. (1951): True, sham, and esophageal feeding as reinforcements. *J Comp Physiol Psychol* 44(3): 236–245.
- [71] Hurley, R.L., Anderson, K.A., Franzone, J.M., Kemp, B.E., Means, A.R., Witters, L.A. (2005): The Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase kinases are AMP-activated protein kinase kinases. *J Biol Chem* 280(32): 29 060–29 066.
- [72] Hurley, R.L., Barré, L.K., Wood, S.D., Anderson, K.A., Kemp, B.E., Means, A.R., Witters, L.A. (2006): Regulation of AMP-activated protein kinase by multisite phosphorylation in response to agents that elevate cellular cAMP. *J Biol Chem* 281(48): 36 662–36 672.
- [73] Inoki, K., Zhu, T., Guan, K.L. (2003): TSC2 mediates cellular energy response to control cell growth and survival. *Cell* 115(5): 577–590.
- [74] Janowitz, H.D., Grossman, M.I. (1949): Some factors affecting the food intake of normal dogs and dogs with esophagostomy and gastric fistula. *Am J Physiol* 159(1): 143–148.
- [75] Jørgensen, S.B., Nielsen, J.N., Birk, J.B., Olsen, G.S., Viollet, B., Andreelli, F.,

- Schjerling, P., Vaulont, S., Hardie, D.G., Hansen, B.F., Richter, E.A., Wojtaszewski, J.F.P. (2004): The alpha2-5'AMP-activated protein kinase is a site 2 glycogen synthase kinase in skeletal muscle and is responsive to glucose loading. *Diabetes* 53(12): 3074–3081.
- [76] Kaang, B.K., Kandel, E.R., Grant, S.G. (1993): Activation of cAMP-responsive genes by stimuli that produce long-term facilitation in *Aplysia* sensory neurons. *Neuron* 10(3): 427–435.
- [77] Kahn, B.B., Alquier, T., Carling, D., Hardie, D.G. (2005): AMP-activated protein kinase: ancient energy gauge provides clues to modern understanding of metabolism. *Cell Metab* 1(1): 15–25.
- [78] Kaiser, W. (1988): Busy bees need rest, too: behavioral and electromyographic sleep signs in honeybees. *J Comp Physiol A* 163: 565–584.
- [79] Kaiser, W., Steiner-Kaiser, J. (1983): Neuronal correlates of sleep, wakefulness and arousal in a diurnal insect. *Nature* 301(5902): 707–709.
- [80] Kandel, E.R. (1991): Principles of Neural Science, chapter Cellular mechanisms of learning and the biological basis of individuality. E. R. Kandel and J. H. Schwartz and T. M. Jessell.
- [81] Kemp, B.E. (2004): Bateman domains and adenosine derivatives form a binding contract. *J Clin Invest* 113(2): 182–184.
- [82] Kim, E.K., Miller, I., Aja, S., Landree, L.E., Pinn, M., McFadden, J., Kuhajda, F.P., Moran, T.H., Ronnett, G.V. (2004): C75, a fatty acid synthase inhibitor, reduces food intake via hypothalamic AMP-activated protein kinase. *J Biol Chem* 279(19): 19 970–19 976.
- [83] Kimura, N., Tokunaga, C., Dalal, S., Richardson, C., Ichi Yoshino, K., Hara, K., Kemp, B.E., Witters, L.A., Mimura, O., Yonezawa, K. (2003): A possible linkage between AMP-activated protein kinase (AMPK) and mammalian target of rapamycin (mTOR) signalling pathway. *Genes Cells* 8(1): 65–79.
- [84] Koh, H., Chung, J. (2007): AMPK links energy status to cell structure and mitosis. *Biochem Biophys Res Commun* 362(4): 789–792.
- [85] Kola, B., Boscaro, M., Rutter, G.A., Grossman, A.B., Korbonits, M. (2006): Expanding role of AMPK in endocrinology. *Trends Endocrinol Metab* 17(5): 205–215.
- [86] Kola, B., Hubina, E., Tucci, S.A., Kirkham, T.C., Garcia, E.A., Mitchell, S.E., Williams, L.M., Hawley, S.A., Hardie, D.G., Grossman, A.B., Korbonits, M. (2005): Cannabinoids and ghrelin have both central and peripheral metabolic and cardiac effects via AMP-activated protein kinase. *J Biol Chem* 280(26): 25 196–25 201.
- [87] Kovacic, S., Soltys, C.L.M., Barr, A.J., Shiojima, I., Walsh, K., Dyck, J.R.B. (2003):

- Akt activity negatively regulates phosphorylation of AMP-activated protein kinase in the heart. *J Biol Chem* 278(41): 39 422–39 427.
- [88] Krause, U., Bertrand, L., Hue, L. (2002): Control of p70 ribosomal protein S6 kinase and acetyl-CoA carboxylase by AMP-activated protein kinase and protein phosphatases in isolated hepatocytes. *Eur J Biochem* 269(15): 3751–3759.
- [89] Krebs, H. (1964): The Croonian Lecture, 1963. Gluconeogenesis. *Proc R Soc Lond B Biol Sci* 159: 545–564.
- [90] Kupfermann, I. (1974): Feeding behavior in *Aplysia*: a simple system for the study of motivation. *Behav Biol* 10(1): 1–26.
- [91] Kurth-Kraczek, E.J., Hirshman, M.F., Goodyear, L.J., Winder, W.W. (1999): 5' AMP-activated protein kinase activation causes GLUT4 translocation in skeletal muscle. *Diabetes* 48(8): 1667–1671.
- [92] Lambrecht, G., Friebe, T., Grimm, U., Windscheif, U., Bungardt, E., Hildebrandt, C., Bäumert, H.G., Spatz-Kümbel, G., Mutschler, E. (1992): PPADS, a novel functionally selective antagonist of P2 purinoceptor-mediated responses. *Eur J Pharmacol* 217(2-3): 217–219.
- [93] Laposky, A.D., Shelton, J., Bass, J., Dugovic, C., Perrino, N., Turek, F.W. (2006): Altered sleep regulation in leptin-deficient mice. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 290(4): R894–R903.
- [94] Leclerc, I., Kahn, A., Doiron, B. (1998): The 5'-AMP-activated protein kinase inhibits the transcriptional stimulation by glucose in liver cells, acting through the glucose response complex. *FEBS Lett* 431(2): 180–184.
- [95] LeDoux, J.E. (2000): Emotion circuits in the brain. *Annu Rev Neurosci* 23: 155–184.
- [96] Lee, J.H., Koh, H., Kim, M., Kim, Y., Lee, S.Y., Karess, R.E., Lee, S.H., Shong, M., Kim, J.M., Kim, J., Chung, J. (2007): Energy-dependent regulation of cell structure by AMP-activated protein kinase. *Nature* 447(7147): 1017–1020.
- [97] Ljungberg, T., Apicella, P., Schultz, W. (1992): Responses of monkey dopamine neurons during learning of behavioral reactions. *J Neurophysiol* 67(1): 145–163.
- [98] Lochhead, P.A., Salt, I.P., Walker, K.S., Hardie, D.G., Sutherland, C. (2000): 5-aminoimidazole-4-carboxamide riboside mimics the effects of insulin on the expression of the 2 key gluconeogenic genes PEPCK and glucose-6-phosphatase. *Diabetes* 49(6): 896–903.
- [99] Long, Y.C., Zierath, J.R. (2006): AMP-activated protein kinase signaling in metabolic regulation. *J Clin Invest* 116(7): 1776–1783.
- [100] Longnus, S.L., Wambolt, R.B., Parsons, H.L., Brownsey, R.W., Allard, M.F. (2003): 5-Aminoimidazole-4-carboxamide 1-beta -D-ribofuranoside (AICAR) stimulates myocardial glycogenolysis by allosteric mechanisms. *Am J Physiol Re-*

- gul Integr Comp Physiol* 284(4): R936–R944.
- [101] Lonze, B.E., Ginty, D.D. (2002): Function and regulation of CREB family transcription factors in the nervous system. *Neuron* 35(4): 605–623.
- [102] Luiken, J.J.F.P., Coort, S.L.M., Willems, J., Coumans, W.A., Bonen, A., van der Vusse, G.J., Glatz, J.F.C. (2003): Contraction-induced fatty acid translocase/CD36 translocation in rat cardiac myocytes is mediated through AMP-activated protein kinase signaling. *Diabetes* 52(7): 1627–1634.
- [103] Markowitsch, H.J., Pritzel, M. (1976): Reward related neurons in cat association cortex. *Brain Res* 111(1): 185–188.
- [104] Mauelshagen, J. (1993): Neural correlates of olfactory learning paradigms in an identified neuron in the honeybee brain. *J Neurophysiol* 69(2): 609–625.
- [105] Menzel, R. (1990): Neurobiology of Comparative Cognition, chapter Learning, memory and cognition in honey bees., 237–292. R.P. Kesner and D.S. Olten.
- [106] Menzel, R. (2001): Searching for the memory trace in a mini-brain, the honeybee. *Learn Mem* 8(2): 53–62.
- [107] Menzel, R., Giurfa, M. (2001): Cognitive architecture of a mini-brain: the honeybee. *Trends Cogn Sci* 5(2): 62–71.
- [108] Menzel, R., Hammer, M., Sugawa, M. (1989): Neural Mechanisms of Behavior., chapter Non-associative components of conditioning in honeybees., 221. Stuttgart, FRG: Thieme.
- [109] Menzel, R., Muller, U. (1996): Learning and memory in honeybees: from behavior to neural substrates. *Annu Rev Neurosci* 19: 379–404.
- [110] Merrill, G.F., Kurth, E.J., Hardie, D.G., Winder, W.W. (1997): AICA riboside increases AMP-activated protein kinase, fatty acid oxidation, and glucose uptake in rat muscle. *Am J Physiol* 273(6 Pt 1): E1107–E1112.
- [111] Minokoshi, Y., Alquier, T., Furukawa, N., Kim, Y.B., Lee, A., Xue, B., Mu, J., Foulfelle, F., Ferré, P., Birnbaum, M.J., Stuck, B.J., Kahn, B.B. (2004): AMP-kinase regulates food intake by responding to hormonal and nutrient signals in the hypothalamus. *Nature* 428(6982): 569–574.
- [112] Mirenowicz, J., Schultz, W. (1994): Importance of unpredictability for reward responses in primate dopamine neurons. *J Neurophysiol* 72(2): 1024–1027.
- [113] Mirenowicz, J., Schultz, W. (1996): Preferential activation of midbrain dopamine neurons by appetitive rather than aversive stimuli. *Nature* 379(6564): 449–451.
- [114] Mitchelhill, K.I., Michell, B.J., House, C.M., Stapleton, D., Dyck, J., Gamble, J., Ullrich, C., Witters, L.A., Kemp, B.E. (1997): Posttranslational modifications of the 5'-AMP-activated protein kinase beta1 subunit. *J Biol Chem* 272(39): 24 475–24 479.

-
- [115] Müller, U. (2000): Prolonged activation of cAMP-dependent protein kinase during conditioning induces long-term memory in honeybees. *Neuron* 27(1): 159–168.
- [116] Müller, U. (2002): Learning in honeybees: from molecules to behaviour. *Zoology (Jena)* 105(4): 313–320.
- [117] Müller, U., Hildebrandt, H. (2002): 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* 22(19): 8739–8747.
- [118] Mobbs (1982): The brain of the honeybee *Apis mellifera*. 1. The connections and spatial organization of the mushroom bodies. *Philos Trans R Soc Lond Biol* 298: 309–354.
- [119] Mobbs, P.G. (1985): Comprehensive Insect Physiology Pharmacology and Biochemistry., chapter Brain Structure., 299–370. Oxford, UK: Pergamon.
- [120] Momcilovic, M., Hong, S.P., Carlson, M. (2006): Mammalian TAK1 activates Snf1 protein kinase in yeast and phosphorylates AMP-activated protein kinase in vitro. *J Biol Chem* 281(35): 25 336–25 343.
- [121] Moore, D. (2001): Honey bee circadian clocks: behavioral control from individual workers to whole-colony rhythms. *J Insect Physiol* 47: 843–857.
- [122] Moore, D., Angel, J.E., Chesseman, I.M., Fahrbach, S.E., Robinson, G.E. (1998): Timekeeping in the honey bee colony-integration of circadian rhythms and division of labor. *Behav Ecol Sociobiol* 43: 147–160.
- [123] Moore, D., Rankin, M.A. (1985): Circadian locomotor rhythms in individual honeybees, *Apis mellifera*. *Physiol Entomol* 10: 191–198.
- [124] Morris, J.S., Dolan, R.J. (2001): Involvement of human amygdala and orbitofrontal cortex in hunger-enhanced memory for food stimuli. *J Neurosci* 21(14): 5304–5310.
- [125] Nakamura, K., Mikami, A., Kubota, K. (1992): Activity of single neurons in the monkey amygdala during performance of a visual discrimination task. *J Neurophysiol* 67(6): 1447–1463.
- [126] Nedeva, I. (2007): P2X/Y-Rezeptoren: Nachweis und Inhibition durch PPADS in Bienenneuronen. Universität des Saarlandes. Zoologie/Physiologie. F-Arbeit.
- [127] Nielsen, J.N., Richter, E.A. (2003): Regulation of glycogen synthase in skeletal muscle during exercise. *Acta Physiol Scand* 178(4): 309–319.
- [128] Nishijo, H., Ono, T., Nishino, H. (1988): Single neuron responses in amygdala of alert monkey during complex sensory stimulation with affective significance. *J Neurosci* 8(10): 3570–3583.
- [129] Norgren, R. (1995): The rat nervous system, chapter Gustatory system, 751–771. Academic Press, San Diego.

- [130] Page, R.E., Erber, J., Fondrk, M.K. (1998): The effect of genotype on response thresholds to sucrose and foraging behavior of honey bees (*Apis mellifera* L.). *J Comp Physiol [A]* 182(4): 489–500.
- [131] Page, R.E., Fondrk, M.K. (1995): The effects of colony-level selection on the social organization of honey bee (*Apis mellifera* L.) colonies: colony-level components of pollen hoarding. *Behav Ecol Sociobiol* 36: 135–144.
- [132] Page, R.E., Fondrk, M.K., Hunt, G.J., Guzmán-Novoa, E., Humphries, M.A., Nguyen, K., Greene, A.S. (2000): Genetic dissection of honeybee (*Apis mellifera* L.) foraging behavior. *J Hered* 91(6): 474–479.
- [133] Page, R.E., Erber, J. (2002): Levels of behavioral organization and the evolution of division of labor. *Naturwissenschaften* 89(3): 91–106.
- [134] Pager, J., Giachetti, I., Holley, A., Magnen, J.L. (1972): A selective control of olfactory bulb electrical activity in relation to food deprivation and satiety in rats. *Physiol Behav* 9(4): 573–579.
- [135] Paintal, A.S. (1954): A study of gastric stretch receptors; their role in the peripheral mechanism of satiation of hunger and thirst. *J Physiol* 126(2): 255–270.
- [136] Pan, D.A., Hardie, D.G. (2002): A homologue of AMP-activated protein kinase in *Drosophila melanogaster* is sensitive to AMP and is activated by ATP depletion. *Biochem J* 367(Pt 1): 179–186.
- [137] Pankiw, T. (2003): Directional change in a suite of foraging behaviours in tropical and temperate evolved honey bees (*Apis mellifera* L.). *Behav Ecol Sociobiol* 119: 458–464.
- [138] Pankiw, T., Page, R.E. (1999): The effect of genotype, age, sex, and caste on response thresholds to sucrose and foraging behavior of honey bees (*Apis mellifera* L.). *J Comp Physiol [A]* 185(2): 207–213.
- [139] Pankiw, T., Page, R.E. (2000): Response thresholds to sucrose predict foraging behaviour in the honey bee (*Apis mellifera* L.). *Behav Ecol Sociobiol* 47: 265–267.
- [140] Pankiw, T., Waddington, K.D., Page, R.E. (2001): Modulation of sucrose response thresholds in honey bees (*Apis mellifera* L.): influence of genotype, feeding, and foraging experience. *J Comp Physiol [A]* 187(4): 293–301.
- [141] Pavlov, I.P. (1927): *Conditioned Reflexes* (G. V. Anrep, Trans.). London: Oxford University Press (Original work published in 1926).
- [142] Peciña, S., Cagniard, B., Berridge, K.C., Aldridge, J.W., Zhuang, X. (2003): Hyperdopaminergic mutant mice have higher "wanting" but not liking for sweet rewards. *J Neurosci* 23(28): 9395–9402.
- [143] Peters, M., Mizuno, K., Ris, L., Angelo, M., Godaux, E., Giese, K.P. (2003): Loss of Ca²⁺/calmodulin kinase kinase beta affects the formation of some, but not all,

- types of hippocampus-dependent long-term memory. *J Neurosci* 23(30): 9752–9760.
- [144] Polekhina, G., Gupta, A., Michell, B.J., van Denderen, B., Murthy, S., Feil, S.C., Jennings, I.G., Campbell, D.J., Witters, L.A., Parker, M.W., Kemp, B.E., Stapleton, D. (2003): AMPK beta subunit targets metabolic stress sensing to glycogen. *Curr Biol* 13(10): 867–871.
- [145] Polekhina, G., Gupta, A., van Denderen, B.J.W., Feil, S.C., Kemp, B.E., Stapleton, D., Parker, M.W. (2005): Structural basis for glycogen recognition by AMP-activated protein kinase. *Structure* 13(10): 1453–1462.
- [146] Pratt, W.E., Mizumori, S.J. (1998): Characteristics of basolateral amygdala neuronal firing on a spatial memory task involving differential reward. *Behav Neurosci* 112(3): 554–570.
- [147] Ralevic, V., Burnstock, G. (1998): Receptors for purines and pyrimidines. *Pharmacol Rev* 50(3): 413–492.
- [148] Ramaiah, A., Hathawy, J.A., Atkinson, D.E. (1964): Adenylate as a metabolic regulator. Effect on yeast phosphofructokinase kinetics. *J Biol Chem* 239: 3619–3622.
- [149] Ravel, S., Legallet, E., Apicella, P. (1999): Tonically active neurons in the monkey striatum do not preferentially respond to appetitive stimuli. *Exp Brain Res* 128(4): 531–534.
- [150] Raynor, H.A., Epstein, L.H. (2001): Dietary variety, energy regulation, and obesity. *Psychol Bull* 127(3): 325–341.
- [151] Rehder, V. (1989): Sensory pathways and motoneurons of the proboscis reflex in the suboesophageal ganglion of the honey bee. *J Comp Neurol* 279(3): 499–513.
- [152] Reppert, S.M., Weaver, D.R. (2002): Coordination of circadian timing in mammals. *Nature* 418(6901): 935–941.
- [153] Robinson, G.E. (1992): Regulation of division of labor in insect societies. *Annu Rev Entomol* 37: 637–665.
- [154] Rolls, B.J., Rowe, E.A., Rolls, E.T., Kingston, B., Megson, A., Gunary, R. (1981): Variety in a meal enhances food intake in man. *Physiol Behav* 26(2): 215–221.
- [155] Rolls, E.T. (2000): The orbitofrontal cortex and reward. *Cereb Cortex* 10(3): 284–294.
- [156] Rolls, E.T., Critchley, H.D., Browning, A.S., Hernadi, I., Lenard, L. (1999): Responses to the sensory properties of fat of neurons in the primate orbitofrontal cortex. *J Neurosci* 19(4): 1532–1540.
- [157] Rolls, E.T., Murzi, E., Yaxley, S., Thorpe, S.J., Simpson, S.J. (1986): Sensory-specific satiety: food-specific reduction in responsiveness of ventral forebrain

- neurons after feeding in the monkey. *Brain Res* 368(1): 79–86.
- [158] Rolls, E.T., Scott, T.R., Sienkiewicz, Z.J., Yaxley, S. (1988): The responsiveness of neurones in the frontal opercular gustatory cortex of the macaque monkey is independent of hunger. *J Physiol* 397: 1–12.
- [159] Rolls, E.T., Yaxley, S., Sienkiewicz, Z.J. (1990): Gustatory responses of single neurons in the caudolateral orbitofrontal cortex of the macaque monkey. *J Neurophysiol* 64(4): 1055–1066.
- [160] Rolls, E.T. (2004): The functions of the orbitofrontal cortex. *Brain Cogn* 55(1): 11–29.
- [161] Rolls, E.T., Sienkiewicz, Z.J., Yaxley, S. (1989): Hunger Modulates the Responses to Gustatory Stimuli of Single Neurons in the Caudolateral Orbitofrontal Cortex of the Macaque Monkey. *Eur J Neurosci* 1(1): 53–60.
- [162] Romo, R., Schultz, W. (1990): Dopamine neurons of the monkey midbrain: contingencies of responses to active touch during self-initiated arm movements. *J Neurophysiol* 63(3): 592–606.
- [163] Sanders, M.J., Grondin, P.O., Hegarty, B.D., Snowden, M.A., Carling, D. (2007): Investigating the mechanism for AMP activation of the AMP-activated protein kinase cascade. *Biochem J* 403(1): 139–148.
- [164] Sandoz, J.C., Menzel, R. (2001): Side-specificity of olfactory learning in the honeybee: generalization between odors and sides. *Learn Mem* 8(5): 286–294.
- [165] Sandoz, J.C., Hammer, M., Menzel, R. (2002): Side-specificity of olfactory learning in the honeybee: US input side. *Learn Mem* 9(5): 337–348.
- [166] Sanghera, M.K., Rolls, E.T., Roper-Hall, A. (1979): Visual responses of neurons in the dorsolateral amygdala of the alert monkey. *Exp Neurol* 63(3): 610–626.
- [167] Scheiner, R., Barnert, M. (2003): Variation in water and sucrose responsiveness during the foraging season affects proboscis extension learning in honey bees. *Apidologie* 34: 67–72.
- [168] Scheiner, R., Müller, U., Heimbürger, S., Erber, J. (2003): Activity of protein kinase A and gustatory responsiveness in the honey bee (*Apis mellifera* L.). *J Comp Physiol A Neuroethol Sens Neural Behav Physiol* 189(6): 427–434.
- [169] Scheiner, R., Page, R.E. (2004): Sucrose responsiveness and behavioural plasticity in honey bees. *Apidologie* 35: 133–142.
- [170] Scheiner, R., Page, R.E., Erber, J. (2001): The effects of genotype, foraging role, and sucrose responsiveness on the tactile learning performance of honey bees (*Apis mellifera* L.). *Neurobiol Learn Mem* 76(2): 138–150.
- [171] Scheiner, R. (2004): Responsiveness to sucrose and habituation of the proboscis extension response in honey bees. *J Comp Physiol A Neuroethol Sens Neural Behav Physiol* 190(9): 727–733.

-
- [172] Schultz, W., Apicella, P., Ljungberg, T. (1993): Responses of monkey dopamine neurons to reward and conditioned stimuli during successive steps of learning a delayed response task. *J Neurosci* 13(3): 900–913.
- [173] Schwaerzel, M., Monastirioti, M., Scholz, H., Friggi-Grelin, F., Birman, S., Heisenberg, M. (2003): Dopamine and octopamine differentiate between aversive and appetitive olfactory memories in *Drosophila*. *J Neurosci* 23(33): 10 495–10 502.
- [174] Schwärzel, M., Müller, U. (2006): Dynamic memory networks: dissecting molecular mechanisms underlying associative memory in the temporal domain. *Cell Mol Life Sci* 63(9): 989–998.
- [175] Scott, J.W., Hawley, S.A., Green, K.A., Anis, M., Stewart, G., Scullion, G.A., Norman, D.G., Hardie, D.G. (2004): CBS domains form energy-sensing modules whose binding of adenosine ligands is disrupted by disease mutations. *J Clin Invest* 113(2): 274–284.
- [176] Scott, T.R., Yan, J., Rolls, E.T. (1995): Brain mechanisms of satiety and taste in macaques. *Neurobiology (Bp)* 3(3-4): 281–292.
- [177] Sharma, K.N., Anand, B.K., Dua, S., Singh, B. (1961): Role of stomach in regulation of activities of hypothalamic feeding centers. *Am J Physiol* 201: 593–598.
- [178] Shaw, R.J., Kosmatka, M., Bardeesy, N., Hurley, R.L., Witters, L.A., DePinho, R.A., Cantley, L.C. (2004): The tumor suppressor LKB1 kinase directly activates AMP-activated kinase and regulates apoptosis in response to energy stress. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101(10): 3329–3335.
- [179] Shidara, M., Aigner, T.G., Richmond, B.J. (1998): Neuronal signals in the monkey ventral striatum related to progress through a predictable series of trials. *J Neurosci* 18(7): 2613–2625.
- [180] Siegelbaum, S.A., Camardo, J.S., Kandel, E.R. (1982): Serotonin and cyclic AMP close single K⁺ channels in *Aplysia* sensory neurones. *Nature* 299(5882): 413–417.
- [181] Silva, A.J., Kogan, J.H., Frankland, P.W., Kida, S. (1998): CREB and memory. *Annu Rev Neurosci* 21: 127–148.
- [182] Soderling, T.R. (1999): The Ca-calmodulin-dependent protein kinase cascade. *Trends Biochem Sci* 24(6): 232–236.
- [183] Soltys, C.L.M., Kovacic, S., Dyck, J.R.B. (2006): Activation of cardiac AMP-activated protein kinase by LKB1 expression or chemical hypoxia is blunted by increased Akt activity. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 290(6): H2472–H2479.
- [184] Stapleton, D., Woollatt, E., Mitchelhill, K.I., Nicholl, J.K., Fernandez, C.S., Mitchell, B.J., Witters, L.A., Power, D.A., Sutherland, G.R., Kemp, B.E. (1997): AMP-activated protein kinase isoenzyme family: subunit structure and chromosomal location. *FEBS Lett* 409(3): 452–456.

-
- [185] Stein, S.C., Woods, A., Jones, N.A., Davison, M.D., Carling, D. (2000): The regulation of AMP-activated protein kinase by phosphorylation. *Biochem J* 345 Pt 3: 437–443.
- [186] Stephenson, D., Siddle, D. (1983): Theories of habituation., chapter Orienting and habituation: Perspectives in human research., 183–236. New York: John Wiley & Sons.
- [187] Sullivan, J.E., Brocklehurst, K.J., Marley, A.E., Carey, F., Carling, D., Beri, R.K. (1994): Inhibition of lipolysis and lipogenesis in isolated rat adipocytes with AI-CAR, a cell-permeable activator of AMP-activated protein kinase. *FEBS Lett* 353(1): 33–36.
- [188] Swithers, S.E., Hall, W.G. (1994): Does oral experience terminate ingestion? *Appetite* 23(2): 113–138.
- [189] Swithers-Mulvey, S.E., Hall, W.G. (1993): Integration of oral habituation and gastric signals in decerebrate rat pups. *Am J Physiol* 265(1 Pt 2): R216–R219.
- [190] Tervaniemi, M., Hugdahl, K. (2003): Lateralization of auditory-cortex functions. *Brain Res Brain Res Rev* 43(3): 231–246.
- [191] Thompson, R.F., Glanzman, D.L. (1976): Neural and behavioral mechanisms of habituation and sensitization., chapter Habituation: Perspectives from child development, animal behavior, and neurophysiology., 49–93. Hillsdale, NJ: Lawrence Erlbaum Associates.
- [192] Thompson, R.F., Groves, P.M., Teyler, T.J., Roemer, R.A. (1973): Habituation: Behavioral studies., chapter A dual-process theory of habituation: Theory and behavior., 239–271. New York: Academic Press.
- [193] Thompson, R.F., Spencer, W.A. (1966): Habituation: a model phenomenon for the study of neuronal substrates of behavior. *Psychol Rev* 73(1): 16–43.
- [194] Thorpe, S.J., Rolls, E.T., Maddison, S. (1983): The orbitofrontal cortex: neuronal activity in the behaving monkey. *Exp Brain Res* 49(1): 93–115.
- [195] Tokumitsu, H., Soderling, T.R. (1996): Requirements for calcium and calmodulin in the calmodulin kinase activation cascade. *J Biol Chem* 271(10): 5617–5622.
- [196] Tremblay, L., Schultz, W. (1999): Relative reward preference in primate orbitofrontal cortex. *Nature* 398(6729): 704–708.
- [197] Tuersley, M.D. (1989): How is food arousal manifested in the pond snail *Lymnaea stagnalis*? An overview. *J. Moll. Stud.* 55: 209–216.
- [198] Turnley, A.M., Stapleton, D., Mann, R.J., Witters, L.A., Kemp, B.E., Bartlett, P.F. (1999): Cellular distribution and developmental expression of AMP-activated protein kinase isoforms in mouse central nervous system. *J Neurochem* 72(4): 1707–1716.
- [199] Um, J.H., Yang, S., Yamazaki, S., Kang, H., Viollet, B., Foretz, M., Chung, J.H.

- (2007): Activation of 5'-AMP-activated kinase with diabetes drug metformin induces casein kinase I ϵ (CKI ϵ)-dependent degradation of clock protein mPer2. *J Biol Chem* 282(29): 20 794–20 798.
- [200] Velasco, G., Geelen, M.J., Guzmán, M. (1997): Control of hepatic fatty acid oxidation by 5'-AMP-activated protein kinase involves a malonyl-CoA-dependent and a malonyl-CoA-independent mechanism. *Arch Biochem Biophys* 337(2): 169–175.
- [201] Vincent, M.F., Marangos, P.J., Gruber, H.E., den Berghe, G.V. (1991): Inhibition by AICA riboside of gluconeogenesis in isolated rat hepatocytes. *Diabetes* 40(10): 1259–1266.
- [202] von Frisch, K. (1967): The dance language and orientation of bees. *Cambridge, MA: Harvard University Press* .
- [203] Warden, S.M., Richardson, C., O'Donnell, J., Stapleton, D., Kemp, B.E., Witters, L.A. (2001): Post-translational modifications of the beta-1 subunit of AMP-activated protein kinase affect enzyme activity and cellular localization. *Biochem J* 354(Pt 2): 275–283.
- [204] Watt, M.J., Holmes, A.G., Pinnamaneni, S.K., Garnham, A.P., Steinberg, G.R., Kemp, B.E., Febbraio, M.A. (2006): Regulation of HSL serine phosphorylation in skeletal muscle and adipose tissue. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 290(3): E500–E508.
- [205] Winder, W.W., Wilson, H.A., Hardie, D.G., Rasmussen, B.B., Hutber, C.A., Call, G.B., Clayton, R.D., Conley, L.M., Yoon, S., Zhou, B. (1997): Phosphorylation of rat muscle acetyl-CoA carboxylase by AMP-activated protein kinase and protein kinase A. *J Appl Physiol* 82(1): 219–225.
- [206] Winston, M.L. (1987): The biology of the honey bee. *Cambridge, MA: Harvard University Press* .
- [207] Wise, R.A. (2002): Brain reward circuitry: insights from unsensed incentives. *Neuron* 36(2): 229–240.
- [208] Witters, L.A., Kemp, B.E. (1992): Insulin activation of acetyl-CoA carboxylase accompanied by inhibition of the 5'-AMP-activated protein kinase. *J Biol Chem* 267(5): 2864–2867.
- [209] Witters, L.A., Kemp, B.E., Means, A.R. (2006): Chutes and Ladders: the search for protein kinases that act on AMPK. *Trends Biochem Sci* 31(1): 13–16.
- [210] Woods, A., Munday, M.R., Scott, J., Yang, X., Carlson, M., Carling, D. (1994): Yeast SNF1 is functionally related to mammalian AMP-activated protein kinase and regulates acetyl-CoA carboxylase in vivo. *J Biol Chem* 269(30): 19 509–19 515.
- [211] Woods, A., Dickerson, K., Heath, R., Hong, S.P., Momcilovic, M., Johnstone,

- S.R., Carlson, M., Carling, D. (2005): Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase kinase-beta acts upstream of AMP-activated protein kinase in mammalian cells. *Cell Metab* 2(1): 21–33.
- [212] Woods, A., Johnstone, S.R., Dickerson, K., Leiper, F.C., Fryer, L.G.D., Neumann, D., Schlattner, U., Wallimann, T., Carlson, M., Carling, D. (2003): LKB1 is the upstream kinase in the AMP-activated protein kinase cascade. *Curr Biol* 13(22): 2004–2008.
- [213] Woods, A., Vertommen, D., Neumann, D., Turk, R., Bayliss, J., Schlattner, U., Wallimann, T., Carling, D., Rider, M.H. (2003): Identification of phosphorylation sites in AMP-activated protein kinase (AMPK) for upstream AMPK kinases and study of their roles by site-directed mutagenesis. *J Biol Chem* 278(31): 28 434–28 442.
- [214] Wyers, E.J., Peeke, H.V.S., Herz, M.J. (1973): Habituation: Behavioral studies., chapter Behavioral habituation in invertebrates., 1–57. New York: Academic Press.
- [215] Yamamoto, T. (2006): Neural substrates for the processing of cognitive and affective aspects of taste in the brain. *Arch Histol Cytol* 69(4): 243–255.
- [216] Yaxley, S., Rolls, E.T., Sienkiewicz, Z.J. (1988): The responsiveness of neurons in the insular gustatory cortex of the macaque monkey is independent of hunger. *Physiol Behav* 42(3): 223–229.
- [217] Yaxley, S., Rolls, E.T., Sienkiewicz, Z.J., Scott, T.R. (1985): Satiety does not affect gustatory activity in the nucleus of the solitary tract of the alert monkey. *Brain Res* 347(1): 85–93.
- [218] Yeh, L.A., Lee, K.H., Kim, K.H. (1980): Regulation of rat liver acetyl-CoA carboxylase. Regulation of phosphorylation and inactivation of acetyl-CoA carboxylase by the adenylate energy charge. *J Biol Chem* 255(6): 2308–2314.
- [219] Yin, J.C., Vecchio, M.D., Zhou, H., Tully, T. (1995): CREB as a memory modulator: induced expression of a dCREB2 activator isoform enhances long-term memory in *Drosophila*. *Cell* 81(1): 107–115.
- [220] Yin, J.C., Wallach, J.S., Vecchio, M.D., Wilder, E.L., Zhou, H., Quinn, W.G., Tully, T. (1994): Induction of a dominant negative CREB transgene specifically blocks long-term memory in *Drosophila*. *Cell* 79(1): 49–58.
- [221] Young, R.C., Gibbs, J., Antin, J., Holt, J., Smith, G.P. (1974): Absence of satiety during sham feeding in the rat. *J Comp Physiol Psychol* 87(5): 795–800.
- [222] Zaika, O.L., Pochynyuk, O.M., Kostyuk, P.G., Yavorskaya, E.N., Lukyanetz, E.A. (2004): Acetylcholine-induced calcium signalling in adrenaline- and noradrenaline-containing adrenal chromaffin cells. *Arch Biochem Biophys* 424(1): 23–32.

- [223] Zhang, J., Kaasik, K., Blackburn, M.R., Lee, C.C. (2006): Constant darkness is a circadian metabolic signal in mammals. *Nature* 439(7074): 340–343.
- [224] Zhou, G., Myers, R., Li, Y., Chen, Y., Shen, X., Fenyk-Melody, J., Wu, M., Ventre, J., Doebber, T., Fujii, N., Musi, N., Hirshman, M.F., Goodyear, L.J., Moller, D.E. (2001): Role of AMP-activated protein kinase in mechanism of metformin action. *J Clin Invest* 108(8): 1167–1174.

8 Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
AC	Adenylatzyklase
ACC	Acetyl-CoA-Carboxylase
AICAR	5-Aminoimidazole-4-carboxamide 1- β -D-ribofuranoside Acadesine N ¹ -(β -D-Ribofuranosyl)-5-aminoimidazole-4-carboxamide
Akt/PKB	Proteinkinase B
AMP	Adenosinmonophosphat
ADP	Adenosindiphosphat
ATP	Adenosintriphosphat
AMPK	5'-Adenosinmonophosphat-aktivierte Proteinkinase
bzw.	beziehungsweise
C-Terminus	Carboxy-Terminus
CaM	Calmodulin
CaMK	Ca ²⁺ /Calmodulin-abhängige Proteinkinase
CaMKK	Ca ²⁺ /Calmodulin-abhängige Proteinkinase-Kinase
cAMP	zyklisches Adenosinmonophosphat
cGMP	zyklisches Guanosinmonophosphat
CBS	Cystathionine β -Synthase
CKI ϵ	Casein Kinase I ϵ
CR	konditionierte Reaktion
CREB	cAMP response element binding protein
CS	zu konditionierender Stimulus
DAG	Diacylglycerol
ER	endoplasmatischen Retikulum
HMG-CoA	Hydroxymethylglutaryl-CoA
HRP	horseradish Peroxidase
HSL	hormonsensible Lipasen
i	ipsilateral
IP ₃	Inositoltrisphosphat
k	kontralateral

K	Kontrolle
Kap.	Kapitel
LKB1	Serin-Threonin-Kinase 11 (STK11)
LTM	long term memory
MAP-KK Kinase	Mitogen-aktivierte Proteinkinase-Kinase-Kinase
M	molar
N-Terminus	Amino-Terminus
NO	Stickstoffmonoxid
o. Abb.	ohne Abbildung
PER	proboscis extension reponse
PDH-ir	pigment-dispersing hormone-immunoreactivity
PDF	pigment-dispersing factors
PKA	cAMP-abhängige Proteinkinase
PKB/Akt	Proteinkinase B
s.	siehe
S.	Seite
SCN	Suprachiasmatischer Nucleus
s.d.	Standardabweichung
SDS-PAGE	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese
Ser	Serin
siRNAs	small interfering RNA
SNF1	sucrose non fermenting protein 1
STM	short term memory
TAK1	growth factor- β -activated kinase
Thr (T)	Threonin
u.a.	unter anderem
UE	Untereinheit
UR	unkonditionierte Reaktion
US	unkonditionierter Stimulus
VUMmx1	ventral unpaired median neuron of the maxillary neuromere 1
Z-Chem	Zentrales Chemikalienlager der Universität des Saarlandes
ZMP	AICAR-Monophosphat
ZNS	Zentrales Nervensystem

9 Danksagung

Ich bedanke mich herzlich bei Herrn Prof. Dr. Uli Müller für die Möglichkeit, ein so spannendes Thema an seinem Lehrstuhl bearbeiten zu dürfen, für seine fachliche Betreuung und unermüdliche Hilfsbereitschaft, die entscheidend zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Mein weiterer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Bernhard Möhl für die freundliche Übernahme des Koreferates und für hilfreiche Anregungen beim Schreiben dieser Arbeit.

Ganz besonders möchte ich mich bei Frau Angelika Gardezi für die Einführung in das praktische Arbeiten und die Hilfe in der Histologie, für die gemeinsame Imkerarbeit und die weit über das Berufliche hinausgehende Unterstützung bedanken.

Mein Dank gilt auch Herrn Dr. Helmut Kallenborn, der mir bei Statistikproblemen geholfen hat und mir die Möglichkeit gab, gemeinsam mit ihm die Studenten in den Histologiekursen und auf Exkursionen zu betreuen.

Herrn Prof. Dr. Dietrich Bilo danke ich ebenfalls für die sehr hilfreiche Unterstützung bei Statistikproblemen.

Der gesamten Arbeitsgruppe Müller möchte ich für die gute Zusammenarbeit und ein ausgezeichnetes Arbeitsklima danken, insbesondere Iliana Nedeva und Jens Neunzig für ihre Unterstützung bei den letzten Versuchen im Rahmen dieser Arbeit.

Tina Martin und Mathias Möhl danke ich für die großartige Hilfe bei \LaTeX -Problemen. Für das Korrekturlesen bin ich Tina und Bärbel Heidtmann zudem sehr dankbar.

Meiner Nicole danke ich nicht nur für die viele Mühe beim Korrekturlesen, sondern darüber hinaus auch dafür, dass sie es in den schwierigen Wochen mit mir ausgehalten und mich stets unterstützt und aufgemuntert hat.

10 Lebenslauf und wissenschaftlicher Werdegang

Name: Thomas Laeger
Geburtsdatum: 17.05.1980
Geburtsort: Magdeburg

Schulausbildung

1986 - 1990 Grundschule in Marlow
 1990 - 1993 Realschule in Marlow
 1993 - 1998 Richard-Wossidlo-Gymnasium in Ribnitz-Damgarten
 1998 Abitur

Universitätsausbildung

1999 - 2004 Studium der Biologie an der Ernst-Moritz-Arndt-Universität in Greifswald, Hauptfach: Zoologie, Nebenfächer: Ökologie der Mikroorganismen und Geologie
 2004 Abschluss des Studiums als Dipl.-Biologe, Thema der Diplomarbeit: „Effizienz-Einschätzung von Barberfallen-Erhebungen für die Formicidenfauna eines Trockenrasen Standortes“, Betreuer: Prof. Dr. Gerd Müller-Motzfeld
 2004 Beginn der Promotion am Institut für Biowissenschaften der Universität des Saarlandes in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Uli Müller
 2004 - 2007 wissenschaftlicher Mitarbeiter am Institut für Biowissenschaften der Universität des Saarlandes

Tagungsbeiträge und Poster

17. Neurobiologischer Doktoranden-Workshop, Freie Universität Berlin 2006:
 Energy levels and memory formation.

7th German Neuroscience Society Meeting, Georg-August-Universität Göttingen 2007:
 Linking satiation levels and learning: A function of the conserved cellular energy sensor AMPK-activated protein kinase.

11 Eidesstattliche Versicherung

Hiermit versichere ich an Eides statt, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Die aus anderen Quellen oder indirekt übernommenen Daten und Konzepte sind unter Angabe der Quelle gekennzeichnet. Die Arbeit wurde bisher weder im In- noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form in einem Verfahren zur Erlangung eines akademischen Grades vorgelegt.

Ort, Datum

(Unterschrift)