

Die Regulation der Hämolympghglucose und ihre
Bedeutung für die sensorische Sensitivität sowie das
appetitive Lernen und Gedächtnis der Honigbiene
(*Apis mellifera*)

Dissertation

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

vorgelegt von

Kathy Rether

Saarbrücken
2012

Tag des Kolloquiums: 30. März 2012
Dekan: Prof. Dr. W. F. Maier
Berichterstatter: Prof. Dr. U. Müller
Prof. Dr. M. Montenarh
Vorsitz: Prof. Dr. V. Helms
Akad. Mitarbeiter: Dr. G.-W. Kohring

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung	VI
Summary	VII
1 Einleitung	1
1.1 Die Energiehomeostase - ein Zusammenspiel zwischen Körper und Gehirn	1
1.1.1 Die Blutglucose und die Energiehomeostase beim Säugetier	1
1.1.1.1 Ein Netzwerk basierend auf Insulin und Leptin	1
1.1.1.2 Glucosendetektion in der Peripherie und im Gehirn	2
1.1.2 Glucosetransporter (GLUT)	4
1.1.2.1 Die Physiologie und Gewebeverteilung der Glucosetransporter	4
1.1.2.2 Die Regulation der Glucosetransporter	6
1.1.3 Die AMP-aktivierte Proteinkinase (AMPK)	7
1.1.4 Die Energiehomeostase bei Insekten	8
1.1.5 Die Honigbiene - Metabolismus und Verhaltensänderungen in einem sozialen Organismus	9
1.1.5.1 Die Zuckeraufnahme und der Hämolymphzucker	9
1.1.5.2 Die Regulation der Arbeitsteilung	10
1.2 Lernen und Gedächtnisbildung	11
1.2.1 Zelluläre und molekulare Grundlagen	11
1.2.2 Lernen bei der Honigbiene	13
1.2.3 Der Metabolismus bei Lern- und Gedächtnisprozessen - ein untrennbares Zusammenspiel	13
1.2.3.1 Motivation und Belohnungssysteme	14
1.3 Zielsetzung	15
2 Material und Methoden	16
2.1 Material	16
2.1.1 Chemikalien	16
2.1.2 Verbrauchsmaterialien	18
2.1.3 Puffer und Lösungen	19
2.1.3.1 Hämolympghglucose-Bestimmung	19
2.1.3.2 Agarose-Gelelektrophorese	19
2.1.3.3 Peptid-Kopplung	19
2.1.3.4 Probenvorbereitung	19
2.1.3.5 SDS-PAGE	20
2.1.3.6 Westernblot und Dotblot	20
2.1.3.7 ELISA	21
2.1.3.8 Histologie	21

2.1.4 Enzyme und Kits	21
2.1.5 Pharmaka	22
2.1.6 Antikörper und Peptide	22
2.1.6.1 Primäre Antikörper	22
2.1.6.2 Sekundäre Antikörper	22
2.1.6.3 Peptide	23
2.1.7 Primer	23
2.1.8 Geräte	23
2.1.9 Software und Internetadressen	24
2.2 Methoden	25
2.2.1 Haltung und Vorbereitung der Versuchstiere (<i>Apis mellifera carnica</i>)	25
2.2.2 Appetitive olfaktorische Konditionierung	26
2.2.3 Zuckerwasserempfindlichkeit (Responsiveness)	27
2.2.4 Hämolympheentnahme und Messung des Hämolympghlucosespiegels	27
2.2.5 Injektion	28
2.2.6 Gehirnpräparation	28
2.2.7 RNA-Aufreinigung aus Geweben	29
2.2.8 Konzentrationsbestimmung der RNA	29
2.2.8.1 Photometer	29
2.2.8.2 RiboGreen®	29
2.2.9 Reverse Transkription	30
2.2.10 Real-time PCR	30
2.2.10.1 Primerdesign	30
2.2.10.2 Durchführung der real-time PCR	31
2.2.10.3 Standardkurve	32
2.2.11 Standard-PCR	34
2.2.12 Agarose-Gelelektrophorese	34
2.2.13 Gelextraktion	34
2.2.14 Konzentrationsbestimmung der cDNA-Standards mit PicoGreen®	35
2.2.15 Herstellung polyklonaler Antikörper	35
2.2.15.1 Peptiddesign	35
2.2.15.2 Kopplung der Peptide an Trägerproteine	35
2.2.15.3 Dialyse	36
2.2.15.4 Immunisierung der Ratten	36
2.2.15.5 Serumgewinnung aus Rattenblut	36
2.2.16 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	36
2.2.16.1 Probenvorbereitung	36
2.2.16.2 Herstellung des Gels	37
2.2.17 Westernblot	37
2.2.18 Dotblot	37

2.2.18.1 Probenvorbereitung	38
2.2.18.2 Erstellen des Dotblots	38
2.2.19 Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA)	38
2.2.19.1 Probenvorbereitung	38
2.2.19.2 Durchführung des ELISA	39
2.2.20 Histologie	39
2.2.20.1 Carnoy-Fixierung des Abdomens	39
2.2.20.2 Formol-Fixierung des Gehirns	40
2.2.20.3 Anfertigung der histologischen Schnitte von Abdomen und Gehirn	40
2.2.20.4 Immunfärbung und Mikroskopie der histologischen Präparate	40
3 Ergebnisse	42
3.1 Etablierung der Hämolympghlucose-Bestimmung in der Honigbiene	42
3.2 Die Heterogenität und Dynamik des Hämolympghlucosespiegels bei der Honigbiene	44
3.3 Die Hämolympghlucose als Basis für Verhaltensänderungen	46
3.3.1 Der Einfluss der Hämolympghlucose auf die Zuckerwasserempfindlichkeit des PER	46
3.3.2 Der Einfluss der Hämolympghlucose auf das appetitive olfaktorische Lernen und Gedächtnis	47
3.3.3 Die Manipulation des Hämolympghlucosespiegels beeinflusst das Gedächtnis	48
3.4 Die Dynamik des Hämolympghlucosespiegels bei der appetitiven Belohnung	49
3.4.1 Der unkonditionierte Stimulus verursacht einen Anstieg des Glucosespiegels	50
3.4.2 Die Manipulation der Hämolympghlucose verändert die Dynamik des Glucosespiegels bei der appetitiven Belohnung	51
3.5 Der Glucosetransporter GLUT1 bei der Honigbiene	52
3.5.1 Die mRNA-Verteilung der beiden GLUT1-Isoformen in der Honigbiene	52
3.5.1.1 Normierung auf den Elongationsfaktor EF1-alpha	53
3.5.1.2 Die Verteilung der GLUT1-Isoformen in Kopf und Körper	54
3.5.1.3 Die Verteilung der GLUT1-Isoformen in Fliegern und Stockbienen	55
3.5.2 Die Abhängigkeit zwischen Hämolympghlucose und GLUT1-mRNA-Expression	57
3.5.3 Der Glucosetransporter im Bienenhirn	58
3.5.3.1 Charakterisierung der selbst hergestellten GLUT1-Antikörper	59
3.5.3.2 Die Regulation der GLUT1-Proteinexpression im Bienenhirn	60
3.5.4 Die Lokalisation des Glucosetransporters GLUT1 a im Bienenhirn	62

3.6 Die Untersuchung potenzieller Vermittler der glucoseabhängigen Verhaltensmodulation in der Honigbiene	64
3.6.1 ATP-sensitive Kaliumkanäle haben keinen Einfluss auf die Hämolympgh glucose und die Zuckerwasserempfindlichkeit	65
3.6.2 Der Insulin-Signalweg	66
3.6.2.1 Die Manipulation der Phosphoinositid-3-Kinase und der Einfluss auf die Zuckerwasserempfindlichkeit	67
3.6.2.2 Die Inhibition der Phosphoinositid-3-Kinase hat keinen Einfluss auf die Hämolympgh glucose	68
3.6.3 Die Vitellogenin-Expression korreliert nicht mit der Hämolympgh glucose und der Zuckerwasserempfindlichkeit: Unterschiede zwischen Sommerbienen und Bienen im Winterflughaus	69
3.6.4 Die AMP-abhängige Proteinkinase (AMPK) als Vermittler des glucoseabhängigen Verhaltens	72
3.6.4.1 Der AMPK-Aktivator AICAR erhöht den Hämolympgh glucosespiegel	73
3.6.4.2 Der AMPK-Aktivator AICAR erniedrigt die Zuckerwasserempfindlichkeit und verschlechtert das Lernen und Gedächtnis .	74
3.6.4.3 Die AMPK-Aktivität im Bienenhirn verändert sich in Abhängigkeit des Fütterungszustands	75
3.7 Verschiedene physiologische Merkmale unterliegen bei der Honigbiene saisonalen Unterschieden	77
3.7.1 Die Dynamik des Hämolympgh glucosespiegels im Winter	77
3.7.2 Die Expression von <i>GLUT1 a</i> bei Stockbienen und Fliegern	79
4 Diskussion	80
4.1 Die Heterogenität des Hämolympgh glucosespiegels - eine Verhaltensspezifizierung	80
4.1.1 Die Modulation des Fressverhaltens: zustandsabhängige Anpassungen der Sensorik	82
4.1.2 Das appetitive Lernen und Gedächtnis - eine Frage der Belohnung .	84
4.1.2.1 Der Anstieg des Glucosespiegels - eine interne Belohnung?	85
4.1.3 Vitellogenin <i>versus</i> Hämolympgh glucose bei der Verhaltensspezifizierung	88
4.2 Die Regulation des Glucosetransporters GLUT1 bei der Honigbiene	89
4.2.1 <i>GLUT1</i> im Körper der Honigbiene	90
4.2.2 Der Glucosetransporter im Bienenhirn	91
4.3 Der Insulin-Signalweg als Verhaltensmodulator - stromabwärts der Hämolympgh glucose?	92
4.4 Die Frage nach ATP-sensitiven Kaliumkanälen in der Honigbiene	94
4.5 Die AMP-abhängige Proteinkinase bei der Glucosehomeostase der Biene .	94

4.5.1 Die AMPK im Bienenhirn	96
4.6 Fazit	97
Literaturverzeichnis	99
Abkürzungsverzeichnis	120
Danksagung	123

Zusammenfassung

Im Zentrum dieser Arbeit steht die Frage nach der Rolle der Hämolympghglucose bei appetitiven Verhaltensanpassungen in der Honigbiene. Dabei wird erstmals ihre Funktion als metabolisches Signal bei Lern- und Gedächtnisprozessen untersucht.

In Verhaltensexperimenten zeigte sich eine Korrelation zwischen dem glykämischen Status und der gustatorischen Sensitivität. Dynamische Änderungen des Glucosespiegels infolge der appetitiven Belohnung nahmen zudem maßgeblichen Einfluss auf das Lernen und die Gedächtnisbildung. Dies liefert erstmals Hinweise auf eine Bedeutung der Hämolympghglucose als internes Belohnungssignal.

Auf molekularer Ebene wurden die AMP-abhängige Proteinkinase (AMPK) und der Glucosetransporter GLUT1 als Kandidaten identifiziert, die als Regulatoren des Glucosespiegels und Komponenten eines internen Belohnungssystems an Verhaltensmodulationen teilhaben. Die Aktivierung der AMPK erhöhte den Glucosespiegel und führte gleichzeitig zu einer Reduktion der sensorischen Sensitivität sowie zu einem Lern- und Gedächtnisdefizit. Schnelle Änderungen des Glucosespiegels spiegelten sich ferner in einer akuten, fütterungsbezogenen Hochregulation des GLUT1-Proteins im Gehirn wider. Dies legt eine Funktion von GLUT1 bei der Übertragung glucosevermittelter Belohnungssignale auf die neuronale Ebene nahe.

Damit wurde erstmals umfassend gezeigt, dass die Hämolympghglucose der Biene individuell reguliert wird und in Abhängigkeit des metabolischen Zustands das appetitive Lernen und Gedächtnis moduliert.

Summary

This thesis focuses on the importance of haemolymph glucose levels in modulating appetitive behaviour in honeybees. Its role as a metabolic signal in learning and memory processes is investigated for the first time.

Behavioural studies revealed a correlation between glycemic state and gustatory sensitivity. Moreover, dynamic changes in glucose levels, caused by appetitive reward, considerably influenced learning and memory formation. This provides first evidence for the relevance of haemolymph glucose levels as an internal reward signal.

On the molecular level, AMP-dependent protein kinase (AMPK) and the glucose transporter GLUT1 turned out to be candidates acting as modulators of glycemia and components of an internal reward system which alters behaviour. AMPK activation increased glucose levels and simultaneously caused a reduction of sensory sensitivity as well as learning and memory deficits. An acute, feeding related upregulation of GLUT1 protein in the brain further reflected rapid changes in glucose concentrations. This suggests a role of GLUT1 in conveying reward signals by glucose to the neuronal level.

This work represents the first extensive study which proves haemolymph glucose levels to be individually regulated in honeybees and to modulate appetitive learning and memory according to metabolic state.

1 Einleitung

1.1 Die Energiehomeostase - ein Zusammenspiel zwischen Körper und Gehirn

Die Energiehomeostase, sprich die Aufrechterhaltung eines ständig angepassten Gleichgewichts zwischen Nahrungsaufnahme und -speicherung, sowie Energiemobilisierung und -verbrauch, ist ein strikt regulierter Prozess, der für einen gesunden, leistungsfähigen und letztendlich lebensfähigen Organismus von unabkömmlicher Bedeutung ist. Eine Hauptrolle spielt dabei die Konstanz der im Blut vorhandenen Glucose, welche als bevorzugter Brennstoff des Gehirns dauernd in ausreichendem Maße zur Verfügung stehen muss. Sie steht so auch als entscheidende Komponente im Mittelpunkt eines komplexen Systems, welches die Kommunikation zwischen Körper und Gehirn voraussetzt und in Abhängigkeit des Ernährungszustands endokrine und autonome Signale sowie Verhaltensanpassungen koordiniert.

Verhaltensänderungen beschränken sich dabei nicht nur auf das Essverhalten an sich, sondern schließen auch im weiteren Sinne damit in Verbindung stehende Prozesse wie Bewegung zum Futtererwerb und Aufmerksamkeit bis hin zum Lernen und Gedächtnis ein [133, 231]. Die Wichtigkeit eines einwandfrei koordinierten homeostatischen Systems wird anhand zahlreicher metabolischer Erkrankungen wie Fettsucht oder *Diabetes mellitus* deutlich, die auch häufig mit kognitiven Einschränkungen einhergehen [29, 118, 170].

1.1.1 Die Blutglucose und die Energiehomeostase beim Säugetier

1.1.1.1 Ein Netzwerk basierend auf Insulin und Leptin

Beim Säugetier gelten die Leber und das Fettgewebe als die wichtigsten Organe zur Speicherung und Mobilisierung von Nährstoffressourcen. Sie stellen auch bedeutende Ausgangs- und/oder Zielpunkte der endokrinen Signalmoleküle Insulin und Leptin dar, die die Hauptkomponenten eines peripher wie zentral vielschichtigen Netzwerks bei der Säugetier-Homeostase bilden (siehe Abbildung 1) [165, 236].

Insulin wird von glucosesensitiven β -Zellen des Pankreas produziert und unter anderem infolge hoher Glucosekonzentrationen postprandial (nach der Nahrungsaufnahme) oder durch autonome Signale sezerniert [5, 203]. Nach der Sekretion erfüllt Insulin durch An-docken an den Insulinrezeptor und Aktivierung einer Vielzahl von intrazellulären Signalen, einschließlich der PI3-Kinase, in verschiedenen Geweben vielfältige Funktionen zur Entfernung der überschüssigen Glucose aus dem Blutkreislauf und der Synthese von Nährstoffspeichern [76, 131, 195]. So wird vor allem in Muskel- und Fettgewebe vermehrt Glucose aufgenommen [131, 184] und die Glykogen- sowie Fettspeicherung gefördert [48, 58]. Umgekehrt wird die Gluconeogenese in der Leber gehemmt [63]. Zudem hat Insulin einen stimulierenden Effekt auf die Proteinsynthese [126]. Der periphere Gegenspieler des Insulins, Glucagon, signalisiert den Hungerzustand und wird infolge niedriger Blutglucose von α -Zellen des Pankreas sezerniert. Glucagon führt zur Mobilisierung der Glykogenspeicher

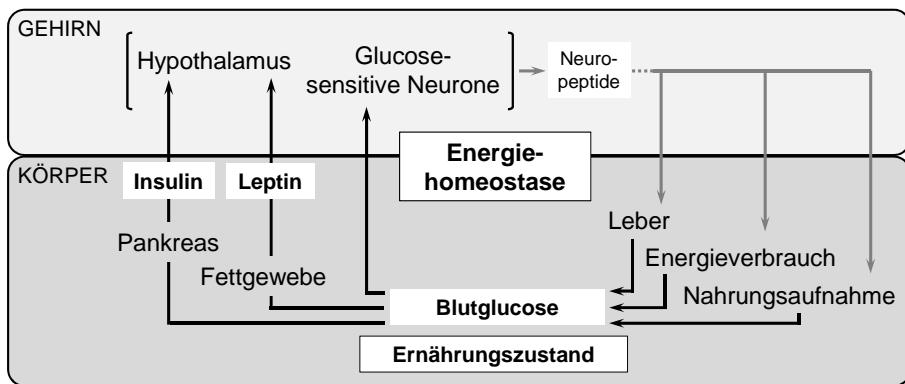


Abbildung 1: Modell der entscheidenden Kontrollpunkte bei der Energie- und Glucosehomeostase. Neuronale Systeme im Hypothalamus nehmen die Nährstoff-/Glucoseverfügbarkeit oder hormonelle Signale über den Energiezustand des Körpers (z.B. Insulin und Leptin) wahr und aktivieren, teilweise über Neuropeptide, Wege zur Regulation der hepatischen Glucoseproduktion oder von Verhaltensweisen wie Nahrungsaufnahme und Energieverbrauch.

und Aktivierung der Gluconeogenese [142, 223].

Insulin hat aber nicht ausschließlich, wie lange vermutet, Effekte in der Peripherie. Auch im Hypothalamus, dem homeostatischen Kontrollzentrum im Gehirn, werden Insulinsignale detektiert und integriert [39, 143]. Es kann zum einen an der Regulation orexigener (Appetit fördernder) und anorexigener (Appetit hemmender) Neuropeptide im Hypothalamus beteiligt sein (die selbst wiederum die Insulinproduktion modulieren können) oder mit anderen Gehirnregionen kommunizieren [5, 206, 215]. Beispielsweise weist der an der Gedächtnisbildung beteiligte Hippocampus eine Vielzahl von Insulinrezeptoren auf, sodass eine Beteiligung an kognitiven Funktionen denkbar ist [86, 166, 245]. Auch Leptin agiert im Hypothalamus und fördert die Produktion anorexigener Neuropeptide [105]. Darüber hinaus ist das Hormon vermutlich auch an der Modulation hypothalamischer glucosesensitiver Neurone beteiligt [203, 217]. Leptin wird vom peripheren Fettgewebe proportional zu seiner Masse abgegeben und signalisiert Sättigung [148].

Neben den durch die Blutglucose ausgelösten Signale spielen auch noch weitere metabolische Faktoren eine Rolle bei der Einspeisung des homeostatischen Systems, wie beispielsweise freie Fettsäuren und Aminosäuren sowie endokrine, mechano- und chemosensorische Signale aus dem Gastrointestinaltrakt [138, 163, 182, 219].

1.1.1.2 Glucosendetektion in der Peripherie und im Gehirn Die interne Glucosendetektion erfolgt über glucosesensitive Neurone. Am besten charakterisiert sind diese Sensoren in den β -Zellen des Pankreas. Sie kommen aber vermutlich auch in dieser Form im Hypothalamus und im Darm vor [203, 217].

Zu dem Sensorsystem gehören spezielle Glucosetransporter (GLUT2; siehe auch Ab-

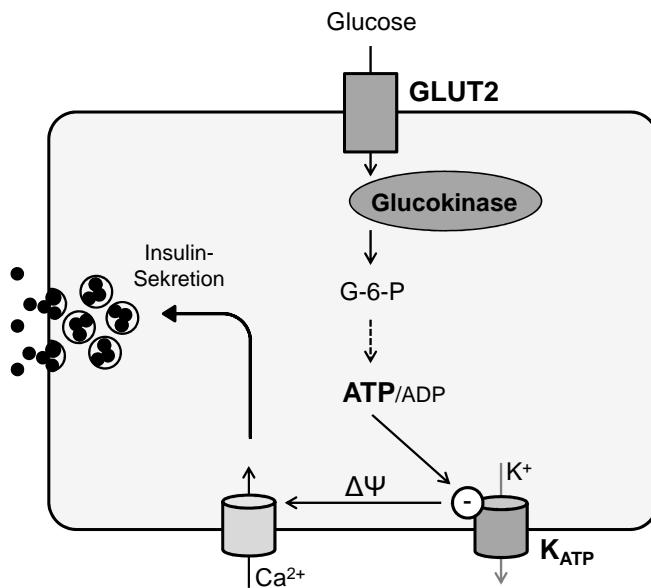


Abbildung 2: Glucosedetektion und Insulinsekretion in β -Zellen des Pankreas. Das Glucose-Sensorsystem besteht aus dem Glucosetransporter GLUT2, der Glucokinase und dem ATP-sensitiven Kaliumkanal (K_{ATP}). Abhängig von der Verfügbarkeit im Blut transportiert GLUT2 Glucose in die Zelle. Dort wird sie bei einem physiologischen Anstieg des Glucosespiegels von der Glucokinase vermehrt phosphoryliert (Glucose-6-Phosphat; G-6-P) und so zur Metabolisierung und ATP-Produktion bereitgestellt. ATP blockiert den K_{ATP} -Kanal, was den Ausstrom von K^+ -Ionen verhindert und das Membranpotential verändert ($\Delta\psi$). Durch spannungsabhängige Calciumkanäle strömen Ca^{2+} -Ionen ein und bewirken die Insulinsekretion.

schnitt 1.1.2) sowie eine Glucokinase und ATP-sensitive Kaliumkanäle (K_{ATP} -Kanäle) [4, 203]. Die passiven Glucosetransporter besitzen eine relativ geringe Affinität zu Glucose, sodass die Glucoseaufnahme direkt von der Blutglucose abhängt und unter physiologischen Bedingungen nicht gesättigt ist [224]. Zusätzlich besitzt die Glucokinase, welche für die Phosphorylierung der Glucose im Zellinneren, dem ersten Schritt der Glykolyse, verantwortlich ist, eine geringe Affinität zu Glucose. Sie stellt den limitierenden Faktor bei der ATP-Produktion im Zuge der Glykolyse dar und hält damit das ATP/ADP-Verhältnis immer an einer unteren Grenze [64].

Dies ist ausschlaggebend für die Funktion der K_{ATP} -Kanäle. Sie bestehen aus einem äußeren Ring aus vier identischen regulatorischen SUR1-Einheiten (Sulfonylurea-Rezeptor 1) und einem inneren, die Pore bildenden Ring aus vier kleineren K_{IR} 6.2-Untereinheiten (englisch: K^+ Inward Rectifier). Diese sind ATP-sensitiv und können den Kanal so in Abhängigkeit von Schwankungen der Blutglucose, welche sich aufgrund der oben genannten Faktoren direkt im ATP/ADP-Verhältnis der β -Zellen wiederspiegeln, öffnen und schließen [15, 16, 144]. Unterstützt wird dieser Vorgang durch das an der SUR1-Untereinheit antagonistisch wirkende ADP [172]. Bei einer Erhöhung der Blutglucose und Bindung von ATP an den Kanal schließt sich dieser, was zu einer Erhöhung der intrazellulären Kaliumkonzentration führt und eine Depolarisation der Membran begünstigt. Infolgedessen werden spannungsabhängige

Calciumkanäle geöffnet, Calcium strömt ein und veranlasst die Insulinsekretion der β -Zellen (siehe Abbildung 2).

Vieles deutet auch darauf hin, dass glucosesensitive Neurone im Hypothalamus ein ähnliches Sensorsystem aufweisen. Speziell im ventromedialen Hypothalamus und im Nucleus arcuatus, die auch von Insulin- und Leptinsignalen moduliert werden (siehe Abschnitt 1.1.1.1), ist eine Neuronen-Population bekannt, die ihre Aktivität zusätzlich in Abhängigkeit der Blutglucose verändert. Sie ist so auch an der neuroendokrinen Glucosehomeostase beteiligt. Diese Neurone exprimieren ebenfalls GLUT2, Glucokinase und K_{ATP} -Kanäle [140, 147, 203, 217].

Es gibt zudem Hinweise, dass K_{ATP} -Kanäle auch im Hippocampus Einflüsse auf Lernen und Gedächtnis haben [27, 53].

1.1.2 Glucosetransporter (GLUT)

Der erleichterte Transport von Glucose über die Plasmamembran von Säugerzellen wird von einer Familie von Glucosetransportern (GLUT) katalysiert. 14 Isoformen dieser Transportproteine (GLUT1-14) sind bekannt, die strukturelle Ähnlichkeiten aufweisen und durch ihre jeweiligen biochemischen Eigenschaften, ihre Regulation und Gewebeverteilung spezifische physiologische Aufgaben erfüllen und eng mit der Glucosehomeostase verwoben sind [17, 174]. Neben den in allen Zellen des Körpers vertretenen passiven Transportern der GLUT-Familie sind aktive, energieabhängige Natrium/Glucose-Cotransporter ausschließlich in den proximalen Nierentubuli und im Dünndarm vertreten [106], sodass die verschiedenen GLUT-Mitglieder den Hauptteil der Glucosetransporter im Körper bilden.

Alle GLUT-Isoformen haben eine gemeinsame vorhergesagte Sekundärstruktur mit 12 Transmembrandomänen. Sie sind hoch glykolsyliert und besitzen eine extrazelluläre N-Glykosylierungsstelle [17, 167].

1.1.2.1 Die Physiologie und Gewebeverteilung der Glucosetransporter

Die klassischen und am besten charakterisierten Glucosetransporter stellen GLUT1 bis GLUT4 dar.

GLUT1 ist in fast allen Geweben des Körpers für die basale Glucoseversorgung gegenwärtig, wobei er in Erythrozyten sowie im Endothel in besonderem Maße exprimiert ist. Er erfüllt eine spezielle Funktion als Blut-Hirn-Schranken-Transporter und ist somit einer der im Hirn am stärksten vertretenen Glucosetransporter, wo er auch durch Expression in Astrozyten an der dynamischen Versorgung von Neuronen beteiligt ist [51, 52, 66, 73].

GLUT2 kann von den anderen GLUT-Isoformen anhand seiner niedrigen Glucose-Affinität und hohen Umsatzrate unterschieden werden. Diese Eigenschaften sind kennzeichnend für seine physiologische Funktion, vornehmlich im Pankreas und in der Leber [224]. Seine Aufgabe als Teil des Blutzucker-Sensorsystems sind bereits in Abschnitt 1.1.1.2 beschrieben. In der Leber als Speicherorgan ist es wichtig, sowohl die Glucoseaufnahme als auch deren Abgabe in den Blutkreislauf zu gewährleisten, wobei der Transport keinen limitierenden

den Faktor darstellen darf. Hoch affine Glucosetransporter wie GLUT1, GLUT3 und GLUT4 hingegen sind unter physiologischen Bedingungen nahezu gesättigt und stellen so eine dauernde Glucoseaufnahme in die Zellen sicher [174]. Auch in der Niere und im Darm, sowie im Hypothalamus kommen GLUT2-Transporter vor [203, 217, 224].

GLUT3 wird hauptsächlich in Neuronen exprimiert, kommt aber auch in anderen Geweben mit hohem Glucoseanspruch, wie Hoden oder Plazenta, vor [51, 66, 113, 149]. Er ist somit neben GLUT1 der im Hirn am häufigsten vorkommende Vertreter der GLUT-Familie.

GLUT4 ist ein sehr gut untersuchter, insulinabhängiger Glucosetransporter, der vor allem in Muskeln und Fettgewebe vorkommt [91, 114, 115]. Mit seiner schnellen und anpassungsfähigen Expressionsdynamik (siehe Abschnitt 1.1.2.2) trägt er einen Großteil zur insulinvermittelten, postprandialen Glucosebeseitigung aus dem Blutkreislauf in die genannten Gewebe und so auch zur systemischen Glucosehomeostase bei. Dies zeigt sich besonders deutlich anhand der Tatsache, dass Fehlfunktionen des Glucosetransporters eine zentrale Rolle bei der *Diabetes mellitus*-Pathogenese spielen [26, 84, 120].

Die Gewebeverteilung und Funktion der verschiedenen Glucosetransporter ist in Abbil-

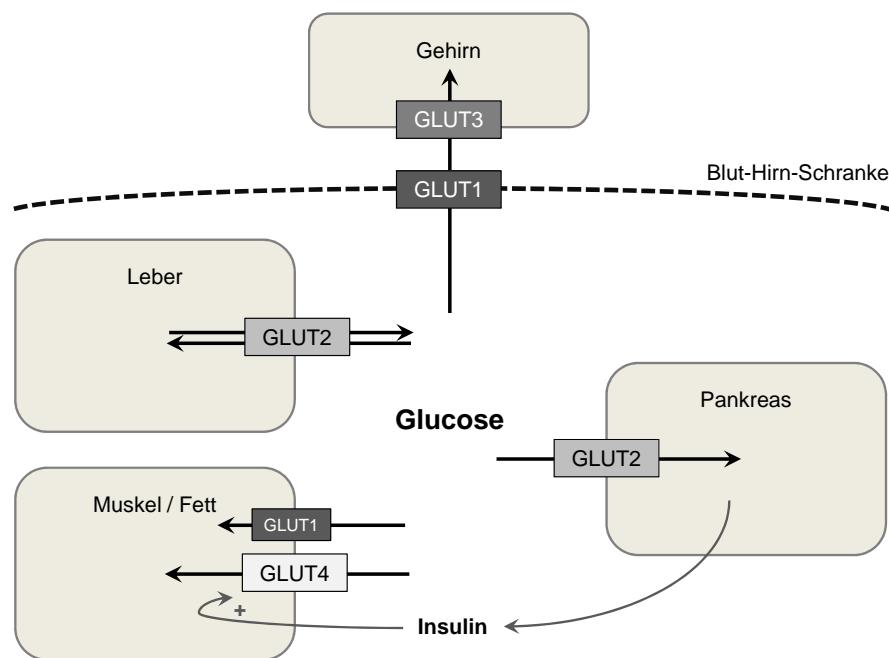


Abbildung 3: Die Gewebeverteilung und Funktion der Glucosetransporter GLUT1-GLUT4 bei der Glucosehomeostase. GLUT2 ist Teil des pankreatischen Glucose-Sensorsystems und bestimmt über die Insulinproduktion. Diese sorgt ihrerseits u.a. über die Expressionserhöhung von GLUT4 in Muskel- und Fettgewebe für die Aufnahme von Glucose aus dem Blutkreislauf. GLUT1 wird in diesen Geweben auch für die basale Glucoseversorgung exprimiert. Die Leber ist in Abhängigkeit des aktuellen Glucosespiegels für die Aufnahme oder Abgabe von Glucose über GLUT2 zuständig, sodass das Gehirn andauernd mit Glucose versorgt werden kann. Dabei ist GLUT1 für den Glucosetransport über die Blut-Hirn-Schranke und GLUT3 für den neuronalen Transport verantwortlich.

dung 3 schematisch zusammengefasst.

1.1.2.2 Die Regulation der Glucosetransporter Die Expression von GLUT-Proteinen kann vielseitig, in lang- wie kurzfristigen Prozessen, durch chronische und akute Signale reguliert werden. Am bekanntesten ist wohl die akute, insulingesteuerte Regulation von GLUT4. Im insulinsensitiven Muskel- und Fettgewebe sind GLUT4-Moleküle nicht nur in der Plasmamembran lokalisiert, sondern befinden sich ebenfalls in großen Mengen in Membranvesikeln in intrazellulären Reservoirs [78, 91]. Diese Reservoirs können infolge der Aktivierung des Insulinrezeptors in einem PI3-Kinase-abhängigen Prozess nach der Nahrungsaufnahme innerhalb von Minuten an die Zelloberfläche rekrutiert werden und die überschüssige Glucose aus dem Blutkreislauf abfangen [40, 91, 184]. Ein weiteres Signal, das eine erhöhte Glucoseaufnahme erfordert und zur Translokation von GLUT4 in die Plasmamembran führt, stellt eine erhöhte Muskelbetätigung dar [103]. Sie führt vermutlich über die Erhöhung des ATP/AMP-Verhältnisses zu einer durch AMPK (AMP-aktivierte Proteinkinase) vermittelten Oberflächenexpression der Transporter [80, 136]. In Fettzellen hingegen, welche Glucose hauptsächlich für die Fettsynthese abziehen, kann AMPK auch an einer Verminderung der GLUT4-Expression in der Plasmamembran beteiligt sein [83, 194].

Chronische Signale wie andauernde Hyper- oder Hypoglykämie dagegen haben nicht nur weitreichende Effekte auf die Rekrutierung von GLUT4, sondern auch auf die Biosynthese verschiedener Glucosetransporter [65, 121, 213]. Daran beteiligt können wiederum der Insulin-PI3K- sowie der AMPK-Signalweg sein, die auch wichtige Modulatoren der Transkriptionsmaschinerie darstellen [42, 108, 246]. Diabetische Ratten zeigen so eine drastische Reduktion der *GLUT1*- und *GLUT4*-mRNA im Skelettmuskel [120, 121]. Auch im Gehirn kann chronische Hyperglykämie eine Herunterregulation von *GLUT1* verursachen [19], wohingegen chronische Hypoglykämie zu einer Hochregulation der mRNA- und Proteinexpression führt [134, 213]. Auch Glucose selbst, nicht nur gekoppelt mit der Insulinantwort, kann als Signal für die GLUT-Regulation fungieren. Es konnte gezeigt werden, dass chronische Hyperglykämie im Rattenmuskel zu einer Erniedrigung der GLUT4-Oberflächen- und mRNA-Expression, jedoch zu einer Erhöhung des GLUT1-Proteinlevels führt [65].

Die GLUT1-Expression hängt vermutlich auch von dem lokalen Glucoseverbrauch in einzelnen Zellen/Geweben ab. Dies wird besonders deutlich im Gehirn, wo GLUT1 in der Blut-Hirn-Schranke für die Energieversorgung der Neurone verantwortlich ist. Im Frontal- und Motorcortex, Hirnregionen mit einem ausgesprochen hohen Energiebedarf, ist die GLUT1-Expression besonders stark ausgeprägt [51]. Aber auch dynamische Veränderungen von GLUT1 in Abhängigkeit des lokalen Energiebedarfs wurden bereits beschrieben. So führt der Verlust visueller Eingänge zu einer parallelen Herabsetzung des Glucoseverbrauchs und der GLUT1-Dichte in visuellen Strukturen des Rattenhirns [67]. Auch bei Lernprozessen wurde ein erhöhter Glucosemetabolismus der beteiligten Hirnregionen nachgewiesen, der mit schnellen Änderungen der GLUT1-Expression auf RNA- und Proteinebene einhergeht [52].

1.1.3 Die AMP-aktivierte Proteinkinase (AMPK)

Die AMP-aktivierte Proteinkinase (AMPK) ist der zentrale zelluläre Energiesensor in eukaryotischen Zellen und spielt sowohl bei der zellulären als auch bei der systemischen Energiehomeostase eine ausschlaggebende Rolle. Sie ist in der Lage, den Energiestatus der Zelle anhand des ATP/AMP-Verhältnisses zu erfassen und bei Energiemangel, sei es durch Hunger, Stress oder Muskeltätigkeit, den Metabolismus in katabolischer Richtung anzupassen. Darüber hinaus ist sie Ziel vielseitiger und komplexer Regulationsmechanismen in der Peripherie und im Gehirn, die auf eine entscheidende systemische Bedeutung der Kinase schließen lassen.

Die Säuger-AMPK besteht aus drei Untereinheiten, einer katalytischen α -Untereinheit, die eine konventionelle Kinasedomäne besitzt, sowie den regulatorischen β - und γ -Untereinheiten. Die γ -Untereinheit besitzt AMP- und ATP-Bindestellen, die entscheidend sind für die Aktivität und weitere Regulation des AMPK-Komplexes [94, 220].

Um eine maximale Sensitivität gegenüber dem Energiestatus zu entfalten, wird die Aktivität der AMPK auf drei Arten reguliert, die jeweils durch AMP und hohe ATP-Konzentrationen antagonistisch beeinflusst werden [93, 101]. Zum einen bewirkt die Bindung von AMP eine allosterische (aber vergleichsweise geringe) Aktivierung. Zum anderen wird die AMPK dadurch aber zu einem besseren Substrat für übergeordnete Kinasen (z.B. LKB1), die durch Phosphorylierung der α -Untereinheit an Thr172 eine starke Aktivitätserhöhung der AMPK verursachen [92, 235]. Auch die Stimulierung durch äußere, rezeptorvermittelte Signale kann zur Phosphorylierung der AMPK- α -Untereinheit durch die übergeordnete CaMK-Kinase führen [102]. Letztendlich wird die AMPK durch AMP-Bindung auch vor der Dephosphorylierung durch Protein-Phosphatasen geschützt [61, 196].

Wird die AMPK nun aufgrund eines akuten zellulären Energiemangels oder durch äußere Signale aktiviert, so bewirkt sie unter anderem über die Phosphorylierung mehrerer, an entscheidenden Stoffwechselwegen beteiligter Enzyme eine Vielzahl zellulärer Antworten zur vermehrten Produktion und zum verminderten Verbrauch von ATP (siehe Abbildung 4) [94]. Beispielsweise werden die Acetyl-CoA-Carboxylase, das geschwindigkeitsbestimmende Enzym bei der Fettsäuresynthese, sowie die Glykogen-Synthase direkt durch AMPK phosphoryliert und damit inaktiviert [47, 212], die Glykolyse dagegen durch Aktivierung der Phosphofructokinase 2 stimuliert [152]. Weiterhin kommt es zur erhöhten Glucoseaufnahme in die Zelle (siehe Abschnitt 1.1.2.2), die unter anderem auf die Wirkung der AMPK auf diverse Transkriptionsprozesse zurückzuführen ist [108, 136, 246].

In der Peripherie wird die AMPK durch die hormonellen „Sättigungssignale“ Leptin und Adiponektin, welche vom Fettgewebe sezerniert werden, aktiviert [159, 243]. Dies zeugt von ihrer Beteiligung am allgemeinen Energiehaushalt des Körpers. Studien, die zeigen, dass die AMPK im Hypothalamus durch Aktivierung die Nahrungsaufnahme stimulieren und umgekehrt durch Hemmung herabsetzen kann, unterstützen die vermutete Schlüsselfunktion in der Energiehomeostase [12, 158]. Auffällig ist dabei auch die teils antagonistische Regulation der AMPK im Körper und im Hirn. Während Leptin, das vom Fettgewebe sezer-

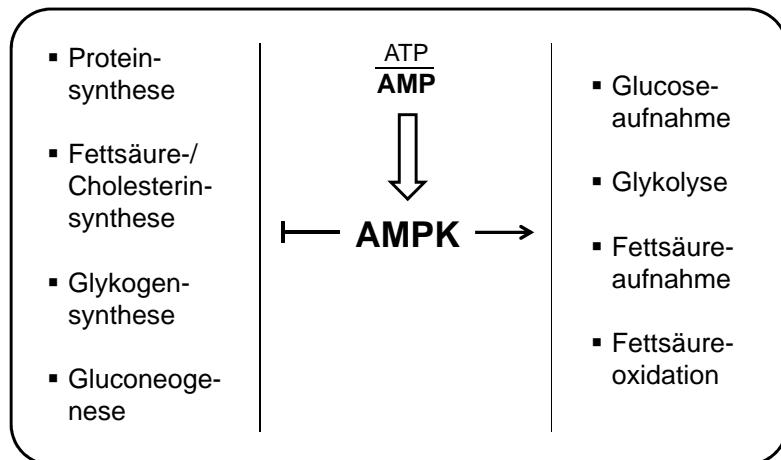


Abbildung 4: AMPK-regulierte Schlüsselprozesse beim Energiehaushalt. Die AMPK-Aktivität ist abhängig vom ATP/AMP-Verhältnis in der Zelle. Bei AMP-Überschuss ist die AMPK aktiv und leitet die Aktivierung (→) oder Hemmung (–) entscheidender Stoffwechselprozesse ein.

nierte „Sättigungssignal“, AMPK im Muskel aktiviert, führt es im Hypothalamus zu einer Hemmung [158, 159].

AMPK ist im zentralen Nervensystem darüber hinaus an der Neuroprotektion beteiligt [135, 218, 228].

1.1.4 Die Energiehomeostase bei Insekten

Bei Insekten hat der Fettkörper essenzielle Funktionen bei der Kontrolle des Energiehaushalts inne. Er ist als nährstoff- und hormonsensitives Organ für die Speicherung und Mobilisierung von Fett und Glykogen sowie für die kontrollierte Synthese vieler in der Hämolymphe zirkulierender Proteine und Metabolite, wie Vitellogenin und Trehalose, verantwortlich [13, 85, 190]. Er übernimmt so ähnliche Aufgaben wie die Leber und das Fettgewebe beim Säugetier. Die Hämolymphe ist das Blut-Korrelat beim Insekt, welches die Organe frei umspült. An zirkulierenden Nährstoffen enthält sie hauptsächlich Proteine und Kohlenhydrate, aber auch Lipide (Diglyceride) [28, 85, 230, 240]. Neben den Monosacchariden Glucose und Fructose ist auch das als Speicherzucker dienende Disaccharid Trehalose in hohen Mengen vorhanden [2, 234, 241].

Die Erforschung endokriner und molekularer Systeme zur Energiehomeostase bei Insekten hat bereits weitreichende Parallelen zum Säugersystem offen gelegt. So haben nährstoff-sensitive insulinähnliche Peptide (Insulin-like Peptides, ILPs), welche bei vielen Insekten in neurosekretorischen Zellen, aber auch teilweise in peripheren Geweben produziert werden, tiefgreifende Effekte auf das Zellwachstum, den Metabolismus und die Nährstoffspeicherung. *Drosophila* ILPs zeigen eine verstärkte Expression bei hoher Nährstoffverfügbarkeit, insbesondere Aminosäuren, und die Ablation der ILP-produzierenden Zellen führt zu einem diabetesähnlichen Phänotyp mit erhöhter Glykämie [99, 100, 112, 191]. Vergrößerte Nähr-

stoffspeicher im Fettkörper und resultierende Verhaltenseffekte, wie verringerte Futteraufnahme, konnten bereits durch Aktivierung des Insulin-Signalwegs erzielt werden, wohingegen die Inhibition einen Abbau der Nährstoffspeicher nach sich zieht [38, 188].

Auch die gegenregulierende Komponente, das glucagonähnliche Adipokinetische Hormon (AKH), ist bei vielen Insekten bekannt und wird nährstoffabhängig von Zellen der Corpora Cardiaca (CC) sezerniert [125, 178]. Bei *Drosophila* unterliegt die Abgabe des Fett und Glykogen mobilisierenden Hormons direkt der Steuerung durch niedrige Hämolymphezucker-Konzentrationen. Das Sensorsystem der CC-Zellen mit einer Beteiligung von K_{ATP}-Kanälen, ähnlich wie in β -Zellen des Pankreas, scheint konservierte Mechanismen zu besitzen [125]. AKH erhöht nicht nur die Diglycerid-, Trehalose- und Glucosekonzentration der Hämolymphe, sondern stimuliert auch die motorische Aktivität, was vermutlich auf eine zusätzliche Aktivierung octopaminerger Neurone zurückgeht [139, 232].

Der zelluläre Energiesensor AMPK, der beim Säuger auch stark in den systemischen Energiehaushalt involviert ist (siehe Abschnitt 1.1.3), ist auch in *Drosophila* charakterisiert. Das Enzym kann durch AMP aktiviert werden und hat viele mit der Säuger-Kinase übereinstimmende Ziele zur Regulation des zellulären Stoffwechsels [176]. Es konnte aber auch bereits gezeigt werden, dass die Herunterregulierung der AMPK-Funktion zu hungerähnlichen metabolischen wie Verhaltensmodulationen führt [117].

1.1.5 Die Honigbiene - Metabolismus und Verhaltensänderungen in einem sozialen Organismus

Die Nahrung einer Honigbiene besteht hauptsächlich aus Kohlenhydraten aus Nektar und Proteinen aus Pollen. Während junge Arbeiterinnen, die Aufgaben im Stock ausführen, wie beispielsweise das Füttern der Brut, tatsächlich auch einen hohen Proteinumsatz haben, basiert der Stoffwechsel und die Nahrung einer älteren Sammlerin (Flieger) fast ausschließlich auf Kohlenhydraten [11, 57, 189, 193, 225]. Die Sammlerin ist für das Ausfliegen aus dem Stock und die Futtersuche verantwortlich. Selbst die Bereitstellung von Energie für den Flug ist allein auf den Kohlenhydrat-Metabolismus zurückzuführen, obwohl die ausfliegende Honigbiene nur relativ geringe Glykogenspeicher in Resten des abgebauten Fettkörpers und in den Flugmuskeln besitzt [28, 171, 189, 193].

1.1.5.1 Die Zuckeraufnahme und der Hämolymphzucker

Als Nahrungsdepot verfügt die Biene über einen Honigmagen (Kropf) [216]. Neben der Hämolymphe, die im Vergleich zum Säuger hohe Mengen an Monosacchariden (Glucose und Fructose) sowie auch das Speicher-Disaccharid Trehalose enthält, dient er als wichtigstes Energiereservoir beim Ausflug der Biene. Die Abgabe gespeicherter Zuckerlösung aus dem Kropf in den Mitteldarm und die Hämolymphe zur Bereitstellung von Energie ist ein regulierter Prozess, der vom Proventriculus durch einen Schließmuskel gesteuert wird [23, 55]. Die Zucker-Transportrate über den Proventriculus in den Mitteldarm hängt dabei von der bereits in der Hämolymphe vor-

handenen Menge metabolisierbaren Zuckers, insbesondere Trehalose, ab, wobei der nachfolgende Transport vom Mitteldarm in die Hämolymphe ein passiver Prozess ist [33, 34, 54]. Ein Konzentrationsgradient für Glucose oder Fructose wird stets durch die sofortige Umwandlung der Monosaccharide in Trehalose oder durch ihre Verbrennung aufrechterhalten. So konnte gezeigt werden, dass die Transportrate von Kohlenhydraten in die Hämolymphe in den ersten fünf Minuten nach Futteraufnahme am höchsten ist und weiterhin von der individuellen metabolischen Rate abhängt [34, 54].

1.1.5.2 Die Regulation der Arbeitsteilung Die Arbeitsteilung im Bienenvolk ist eng assoziiert mit den Ernährungszuständen der Individuen im Laufe ihres Lebens. Eine Arbeiterin durchläuft normalerweise verschiedene Stationen, wobei die Aufgabenbereiche als junge Arbeiterin zunächst innerhalb des Stocks, später - als ältere Arbeiterin - außerhalb als Nektar- oder Pollensammlerin anfallen [11, 225].

Junge Bienen besitzen ein hohes Maß an Nährstoffspeichern im gut ausgebildeten Fettkörper. Entsprechend der Nährstoffverfügbarkeit produziert der Fettkörper große Mengen des Dotterproteins Vitellogenin (Vg) [31, 57, 70]. Dieses Protein wird zum einen bei Invertebraten als Nährstoffspeicher in Eizellen akkumuliert, zum anderen ist es aber bei der Honigbiene eine Schlüsselkomponente bei der komplexen Regulation des sozialen Arbeitsverhaltens [7, 9, 70]. Eine hohe Vg-Expression, welche an Proteinkonsum und die ausreichende Verfügbarkeit von Aminosäuren geknüpft ist, geht mit einem niedrigen Niveau an Juvenilhormon einher und das Flug- und Sammelverhalten der Biene wird unterdrückt [90]. In älteren Tieren nimmt der Proteinkonsum ab und die Nährstoffspeicher im immer mehr reduzierten Fettkörper verringern sich. Die damit einhergehende Herabregulierung der Vitellogenin-Expression und Erhöhung der Juvenilhormon-Titer führen zum Einsetzen des Sammelverhaltens. Dazu zählt auch die Erhöhung der sensorischen Empfindlichkeit auf Zuckerwasser-Stimuli sowie die verbesserte Fähigkeit zum appetitiven assoziativen Lernen und der Ausbildung eines Gedächtnisses, was für das effiziente Sammeln von Nektar und Pollen erforderlich ist [7, 177, 201, 202].

Auch der Insulin-Signalweg scheint in Beziehung zur nährstoffabhängigen Arbeitsteilung zu stehen. Der niedrigere Ernährungszustand der Flieger im Vergleich zu Stockbienen ist hier aber an eine gesteigerte Expression von *ILP1* (Insulin-like peptide 1) sowie eine höhere ILP-Empfindlichkeit (durch erhöhte Insulinrezeptor-Expression) gekoppelt [10, 173]. Dies stellt speziell bei der sozialen Reifung der Honigbiene eine umgekehrte Beziehung zwischen Nährstoffverfügbarkeit und -speichern und dem Insulin-Signalweg im Vergleich zu anderen Tieren, aber auch Honigbienen-Larven selbst, dar [38, 105, 190, 229].

Darüber hinaus sind biogene Amine, wie Octopamin, an der Regulation der Arbeitsteilung beteiligt [97, 198].

1.2 Lernen und Gedächtnisbildung

Das Lernen und die Gedächtnisbildung sind Prozesse, die für das Überleben von Tier und Mensch unabdingbar sind. Beim Lernen werden Erfahrungen, Kenntnisse und Fertigkeiten erworben, die als Gedächtnis gespeichert und in gleichen oder ähnlich wieder auftretenden Situationen abgerufen und akkurat angewandt werden können. Neben den ursprünglichen und primitiven Lernformen, wie beispielsweise der Nahrungssuche und -bewertung, die die Basis des Überlebens sichern, gibt es bei höheren Organismen - insbesondere beim Menschen - zusätzlich hoch entwickelte Lern- und Gedächtnisformen, welche ein ausgeprägtes Abstraktionsvermögen und bewusste Wahrnehmungserfahrungen erfordern, wie beispielsweise der Spracherwerb. Es kann so zwischen deklarativen (bewussten) und nicht-deklarativen (unbewussten) Lernformen unterschieden werden.

Die Fähigkeit zu lernen und das Verhalten an gegebene Bedingungen anzupassen ist im gesamten Tierreich hoch konserviert und auch molekulare Grundprinzipien sind bei verschiedenen Organismen immer wieder anzutreffen. Diese Grundprinzipien konnten in niederen Organismen anhand einfacher Lernformen gut erforscht werden und lassen sich auch auf höhere Organismen übertragen.

1.2.1 Zelluläre und molekulare Grundlagen

Die Verknüpfungen zwischen Neuronen im Nervensystem eines Organismus, die synaptischen Verbindungen, sind nicht statisch. Erst das Vorhandensein hoch dynamischer Prozesse, die die Umstrukturierung, Verstärkung oder Abschwächung neuronaler Verbindungen gewährleisten, ermöglichen die Funktion und Anpassungsfähigkeit des Nervensystems. Dieses Phänomen wird als synaptische Plastizität bezeichnet und wird als Basis des Lernens und der Gedächtnisbildung angesehen [21, 22, 153]. Aktivitätsabhängig werden hierbei neuronale Verbindungen spezifisch verstärkt, wenn die beteiligten Neurone gleichzeitig aktiv sind (Hebb'sche Regel) [104].

Die synaptische Plastizität kann sowohl auf Ebene der Morphologie als auch auf Ebene der Physiologie der Synapsen stattfinden [45]. So können zum einen zusätzliche Synapsen auswachsen, die die Kontaktfläche zwischen den Neuronen vergrößern. Zum anderen kann die Übertragung durch Verstärkung der Transmitterausschüttung an der Präsynapse oder die Änderung der postsynaptischen Rezeptorausstattung verbessert werden.

Auf molekularer Ebene spiegelt sich die erforderliche Koinzidenz neuronaler Aktivität in der Ausprägung von second messenger Kaskaden wieder, die eine zentrale Rolle bei der Aktivitäts- und Strukturmodulation von Neuronen bei der Gedächtnisbildung spielen [160]. Der second messenger cAMP (zyklisches Adenosinmonophosphat) und die cAMP-abhängige Proteinkinase A (PKA) gehören zu den evolutionär hoch konservierten Signalkaskaden, die im Zusammenhang mit der Gedächtnisbildung sowohl bei Invertebraten wie der Meereschnecke (*Aplysia californica*) [18, 60], der Fruchtfliege (*Drosophila melanogaster*) [87, 244] und der Honigbiene (*Apis mellifera*) [79, 168], als auch bei Säugern (Maus, *Mus musculus*)

lus) [37] gut erforscht sind. Ein ausführlich beschriebenes molekulares Modell stellt die Gedächtnisbildung an einem neuronalen Schaltkreis bei der Meeresschnecke dar (siehe Abbildung 5).

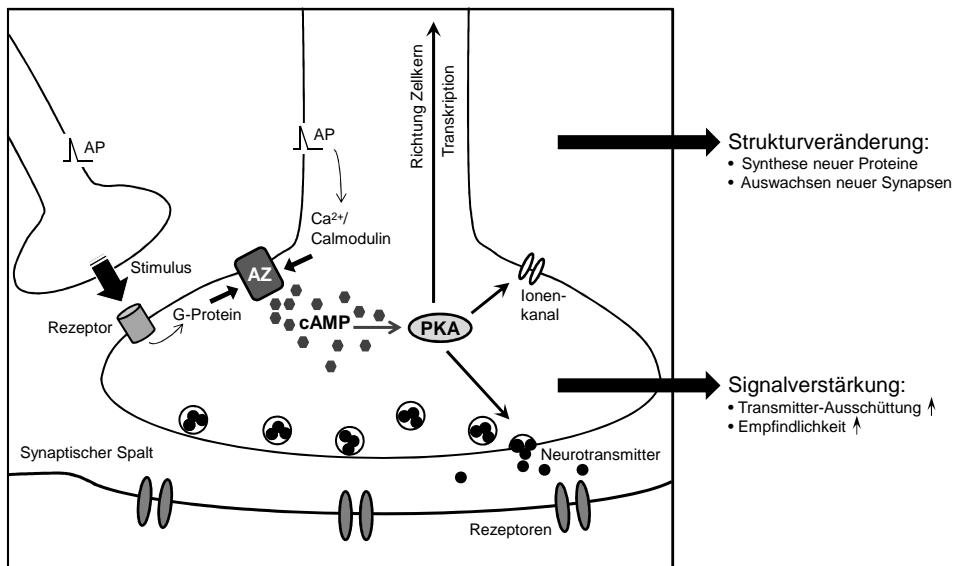


Abbildung 5: Molekulare Prozesse beim Lernen und der Gedächtnisbildung am Modell *Aplysia*. Die Adenylatzyklase (AZ) wird vollständig aktiviert, wenn die gleichzeitige Aktivität (AP: Aktionspotentiale) zweier Neurone gegeben ist. Über die Produktion des second messengers cAMP aktiviert sie die PKA, welche lokal an einer Signalverstärkung zur verbesserten Reizweiterleitung (erhöhte Transmitterausschüttung oder Empfindlichkeitssteigerung durch Kanalmodifikationen) oder aber durch Wanderung in den Zellkern an der Transkriptionsaktivierung beteiligt sein kann. Dies führt letztendlich zu einer Strukturveränderung der Synapsen.

Die membranständige, calciumabhängige Adenylatzyklase, welche ATP in cAMP umwandelt, spielt dabei als Koinzidenzdetektor eine entscheidende Rolle [3]. Ist ein Neuron aktiv, so kommt es aufgrund von Aktionspotentialen zu einem Calciumeinstrom im Synapsenbereich. Dies führt zu einer teilweisen Aktivierung der Adenylatzyklase. Erst, wenn ein zweites Neuron gleichzeitig aktiv ist, welches durch Transmitterfreisetzung die Adenylatzyklase zusätzlich über G-Protein-gekoppelte Rezeptoren aktiviert, potenziert sich der Effekt und es kommt zur ausreichenden cAMP-Produktion, die die Aktivierung der cAMP-abhängigen Proteinkinase A (PKA) nach sich zieht. Diese ist im Weiteren an einer Verstärkung der Signalübertragung beteiligt. Bei kurzzeitiger Aktivierung kann sie bereits vorhandene Proteine im Synapsenbereich, wie Ionenkanäle, modifizieren, um eine erhöhte Empfindlichkeit des Neurons oder eine verstärkte Transmitterausschüttung auszulösen [45, 49, 129]. Bei verlängerter Aktivierung, beispielsweise durch wiederholte Koinzidenz, gelangt sie in den Zellkern und kann durch Transkriptionsaktivierung zur Neusynthese von Proteinen und dauerhaften Strukturveränderungen der Synapse führen [60, 211]. Neben der cAMP-PKA-Kaskade trägt unter anderem auch die Calcium-Calmodulin-Kaskade in vielen Organismen zur transkripti-

onsabhängigen wie -unabhängigen Gedächtnisbildung bei [25].

In einem einfachen System wie den neuronalen Schaltkreisen von *Aplysia* lassen sich die molekularen Grundlagen gut studieren. Im lebenden Tier, vor allem auch bei höheren Organismen, gibt es aber eine Vielzahl von verschalteten Mechanismen und Modulatoren, wie circadiane Rhythmik, Motivation oder Stressfaktoren, die in komplexen Netzwerken das Lernen und die Gedächtnisbildung beeinflussen.

1.2.2 Lernen bei der Honigbiene

Die Honigbiene als Invertebrat verfügt über ein äußerst komplexes Lernverhalten. Speziell beim Sammelflug muss sie ihre Umwelt schnell erfassen, sich orientieren und Orte, Farben und Düfte ertragreicher Blüten erlernen und immer wieder abrufen können. So zeichnet sie sich durch die Bildung robuster visueller und olfaktorischer Gedächtnisse aus, die sich auch unter Laborbedingungen hervorragend induzieren und beobachten lassen. Daher stellt die Honigbiene einen sehr guten, etablierten Modellorganismus zur Erforschung der molekularen Grundlagen des Lernens und der Gedächtnisbildung dar [155, 156].

Ein im Labor angewandtes Lernparadigma ist die appetitive olfaktorische Konditionierung nach dem Prinzip der klassischen Konditionierung nach Pavlov [156, 160, 179]. Dabei wird die Fähigkeit der Biene ausgenutzt, eine Assoziation zwischen dem Duft einer Blüte und der darauf folgenden Belohnung in Form von Nektar oder Pollen herzustellen. Der Biene im Labor wird ein für sie unbedeutender Duft präsentiert (konditionierter Stimulus, CS), der einmal oder mehrmals mit einer Zuckerwasserbelohnung an den Antennen und dem Rüssel gepaart wird (unkonditionierter Stimulus, US). Die Biene reagiert bei Berührung ihrer Antennen mit Zuckerwasser natürlicherweise mit dem Herausstrecken ihres Rüssels (Proboscis), um die Belohnung aufzunehmen (Rüsselreflex; englisch: Proboscis Extension Reflex; PER). Nach der erlernten Assoziation zwischen dem (zuvor) unbedeutenden Duft und der Belohnung zeigt sie jedoch auch infolge der alleinigen Duftgabe diese Reaktion, sodass sich das Vorhandensein eines Gedächtnisses anhand des PER leicht beobachten lässt (siehe dazu auch Abbildung 7, Seite 26 im Methodenteil).

1.2.3 Der Metabolismus bei Lern- und Gedächtnisprozessen - ein untrennbares Zusammenspiel

Lern- und Gedächtnisprozesse sind energieaufwändig und benötigen einen erhöhten Nachschub an Brennstoffen, in Neuronen also vornehmlich Glucose. Im Gehirn des Säugers wird dies z.B. durch einen erhöhten lokalen Blutfluss oder über die Dichte der Glucosetransporter realisiert [52, 77, 128]. Zudem beeinflussen viele Faktoren, wie Motivation, Aufmerksamkeit und sensorische Sensitivität, die eng an metabolische Signale gekoppelt sind, Lern- und Gedächtnisprozesse. So ist es nicht verwunderlich, dass das Lernen und die Gedächtnisbildung eine funktionierende Einheit mit der Energiehomeostase des Körpers bilden müssen und viele Stoffwechselerkrankungen mit kognitiven Defiziten einhergehen.

Einschränkungen in der Glucoseregulation mit erhöhter Glykämie, wie sie bei Fettsucht oder *Diabetes mellitus*, aber auch bei älteren Säugern auftreten, sind häufig mit Beeinträchtigungen im Lernverhalten und der synaptischen Plastizität verbunden [29, 118, 162, 170], während eine verminderte Kalorienzufuhr und ein beschleunigter Stoffwechsel, z.B. durch Bewegung, umgekehrte Effekte aufweisen [221]. Weiterhin wurde eine Gedächtnisverbesernde Wirkung von Glucose durch äußere Zufuhr bereits vielfach demonstriert [157].

Es gibt Hinweise darauf, dass sich metabolische Signale, wie Insulin oder auch Glucose selbst, in direktem Weg auf Prozesse des Lernens und der Gedächtnisbildung in den beteiligten Hirnregionen auswirken, beispielsweise auf die lokale Transmittersynthese [68, 166, 185].

1.2.3.1 Motivation und Belohnungssysteme Viele Verhaltensweisen, darunter auch das Fressverhalten, sind motivationsgesteuert und in ihrer Ausprägung abhängig vom aktuellen physiologischen Zustand eines Tieres. Hunger ist dabei der wohl am besten untersuchte Motivationszustand, der, ausgelöst durch endokrine und neuronale „Hungersignale“ aus dem Körper, die Futtersuche und das Fressverhalten initiiert [188, 236]. Jedoch ist nicht der Energiestatus allein für die Initiation des appetitiven Verhaltens verantwortlich. Vielmehr spielen auch erlernte futterbezogene Hinweise über die sensorischen Eigenschaften, wie Geschmack und Duft, aber auch über die Bekömmlichkeit und den Kaloriengehalt der Nahrung nach Aufnahme eine Rolle. Diese appetitiven Gedächtnisse unterliegen ebenso der Modulierbarkeit durch den Motivationsstatus. So ist ein verbessertes appetitives Lernen und Gedächtnis bei hungrigen im Vergleich zu satten Tieren ein überall im Tierreich verbreitets Phänomen [79, 133].

Neuronale Belohnungssysteme sind an der Bewertung und Integration von Belohnungsinformationen, z.B. durch Nahrung, beteiligt. Sie werden im Vertebraten-Hirn von dopaminerigen Neuronen gebildet, welche in viele Gehirnregionen projizieren, deren Aktivität beeinflussen und so verschiedene Verhaltensweisen kontrollieren. Diese Neurone reagieren auf neue und erwartete (erlernte) Futterreize, und zwar bei hungrigen Tieren stärker als bei satten, sodass sie die individuelle Belohnungsstärke repräsentieren [204, 205, 233].

Es gibt zahlreiche Hinweise darauf, dass Hormone, wie Insulin und Leptin, sowie hypothalamische Neuropeptide, die in Abhängigkeit des Energiezustands sezerniert werden (siehe Abschnitt 1.1.1.1), zur Aktivität des dopaminerigen Motivationssystems beitragen [82, 96, 109].

Auch bei *Drosophila* wurden kürzlich durch das Neuropeptid NPY (*Drosophila* NPF) modulierte dopaminerige Neurone gefunden, die an der Verknüpfung des Sättigungszustands mit der appetitiven Gedächtnisbildung beteiligt sind [133]. Bei Invertebraten, wie auch der Honigbiene, spielen aber insbesondere auch octopaminerige Neurone eine wichtige Rolle bei der Übertragung der Belohnungsinformation [198, 226].

Auch die sensorische Sensitivität unterliegt Modulationen durch den physiologischen Zustand des Körpers. Bei der Honigbiene korreliert die Sensitivität gegenüber Zuckerwas-

serreizen (Zuckerwasserempfindlichkeit) direkt mit dem appetitiven Lernen und Gedächtnis [169, 201] und ist mitunter abhängig von der Nährstoffverfügbarkeit in der Hämolymphe [7]. Bei der Vermittlung der sensorischen Modulation, z.B. süßem Geschmack, spielen beim Säugetier orexigene (Appetit steigernde) und anorexigene (Appetit hemmende) Faktoren eine Rolle [119].

1.3 Zielsetzung

Ziel dieser Arbeit ist es, die Rolle der Hämolympgh glucose als potenzielles internes Signal über den physiologischen Zustand des Körpers in der Honigbiene (*Apis mellifera*) zu untersuchen. Im Vordergrund steht die Prüfung der Hypothese, dass die Hämolympgh glucose in Abhängigkeit des individuellen Sättigungszustands an neuronalen sensorischen Modulationen beteiligt ist und mithin das Verhalten, speziell die Zuckerwasserempfindlichkeit sowie das appetitive Lernen und Gedächtnis, beeinflusst. Hierbei wird zusätzlich ihre Bedeutung bei der Verabreichung eines minimalen appetitiven Stimulus, der auch beim Lernen als Belohnung dient, herausgestellt.

Weiterhin soll untersucht werden, ob Glucosetransportern bei der Regulation des Hämolympgh glucosegehalts eine Funktion zukommt und welche weiteren molekularen Vermittler an der Einstellung des Glucosespiegels in der Biene beteiligt sind.

Dabei stehen die folgenden Fragestellungen im Mittelpunkt:

- Sind Parallelen zwischen dem Hämolympgh glucoseespiegel, dem appetitiven Lernverhalten und der sensorischen Prozessierung erkennbar?
- Lässt sich das Gedächtnis durch die Manipulation des Hämolympgh glucoseespiegels verändern?
- Führt eine geringfügige Zuckeraufnahme wie im Zuge der Konditionierung zu Änderungen des Hämolympgh glucoseespiegels?
- Gibt es Glucosetransporter, deren Expression mit kurz- oder langfristigen Veränderungen des Hämolympgh glucoseespiegels in Zusammenhang stehen?
- Spielen molekulare Signale wichtiger Glucose-Regulationssysteme von Säugetieren, wie der Insulin-Signalweg und K_{ATP}-Kanäle, auch eine Rolle bei der Honigbiene? Stehen sie in Verbindung mit der Hämolympgh glucose und dem Verhalten? Korrelieren Hämolympgh glucose und Verhalten mit anderen Nährstoff-Speichersystemen der Biene?

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Chemikalien

Substanz

1-Butanol (wassergesättigt)
 2-Mercaptoethanol
 Agarose
 APS (Ammoniumperoxodisulfat)
 Bis-Acrylamid (0,8 % [w/v] Bisacryl-
 amid, 30% [w/v] Acrylamid)
 Bromphenolblau (3,3',5,5'-Tetrabrom-
 phenolsulfonphthalein-Na-Salz)
 BSA (Rinder Albumin Fraktion V)
 BSA (Rinder Albumin Fraktion V; für
 Zellkultur)
 $\text{CaCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$ (Calciumchlorid-2-Hydrat)
 Chemolumineszenz-HRP-Substrat
 (Luminol Reagenz, Peroxid)
 Chloroform
 DEPC (Diethylpyrocarbonat)
 D-(+)-Glucose
 DMSO (Dimethylsulfoxid)
 DNA-Standard (6x O'Range Ruler
 DNA-Ladder)
 dNTP Mix (jeweils 10 mM)
 EDTA (Ethylendiamintetraessigsäure;
 Dinatriumsalz-Dihydrat)
 Eisessig
 Ethanol absolut
 Ethidiumbromid-Lösung (1%)
 Glutardialdehyd (25%)
 Glycerin
 Glycin
 H_2O (DNase/RNase-frei)
 Harnstoff
 HCl (Salzsäure)
 Heparin

Firma

Z-Chem
 Merck, Darmstadt
 Sigma-Aldrich, München
 Z-Chem
 Roth, Karlsruhe
 Appli Chem, Darmstadt
 Roth, Karlsruhe
 Sigma-Aldrich, München
 Merck, Darmstadt
 Elmer Perkin, Waltham USA
 Z-Chem
 Roth, Karlsruhe
 Z-Chem
 Z-Chem
 Fermentas, St. Leon-Rot
 Fermentas, St. Leon-Rot
 Z-Chem
 Z-Chem
 Sigma-Aldrich, München
 Appli Chem, Darmstadt
 Roth, Karlsruhe
 Z-Chem
 Roth, Karlsruhe
 Invitrogen, Darmstadt
 Z-Chem
 Merck, Darmstadt
 Sigma-Aldrich, München

Imject Maleimid Activated Blue	Thermo Scientific Pierce, Rockford USA
Carrier Protein	Z-Chem
Isopropylalkohol	Merck, Darmstadt
KCl (Kaliumchlorid)	Merck, Darmstadt
KH ₂ PO ₄ (Kaliumdihydrogenphosphat)	Sigma-Aldrich, München
KLH (Keyhole-Limpet-Hämocyanin)	
Ladepuffer (6x Orange DNA loading Dye)	Fermentas, St. Leon-Rot
Methanol	Z-Chem
MgCl ₂ ·6H ₂ O (Magnesiumchlorid)	Merck, Darmstadt
NaCl (Natriumchlorid)	Z-Chem
NaHCO ₃ (Natriumhydrogencarbonat)	Merck, Darmstadt
Na ₂ HPO ₄ ·2H ₂ O (Dinatriumhydrogen- phosphat-2-Hydrat)	Z-Chem
NaH ₂ PO ₄ ·2H ₂ O (Natriumdihydrogen- phosphat-2-Hydrat)	Z-Chem
NaN ₃ (Natriumazid)	Acros Organics, Geel B
NaOH (Natriumhydroxid)	Z-Chem
Nelkenöl	Apotheke
Paraffin Histowax	Leica, Solms
Paraformaldehyd	Sigma-Aldrich, München
p-NPP (para-Nitrophenylphosphat- Dinatriumsalz-Hexahydrat)	Appli Chem, Darmstadt
Poly-L-Lysin	Sigma-Aldrich, München
Protein-Standard (SeeBlue® Plus2 Pre-Stained Standard)	Invitrogen, Darmstadt
Protein-Standard (ColorPlus Pre- Stained Protein Ladder)	New England Biolabs, Frankfurt
RNase-Dekontaminationsreagenz	Appli Chem, Darmstadt
Rox II Dye	Takara, Saint-Germain-en-Laye F
Saccharose	Lebensmittelhandel
SDS (Natriumdodecylsulfat)	Roth, Karlsruhe
Stimune (Adjuvans)	Prionics, Lelystad NL
SYBR® Green 10000x	Sigma-Aldrich, München
Temed (N,N,N',N'-Tetramethylethylen- diamin)	Appli Chem, Darmstadt
Tris (Tris-(hydroxymethyl)-amino- methan)	Sigma-Aldrich, München
Triton-X-100	Fluka, Neu-Ulm

Tween 20 (Polyoxyethylensorbitan-monolaurat)	Appli Chem, Darmstadt
Xylol	Z-Chem

2.1.2 Verbrauchsmaterialien

Material

96-well PCR-Platten High-Profile
96-well Platten Immuno-Plate (schwarz)
96-well Platten Immuno-Plate
Bienenracks (Plastik)
Bienenrörchen (Plastik)
Dialyseschlauch
Dentalwachs (medium)
Falcons 15 ml und 50 ml
gestopfte Pipettenspitzen
Glaskapillare Capilettor Tip (1 - 5 μ l)
Glasobjekträger
Glucoseteststreifen
Contour Sensoren Teststreifen
Deckgläschchen
Hamilton-Spritze
Kanülen
Klebefilm für PCR-Platten
Optical adhesive film
Metallpistill für Glaskapillare
Nitrocellulose-Membran Optitran BA-S 85
Pasteurpipetten
PCR-Reaktionsgefäße
Röntgenfilm Amersham Hyperfilm MP
Röntgenfilm-Entwickler REF 103482
Röntgenfilm-Fixierer REF 103655
Reaktionsgefäße (0,5 ml und 1,5 ml)
Spritzen (2 ml und 20 ml)
Whatman-Papier

Firma

Biozym, Hessisch Oldendorf
Nunc, Wiesbaden
Nunc, Wiesbaden
eigene Herstellung
eigene Herstellung
Roth, Karlsruhe
Ubert, Raesfeld
Sarstedt, Nümbrecht
Sarstedt, Nümbrecht
Selzer, Frankfurt
Roth, Karlsruhe

Bayer Vital GmbH, Leverkusen
Roth, Karlsruhe
Roth, Karlsruhe
Braun, Melsungen

Finnzymes, Vantaa FIN
Selzer, Frankfurt
Schleicher/Schuell, Dassel
VWR, Darmstadt
Sarstedt, Nümbrecht
GE Healthcare, München
Tetenal, Norderstedt
Tetenal, Norderstedt
Eppendorf, Hamburg
Braun, Melsungen
Schleicher/Schuell, Dassel

2.1.3 Puffer und Lösungen

2.1.3.1 Hämolympghglucose-Bestimmung

Humanringer, NaHCO ₃ -gepuffert:	147 mM NaCl 4 mM KCl 2,2 mM CaCl ₂ 24 mM NaHCO ₃
---	---

2.1.3.2 Agarose-Gelelektrophorese

TAE-Puffer (50x):	2 M Tris 50 mM EDTA, pH 8,0 1 M Eisessig
-------------------	--

Agarosegel 1% (90 ml):	0,9 g Agarose 4,5 μ l Ethidiumbromid in TAE-Puffer
------------------------	--

2.1.3.3 Peptid-Kopplung

0,1 M Phosphatpuffer; pH 7,5:	81 mM Na ₂ HPO ₄ 19 mM NaH ₂ PO ₄
-------------------------------	--

0,1 M Phosphatpuffer; pH 6,8:	46,3 mM Na ₂ HPO ₄ 53,7 mM NaH ₂ PO ₄
-------------------------------	--

2.1.3.4 Probenvorbereitung

PBS:	137 mM NaCl 2,7 mM KCl 1,5 mM KH ₂ PO ₄ 8 mM Na ₂ HPO ₄ \times 2H ₂ O; pH 7,3-7,4
------	---

Homogenisierungspuffer:	1 mM EDTA in PBS
-------------------------	---------------------

Homogenisierungspuffer mit Harnstoff:	1 mM EDTA 1 M Harnstoff in PBS
---------------------------------------	--------------------------------------

2.1.3.5 SDS-PAGE

Probenpuffer:	10 mM 2-Mercaptoethanol 0,05% [w/v] Bromphenolblau 20% [v/v] Glycerin 10% [w/v] SDS 0,2 M Tris-HCl; pH 6,8
Polyacrylamid-Gel:	Sammelgel 4% (2 ml): 267 μ l Bis-Acrylamid 25 μ l 20% [w/v] SDS 10 μ l 10% [w/v] APS 5 μ l Temed 1,193 ml H ₂ O dest. 500 μ l 0,5 M Tris-HCl; pH 6,8
	Trenngel 10% (4 ml): 1,3 ml Bis-Acrylamid 20 μ l 20% [w/v] SDS 20 μ l 10% [w/v] APS 10 μ l Temed 1,617 ml H ₂ O dest. 1 ml 1,5 M Tris-HCl; pH 8,8
Laufpuffer (10x)	2 M Glycin 1% SDS 0,25 M Tris

2.1.3.6 Westernblot und Dotblot

Blotpuffer:	0,2 M Glycin 20% [v/v] Methanol 0,25 M Tris
Blockpuffer:	0,5% bzw. 2% [w/v] BSA 0,1% [v/v] Tween 20 in PBS
Waschpuffer:	0,4 M NaCl 0,1% [v/v] Tween 20 in PBS

2.1.3.7 ELISA

Blockpuffer:	0,5% [w/v] BSA in PBS
RxN-Puffer:	1 mM MgCl ₂ ·6H ₂ O 0,1 M Tris-HCl; pH 8,7
Färbelösung:	1 mM p-NPP in RxN-Puffer

2.1.3.8 Histologie

Carnoy-Lösung:	30 ml Ethanol absolut 15 ml Chloroform 15 ml Eisessig
PBS-T:	0,1% [v/v] Triton in PBS
Blockpuffer:	0,5% [w/v] BSA 0,1% [v/v] Triton in PBS
Formaldehyd-Lösung:	4% [w/v] Paraformaldehyd in PBS mit einigen Tropfen 1 M NaOH gelöst

2.1.4 Enzyme und Kits

Enzym / Kit

Maxima® Hot Start Taq DNA Polymerase
Peq Gold Gel Extraction Kit
Premix Ex Taq™ Perfect real Time
Quant-it™ PicoGreen® dsDNA Assay Kit
Quant-it™ RiboGreen® RNA Assay Kit
RevertAid™ H Minus First Strand cDNA
Synthesis Kit
RNase Free DNase Set
RNeasy Mini Kit

Firma

Fermentas, St. Leon-Rot
Peqlab, Erlangen
Takara, Saint-Germain-en-Laye F
Invitrogen, Darmstadt
Invitrogen, Darmstadt
Fermentas, St. Leon-Rot
Qiagen, Hilden
Qiagen, Hilden

2.1.5 Pharmaka

Substanz	Firma
AICAR	Sigma-Aldrich, München
Compound C	Calbiochem, Darmstadt
Diazoxid	Enzo Life Sciences GmbH, Lörrach
Glyburid	Enzo Life Sciences GmbH, Lörrach
LY294002	Cayman Chemical, Tallinn EST
Wortmannin	Cayman Chemical, Tallinn EST

2.1.6 Antikörper und Peptide

2.1.6.1 Primäre Antikörper

Antikörper / Wirt	Firma
GLUT1 b Antikörper aus Ratte (polyklonal)	eigene Produktion
GLUT1 a Antikörper aus Ratte (polyklonal)	eigene Produktion
AMPK α Antikörper aus Kaninchen (polyklonal)	Cell Signaling, Danvers USA
Phospho-AMPK α (Thr172) Antikörper aus Kaninchen (monoklonal)	Cell Signaling, Danvers USA
Vitellogenin Antikörper, Klon 03A6, aus Maus (monoklonal)	eigene Produktion

2.1.6.2 Sekundäre Antikörper

Antikörper / Wirt	Firma
Anti-Kaninchen IgG, Alkalische Phosphatase-gekoppelt aus Ziege	Sigma-Aldrich, München
Anti-Maus IgG, Alkalische Phosphatase-gekoppelt aus Ziege	Sigma-Aldrich, München
Anti-Kaninchen IgG, Peroxidase- gekoppelt aus Ziege	Sigma-Aldrich, München
Anti-Ratte IgG, Peroxidase- gekoppelt aus Ziege	Sigma-Aldrich, München
Anti-Maus IgG AffiniPure, Cy TM 3- gekoppelt aus Ziege	Dianova, Hamburg
Anti-Ratte IgG AffiniPure, Cy TM 3- gekoppelt aus Ziege	Dianova, Hamburg

2.1.6.3 Peptide Die Peptide zur Ratten-Immunisierung gegen die Glucosetransporter (GLUT1) der Honigbiene (NCBI Accession XP_393425.2 und XP_392938.2) wurden von der Firma PANATecs, Tübingen synthetisiert. Die Sequenzen sind Tabelle 4 (Seite 35) im Methodenteil zu entnehmen.

2.1.7 Primer

Die Primer für die real-time PCR wurden HPLC-gereinigt, die Primer für die Standard-PCR entsalzt in einer Konzentration von je 100 μ M geliefert. Sie stammten von der Firma Sigma-Aldrich, München. Die Sequenzen der Primer sind in Tabelle 3 (Seite 31) im Methodenteil aufgeführt.

2.1.8 Geräte

Gerät	Firma
1 ml-Glashomogenisator/Glas-S-Pistill	Braun, Melsungen
Agarose-Gelelektrophoresekammer	Owl Separation Systems
Binokular S6D	Leica, Solms
Block-Heizgerät Accu Block TM digital	Labnet, Berlin
Blotkammer	Owl Separation Systems
Blutzuckermessgerät Contour Set	Bayer Vital GmbH, Leverkusen
Brutschrank	MELAG Medizintechnik, Berlin
Cool Snap HQ ²⁺ Kamera	Photometrics, München
Fluoreszenzmikroskop Axiovent 200 M	Zeiss, Jena
Kühlzentrifuge 5804R	Eppendorf, Hamburg
Lötkolben	eigene Herstellung
Mastercycler personal	Eppendorf, Hamburg
Microtom Autocut 2040	Reichert-Jung
Mikropipetten Puller Model P-87	Sutter Instrument, Novato USA
Mx3000P QPCR System	Stratagene, Amsterdam NL
pH-Meter inoLab pH 730	WTW, Weilheim
Photometer Bio Mate 3	Thermo Scientific
Powerstation 300 PLUS	Labnet, Berlin
Rührheizgerät RCT basic	IKA-Labortechnik, Staufen
Safire ² Plate-Reader	Tecan, Mainz
Schüttler KS501 digital	IKA-Labortechnik, Staufen
SDS-PAGE-Gelelektrophoresekammer	C.B.S.
Switching Power DPS-4005 PFC	Voltkraft, Hirschau
Tischzentrifuge Spectrafuge 24D	Labnet, Berlin

2.1.9 Software und Internetadressen

- ImageJ (Bildverarbeitung und -analyse in Java)
- Integrated DNA Technologies OligoAnalyzer 3.1 (Primerdesign; eu.idtdna.com/analyzer/Applications/OligoAnalyzer/Default.aspx)
- Microsoft Office Excel (Tabellenkalkulation)
- National Center for Biotechnology Information, NCBI (Molekularbiologische Datenbank; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)
- Oligonucleotide Properties Calculator (Primerdesign; www.basic.northwestern.edu/biotools/oligocalc.html)
- Origin8 (Datenanalyse- und Graphikprogramm)
- Pôle BioInformatique Lyonnaise (PBIL) Network Protein Sequence Analysis (Software zur Protein-Sequenzanalyse; <http://npsa-pbil.ibcp.fr>)
- Primer of Biostatistics (Statistik-Programm)
- Stratagene MxPro-Mx3000P Software (real-time PCR Software)

2.2 Methoden

2.2.1 Haltung und Vorbereitung der Versuchstiere (*Apis mellifera carnica*)

Die Versuchstiere stammten aus Bienenstöcken im botanischen Garten der Universität des Saarlandes. Im Sommer wurden die Stöcke im Freien, im Winter im Winterflughäuschen bei konstanter Temperatur (28 °C) und Luftfeuchtigkeit (50%) gehalten. Wenn nicht anders beschrieben, wurden die Experimente mit Sammlerbienen durchgeführt, welche beim Verlassen des Stocks in einer Plexiglas-Pyramide gefangen wurden. Zum Sammeln von Bienen innerhalb des Stocks wurde der Deckel geöffnet und die Bienen wurden mithilfe einer Pinzette direkt vom Kamm gepflückt.

Die Tiere wurden auf Eis immobilisiert und in Plastikröhren eingespannt, sodass ausschließlich der Kopf mit Antennen und Proboscis (Rüssel) frei beweglich, sowie Thorax und Abdomen für Injektionen bzw. die Hämolympheentnahme zugänglich waren (siehe Abbildung 6). Vor und zwischen den Versuchseinheiten wurden die Bienen in abgedunkelten, feuchten Boxen aufbewahrt. Die Fütterung erfolgte mit 1 M Saccharoselösung mittels einer Kanüle. Genauere Angaben zu Fütterungszeiten und -mengen bei den Einzelexperimenten sind dem Methoden- und Ergebnisteil zu entnehmen.

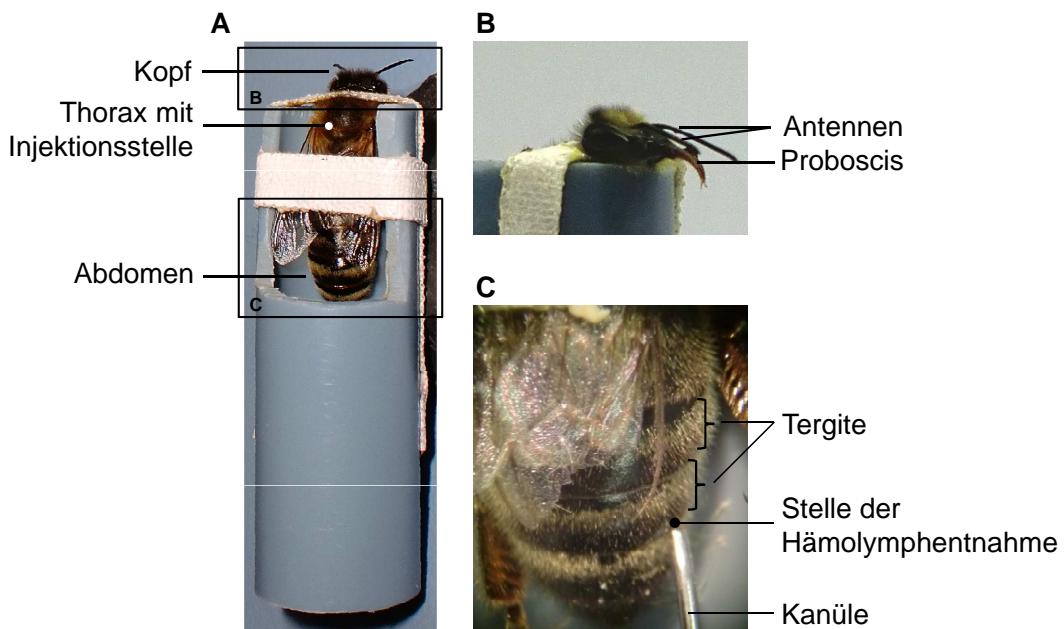


Abbildung 6: A: In einem Plastikröhrchen eingespannte Biene in dorsaler Ansicht. Der Thorax mit der seitlichen Injektionsstelle sowie das Abdomen sind zugänglich. **B:** Kopf einer eingespannten Biene in seitlicher Ansicht mit frei beweglichen Antennen und Proboscis. **C:** Abdomen einer eingespannten Biene bei der Hämolympheentnahme mit einer Kanüle (Hamiltonspritze) zwischen zwei Tergiten.

2.2.2 Appetitive olfaktorische Konditionierung

Bei diesem Lernparadigma wurden die Bienen durch die Paarung zweier Reize darauf trainiert, einen neutralen, konditionierten Stimulus (CS) mit einem belohnenden, unkonditionierten Stimulus (US) zu assoziieren. Als CS diente dabei Nelkenduft, der 5 Sekunden lang durch ein Spritze auf die Antennen der Biene geblasen wurde. Nach 3 Sekunden der alleinigen Duftpräsentation wurde das Tier überlappend mit einem in 1 M Saccharoselösung (US) getränkten Zahnstocher zunächst kurz an den Antennen berührt bis der durch den US ausgelöste PER (Proboscis Extension Reflex = Rüsselreflex) eintrat und daraufhin 5 Sekunden lang am Rüssel belohnt (siehe Abbildung 7A). Dieser Trainingsdurchgang (Trial) wurde entweder einmal oder dreimal mit einem Inter-Trial-Intervall von 2 Minuten durchgeführt (siehe Abbildung 7B). Die Gedächtnisabrufe erfolgten 2 Stunden (2 h) und 1 Tag (1 d) nach dem Training durch die alleinige Präsentation des Duftes. Je nach Vorhandensein des PER wurden die Reaktionen als positiv oder negativ dokumentiert. Während des Trainings und der Abrufe waren die Bienen vor einem Abzug positioniert.

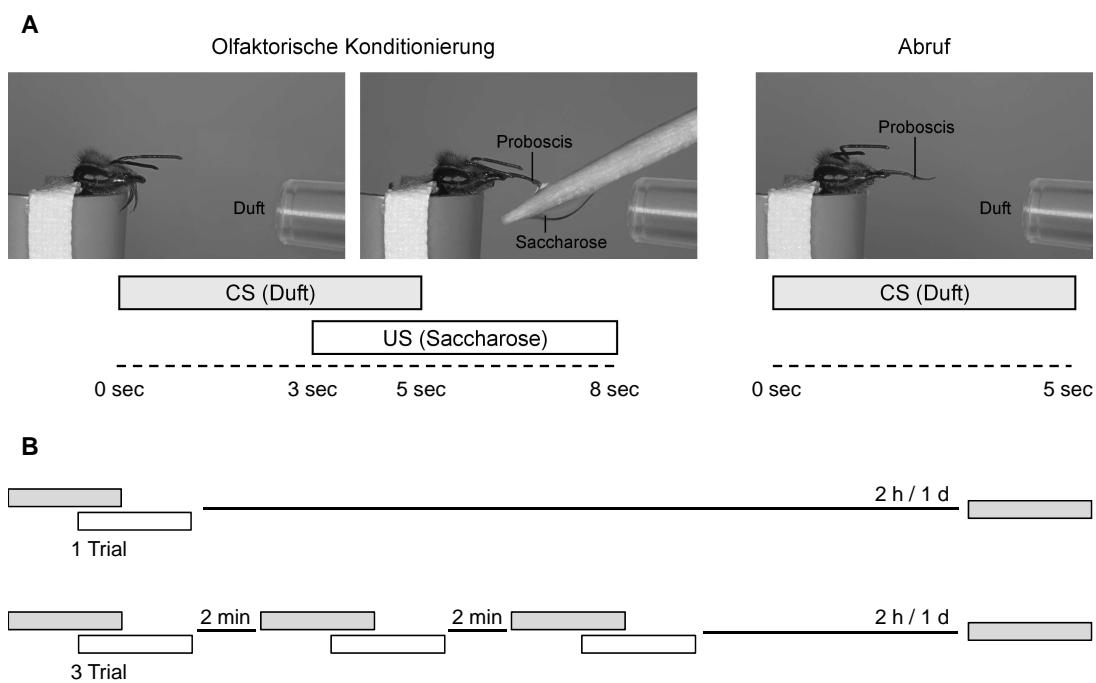


Abbildung 7: Ablauf der appetitiven olfaktorischen Konditionierung der Honigbiene. A: Das Training erfolgte durch die zeitlich überlappende Applikation des konditionierten Duftstimulus (CS) und der Saccharose-Belohnung am Proboscis (US). Beim Gedächtnisabruf wurde hingegen nur der Duftreiz präsentiert, der im Falle eines ausgebildeten Gedächtnisses den PER hervorruft. **B:** Die Trainingsprozedur gestand aus 1 Trial oder aus 3 Trials im Abstand von 2 min, während die Gedächtnisabrufe immer nach 2 h und 1 d stattfanden.

Für die Konditionierungsversuche wurden die Bienen in der Regel am Nachmittag des Vortages gefangen und mit 20 bis 30 μ l 1 M Saccharoselösung gefüttert. Weiterhin erhielten die Tiere an jedem weiteren Versuchsabend 20 bis 30 μ l und mindestens 30 min nach den Gedächtnisabrufen 10 bis 20 μ l der Saccharoselösung. Weitere Angaben zur Fütterung sind an entsprechender Stelle im Ergebnisteil zu finden.

Zur Versuchsauswertung wurde der Prozentsatz reagierender Tiere bei jedem Trial und Abruf aufgetragen. Dazu wurde Microsoft Office Excel zuhilfe genommen. Bienen, die bereits bei der ersten Duftpräsentation einen PER zeigten (falsch positiv), sowie Bienen, die bei der US-Präsentation keinen PER zeigten, wurden aus den Experimenten ausgeschlossen. Die Software Primer of Biostatistics diente zur statistischen Auswertung der Daten im Fisher Exact (Anzahl der Versuchstiere < 100) oder Chi Square Test (Anzahl der Versuchstiere > 100).

2.2.3 Zuckerwasserempfindlichkeit (Responsiveness)

Beim Responsiveness-Test wurden die Tiere auf ihre Reaktion gegenüber Zuckerwasser (Saccharoselösung) getestet. Dazu wurden die Antennen mittels getränkter Zahnstocher im zeitlichen Abstand von etwa 2 min mit Saccharoselösungen aufsteigender Konzentrationen (0, 30, 100, 300, 1000 mM) berührt, ohne dass eine Belohnung am Rüssel erfolgte. Die Reaktion wurde je nach Vorhandensein des Rüsselreflexes (PER) positiv oder negativ bewertet und die Gesamtzahl der positiven Reaktionen auf Wasser und Zuckerwasser eines Individuums gaben den „Sucrose Response Score“ an. Alternativ wurden die Reaktionen der Tiere bei jeder einzelnen Konzentration prozentual angegeben. Zur statistischen Analyse wurde in diesem Fall der Fisher Exact Test zum Gruppenvergleich angewendet. Bei der Angabe der Daten als „Sucrose Response Score“ konnte dieser für Spearman Rangkorrelationen oder Gruppenvergleiche im Mann-Whitney Rangtest (beides im Programm Origin8) eingesetzt werden.

2.2.4 Hämolympentnahme und Messung des Hämolympglucosespiegels

Die Hämolympproben ($2 \pm 0,5 \mu$ l pro Biene) wurden dem lebenden Tier mithilfe einer Hamilton-Spritze entnommen, indem es am Abdomen zwischen zwei Tergiten (Rückenplatten) seitlich punktiert wurde (siehe Abbildung 6 A und C, Seite 25). Die Messung erfolgte mittels eines kommerziellen Blutzuckermessgeräts, welches lediglich ein Testvolumen von 0,6 μ l benötigt und einen Messbereich von 0,1 bis 6 mg/ml Glucose einschließt.

Dazu wurde die entnommene Hämolymphe auf einen Objektträger gegeben, umgedehnt mit carbonatgepuffertem Humanringer verdünnt (mindestens 1:2 [v/v]) und gemessen. Glucosekonzentrationen über 4 mg/ml wurden ausgeschlossen, Konzentrationen unter 0,1 mg/ml wurden wie 0,09 mg/ml behandelt.

2.2.5 Injektion

Alle Substanzen wurden mithilfe spitz ausgezogener Glaskapillaren mit Metallpistill seitlich in den Thorax injiziert (siehe Abbildung 6A, Seite 25). Die jeweiligen Injektionsvolumina und Konzentrationen sind Tabelle 1 zu entnehmen.

Tabelle 1: Konzentrationen und Volumina der Injektionslösungen

Substanz	Injektionslösung	Injektionsvolumen
AICAR	0,2 M in PBS	1 μ l
Compound C	3,5 mM in DMSO	1 μ l
Diazoxid	10 mM in 50% DMSO	1 μ l
Glucose	0,2 mg/ μ l in PBS	2 μ l
Glyburid	4 mM in 50% DMSO	1 μ l
LY294002	1,5 mM in DMSO	1 μ l
Wortmannin	10 μ M in DMSO	1 μ l

2.2.6 Gehirnpräparation

Der Kopf einer auf Eis immobilisierten Biene wurde mit einem Skalpell abgetrennt und in einen Wachswürfel eingebettet. Die Kopfkapsel wurde unverzüglich durch einen waagerechten Schnitt von den Antennen zum obersten Ocellus geöffnet (siehe Abbildung 8). Nach raschem Entfernen der Drüsen mit einer feinen Pinzette wurde das Zentralhirn (oder für die Histologie das gesamte Hirn mit optischen Loben) umgehend mittels eines Skalpells herausgetrennt und mit einer Pinzette entnommen.

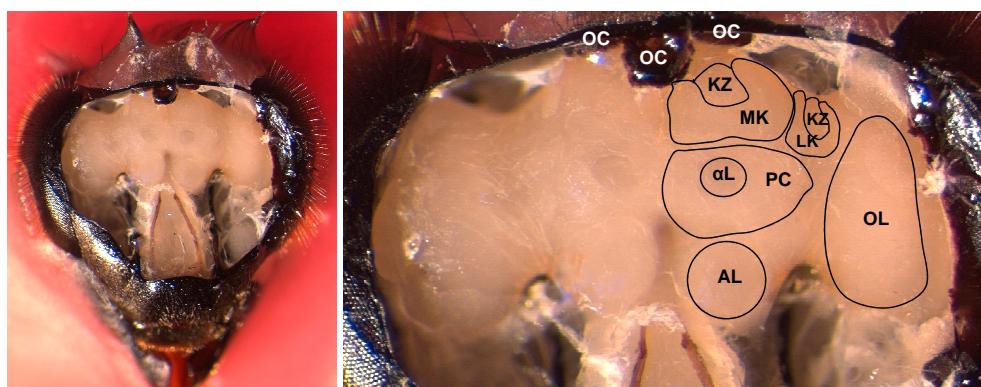


Abbildung 8: Links: Blick auf das Bienenhirn in einer geöffneten Kopfkapsel. Rechts: Detailansicht des Gehirns mit Hirnregionen. Das Zentralhirn, dem beim olfaktorischen Lernen wichtige Funktionen zukommen, besteht aus den Antennalloben (AL), dem Protocerebrum (PC), den alpha-Loben (α L) und den Kelchen des medianen (MK) und lateralen Pilzkörpers (LK) mit den Kenyon Zellen (KZ). Die Ocellen (OC) sowie die optischen Loben (OL) gehören nicht zum Zentralhirn. Die Hirnregionen sind einseitig markiert.

2.2.7 RNA-Aufreinigung aus Geweben

Gesamt-RNA wurde mithilfe des RNA-Aufreinigungskits „RNeasy Mini Kit“ (Qiagen) nach dem Herstellerprotokoll aus verschiedenen Geweben (Kopf, Thorax, Abdomen, Hirn) isoliert. Diese wurden in RNase-freien (mit RNase-Dekontaminationsreagenz behandelten und mit DEPC-H₂O gespülten) Glashomogenisatoren in mitgeliefertem, 2-mercaptoethanolhaltigem Homogenisierungspuffer homogenisiert. Ein DNase-Verdau wurde mit dem „RNase Free DNase Set“ von Qiagen wie vom Hersteller angegeben ins Protokoll mit eingebunden. Die eingesetzten Gewebemassen sowie Homogenisierungspuffer- und Säulenelutionsvolumina (mitgeliefertes RNase-freies H₂O) sind Tabelle 2 zu entnehmen. Die RNA wurde entweder umgehend zur Reversen Transkription eingesetzt oder bei -70 °C gelagert.

Tabelle 2: Eingesetzte Gewebemassen und Puffervolumina zur RNA-Extraktion aus verschiedenen Geweben.

Gewebe	Gewebemasse [mg]	Homogenisierungsvol. / eingesetztes Vol. [μl]	Elutionsvol. (H ₂ O) [μl]
Abdomen komplett	60	1000 / 600	80
Thorax komplett	40	600 / 600	60
Kopf komplett	10	350 / 350	80
Körper (ohne Kopf)	100	1200 / 600	80
Hirn (1-3 vereint)	< 10	350 / 350	60

2.2.8 Konzentrationsbestimmung der RNA

2.2.8.1 Photometer Zur Konzentrationsbestimmung der aufgereinigten RNA wurde diese 1:10 [v/v] mit RNase-freiem Wasser zu einem Volumen von 70 μl verdünnt. Als Referenzwert diente reines Wasser. Durch die Erfassung der optischen Dichte bei 260 nm (Nucleinsäure-Absorption) sowie 280 nm (Protein-Absorption) im Photometer wurden Quantität und Reinheit der RNA wie folgt ermittelt:

$$OD_{260} = 44 \mu\text{g/ml RNA}$$

$$OD_{260}/OD_{280} = \text{Reinheit}$$

Es wurde ausschließlich mit Proben weitergearbeitet, deren OD₂₆₀ zwischen 0,1 und 1 und deren OD₂₆₀/OD₂₈₀ über 1,6 lag. Proben mit einer OD₂₆₀ < 0,1 wurden einer zusätzlichen RNA-Konzentrationsbestimmung (siehe unten) unterzogen.

2.2.8.2 RiboGreen® Sehr niedrige RNA-Mengen außerhalb des Sensitivitätsbereichs des Photometers wurden mithilfe des hochsensitiven RNA-bindenden Fluoreszenzfarbstoffs RiboGreen® bestimmt. Hierzu wurde eine 6-stufige Standardreihe des mitgelieferten rRNA-Standards (1:3-Verdünnungsschritte in mitgeliefertem TE-Puffer) im Bereich zwischen 0 und 1000 ng/ml rRNA hergestellt und die RNA-Proben in einer Verdünnung zwischen 1:30 und

1:50 [v/v] in mitgeliefertem TE-Puffer eingesetzt. Als Referenzwerte dienten entweder reiner TE-Puffer (Standard) oder TE-Puffer mit H₂O (1:30 bzw. 1:50, RNA-Proben). Die Fluoreszenz der Ansätze (jeweils Dupletts) wurde nach Zugabe eines Volumens Ribogreen® Reagenz (1:200 [v/v] in TE) und fünfminütiger Inkubation unter Lichtausschluss bei einer Anregungswellenlänge von 480 nm und einer Extinktionswellenlänge von 520 nm in einem Reaktionsendvolumen von jeweils 200 µl in schwarzen 96-well Platten bestimmt. Hierfür wurde ein Safire² Plate-Reader benutzt. Die Fluoreszenzwerte der Proben lagen immer zwischen 5000 und 50000, die der niedrigsten Standardverdünnung nahe 60000. Die RNA-Konzentrationen der Proben wurden mithilfe von Microsoft Office Excel anhand der Standard-Geradengleichung ermittelt.

2.2.9 Reverse Transkription

Bei der reversen Transkription wird mRNA unspezifisch mithilfe einer Reversen Transkriptase und Oligo-(dT)_x Primern in einzelsträngige cDNA umgeschrieben, welche dann als Template zur Amplifikation spezifischer Gene in der real-time PCR eingesetzt werden kann.

Zur reversen Transkription wurde das „RevertAid™ H Minus First Strand cDNA Synthesis Kit“ von Fermentas nach Anleitung des Herstellers verwendet. Es wurden immer zwischen 2,5 µl und 11 µl RNA (0,1 - 0,5 µg) eingesetzt. Die cDNA im Reaktionsansatz wurde entweder direkt zur real-time PCR eingesetzt oder alternativ einige Tage bei -20 °C gelagert.

2.2.10 Real-time PCR

Die quantitative real-time PCR ist eine Methode zur Vervielfältigung und gleichzeitigen Quantifizierung von DNA. Sie kann nach vorheriger reverser Transkription von mRNA zu cDNA Aufschluss über die relative und quantitative Expression von mRNA spezifischer Gene geben. Im Gegensatz zur Endpunktanalyse von Standard PCRs kann in der real-time PCR mithilfe Fluoreszenzmarkern die PCR-Produktmenge nach jedem einzelnen Zyklus beobachtet werden (siehe Abbildung 9A, Seite 33). Der erste signifikante Fluoreszenzanstieg der exponentiellen Phase (C_t = Threshold Cycle) korreliert dabei direkt mit der Ausgangsmenge an cDNA in der Reaktion.

2.2.10.1 Primerdesign Die Primer für die real-time PCR wurden Intron-überspannend entworfen, sodass mindestens einer der beiden Primer zum Teil das 3'-Ende eines Exons und zum Teil das 5'-Ende des benachbarten Exons abdeckte. So wurde gewährleistet, dass keine genomische DNA zusätzlich zur mRNA amplifiziert wurde. Die Amplikonlänge betrug 125 bis 150 bp. Die Primer wurden mithilfe der Programme „Oligonucleotide Properties Calculator“ und „IDT OligoAnalyzer 3.1“ so gewählt, dass sie keine Selbst- oder Heterodimere sowie Haarnadel-Strukturen bildeten, der G/C-Gehalt bei 40%-60% und die Schmelztemperatur zwischen 60 °C und 65 °C lag. Nucleotid-Repeats wurden vermieden und die BLAST-Analyse ergab keine weiteren Sequenzhomologien in der Biene. Die Primer-Sequenzen aller

Tabelle 3: Sequenzen der in der real-time PCR und Standard-PCR eingesetzten Primerpaare

Gen / ID	Sequenz der real-time PCR-Primer 5'- 3'		
<i>GLUT1 b</i> / 409933	for	AAGACTAGCCTTGAAACTACACG	
	rev	CAAGCTGCTCCTGCGTTAC	
<i>GLUT1 a</i> / 409424	for	CACCTCAGCAGCTTATTGAAG	
	rev	CACCAGAGAACCAACCGATC	
<i>EF1-alpha</i> / 544670	for	CCTCTTCAGGACGTATATAAAATCG	
	rev	AGCTTCGTGATGCATTCAACAG	
Sequenz der Standard-Primer 5'- 3'			
<i>GLUT1 b</i> / 409933	for	GGTCAGCGTTATGAGTATGAAC	
	rev	CCACTTGGTTACTGGCTCTC	
<i>GLUT1 a</i> / 409424	for	AGCAGGCTACAACAAGTACGC	
	rev	GCTCCAACACCCAATGTCGC	
<i>EF1-alpha</i> / 544670	for	GTTATTGGACACGTCGACTCTGG	
	rev	CCATTGCTGATTGACCAGGGTG	

in der real-time PCR verwendeten Primer sind in Tabelle 3 aufgelistet.

2.2.10.2 Durchführung der real-time PCR Die real-time PCR wurde mit dem Mx3000P QPCR System von Stratagene und der dazugehörigen Software durchgeführt. Beides wurde vom Institut für Genetik an der Universität des Saarlandes unter Leitung von Herrn Prof. Walter zur Verfügung gestellt.

Zur Detektion der Amplifikat-Menge wurde der interkalierende Fluoreszenzfarbstoff SYBR® Green benutzt, als Referenzfluorochrom Rox II. Die Reaktionsansätze wurden mit dem „Premix Ex Taq™ Perfect real Time“ von Takara in 96-well PCR-Platten pipettiert. Als Template für die Proben diente der Reaktionsansatz aus der reversen Transkription (siehe 2.2.9) unverdünnt oder 1:1 [v/v] in DNase- und RNase-freiem H₂O verdünnt. Die Templates der Standards (siehe 2.2.10.3) wurden in 6 Verdünnungsstufen (in DNase- und RNase-freiem H₂O) von 10⁷ bis 10² Moleküle/10µl eingesetzt. Nach dem Ansetzen der Reaktionen auf Eis wurden die Platten umgehend mit einem Klebefilm verschlossen, 1 min lang bei 1000xg und 4 °C abzentrifugiert und zum PCR-Lauf in den Cycler überführt. Zur Identifizierung unspezifischer PCR-Produkte anhand ihrer Schmelztemperatur wurde direkt im Anschluss an die real-time PCR eine Dissoziationskurve (Diss.-Kurve), wie in den Reaktionsbedingungen angegeben, im Programm erstellt (siehe auch Abbildung 9C). Die Ansätze und Reaktionsbedingungen sind im Folgenden aufgeführt:

Reaktionsansätze:		Proben:	Standards:	Reaktionsbedingungen:		
H ₂ O		9,1 µl	0,1 µl	Denaturierung	95 °C	3 min
Takara Premix		8 µl	8 µl			
Rox II		0,3 µl	0,3 µl	Denaturierung	95 °C	10 sec
SYBR® Green (1:5000)		1 µl	1 µl	Hybridisierung	58 °C	18 sec
Primer forward		0,3 µl	0,3 µl	Elongation	72 °C	18 sec
Primer reverse		0,3 µl	0,3 µl			
Template		1 µl	10 µl			
		20 µl	20 µl	Denaturierung	95 °C	30 sec
				Hybridisierung	58 °C	18 sec
				Denaturierung	95 °C	Diss.-Kurve
						30 sec

Zusätzlich wurden für jedes Gen Negativkontrollen ohne Template angefertigt. Jede Probe wurde stets als Triplet, die Standards und Negativkontrollen als Dupletts gemessen, deren C_t-Werte nicht mehr als 0,5 Zyklen voneinander abweichen durften.

Zur Auswertung wurden die vom Programm MxPro von Stratagene mittels der Standardgeraden (siehe 2.2.10.3) berechneten Kopienzahlen in Microsoft Office Excel exportiert und es wurden zunächst von jeder Probe die Verhältnisse zwischen GLUT1- und EF1-alpha-Kopienzahl zur Normierung gebildet, die im Folgenden auf den Mittelwert jedes Einzelexperiments normiert wurden. Die normierten Werte wurden entweder für Pearson Korrelationsanalysen und Regressionsanalysen mithilfe des Programms „Primer of Biostatistics“ eingesetzt oder es wurden Mittelwerte und Standardabweichungen gebildet und im t-Test statistisch ausgewertet.

2.2.10.3 Standardkurve Zur quantitativen Analyse der Proben wurde für jedes Gen eine Standardkurve mittels eines spezifischen cDNA-Standards definierter Kopienzahl erstellt. Durch die Auftragung der C_t-Werte gegen den Logarithmus (log) der Startkopienzahl jeder Standardverdünnung (1:10 in DNase- und RNase-freiem H₂O; 10⁷-10²) kann zum einen die Startkopienzahl der Proben an der Standardkurve abgelesen werden, zum anderen die Effizienz der PCR anhand der Steigung festgestellt werden (siehe Abbildung 9B). Die Effizienz lag bei den Experimenten immer zwischen 90% und 110%.

Die cDNA-Standards wurden für jedes in der real-time PCR quantifizierte Gen so gewählt, dass sie ein etwa 1000 bp großes Fragment des Gens repräsentierten, welches das spezifische Amplikon für die real-time PCR enthielt. Dazu wurde RNA aus drei Hirnen isoliert (siehe 2.2.6), revers transkribiert (siehe 2.2.9) und nach Bestimmung der cDNA-Konzentration (siehe 2.2.8) in einer Standard PCR (siehe 2.2.11) mit spezifischen Standard-Primerpaaren vervielfältigt (siehe Tabelle 3, Seite 31). Das PCR-Produkt wurde gelektrophoretisch aufgetrennt (siehe 2.2.12) und die Standard-cDNA aus dem Gel eluiert (siehe 2.2.13). Nach der Konzentrationsbestimmung der cDNA mit PicoGreen® (siehe 2.2.14) wurden die spezifischen Standards in DNase- und RNase-freiem H₂O auf eine Konzentration von 10⁸ Molekülen/10 µl verdünnt und in 1 ml-Aliquots bei -20 °C eingefroren.

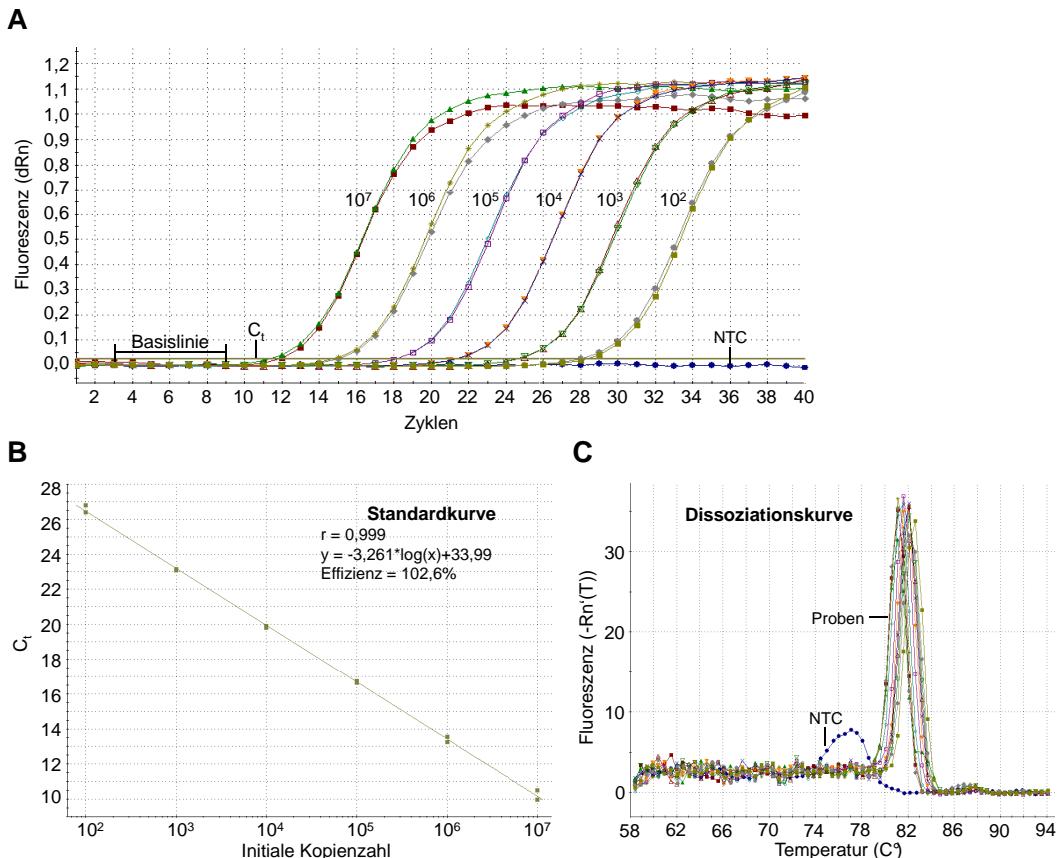


Abbildung 9: A: Beispiel einer Aufzeichnung der Amplifikation von cDNA-Standardproben in einem real-time PCR-Lauf. Die Standards wurden mit verschiedenen Anfangskopienzahlen, die sich jeweils um das 10-fache unterschieden (10^7 - 10^2) in die Reaktion eingesetzt. Die Negativkontrolle ohne Template (NTC) zeigt keine Amplifikation. Der C_t kennzeichnet den Zyklus, bei dem es zur ersten sichtbaren Fluoreszenzerhöhung der exponentiellen Phase der PCR kommt, und korreliert mit der Anfangskopienzahl der cDNA. Aufgetragen ist das Delta (Δ) der auf den Referenzfarbstoff RoxII normierten (n) Fluoreszenz (R) zur Basislinie [dRn] abhängig von der Zykluszahl. **B:** Beispiel einer Standardkurve wie sie aus der Auftragung der C_t -Werte gegen die Anfangskopienzahlen (log) der Standards aus A hervorgeht. Die Effizienz der PCR kann an der Steigung der Standardgeraden abgelesen werden. Bei optimaler Effizienz der PCR (100%; Verdopplung der PCR-Produktmenge pro Zyklus) liegen die C_t -Werte der 10-fachen Standardverdünnungen ($10 = 2^x$) um 3,32 Zyklen auseinander. **C:** Beispiel einer Dissoziationskurve der PCR-Produkte. Spezifische PCR-Produkte (Proben) zeigen einen Peak bei ihrer spezifischen Schmelztemperatur. In der Template-freien Negativkontrolle (NTC) können sich Primerdimere mit niedrigerer Schmelztemperatur bilden. Weitere Peaks bei höheren Temperaturen können Verunreinigungen der Proben mit genomischer DNA darstellen (hier nicht vorhanden). Aufgetragen ist die Fluoreszenzabnahme durch den Übergang von dsDNA in ssDNA bei der jeweiligen Temperatur (negative 1. Ableitung der auf den Referenzfarbstoff RoxII normierten Fluoreszenz nach der Temperatur [- $Rn'(T)$]) gegen die Temperatur.

2.2.11 Standard-PCR

Zur Gewinnung und Amplifikation der spezifischen cDNA-Standards wurde eine Standard-PCR (Maxima® Hot Start *Taq* DNA Polymerase, Fermentas) unter folgenden Bedingungen durchgeführt:

Reaktionsansätze:		Reaktionsbedingungen:		
H ₂ O	32,1 µl	Denaturierung	95 °C	4 min
10x Puffer	5 µl	Denaturierung	95 °C	45 sec
MgCl ₂	4 µl (25 mM)	Hybridisierung	58 °C	45 sec
dNTPs	1 µl (je 10 mM)	Elongation	72 °C	45 sec
Primer forward	2,5 µl (je 10 mM)	35 Zyklen		
Primer reverse	2,5 µl (je 10 mM)			
Polymerase	0,4 µl (5u/µl)			
Template	2,5 µl (~120 ng)			
	50 µl	Finale Elongation		

Die Primer-Sequenzen aller Standard-Primer sind in Tabelle 3 (Seite 31) aufgeführt. Es wurden zwei Reaktionsansätze pro Gen angefertigt.

2.2.12 Agarose-Gelelektrophorese

Bei der Agarose-Gelelektrophorese wandern Nucleinsäuren aufgrund ihrer negativen Ladung im elektrischen Feld zur Anode und werden in der Gelstruktur ihrer Größe nach aufgetrennt.

Die gesamten PCR-Ansätze für die cDNA Standards (siehe 2.2.11) wurden nach der Amplifikation mit Ladepuffer versetzt (jeweils 50 + 10 µl) und auf ein 1%iges Agarosegel mit Ethidiumbromid geladen. Zusätzlich wurden 5 µl eines DNA-Standards aufgetragen. Das Gel lief eine Stunde bei 60 V in einer mit TAE-Puffer gefüllten Gelkammer.

2.2.13 Gelextraktion

Nach der Auftrennung der PCR-Produkte für die Standardherstellung im Agarosegel wurden die spezifischen Banden mit der Größe von etwa 1000 bp aus dem Gel extrahiert. Hierzu wurden die Banden kurz auf einer UV-Lampe sichtbar gemacht und mit einem Skalpell ausgeschnitten (jeweils beide nebeneinander liegenden Banden derselben PCR-Ansätze zusammen). Die Extraktion erfolgte mit dem Gelextraktionskit „Peq Gold Gel Extraction Kit“ von Peqlab nach Anleitung des Herstellers. Die cDNA wurde im letzten Schritt mit 80 µl des mitgelieferten Elutionspuffers eluiert.

2.2.14 Konzentrationsbestimmung der cDNA-Standards mit PicoGreen®

Zur möglichst präzisen Konzentrationsbestimmung der aus dem Gel eluierten Standard-cDNA wurde der hochsensitive, DNA doppelstrangbindende Fluoreszenzfarbstoff PicoGreen® benutzt. Es wurde eine Standardreihe aus der mitgelieferten Lambda-DNA hergestellt wie auch in Abschnitt 2.2.8 (RiboGreen®) beschrieben. Die cDNA-Proben wurden ebenfalls in 1:30 oder 1:50 [v/v] Verdünnungen in mitgeliefertem TE-Puffer eingesetzt, während deren Referenzansätze mit Elutionspuffer aus dem Gelextraktionskit (siehe 2.2.13) angesetzt wurden. Die weitere Vorgehensweise war analog zur RiboGreen®-Messung (siehe 2.2.8).

2.2.15 Herstellung polyklonalter Antikörper

Auf Grund der fehlenden Verfügbarkeit kommerzieller Antikörper, welche mit der Sequenz der beiden GLUT1-Isoformen der Honigbiene kompatibel sind, wurden mittels synthetischer Peptide polyklonale Antikörper in Ratten hergestellt.

2.2.15.1 Peptiddesign Als Antigen zur Immunisierung der Ratten wurde jeweils ein Peptid aus der Aminosäuresequenz der beiden GLUT1-Isoformen ausgewählt, welches möglichst hydrophil ist und sich laut Voraussagen gut zugänglich außerhalb von Transmembrandomänen befindet. Dazu wurde ein frei verfügbares Programm (PBIL Network Protein Sequence Analysis, siehe 2.1.9) zu Hilfe genommen. Außerdem wurde N-terminal ein Cysteinrest angehängt, der über seine Thiol-Gruppe die Kopplung an die Trägersubstanzen (siehe 2.2.15.2) ermöglicht. Die Sequenzen der Peptide sind in Tabelle 4 aufgeführt.

Tabelle 4: Sequenzen der synthetischen Peptide zur Immunisierung von Ratten gegen GLUT1 der Honigbiene.

Protein (NCBI Accession / Gen ID)	Peptidsequenz
GLUT1 a (XP_392938.2 / 409424)	CETENDKSSNKIQE
GLUT1 b (XP_393425.2 / 409933)	CDRLEEHSHRRKLR

2.2.15.2 Kopplung der Peptide an Trägerproteine Als hoch immunogene Trägerproteine dienten BSA, KLH und „Imject Maleimide Activated Blue Carrier Protein“. Zur Kopplung an BSA oder KLH wurden jeweils 1 mg des Peptids mit 1 mg BSA bzw. KLH und 10 µl des Crosslinkers Glutardialdehyd (25%) in einem Endvolumen von 1 ml (in Phosphatpuffer pH 7,5) 2 h bei RT inkubiert. Die Reaktion wurde 30 min lang durch Zugabe von 100 µl 1 M Glycin abgestoppt und bei 4°C in PBS diaysiert (siehe 2.2.15.3). Aliquots der gekoppelten Peptide wurden bei -20°C gelagert.

Die Kopplung an „Imject Maleimide Activated Blue Carrier Protein“ erfolgte in einem 200 μ l-Ansatz aus 1 mg Peptid und 1 mg des Trägerproteins in Phosphatpuffer (pH 6,8). Nach einer zweistündigen Inkubation bei RT wurde der Ansatz in PBS (pH < 7,5) dialysiert (siehe 2.2.15.3) und innerhalb von 2 Wochen verwendet.

2.2.15.3 Dialyse Zur Vorbereitung des Dialyseschlauchs wurde dieser zunächst in etwa 800 ml bidestilliertem Wasser gekocht. Nach kurzem Schwenken in Wasser wurde er erneut in bidestilliertem Wasser gekocht, welches mit einem Teelöffel EDTA versetzt wurde. Der Schlauch wurde nach einem weiteren Waschschritt mit Wasser bei 4 °C in bidestilliertem Wasser mit etwas NaN₃ gelagert.

Zur Dialyse der Peptide im Reaktionsgefäß wurden die Öffnungen der Gefäße wasser-tight mit Dialyseschlauch überspannt und mit einem Schwimmer in ein mit PBS befülltes Becherglas gegeben, welches über Nacht bei 4 °C auf einen Rührer gestellt wurde.

2.2.15.4 Immunisierung der Ratten Zur Immunisierung wurden acht Wochen alte Lewis-Ratten aus Eigenzucht verwendet. Sie wurden insgesamt 4x im Abstand von jeweils drei Wochen durch subkutane Injektion des mit Stimune Adjuvans versetzten gekoppelten Peptids (jeweils 100 μ l; 0,1 mg Peptid) immunisiert. Die erste Injektion wurde mit BSA-gekoppeltem Peptid, die zweite Injektion mit KLH-gekoppeltem Peptid vorgenommen. Nach zwölf Tagen wurden Blutproben der Ratten entnommen und im Westernblot auf den Antikörpertiter und die Spezifität getestet (nicht gezeigt). Es folgten zwei weitere Injektionen mit je 0,5 mg des an „Imject Maleimide Activated Blue Carrier Protein“ gekoppelten Peptids (100 μ l + 100 μ l Adjuvans).

2.2.15.5 Serumgewinnung aus Rattenblut Die Ratten wurden 16 Tage nach der letzten Immunisierung durch CO₂-Begasung getötet und das Blut durch Herzpunktion mit einer heparinisierten Spritze entnommen. Das die Antikörper enthaltende Rattenserum wurde durch 15 min lange Zentrifugation des Blutes bei 2400xg gewonnen. Der Überstand wurde aliquo-tiert und bei -20 °C gelagert.

2.2.16 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Durch das anionische Tensid SDS werden Proteine denaturiert und erhalten eine stark negative Ladung, sodass sie im elektrischen Feld zur Anode wandern und im Gel ihrer Größe nach aufgetrennt werden. Die Homogenate von Bienenhirnen wurden einer Auf trennung unterzogen, um spezifische Banden der zu untersuchenden Proteine GLUT1 und AMPK zu erhalten.

2.2.16.1 Probenvorbereitung Die Gehirnhomogenate wurden hergestellt, indem 2 Hirne in 400 μ l (GLUT1) bzw. 200 μ l (AMPK α und phospho-AMPK α) Homogenisierungspuffer

(PBS, 1 mM EDTA) im Glashomogenisator auf Eis homogenisiert wurden. Im Anschluss wurden die Homogenate mit 1/5 Volumen 2-mercaptoethanol- und SDS-haltigem Probenpuffer versetzt und 5 min bei 95 °C im Heizblock erhitzt.

2.2.16.2 Herstellung des Gels Im Folgenden wurde eine diskontinuierliche SDS-PAGE nach Laemmli durchgeführt, wobei ein 4%iges Sammelgel und ein 10%iges Trengel gegossen wurde. 200 μ l der oben beschriebenen Homogenate wurden in eine Tasche des Gels gegeben, parallel dazu 5 μ l eines Protein-Standards von New England Biolabs (GLUT1) oder Invitrogen (AMPK α und phospho-AMPK α) in eine benachbarte Tasche. Das Gel lief bei einer konstanten Stromstärke von 20 mA etwa 1 h lang in einer mit SDS-Laufpuffer gefüllten Kammer.

2.2.17 Westernblot

Beim Westernblot werden Proteine nach ihrer Auftrennung im SDS-Gel durch Anlegen eines elektrischen Feldes aus dem Gel auf eine Nitrocellulose-Membran überführt. Auf der Membranoberfläche sind sie schließlich für Immunreaktionen erreichbar. Die Methode diente zur Überprüfung der Funktionsfähigkeit und Spezifität der hergestellten GLUT1-Antikörper im Rattenserum sowie der kommerziellen AMPK α und phospho-AMPK α Antikörper.

Das Gel wurde im semi-dry System 40 min lang bei 20 V und 0,4 A auf die in Blotpuffer äquilibrierte Membran geblottet. Im Anschluss wurde die Membran in Blockpuffer mit 2% BSA [w/v] (GLUT1) bzw. 0,5% BSA [w/v] (AMPK α und phospho-AMPK α) 1 h bei Raumtemperatur (RT) geblockt und danach in einzelne Streifen geschnitten, welche in den beiden GLUT1-Serumlösungen bzw. AMPK α - und phospho-AMPK α Antikörperlösungen (alle 1:1000 [v/v] im jeweiligen Blockpuffer) oder in reinem Blockpuffer (Negativkontrolle) über Nacht bei 4 °C inkubiert wurden. Die Membranstreifen wurden unter Leitungswasser abgespült und nach 3x 5 min Waschen mit Waschpuffer (PBS; 0,4 M NaCl; 0,1% Tween [v/v] für GLUT1) bzw. mit PBS (für AMPK α und phospho-AMPK α) 1 h lang im sekundären, Peroxidase-gekoppelten Antikörper (1:10000 im jeweiligen Blockpuffer) inkubiert. Die Streifen wurden erneut 3x gewaschen, in Luminol-Reagenz und Peroxid-Substrat (1:1) getaucht und auf einem Röntgenfilm entwickelt.

2.2.18 Dotblot

Der Dotblot stellt eine vereinfachte Form des Westernblots zur immunologischen Detektion und Analyse von Proteinen dar, ohne dass eine vorherige Auftrennung der Proteine erfolgt. Im Gegensatz zur ELISA-Technik (siehe 2.2.19) können die Proteine hier auch in denaturierter Form eingesetzt werden. Mit dieser Methode wurden die Spezifität der GLUT1-Antikörper für ihre Immunisierungspeptide sowie die GLUT1-Proteinexpression im Bienenhirn untersucht.

2.2.18.1 Probenvorbereitung Die an BSA gekoppelten Immunisierungspeptide GLUT1 a und GLUT1 b (siehe 2.2.15.2) wurden 1:3 (GLUT1 a) bzw. 1:10 (GLUT1 b) in Homogenisierungspuffer (PBS, 1mM EDTA) vorverdünnt.

Zur Herstellung der Gehirnhomogenate wurde jeweils ein Hirn in 150 μ l Homogenisierungspuffer auf Eis homogenisiert.

Im Folgenden wurden sowohl für die Peptid-Proben als auch für die Gehirnhomogenate 4-stufige Verdünnungsreihen (1:3-Schritte) in Homogenisierungspuffer hergestellt. Die Proben wurden mit 1/5 Volumen 2-mercaptoethanol- und SDS-haltigem Probenpuffer versetzt und 5 min bei 95 °C im Heizblock gekocht. Bei den Gehirnhomogenaten wurde zusätzlich eine Negativkontrolle aus reinem Homogenisierungspuffer mitgeführt.

2.2.18.2 Erstellen des Dotblots Jeweils 1,5 μ l der Proben wurden mittels einer Achtkanal-Pipette auf eine in Blotpuffer äquilibrierte Nitrocellulose-Membran pipettiert, welche direkt im Anschluss 1 h bei RT in Blockpuffer (mit 2% BSA [w/v]) geblockt wurde. Die weitere Prozedur verlief äquivalent zum Westernblot mit GLUT1-Antikörpern (siehe 2.2.17) mit einer verkürzten Inkubationszeit des GLUT1-Serums (1 h bei RT). Zudem wurden die primären GLUT1-Antikörper für die Peptid-Proben in einer Verdünnung von 1:10000 eingesetzt.

Die Auswertung wurde mithilfe des Programms ImageJ und mit Microsoft Office Excel vorgenommen. Dabei wurden die Grauwerte der einzelnen Probenverdünnungen auf dem entwickelten Film bestimmt und so wurde für jede Probe eine Steigung berechnet, deren Bestimmtheitsmaß nicht < 0,8 sein durfte. Die Mittelwerte der Steigungen wurden, zunächst auf den Mittelwert jedes Einzelexperiments und schließlich auf den Mittelwert einer Gruppe normiert, mit Standardabweichungen aufgetragen und im t-Test statistisch analysiert.

2.2.19 Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA)

Der ELISA ist ein immunologisches Verfahren, mit dem native Antigene mittels enzymatischen Farbreaktionen quantitativ nachwiesen werden können. Diese Technik diente zur Quantifizierung von Vitellogenin (Vg) im Abdomen der Honigbiene sowie zur Bestimmung der AMPK-Aktivität im Bienenhirn.

2.2.19.1 Probenvorbereitung Zur Bestimmung der Vitellogeninmenge wurde das Abdomen einer auf Eis immobilisierten Biene mit einem Skalpell abgetrennt und der Darm zusammen mit dem Stechapparat mit einer Pinzette aus dem Abdomen gezogen. Die darmfreien Abdomen wurde in jeweils 300 μ l Homogenisierungspuffer (PBS, 1 mM EDTA, 1 M Harnstoff) in einem Glashomogenisator auf Eis homogenisiert. Weiterhin erfolgte eine 1:50-Verdünnung der Homogenate in Homogenisierungspuffer mit Harnstoff und ein dreiminütiger Zentrifugationsschritt bei 8000xg zum Entfernen von Gewebe- und Kutikularesten. Beim Auftragen auf die 96-well Platte (Immuno-Plate) wurden die Proben zunächst noch einmal

1:3 verdünnt und schließlich wurde eine 3-stufige Verdünnungsreihe in Homogenisierungspuffer mit Harnstoff (1:3-Schritte) vorgenommen.

Zur Bestimmung der AMPK-Aktivität im Bienenhirn wurde jeweils ein Hirn auf Eis in 500 μ l Homogenisierungspuffer (PBS, 1 mM EDTA, 1 M Harnstoff) aufgenommen und, wie oben beschrieben, homogenisiert. Die Proben wurden hier beim Auftragen auf die Platten noch einmal 1:4 verdünnt und die Verdünnungsreihe bestand aus 5 Stufen in 1:2-Verdünnungsschritten.

2.2.19.2 Durchführung des ELISA Nach der Auftragung der Homogenat-Verdünnungsreihen und zusätzlichen homogenatfreien Negativkontrollen (jeweils 100 μ l) folgte eine einstündige Inkubation bei RT (Coating). Anschließend wurden in jeder Kavität unspezifische Bindungsstellen mit 400 μ l Blockpuffer (PBS, 0,5% BSA [w/v]) 1 h bei RT abgeblockt und die Inkubation mit dem primären Antikörper (je 50 μ l) erfolgte über Nacht bei 4°C auf dem Schüttler. Die primären Antikörper wurden wie folgt eingesetzt:

Vitellogenin (dialysierter Zellüberstand): 1:2000 [v/v] in Blockpuffer mit NaN₃;

AMPK α und phospho-AMPK α : 1:1000 [v/v] in Blockpuffer mit NaN₃.

Die Antikörper wurden wiederverwendet, weshalb sie mit NaN₃ versetzt wurden. Die Platten wurden 3x 3 min mit PBS gewaschen und mit jeweils 50 μ l des sekundären, Alkalische Phosphatase-gekoppelten Antikörpers (anti-Maus IgG (Vg) und anti-Kaninchen IgG (AMPK α , phospho-AMPK α) jeweils 1:4000 [v/v] in Blockpuffer) 1 h bei RT inkubiert. Nach weiteren drei Waschschritten mit PBS wurden 200 μ l Färbelösung (1 mM p-NPP in RxN-Puffer) zugegeben und die Platten wurden bis zur Gelbfärbung bei 37°C aufbewahrt. Es folgte eine Absorptionsmessung im Safire² Plate-Reader bei 405nm.

Aus den Absorptionswerten der Verdünnungsreihen ließen sich in Microsoft Office Excel Steigungen und Bestimmtheitsmaße berechnen. Vitellogeninmengen wurden über die Mittelwerte (mit Standardabweichungen) der Steigungen im statistischen t-Test (ungepaart) verglichen, während zur Bestimmung der AMPK-Aktivität zunächst das Verhältnis der Steigungen phospho-AMPK α /AMPK α für jede Probe gebildet wurde. Aus den Verhältnissen wurden schließlich ebenfalls Mittelwerte und Standardabweichungen gebildet, die auf eine Gruppe normiert wurden. Die statistische Auswertung erfolgte mit dem ungepaarten t-Test.

2.2.20 Histologie

Es wurden zum einen histologische Präparate des Abdomens der Biene zur Immunfärbung von Vitellogenin angefertigt, zum anderen Präparate des Bienenhirns zur Lokalisierung von GLUT1. Für die Vg-Färbung wurde das Gewebe mit Carnoy-Lösung fixiert, während für die GLUT1-Färbung eine Formol-Fixierung vorgenommen wurde.

2.2.20.1 Carnoy-Fixierung des Abdomens Das Abdomen einer auf Eis betäubten Biene wurde abgetrennt und mit einer feinen Präparierschere seitlich längs aufgeschnitten. Es

wurde in Carnoy-Lösung (siehe 2.1.3.8) überführt, wo es 4 h bei RT fixiert wurde. Nach 2 Waschschritten (jeweils 30 min) in absolutem Ethanol erfolgte eine Inkubation über 1 h bei RT in Isopropylalkohol. Die Abdomen wurde im Anschluss erneut 1 h in Isopropylalkohol bei 45 °C inkubiert. Nachfolgend wurden sie für 1 h in ein Isopropylalkohol-Paraffingemisch (1:1) bei 70 °C überführt und schließlich über Nacht in flüssigem Paraffin bei 60 °C im Wärmeschrank aufbewahrt.

2.2.20.2 Formol-Fixierung des Gehirns Zur Formol-Fixierung des Gehirns wurde der Kopf einer auf Eis betäubten Biene abgetrennt und auf einem Wachsblock immobilisiert. Nach dem Öffnen der Kopfkapsel und dem Entfernen der Drüsen (siehe auch 2.2.6) wurde das Gehirn zunächst in der Kopfkapsel durch das Aufbringen eines Tropfens 4%iger Formaldehyd-Lösung 30 min lang vorfixiert, bevor es herauspräpariert und weitere 2,5 h in 4%iger Formaldehyd-Lösung fixiert wurde. Nachfolgend wurden die Hirne 3x 15 min in PBS gewaschen und zum Entwässern zunächst 1 h bei RT oder über Nacht bei 4 °C auf dem Schüttler in 60% Isopropylalkohol aufbewahrt. Es folgte eine aufsteigende Isopropylalkohol-Reihe (90% und 100%), in der die Hirne jeweils 1 h inkubierten und der absolute Alkohol 2x erneuert wurde. Danach wurde eine weitere Inkubation in 100% Isopropylalkohol bei 45 °C vorgenommen und die Hirne wurden anschließend in einem Isopropylalkohol-Paraffingemisch (1:1) bei 70 °C inkubiert. Die Hirne wurden über Nacht bei 60 °C in flüssigem Paraffin aufbewahrt.

2.2.20.3 Anfertigung der histologischen Schnitte von Abdomen und Gehirn Am Folgetag der oben beschriebenen Fixierungen der Abdomen und Hirne wurde das Paraffin zunächst erneuert und nach dem Aushärten (etwa 2 h) konnte das Gewebe ausgeblockt werden. Für das Schneiden am Mikrotom wurden kleine Paraffinblöcke zurechtgeschnitten und 7 µm dünne Serienschnitte angefertigt (Hirn: frontal, Abdomen: transversal), welche nachfolgend mit H₂O dest. auf einen mit Poly-L-Lysin beschichteten Glasobjektträger aufgebracht wurden. Die Objektträger wurden zum Strecken und Trocknen auf eine 40 °C warme Heizplatte überführt und über Nacht bei 45 °C im Trockenschrank aufbewahrt.

2.2.20.4 Immunfärbung und Mikroskopie der histologischen Präparate Für die Antikörperfärbung mussten die Schnitte entparaffiniert werden, indem die Objektträger zunächst 2x 5 min in Xylol und im Folgenden jeweils 2 min in eine absteigende Ethanolreihe (96%, 90%, 80%, 70%, 50%) und schließlich H₂O dest. überführt wurden. Die Präparate wurden 30 min in Blockpuffer (PBS; 0,5% BSA; 0,1% Triton) geblockt und bei 4 °C über Nacht mit dem primären Antikörper (Vg und GLUT1 jeweils 1:500 in Blockpuffer) inkubiert. Nach 3 Waschschritten (je 5 min) in PBS-T erfolgte die Inkubation mit dem fluoreszenzmarkierten (CyTM3) Sekundärantikörper (anti-Maus IgG (Vg) und anti-Ratte IgG (GLUT1) jeweils 1:500 [v/v] in Blockpuffer) über 1,5 h bei RT. Drei weitere Waschschritte in PBS-T (je 5 min) schlossen sich an und die Schnitte wurden durch Aufbringen eines Tropfens Glycerin-H₂O dest.

(1:1) mit einem Deckgläschen abgedeckt. Ab der Behandlung mit Blockpuffer wurden sämtliche Schritte in einer abgedunkelten Schale durchgeführt. Die gefärbten Präparate konnten im Kühlschrank gelagert werden.

Die Mikroskopie und Fotografie der Gewebeschnitte erfolgte mittels eines inversen Fluoreszenzmikroskops (Axiovent 200 M; Zeiss) und einer Kamera (Cool Snap HQ²⁺, Photometrics).

3 Ergebnisse

3.1 Etablierung der Hämolympghglucose-Bestimmung in der Honigbiene

Zunächst war das Ziel, von einer einfachen und schnellen Messmethode Gebrauch zu machen, die es zuließ, den Hämolympghglucosespiegel mehrfach in der lebenden Biene zu bestimmen. Eine Möglichkeit hierzu bot die Verwendung eines kommerziellen Blutglucosemessgerätes, welches Glucose in kleinsten Volumina menschlichen Vollbluts innerhalb weniger Sekunden amperometrisch in einer Glucose-Oxidationsreaktion zu messen vermag. Diese Art der Glucosebestimmung wurde im Rahmen dieser Arbeit leicht abgewandelt und zur Anwendung auf die Hämolymphe der Honigbiene etabliert. In früheren Arbeiten [28,54,55,234] wurden bereits Messtechniken angewendet, die ebenfalls auf Redoxreaktionen beruhten, jedoch anhand von Farbreaktionen optisch ausgewertet werden mussten.

In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass die Hämolymphe vor jeder Messung mindestens 1:2 mit NaHCO_3 -gepuffertem Humanringer versetzt werden musste, um verlässliche Werte zu liefern, da das Gerät auf menschliches Vollblut kalibriert ist. Wie in Abbildung 10 dargestellt, wurde die Funktionsfähigkeit der Methode in mehreren Experimenten demonstriert. Die Zugabe linear aufsteigender Konzentrationen Glucose (gelöst in NaHCO_3 -gepuffertem Humanringer) zu Hämolympfproben führte zu einem linearen Anstieg der Messwerte (siehe Abbildung 10A). Zudem ließ sich bei stufenweiser Verdünnung der Hämolymphe in NaHCO_3 -gepuffertem Humanringer ebenfalls eine lineare Abnahme der Messwerte verzeichnen (siehe Abbildung 10B).

Weiterhin wurde die unspezifische Detektion von Trehalose neben Glucose ausgeschlossen. Trehalose ist ein Disaccharid aus zwei α -glykosidisch verknüpften Glucosemolekülen, welches als Speicherzucker in der Hämolymphe von vielen Insekten, nicht jedoch in Humanblut vorkommt [241]. Während die Zugabe von Glucose zu Hämolympfproben in der Messung detektiert wurde, führte die Zugabe von Trehalose jedoch zu keiner Erhöhung der Messwerte gegenüber der mit reinem Puffer versetzten Proben (siehe Abbildung 10C).

Die Spaltung von Trehalose in zwei Glucosemoleküle durch die Aktivität von α -Glucosidasen in der Hämolymphe führt auch nach der Probenentnahme zu einem zeitlichen Anstieg der Glucosekonzentration in der Hämolymphe [36]. Es konnte jedoch dokumentiert werden, dass weder zugegebene Trehalose noch Glucose diesen Vorgang beschleunigen (siehe Abbildung 10D). Somit wurde ein Einfluss individueller Trehalosemengen auf das Ergebnis der Glucosemessung, die stets im gleichen zeitlichen Abstand zur Hämolympfentnahme stattfand, ausgeschlossen.

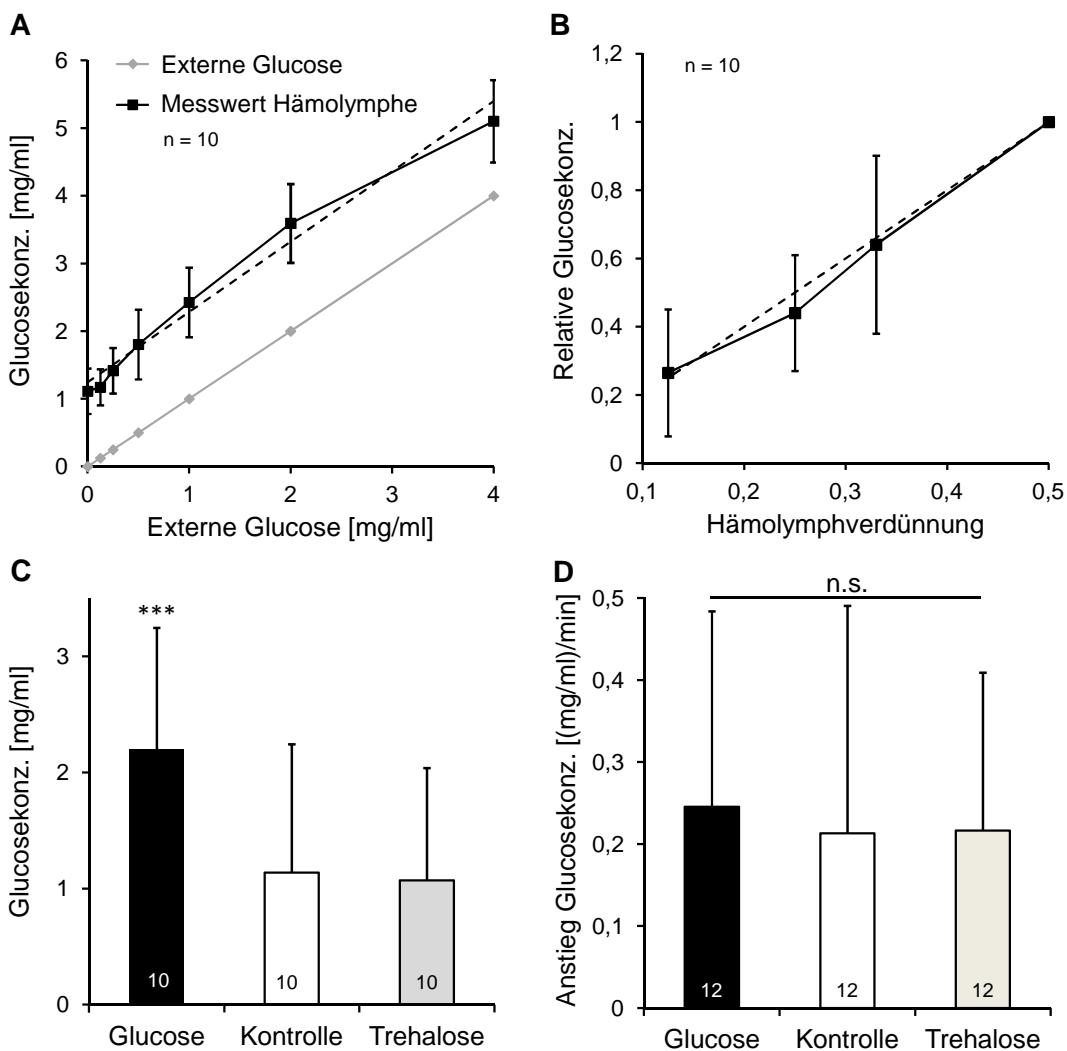


Abbildung 10: Etablierung der HämolympghGlucose-Bestimmung. **A:** Hämolympfproben wurden in 7 Proben aufgeteilt, welche mit externer Glucose linear ansteigender Konzentrationen versetzt und gemessen wurden (Mittelwerte und Standardabweichungen). Die Steigung der Glucose-Messwerte aus den Hämolympfproben ist identisch zur Steigung der zugegebenen Glucosekonzentrationen. Spearman Korrelation: $r = 0,9$; $p \leq 0,001$; - - - Trendlinie. **B:** Verdünnungsreihe der Hämolympfproben: Die Messwerte sind als relative Werte zur 1:2-Verdünnung aufgetragen (Mittelwerte und Standardabweichungen) und stimmen mit dem erwarteten Verlauf (---) der Verdünnungsreihe überein. Die ursprünglichen Werte der 1:2-Verdünnungen liegen im Bereich von 0,23 mg/ml bis 3,12 mg/ml Glucose. Spearman Korrelation: $r = 0,8$; $p \leq 0,001$. **C:** Hämolympfproben wurden in An- oder Abwesenheit von 1 mg/ml externer Glucose oder Trehalose gemessen (Mittelwerte und Standardabweichungen). Der Assay erkennt spezifisch Glucose, nicht Trehalose. Gepaarter t-Test; ***: $p \leq 0,001$. **D:** Der durch Spaltung von Trehalose verursachte Anstieg der Glucosekonzentration/min in entnommener Hämolymphe wurde berechnet, indem in jeder Probe eine Doppelbestimmung der Glucosekonzentration 20 sec sowie 2 min nach Entnahme vorgenommen wurde. Die Proben wurden zuvor aufgeteilt und mit 1 mg/ml Glucose oder Trehalose bzw. Ringer versetzt. Der Anstieg (Mittelwerte und Standardabweichungen) ist unter allen drei Bedingungen identisch und unabhängig vom momentanen Zuckergehalt der Hämolymphe. Gepaarter t-Test. Die Zahlen in den Balken sowie n geben die Anzahl der unabhängigen Hämolympfproben an.

3.2 Die Heterogenität und Dynamik des Hämolympghlucosespiegels bei der Honigbiene

Bei Säugern wird die Blutglucose durch ein komplexes Regulationssystem stets in einem engen Rahmen gehalten und weicht im Normalfall selbst nach der Nahrungsaufnahme und nach längeren Hungerperioden kaum vom Basiswert ab. Bei der Biene hingegen ist bereits aus früheren Arbeiten bekannt, dass die Hämolympghlucose abhängig vom Fütterungsstatus hoch variabel ist und schnellen Änderungen unterliegt [2, 55, 234]. In Abbildung 11 ist die Kinetik des Hämolympghlucosespiegels bei Fütterung von 30 μ l Saccharoselösung bei gehungerten Bienen dargestellt. Bereits 3 min nach Fütterung zeigte sich trotz der hohen Variabilität der Werte ein hoch signifikanter Anstieg des Glucosespiegels, während das Maximum nach 10 min erreicht war und etwa das Fünffache des Wertes im gehungerten Zustand betrug. Dieser stark dynamische Verlauf des Glucosespiegels bei Fütterung stimmt zunächst in etwa mit den Befunden aus früheren Arbeiten überein. Die auffällige Heterogenität bei gleicher Behandlung der Tiere wurde hingegen bisher nicht näher untersucht.

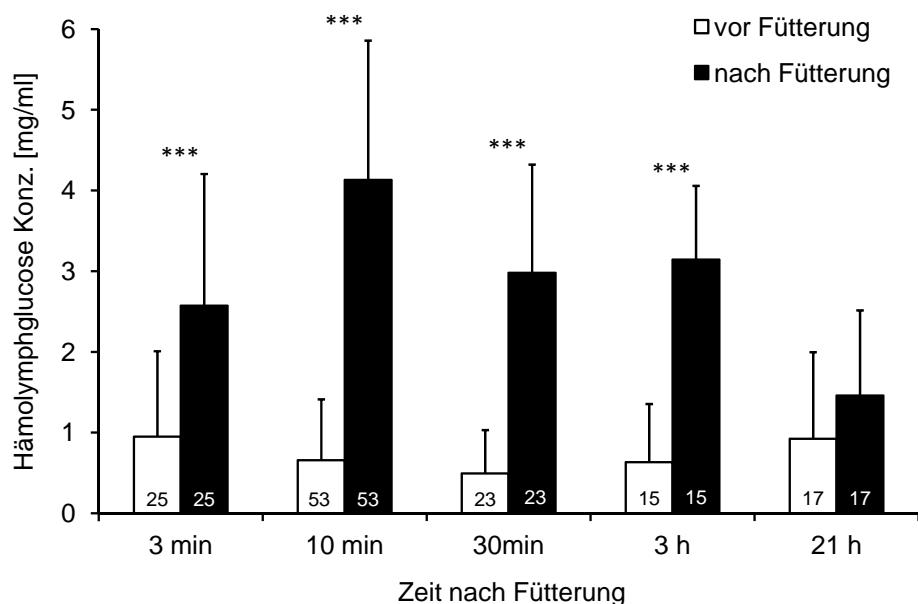


Abbildung 11: Kinetik des Hämolympghlucosespiegels nach Fütterung. Der Hämolympghlucosespiegel jeden Tieres wurde vor der Fütterung mit 30 μ l Saccharoselösung und zu mindestens einem weiteren Zeitpunkt gemessen (gepaarter t-Test; ***: $p \leq 0,001$). Der Glucosespiegel vor der Fütterung unterscheidet sich zwischen den verschiedenen Zeitpunkten nicht (ungepaarter t-Test). Mittelwerte und Standardabweichungen sind dargestellt. Die Zahlen in den Balken geben die Anzahl der Versuchstiere an.

Aus diesem Grund wurde im Folgenden die individuelle Abnahme des Glucosespiegels betrachtet, welche einen möglichen Faktor darstellt, der mit der enormen Variabilität des Hämolympghlucosespiegels in Zusammenhang steht. Abbildung 12 zeigt zum einen, wie stark sich Einzeltiere - trotz identischer Fütterung - in ihrem individuellen Glucosespiegel kurz

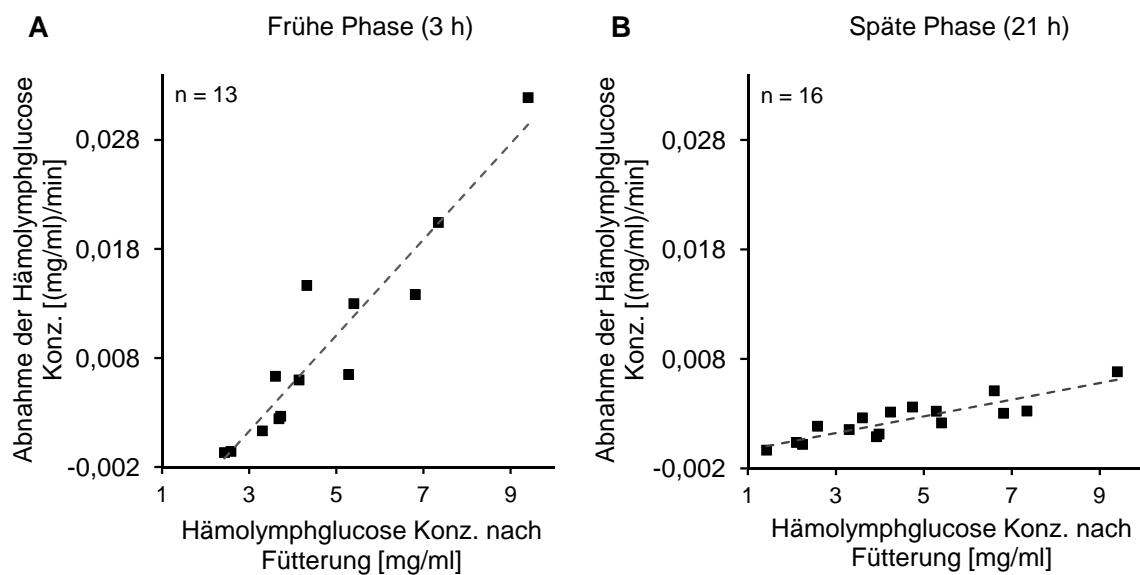


Abbildung 12: Abhängigkeit zwischen dem Hämolympgh glucosespiegel und dessen Abnahme nach Fütterung. Der Glucosespiegel wurde zweimal pro Tier bestimmt, 3 bis 10 min nach der Fütterung mit $30 \mu\text{l}$ Saccharoselösung (nach Fütterung) sowie noch einmal nach 3 h (A) oder 21 h (B). Die Abnahme pro Minute zeigt dabei eine frühe, schnelle (A) sowie eine späte, langsame (B) Phase und korreliert jeweils positiv mit der Hämolympgh glucose nach Fütterung. Spearman Korrelation: A: $r = 0,9$; $p \leq 0,001$; B: $r = 0,9$; $p \leq 0,001$. n = Anzahl der Versuchstiere.

nach Fütterung unterschieden. Zum anderen wird deutlich, dass die Abnahme des Glucosespiegels, sowohl über einen mittleren (3 h, siehe Abbildung 12A) als auch einen längeren Zeitraum (21 h, siehe Abbildung 12B), stark mit dem individuell erreichten Wert der Hämolympgh glucosekonzentration kurz nach Fütterung korrelierte. Die Abnahme des Glucosespiegels ließ weiterhin zwei Phasen erkennen, eine frühe, schnelle Phase, die sich über 3 h nach Fütterung erstreckte (siehe Abbildung 12A) und eine späte, langsame Phase bis 21 h nach Fütterung (siehe Abbildung 12B).

Umgekehrt konnte auch demonstriert werden, dass lediglich Bienen mit niedrigem Glucosespiegel nach einer definierten Zeit des Hungerns einen hoch signifikanten Anstieg des Hämolympgh glucosespiegels nach erneuter Fütterung zeigten. Dieser Anstieg blieb hingegen bei Tieren mit hohem Glucosespiegel aus (Abbildung 13).

Dies legte eine grundlegend unterschiedliche Dynamik des Hämolympgh glucosespiegels zwischen exakt gleich behandelten Individuen nahe, sodass die Flieger-Population diesbezüglich ein Kontinuum verschiedener Phänotypen bildet. So blieb im Zuge dieser Arbeit die Frage zu klären, welche physiologischen Auswirkungen die in diesem Kapitel beschriebenen, auffällig unterschiedlichen Zustände und Veränderungen des Hämolympgh glucosespiegels bei verschiedenen Individuen haben.

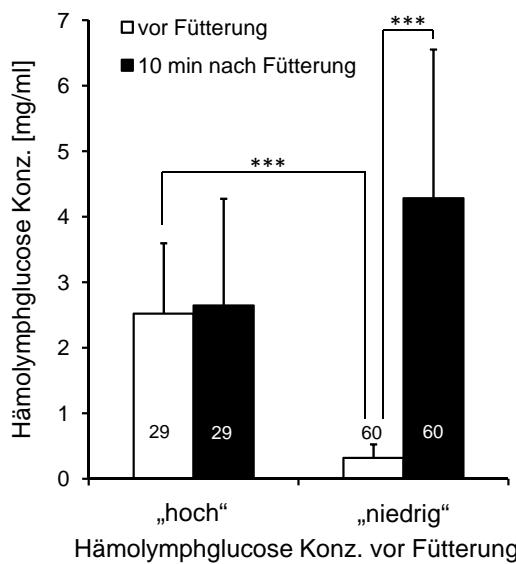


Abbildung 13: Der Anstieg des Hämolympgh glucosespiegels nach Fütterung beschränkt sich auf Tiere mit niedrigem Glucosespiegel. Der Hämolympgh glucosespiegel gehungerter Tiere wurde einmal vor der Fütterung bestimmt und ein zweites Mal 10 min nach der Fütterung mit 30 μ l Saccharoselösung. Die Aufteilung in „hoch“ und „niedrig“ erfolgte nachträglich nach dem Kriterium $>$ oder $<$ 1 mg/ml Glucose vor Fütterung. Mittelwerte und Standardabweichungen sind dargestellt. Statistik: Vor Fütterung vs. nach Fütterung: gepaarter t-Test; niedrige vs. hohe Hämolympgh glucosekonz. vor Fütterung: ungepaarter t-Test; ***: $p \leq 0,001$. Die Zahlen in den Balken geben die Anzahl der Versuchstiere an.

3.3 Die Hämolympgh glucose als Basis für Verhaltensänderungen

Im Folgenden war von Interesse, aufzuklären, ob und wie die individuell unterschiedlichen Glucosekonzentrationen in der Hämolymphe sowie deren Dynamik in Verbindung mit Verhaltensmodulationen bei der Honigbiene stehen. Es ist bekannt, dass Signale über den metabolischen Zustand des Körpers, beispielsweise der Hormonstatus des Adipokinetischen Hormons [139, 232], aber auch die Verfügbarkeit von Nährstoffen wie Aminosäuren und Zuckern in der Hämolymphe, das Fressverhalten bei Insekten beeinflussen [1, 6]. Nun stellte sich die Frage, ob und inwiefern die Hämolympgh glucose daran beteiligt ist. Hat sie einen Einfluss auf die Sensorik und kann so auch die Effizienz weiterer relevanter Verhaltensmechanismen wie das appetitive Lernen und Gedächtnis steuern?

3.3.1 Der Einfluss der Hämolympgh glucose auf die Zuckerwasserempfindlichkeit des PER

Die Auswirkung der Hämolympgh glucose auf die sensorische Prozessierung der Biene wurde auf Verhaltensebene über die Bestimmung der Zuckerwasserempfindlichkeit des PER (siehe 2.2.3) im Anschluss an eine Hämolympgh glucose-Messung untersucht. Dabei stellte sich heraus, dass eine Korrelation zwischen der Zuckerwasserempfindlichkeit und dem Hämolympgh glucosespiegel bestand, wobei die Reaktionsbereitschaft der Tiere mit der Höhe der

Glucosekonzentration abnahm (siehe Abbildung 14). Dies liefert erste Hinweise darauf, dass interne Glucose die Sensorik der Biene rückkoppelnd anpassen kann und auf diesem Weg an futterbezogenen Verhaltensänderungen beteiligt ist.

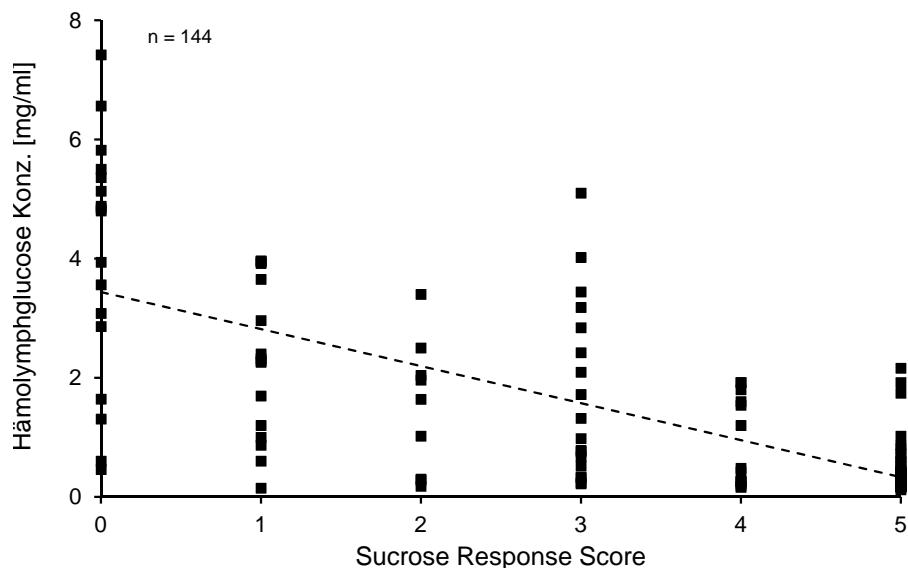


Abbildung 14: Abhängigkeit der Zuckerwasserempfindlichkeit des PER vom Hämolympghglucosespiegel. Die Messung des Glucosespiegels erfolgte im Anschluss an die Messung der Zuckerwasserempfindlichkeit. Es zeigt sich eine negative Korrelation zwischen der Reaktionsbereitschaft der Tiere und ihrem Glucosegehalt in der Hämolymphe. Die Darstellung beinhaltet sowohl Flieger als auch Stockbienen (Sommer). - - - Trendlinie; Spearman Korrelation; $r = -0,7$; $p \leq 0,001$. n = Anzahl der Versuchstiere.

3.3.2 Der Einfluss der Hämolympghglucose auf das appetitive olfaktorische Lernen und Gedächtnis

Die Hypothese der glucosebasierten sensorischen Modulation wurde im Folgenden weiter untersucht, indem komplexere Verhaltensmechanismen, die in enger Verbindung mit dem gustatorisch-sensorischen System stehen, in Bezug auf die Hämolympghglucose betrachtet wurden. Einen solchen Verhaltensmechanismus stellt die appetitive olfaktorische Konditionierung dar, die in der Honigbiene einfach und verlässlich durchführbar ist. Sie weist bekanntermaßen Parallelen zur Ausprägung der Zuckerwasserempfindlichkeit in der Biene auf, wobei eine höhere Empfindlichkeit mit effektiverem Lernen einhergeht [169, 199, 201].

Bei jedem Trial und jedem Gedächtnisabruf reagiert ein gewisser Prozentsatz an Tieren nicht, welche nicht gelernt bzw. kein Gedächtnis gebildet haben (PER (-)). Dieser Prozentsatz ist bei satten Bienen höher als bei hungrigen [79]. Aber gibt es hier auch einen Zusammenhang zum internen Glucosespiegel? Das folgende Experiment zeigt, dass die nicht reagierenden Tiere (PER(-)) sowohl bei der Akquisition als auch beim Gedächtnisabruf nach einem Tag einen signifikant höheren Hämolympghglucosespiegel vor dem Training

aufwiesen als jene Tiere, die beim Lernen und dem Gedächtnisabruf positiv abschnitten (PER(+); siehe Abbildung 15). Die Hämolympghlucose scheint demnach über die Effizienz des Lernens und der Gedächtnisbildung zu entscheiden.

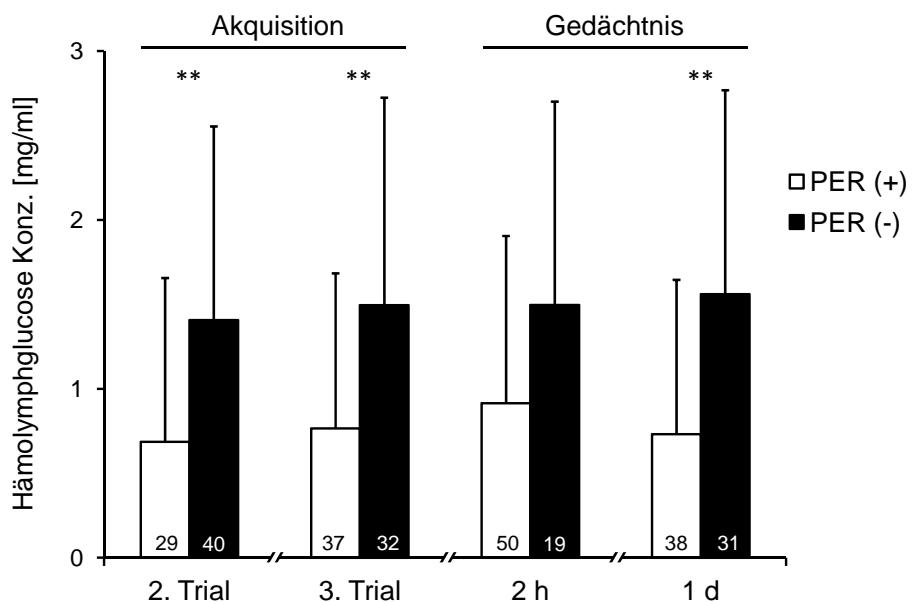


Abbildung 15: Der Glucosespiegel vor dem Training beeinflusst die Effizienz des appetitiven Lernens und Gedächtnisses. Die Hämolympghlucosekonzentration wurde 20 min vor dem Training bestimmt und die Tiere wurden nach jedem Trial und Abruf neu in 2 Gruppen mit PER (+) und PER (-) unterteilt. Mittelwerte und Standardabweichungen sind dargestellt. Ungepaarter t-Test: **: $p \leq 0,01$. Die Zahlen in den Balken geben die Anzahl der Versuchstiere an.

3.3.3 Die Manipulation des Hämolympghlucosespiegels beeinflusst das Gedächtnis

Die oben beschriebene Abhängigkeit zwischen dem Hämolympghlucosespiegel und der Zuckerwasserempfindlichkeit sowie der Effizienz des appetitiven Lernens und Gedächtnisses wurde durch einen weiteren Versuch bestätigt, bei dem die Bienen einer Glucose-Injektion unterzogen wurden. Das Ziel war, den Hämolympghlucosespiegel künstlich und unter Umgehung der gustatorischen und gastrointestinalen Sensorik zu erhöhen und dadurch eine Verschlechterung des Lernens und der Gedächtnisbildung ausschließlich auf Basis des internen Milieus zu induzieren.

Abbildung 16A zeigt, dass sich der Glucosespiegel 18 h gehungerter Bienen 10 min nach der Injektion von 0,4 mg Glucose kurzzeitig auf einem Niveau ähnlich dem frisch gefütterter Tiere befand (zum Vergleich siehe Abbildung 11; 0,4 mg Glucose entsprechen etwa 1/10 der gefütterten Menge). Das Training wurde entsprechend 10 min nach der Glucose-Injektion durchgeführt. Parallel diente die zeitverschobene Glucose-Injektion 20 min nach dem Training als Kontrolle zum Ausschluss genereller glucoseinduzierter Effekte, beispielsweise durch osmotischen Stress. Aus Gründen der praktischen Durchführbarkeit wurde für

dieses Experiment ein Training mit nur einem Trial herangezogen, sodass keine Aussage über das Lernen *per se* getroffen werden konnte. Wie in Abbildung 16B dargestellt, führte jedoch die Glucose-Injektion 10 min vor dem Training zu einer Verschlechterung des 2 h- und 1 d-Gedächtnisses, während die Injektion von PBS (Lösungsmittel) 10 min vor und 20 min nach dem Training keine Gedächtnis-Effekte verursachte.

Dieses Experiment verdeutlicht die Modulierbarkeit des Gedächtnisses durch äußere Manipulation des Glucosespiegels in einem kritischen Zeitfenster und untermauerte so ihre Bedeutung als internes, rückkoppelndes Signal bei der Verhaltensmodulation.

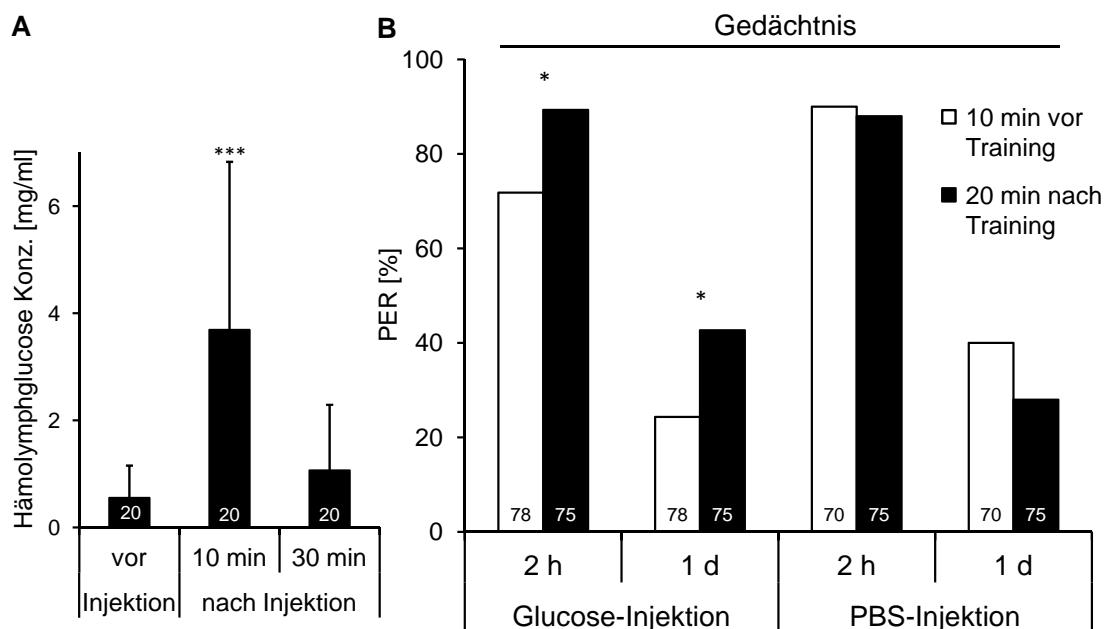


Abbildung 16: Eine Glucose-Injektion in die Hämolymphe verschlechtert das appetitive Gedächtnis. **A:** Die Injektion von 0,4 mg Glucose erhöht den Hämolympgh glucosespiegel 18 h gehungerter Tiere nach 10 min. Mittelwerte und Standardabweichungen sind dargestellt. Gepaarter t-Test; ***: $p \leq 0,001$. **B:** 18 h gehungerte Tiere wurden 10 min vor dem Training (1 Trial) oder 20 min nach dem Training mit 0,4 mg Glucose oder PBS injiziert. Dargestellt ist der Prozentsatz der mit dem Rüsselreflex (PER) auf den CS reagierenden Tieren. Chi Square Test; *: $p \leq 0,05$. Die Zahlen in den Balken geben die Anzahl der Versuchstiere an.

3.4 Die Dynamik des Hämolympgh glucosespiegels bei der appetitiven Belohnung

Während bislang der aktuelle Hämolympgh glucosespiegel *per se* im Fokus stand, warf sich im Weiteren die Frage auf, ob dessen auffällige Dynamik, die bei der Fütterung der Biene auftrat (siehe Abbildung 11 und Abbildung 13), ebenfalls eine Rolle beim Lernen spielt. Erste Hinweise darauf lieferte bereits die Erkenntnis, dass lediglich die Fütterung von Tieren mit niedrigem Glucosespiegel, welche auch bei der Konditionierung besser abgeschnitten hatten (siehe Abbildung 15), mit einem enormen Anstieg der Glucosekonzentration einherging,

während dieser bei Tieren mit hohem Glucosespiegel ausblieb (siehe Abbildung 13). Ein ähnliches Experiment zeigte, dass der Anstieg bei Tieren, die vor der Fütterung anhand ihrer Zuckerwasserempfindlichkeit in „Responder“ („Sucrose Response Score“ ≥ 4) und „Non-Responder“ („Sucrose Response Score“ ≤ 3) eingeteilt worden waren, ausschließlich bei „Respondern“ auftrat (nicht gezeigt). Diese Tiere weisen auch im Vergleich zu Tieren mit einer niedrigen Responsiveness (Zuckerwasserempfindlichkeit) eine gute appetitive olfaktorische Konditionierbarkeit auf [169, 199, 201]. In Anbetracht dieser Resultate war die nähere Untersuchung des Hämolympghlucosespiegels bei der Verabreichung kleinstter Saccharosemengen, die im Zuge der appetitiven Konditionierung als Belohnung aufgenommen werden (unkonditionierter Stimulus, US), ein vielversprechender Ansatz.

3.4.1 Der unkonditionierte Stimulus verursacht einen Anstieg des Glucosespiegels

Der unkonditionierte Stimulus besteht aus kleinsten Mengen Saccharoselösung, die während des Trainings von der Biene aufgenommen werden. Im Vergleich zur Fütterung mit $30 \mu\text{l}$ ist dies nur grob ein Zehntel der Saccharosemenge. Ist sie aber ausreichend, um bereits während der Konditionierung - einen so drastischen Anstieg des Hämolympghlucosespiegels herbeizuführen?

Um dies herauszufinden, wurden hungrige Tiere wie bei einer Konditionierung mit einem

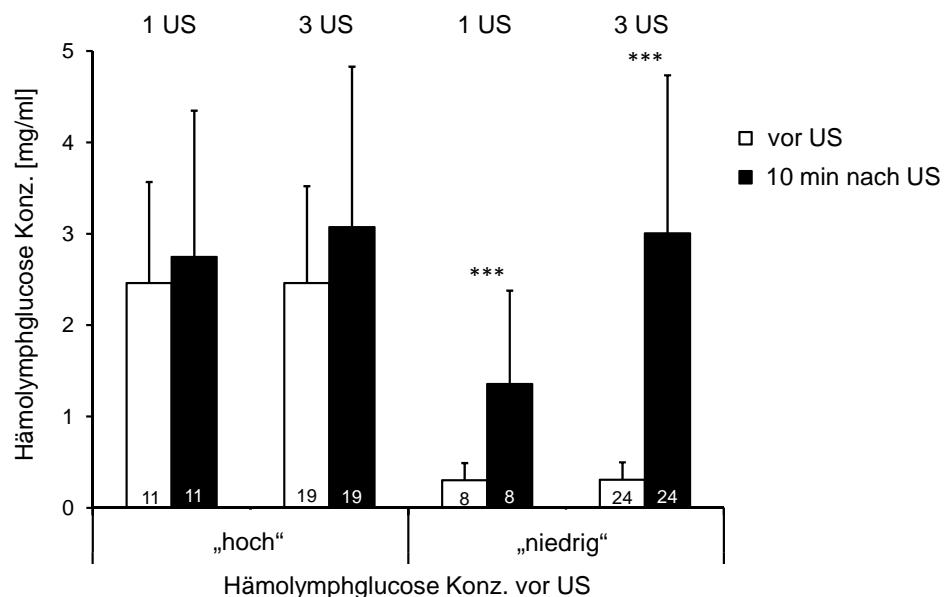


Abbildung 17: Der US verursacht bei Tieren mit niedrigem Glucosespiegel einen Anstieg der Hämolympghlucosekonzentration. Der Hämolympghlucosespiegel 18 h gehungerter Tiere wurde einmal vor der Fütterung gemessen und ein zweites Mal 10 min nach der Fütterung geringer Saccharosemengen entsprechend 1 oder 3 US (etwa $1,6 \mu\text{l}$ pro US) mit einem benetzten Zahnstocher. Die Aufteilung in „hoch“ und „niedrig“ erfolgte nachträglich nach dem Kriterium $>$ oder $< 1 \text{ mg/ml}$ vor US. Mittelwerte und Standardabweichungen sind dargestellt. Gepaarter t-Test; ***: $p \leq 0,001$. Die Zahlen in den Balken geben die Anzahl der Versuchstiere an.

in Saccharoselösung getränkten Zahnstocher einmal oder dreimal hintereinander 5 Sekunden lang gefüttert (entsprechend dem US bei einer Konditionierung mit 1 Trial oder mit 3 Trials). Die Bestimmung der Hämolympghglucosekonzentration fand einmal zuvor sowie ein zweites Mal 10 min nach der Fütterung statt. Überraschenderweise rief der US dreimal infolge eine ebenso drastische Erhöhung der Glucosekonzentration in der Hämolymphe der Biene hervor wie er bei einer vollwertigen Fütterung mit 30 μ l Saccharoselösung (siehe Abbildung 11 und Abbildung 13) aufgetreten war. Selbst 1 US reichte aus, um eine Erhöhung des Hämolympghglucosespiegels auszulösen, wenn auch nicht im selben Ausmaß (siehe Abbildung 17). Wieder war der Hämolympghglucosespiegel vor der Fütterung entscheidend dafür, ob der Anstieg auftrat oder nicht.

Diese Resultate machen deutlich, wie die Dynamik des Hämolympghglucosespiegels auch bereits während eines geringfügigen appetitiven Stimulus zum Tragen kommt. Es wurde gezeigt, dass der US, die appetitive Belohnung bei einer Konditionierung, sich nicht lediglich auf die sensorischen Eingänge von Antennen und Proboscis beschränkt, sondern sich auch im internen Milieu der Hämolympghglucose widerspiegelt. Dabei scheint der Hämolympghglucosespiegel vor der Konditionierung nicht nur für eine generelle Anpassung der Sensorik an die energetischen Erfordernisse des Organismus von Bedeutung zu sein (wie anhand der Zuckerwasserempfindlichkeit in Abschnitt 3.3.1 gezeigt). Vielmehr entscheidet er zusätzlich über die Ausprägung eines potenziellen internen Signals - dem Anstieg des Glucosespiegels - als Belohnung beim appetitiven Lernen.

3.4.2 Die Manipulation der Hämolympghglucose verändert die Dynamik des Glucosespiegels bei der appetitiven Belohnung

In diesem Zusammenhang konnte auch gezeigt werden, dass der vom US verursachte Anstieg des Glucosespiegels innerhalb von 10 min, der charakteristisch für Tiere mit niedrigem Glucosespiegel war (siehe Abbildung 17), durch eine künstliche Erhöhung des Hämolympghglucosegehalts mittels einer Glucose-Injektion verhindert werden konnte (siehe Abbildung 18). Stattdessen führte die Glucose-Injektion im gegebenen Zeitfenster zu einer starken Abnahme und veränderte so den vom US herbeigeführten dynamischen Verlauf des Glucosespiegels.

Die gleiche Glucose-Injektion hatte auch bereits eine Verschlechterung des Gedächtnisses hervorgerufen (siehe Abbildung 16). Dass der Glucosespiegel zum Zeitpunkt der Messung nach dem US bei Glucose- und PBS-injizierten Tieren etwa gleich hoch war (siehe Abbildung 18), verdeutlicht die Relevanz der vorangegangenen dynamischen Veränderung der Glucosekonzentration. Der Anstieg in einem kritischen Zeitfenster nach dem US scheint folglich Voraussetzung für die einwandfreie Effizienz der appetitiven Gedächtnisbildung zu sein. So verursachte die Glucose-Injektion 10 min vor dem US eine Abnahme des Glucosespiegels in diesem Zeitfenster und führte gleichzeitig zu einer Beeinträchtigung des Gedächtnisses (siehe Abbildung 16).

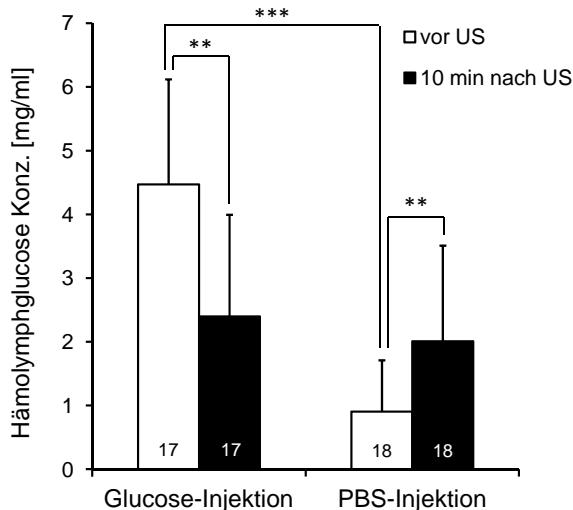


Abbildung 18: Der Einfluss einer Glucose-Injektion auf die Dynamik des Hämolympghglucosespiegels infolge des US. 18 h gehungerte Tiere wurden mit 0,4 mg Glucose oder PBS injiziert und der Glucosespiegel nach 10 min bestimmt. Direkt im Anschluss erfolgte die Verabreichung von 3 US mit einem benetzten Zahnstocher (etwa 1,6 μ l Saccharoselösung pro US; entspricht insgesamt etwa 0,9 mg Glucose) und der Glucosespiegel wurde weitere 10 min später ein zweites Mal bestimmt. Mittelwerte und Standardabweichungen sind dargestellt. Statistik: Vor US vs. nach US: gepaarter t-Test; Glucose-Injektion vs. PBS-Injektion vor US: ungepaarter t-Test; **: $p \leq 0,01$; ***: $p \leq 0,001$. Die Zahlen in den Balken geben die Anzahl der Versuchstiere an.

3.5 Der Glucosetransporter GLUT1 bei der Honigbiene

Glucosetransporter (GLUT) der Solute Carrier Familie 2A (SLC2A) sind beim Säugetier für den Energie- und Glucosehaushalt von großer Bedeutung. Ihre Funktion und vielfältige, dynamische Regulation spielt bei der gezielten Aufnahme und Abgabe von Glucose in verschiedenen Geweben eine wichtige Rolle und dient überdies als internes Glucose-Sensorsystem [17, 174]. Es stellte sich im Folgenden die Frage, ob diese Transporter ebenso in der Honigbiene vorhanden und an der Glucoseregulation beteiligt sind, im Speziellen an der Vermittlung der oben beschriebenen Effekte der Hämolympghglucose auf die Zuckerwas-serempfindlichkeit sowie das appetitive Lernen und Gedächtnis.

3.5.1 Die mRNA-Verteilung der beiden GLUT1-Isoformen in der Honigbiene

Zunächst musste geklärt werden, welche Gene und Proteine für den Glucosetransport in der Honigbiene vorhanden sind. Literaturrecherchen zufolge sind bisher keine Arbeiten zur Beschreibung und Charakterisierung von Glucosetransportern in der Honigbiene erschienen. Die NCBI-Datenbankanalyse ergab vier Treffer für Glucosetransporter-Gene: *Glucose transporter 1*, *facilitated glucose transporter member 1-like*, *facilitated glucose transporter member 3-like* und *facilitated glucose transporter member 10-like*, zu denen jeweils nur vorhergesagte Proteinsequenzen existieren.

GLUT1 kommt bei Säugern in fast allen Zellen vor, vornehmlich aber in Erythrozyten

sowie im Endothel. Von besonderer Bedeutung ist dieser Glucosetransporter in der Blut-Hirn-Schranke, wo er für die energetische Versorgung des Gehirns eine wichtige Rolle spielt [51, 52, 66, 73]. Aus diesem Grund wurden beide *GLUT1*-Gene (*Solute carrier family 2, facilitated glucose transporter member 1-like*/ID 409424 und *Glucose transporter 1*/ID 409933) der Honigbiene ausgewählt, welche zur näheren Untersuchung - zunächst zur Lokalisation und Verteilung ihrer mRNA - herangezogen wurden. Die Transporter-Gene werden im Folgenden mit *GLUT1 a* (ID 409424) und *GLUT1 b* (ID 409933) bezeichnet.

3.5.1.1 Normierung auf den Elongationsfaktor *EF1-alpha* Die mRNA der *GLUT1*-Gene wurden in der real-time PCR quantifiziert. Dazu wurde zum einen die absolute Quantifizierung mittels cDNA-Standards vorgenommen (siehe Abschnitt 2.2.10.3 im Methodenteil). Zum anderen war jedoch eine probeninterne Normierung notwendig, die die Quantifizierung relativ zu einem Referenzgen ermöglicht, welches sich abhängig von verschiedenen physiologischen Bedingungen nicht verändert und eine stabile Expression aufweist [44].

Eine Möglichkeit stellte der Elongationsfaktor 1-alpha (*EF1-alpha*) dar [127, 180]. Als Anhaltspunkt zur Verifizierung von *EF1-alpha* als geeignetes Referenzgen in der Honigbiene zu Beginn der Experimente wurde zunächst vor jedem PCR-Lauf die Masse der in der real-time PCR eingesetzten Gesamt-RNA bestimmt und gegen die in der real-time PCR quantifizierten *EF1-alpha* mRNA aufgetragen. Die signifikante Korrelation, die auch zwischen Fliegern

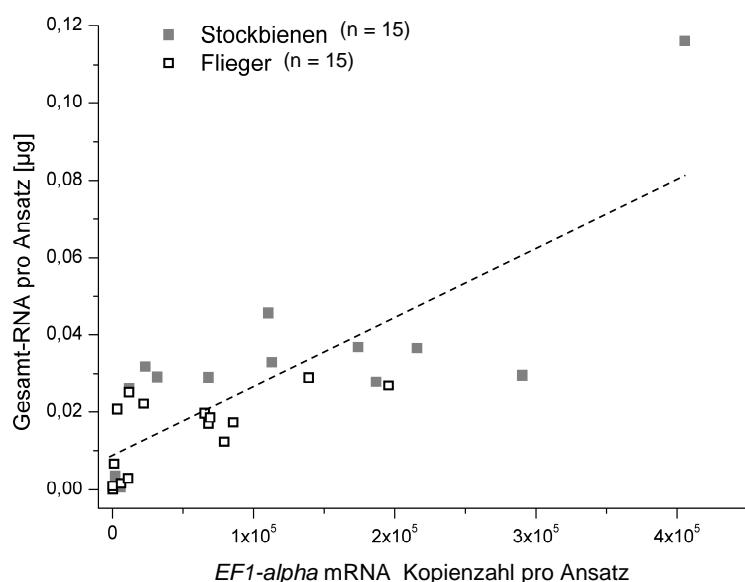


Abbildung 19: Abhängigkeit zwischen der Gesamt-RNA und der Elongationsfaktor 1-alpha (*EF1-alpha*) mRNA. Aufgetragen sind die eingesetzte Masse Gesamt-RNA pro real-time PCR-Ansatz aus Gewebeproben (Kopf, Thorax, Abdomen) von 10 Bienen sowie die darin quantifizierte Kopienzahl der *EF1-alpha*-mRNA. Beide Größen korrelieren miteinander (Spearman Korrelation: $r = 0,8$; $p \leq 0,001$; $n = 30$) und es gibt keinen Hinweis auf unterschiedliche Verteilungen zwischen Fliegern ($n = 15$) und Stockbienen ($n = 15$). *EF1-alpha* eignet sich demnach zur Normierung der in der real-time PCR quantifizierten Gene. - - - Trendlinie; $n = \text{Anzahl der Gewebeproben}$.

und Stockbienen keine offensichtlichen Unterschiede erkennen ließ (siehe Abbildung 19), unterstützte die Vermutung, dass Schwankungen von *EF1-alpha* nur in Abhängigkeit von Schwankungen der Gesamt-RNA auftraten und der Elongationsfaktor sich so als Referenzgen eignete. Im weiteren Verlauf zeigte sich zudem, dass es in keinem der Experimente zu einem signifikanten Unterschied der *EF1-alpha* mRNA-Kopienzahl zwischen den untersuchten, normierten Gruppen kam (nicht gezeigt).

3.5.1.2 Die Verteilung der *GLUT1*-Isoformen in Kopf und Körper Um eine grobe Übersicht über die Verteilung der beiden *GLUT1*-Isoformen in der Honigbiene zu erhalten, wurde die mRNA-Expression in verschiedenen Körperteilen quantifiziert. Getrennt betrachtet wurden Kopf und restlicher Körper, aber auch Hirn, Thorax und Abdomen im Einzelnen. Eine vorerst grobe Zusammenfassung von Geweben des Kopfes (Kopf gesamt, Hirn) und Geweben des restlichen Körpers (Körper gesamt, Thorax, Abdomen) und Auftragung der beiden *GLUT1*-Isoformen gegeneinander (siehe Abbildung 20) machte deutlich, dass beide Transporter sowohl im Kopf als auch im Körper lokalisiert waren und jeweils in Korrelation zueinander standen.

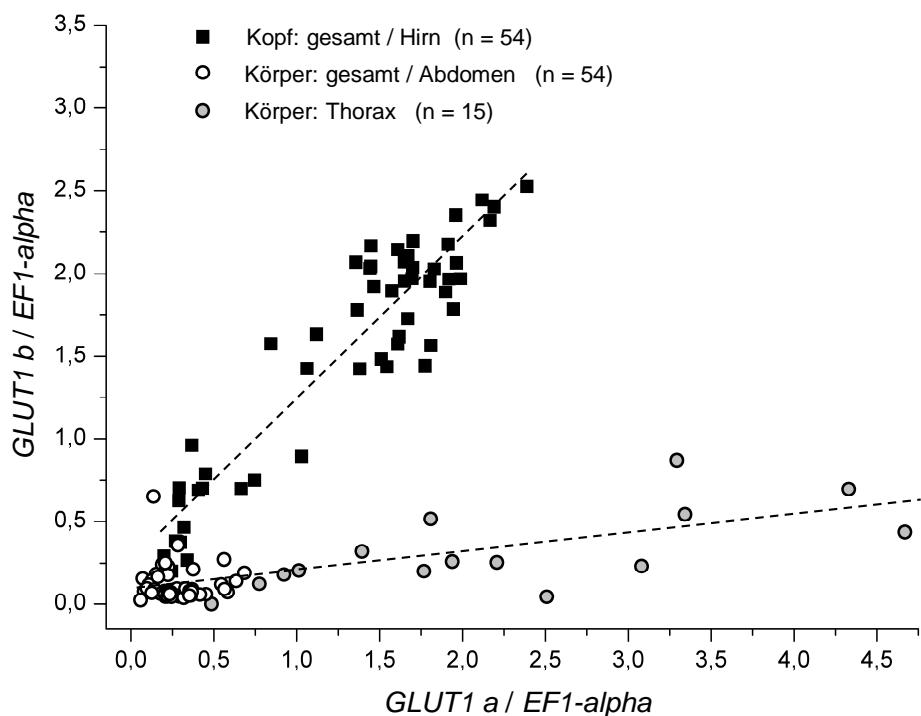


Abbildung 20: Die Verteilung der *GLUT1*-mRNA (*GLUT1 b* und *GLUT1 a*) im Kopf und im Körper. Für die Erstellung der Trendlinien (---) wurden jeweils Proben aus Geweben des Kopfes (Kopf gesamt, Hirn) sowie Geweben des Körpers (Körper gesamt, Abdomen, Thorax) zusammengefasst. Die Kopienzahl der Glucosetransporter wurde auf *EF1-alpha*-mRNA normiert. Beide Transporter korrelieren sowohl im Kopf (Pearson Korrelation; $r = 0,9$; $p \leq 0,001$) als auch im Körper (Pearson Korrelation; $r = 0,7$; $p \leq 0,001$) miteinander, sind jedoch in diesen Körperteilen unterschiedlich stark exprimiert (Steigungsvergleich nach Regressionsanalyse: $p \leq 0,001$). Es sind Daten von Stockbienen und Fliegern über das ganze Jahr enthalten. n = Anzahl der Versuchstiere.

Während die Transporter im Kopf etwa gleich stark vertreten waren (etwa 1:1), schien im Vergleich dazu im Körper *GLUT1 a* die dominierende Isoform zu sein, die etwa 4x so stark exprimiert wurde wie *GLUT1 b*. Tatsächlich wiesen aber dennoch nur die wenigsten Tiere sehr hohe Mengen *GLUT1 a*-mRNA im Körper auf. Die stärkere Streuung um die Trendlinie im Körper ließ zudem vermuten, dass es sich um eine heterogene Gruppe von Geweben handelte, die entweder jeweils eine korrelierende Expression der beiden Glucosetransporter mit verschiedenen Steigungen aufwiesen oder dass in einigen Geweben tatsächlich keine Korrelation vorlag. So ließ die getrennte Betrachtung des Thorax erkennen, dass die Korrelation der beiden Transporter sowie die hohe Expressionsrate von *GLUT1 a* im Körper tatsächlich lediglich vom Thorax herrührte ($n = 15$; $r = 0,7$; $p = 0,007$), während im gesamten Körper bzw. im Abdomen keine Hinweise auf eine Korrelation bestanden.

Die Daten wurden aus Versuchen, die sich über das ganze Jahr verteilten, zusammengestellt und beinhalten Winter- und Sommertiere, sowohl aus dem Flughäus als auch aus Stöcken im Freien.

3.5.1.3 Die Verteilung der *GLUT1*-Isoformen in Fliegern und Stockbienen Im Weiteren wurde die Verteilung der Glucosetransporter-Isoformen bei Bienen mit verschiedenen Aufgaben im Bienenstock, den Fliegern und den Stockbienen, untersucht. Dies war von Interesse, da sich Tiere im Laufe ihrer Entwicklung von der Stockarbeiterin zur Sammlerin neben dem Verhalten in vielen weiteren physiologischen Eigenschaften, wie dem Metabolismus, verändern [11, 225]. Flieger weisen kaum Energieressourcen in Form von gespeicherten Nährstoffen auf. Sie sind verantwortlich für das Sammeln von Nektar und Pollen und bilden ein besseres appetitives olfaktorisches Gedächtnis aus als Stockbienen [177, 202]. Die Stockbienen, die Arbeiten innerhalb des Bienenstocks ausführen, besitzen vergleichsweise gut gefüllte Energiespeicher.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde auch gezeigt, dass Stockbienen und Flieger (ausgenommen Stockbienen im Winter-Flughäus) sich in ihrem Hämolympghglucosegehalt und ihrer Zuckerwasserempfindlichkeit hoch signifikant unterscheiden, wobei Stockbienen einen höheren Glucosespiegel und eine niedrigere Reaktionsbereitschaft auf Zuckerwasser aufzeigten (siehe dazu auch Abschnitt 3.6.3). Darüber hinaus konnte in einem Konditionierungs-Experiment mit 1 Trial demonstriert werden, dass im Winter die Stockbienen im Freien bei den Gedächtnisabrufen (2 h und 1 d) bedeutend schlechter abschnitten als Flieger im Flughäus ($n = 44/45$, $p \leq 0,01$; nicht gezeigt). Die Abhängigkeit zwischen der Hämolympghglucose und der Zuckerwasserempfindlichkeit sowie dem Lernen und Gedächtnis, die in Abschnitt 3.3 bereits innerhalb der Flieger-Population demonstriert wurde, bestand demnach auch beim Vergleich von Stockbienen und Fliegern.

Die vergleichende Betrachtung der *GLUT1*-Expression in diesen Tieren sollte Hinweise auf eine mögliche Beteiligung der Glucosetransporter an grundlegend unterschiedlichen metabolischen Zuständen liefern, die auch Einfluss auf das Verhalten nehmen. Abbildung 21 zeigt die in der real-time PCR bestimmte mRNA-Expression in Fliegern und Stockbienen

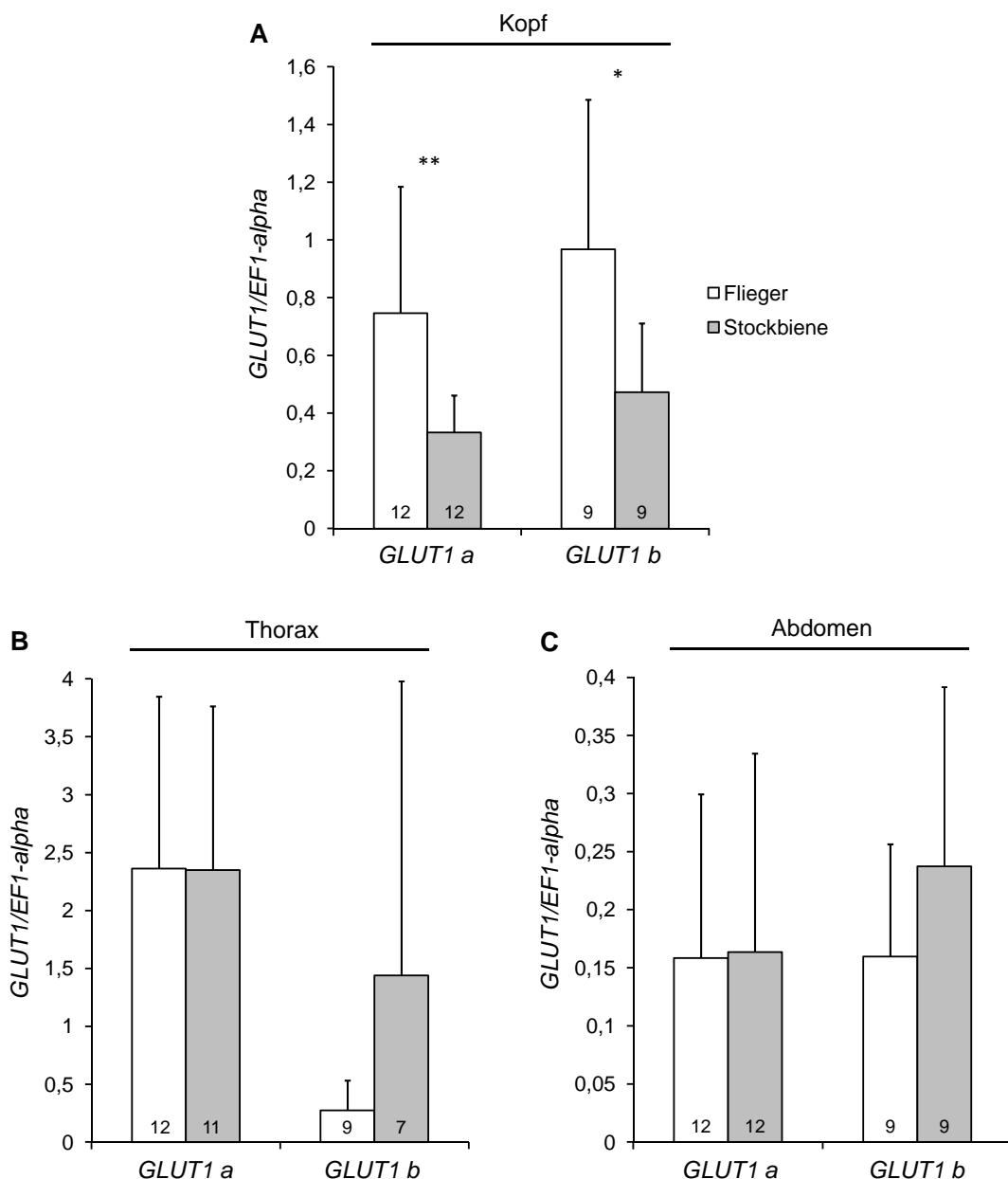


Abbildung 21: mRNA-Expression der GLUT1-Isoformen *a* und *b* bei Stockbienen und Fliegern. Es wurden verschiedene Körperteile (A: Kopf, B: Thorax, C: Abdomen) untersucht. Flieger und Stockbienen stammten im Sommer aus demselben Stock im Freien, ebenso wie die Stockbienen im Winter. Die Flieger im Winter stammten aus einem anderen Stock im Flughaus. Die Kopienzahl der Glucosetransporter mRNA wurde auf EF1-alpha-mRNA normiert. Mittelwerte und Standardabweichungen sind dargestellt. Ungepaarter t-Test; *: $p \leq 0,05$; **: $p \leq 0,01$. Die Zahlen in den Balken geben die Anzahl der Versuchstiere an.

in verschiedenen Körperteilen. Während es in Thorax und Abdomen zu keinen signifikanten Unterschieden kam, wiesen Flieger jedoch im Kopf für beide Isoformen GLUT1 *a* und GLUT1 *b* eine höhere Expression auf als Stockbienen. Die allgemein sehr hohen Standard-

abweichungen ließen aber wiederum auf Heterogenität innerhalb der Gruppen schließen, was im Speziellen auch in Abschnitt 3.7.2 belegt wird, in dem eine nähere Unterteilung in Sommer- und Wintertiere vorgenommen wurde.

Die signifikanten Unterschiede der *GLUT1 a*-mRNA im Kopf von Fliegern und Stockbienen gaben dennoch erste Hinweise auf einen möglichen Zusammenhang zwischen der Hämolympghglucose, dem appetitiven Verhalten und der Expression von Glucosetransportern. Möglicherweise regulieren Tiere mit niedrigem Glucosespiegel ihre *GLUT1*-Expression im Kopf hoch, um trotz einer niedrigen Glucoseverfügbarkeit eine möglichst effiziente Energieversorgung des Gehirns zu gewährleisten. Der Klärung dieser Frage wurde in den folgenden Experimenten nachgegangen.

3.5.2 Die Abhängigkeit zwischen Hämolympghglucose und *GLUT1*-mRNA-Expression

Um eine Regulation der *GLUT1*-Expression in direktem Zusammenhang mit dem Hämolympghglucosespiegel und dessen Dynamik zu untersuchen, die in Fliegern bei Fütterung und auch im Zuge des unkonditionierten Stimulus charakterisiert worden sind (siehe Abschnitte 3.2 und 3.4), beschränkten sich die folgenden Experimente zunächst auf Flieger.

Zu Beginn dieser Untersuchungen wurden Bienen, deren Hämolympghglucosespiegel nach einer definierten Zeit des Hungerns bestimmt worden war, wiederum in zwei Gruppen mit hohem bzw. niedrigem Glucosespiegel eingeteilt. Diese Heterogenität des glykämischen Niveaus hat bereits Konsequenzen für die Zuckerwasserempfindlichkeit und das Lernen und Gedächtnis bewiesen (siehe Abbildungen 14 und 15). Beim Säuger ist bekannt, dass das glykämische Niveau mit dem Glucosetransport im Zusammenhang steht. Durch chronische, aber auch akute Veränderungen kann es die Expression und Translokation von Glucosetransportern im Körper [65, 150], aber auch im Hirn beeinflussen [134, 213]. Sind hier auch Parallelen in der Honigbiene zu erkennen?

Die anhand ihres Hämolympghglucosespiegels eingeteilten Bienen wurden in der real-time PCR auf ihr *GLUT1*-Expressionsniveau im Hirn und im Körper (Thorax + Abdomen) untersucht. Die Ergebnisse sind in Abbildung 22 dargestellt. Es wird zum einen deutlich, dass die Tiere, welche alle im Sommer untersucht worden sind, im Hirn eine deutlich höhere Expression beider *GLUT1*-Isoformen aufwiesen als im Rest des Körpers, was Hinweise auf eine wichtige Funktion im Bienenhirn gibt. Die mRNA-Expression unterschied sich dort allerdings nicht bei Tieren mit hohem und niedrigem Glucosespiegel.

Im Körper hingegen war zu beobachten, dass sich zwar die Expression der *GLUT1*-Isoform *b* nicht unterschied, jedoch *GLUT1 a* in Tieren mit niedrigem Hämolympghglucosegehalt signifikant höher war. Dies liefert nicht nur Hinweise auf eine Beteiligung des Glucosetransporters an der Einstellung der Hämolympghglucose und der Vermittlung von schnellen Änderungen des Glucosespiegels, welche möglicherweise durch eine erhöhte Präsenz des Transporters gewährleistet ist. Zudem ergaben sich auch erste Parallelen zur glykämieabhängigen Expression beim Säuger.

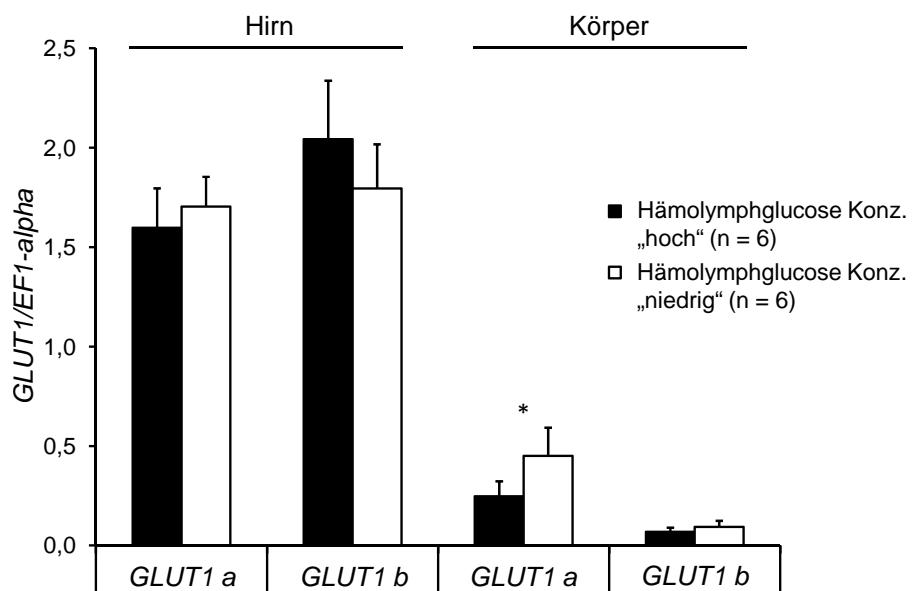


Abbildung 22: Zusammenhang zwischen dem Hämolympghglucosespiegel und dem mRNA-Expressionsniveau von GLUT1 a und GLUT1 b im Hirn und im Körper. Die Hämolympghglucose wurde 3 h nach Fütterung mit 30 μ l Saccharoselösung bestimmt und Tiere hohen (> 1 mg/ml Glucose) und niedrigen (< 1 mg/ml Glucose) Glucosespiegels selektiert („hoch“: $3,47 \pm 0,78$ mg/ml; „niedrig“: $0,31 \pm 0,09$ mg/ml; Mittelwerte und Standardabweichungen). Direkt nach der Glucosebestimmung wurden Hirne und Körper für die mRNA-Quantifizierung präpariert. Die Kopienzahl der Glucosetransporter-mRNA wurde auf EF1-alpha-mRNA normiert. Mittelwerte und Standardabweichungen sind dargestellt. Ungepaarter t-Test; *: $p \leq 0,05$. n = Anzahl der Versuchstiere.

Dennoch erlaubten die ausbleibenden Effekte im Hirn zunächst nicht, die vermutete Rolle von GLUT1 als anpassungsfähiges Modul bei der Energieversorgung des Gehirns in Abhängigkeit des Glucosespiegels zu bestätigen. Ein Unterschied in der tatsächlichen Proteineexpression war aber weiterhin nicht auszuschließen.

3.5.3 Der Glucosetransporter im Bienenhirn

Die Untersuchung der GLUT1-mRNA im Bienenhirn zeigte keine Unterschiede bei Tieren unterschiedlichen Hämolympghglucose-Niveaus. Ein Effekt bei der GLUT1-Expression auf Proteinebene war in diesem Zusammenhang aber dennoch nicht auszuschließen. Aus diesem Grund wurden polyklonale Antikörper zur Immundetektion der beiden GLUT1-Isoformen der Honigbiene hergestellt, indem Ratten mit synthetischen Peptiden immunisiert wurden (siehe Abschnitt 2.2.15 im Methodenteil). Die Charakterisierung der Antiseren ist im Folgenden dargestellt.

3.5.3.1 Charakterisierung der selbst hergestellten GLUT1-Antikörper Die selbst hergestellten Antikörper gegen die Glucosetransporter-Isoformen GLUT1 a und GLUT1 b der Biene wurden in zwei Experimenten auf ihre Spezifität getestet. Zunächst musste sichergestellt werden, dass die Antikörper das gewünschte Antigen, nämlich das Peptid aus der GLUT1-Sequenz, erkennen und nicht mit unspezifischen Sequenzen der Trägerproteine kreuzreagieren. Zu diesem Zweck wurde ein Dotblot mit den an BSA gekoppelten Immunisierungspeptiden GLUT1 a und GLUT1 b angefertigt, die bei der Antikörperherstellung zur 1. Immunisierung der Ratten verwendet worden waren (siehe 2.2.15.2). Beide Antikörper GLUT1 a und GLUT1 b wurden dabei jeweils auf ihr eigenes sowie auf das Immunisierungspeptid der jeweils anderen GLUT1-Isoform getestet.

Wie aus Abbildung 23 deutlich hervorgeht, erkannten die Antikörper GLUT1 a und GLUT1 b ausschließlich ihre eigenen Antigene, sodass eine unspezifische Immunreaktion mit dem Trägerprotein ausgeschlossen war und die Spezifität für die GLUT1-Peptide bestätigt werden konnte.

Zudem wurde in einem Westernblot die Funktion der Antikörper im Bienenhirn dargestellt. Abbildung 24 zeigt, dass die eingesetzten Antiseren GLUT1 a und GLUT1 b jeweils eine einzige Bande in der Höhe zwischen 50 und 80 kDa erkannten. Die Längen der vorhergesagten Proteine betragen laut der Datenbank NCBI 501 Aminosäuren (GLUT1 a) und 865 Aminosäuren (GLUT1 b).

Basierend auf den beiden hier beschriebenen Experimenten zur Funktion und Spezifität der Antikörper, sowohl im Bienenhirn als auch für die Immunisierungspeptide, wurden die selbst hergestellten Antikörper zur weiteren Untersuchung der Glucosetransporter GLUT1 in der Honigbiene verwendet.

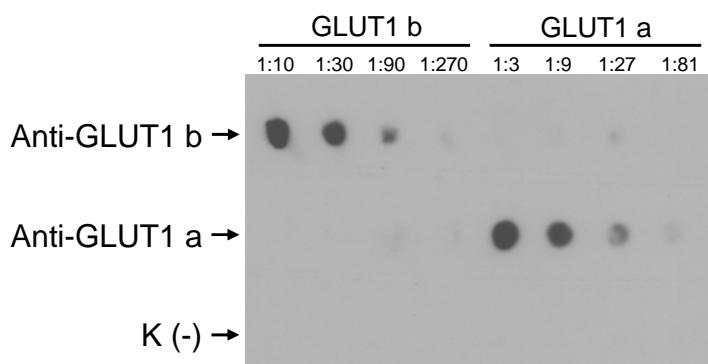


Abbildung 23: Spezifitätstest der GLUT1 a- und GLUT1 b-Antikörper für die Immunisierungspeptide zum Ausschluss von Kreuzreaktionen mit dem Trägerprotein. Die an BSA gekoppelten Peptide GLUT1 b (linke Spalte) und GLUT1 a (rechte Spalte) wurden in einer Verdünnungsreihe wie oben angezeigt auf die Nitrocellulose-Membran gespottet und jeweils einmal mit dem Antiserum GLUT1 b (obere Reihe, 1:10000) und GLUT1 a (mittlere Reihe, 1:10000) immungefärbt. Eine Negativkontrolle ohne Primärantikörper (K(-), untere Reihe) wurde mitgeführt. Der sekundäre anti-Ratte IgG (Peroxidase-Konjugat) wurde in einer Verdünnung von 1:15000 eingesetzt.

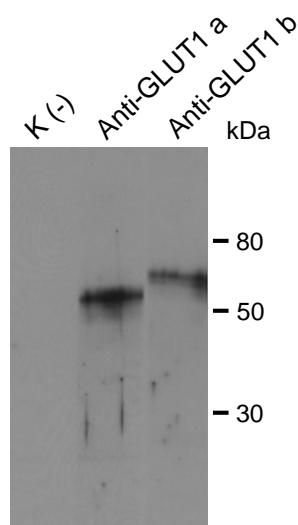


Abbildung 24: Test der GLUT1 a- und GLUT1 b-Antikörper auf Bienenhirn. Dargestellt ist die Immunfärbung eines Bienenhirn-Homogenats (1 Hirn in 200 μ l Homogenisierungspuffer) mit den Ratten-Antiseren GLUT1 a (mittlere Spur) und GLUT1 b (rechte Spur) im Westernblot. Die Antiseren wurden in einer Verdünnung von 1:1000 eingesetzt. Eine Negativkontrolle ohne primärem Antikörper (K(-); linke Spur) wurde mitgeführt. Der sekundäre anti-Ratte IgG (Peroxidase-Konjugat) wurde in einer Verdünnung von 1:15000 eingesetzt.

3.5.3.2 Die Regulation der GLUT1-Proteinexpression im Bienenhirn Zunächst wurden wieder, ebenso wie in vorherigen Versuchen, Bienen hohen und niedrigen Glucosespiegels nach einer definierten Hungerperiode herangezogen. Im Weiteren wurden die Hirne der Tiere auf ihre GLUT1-Proteinexpression getestet, indem Verdünnungsreihen denaturierter Hirnhomogenate im Dotblot mit den GLUT1 a- und GLUT1 b-Antikörpern immungefärbt wurden. Wie Abbildung 25 klar zeigt, stand der Glucosespiegel durchaus in Zusammenhang mit dem Expressionsniveau von GLUT1, genauer mit GLUT1 a, während GLUT1 b nicht betroffen war. Interessanterweise standen GLUT1 a und der Hämolympghlucosegehalt aber in genau umgekehrter Beziehung zueinander, wie es bei der *GLUT1 a*-mRNA im Körper der Fall war (siehe Abbildung 22). Bei einem hohen Hämolympghlucosespiegel war auch eine höhere Präsenz des GLUT1 a-Proteins im Gehirn zu verzeichnen.

So blieb aufzuklären, ob und inwiefern auch schnelle Änderungen des Hämolympghlucosespiegels Auswirkungen auf die Proteinexpression von GLUT1 im Bienenhirn haben. Die Kinetik des Glucosespiegels nach Fütterung (siehe Abbildung 11) zeigte bereits, dass innerhalb von 10 min ein enormer Anstieg der Glucosekonzentration in der Hämolymphe zu detektieren war. Um resultierende Effekte bezüglich der GLUT1-Expression zu ermitteln, wurde ein zeitnäher Punkt gewählt, nämlich 30 min nach der Fütterung, zu dem die Proteinexpression der Glucosetransporter im Bienenhirn bestimmt wurde.

Ein identisch aufgebautes Experiment, bei dem 30 min nach der Fütterung die *GLUT1*-mRNA sowohl im Hirn als auch im Körper bestimmt wurde, lieferte keine Unterschiede zwischen dem gehungerten und gefütterten Zustand (nicht gezeigt).

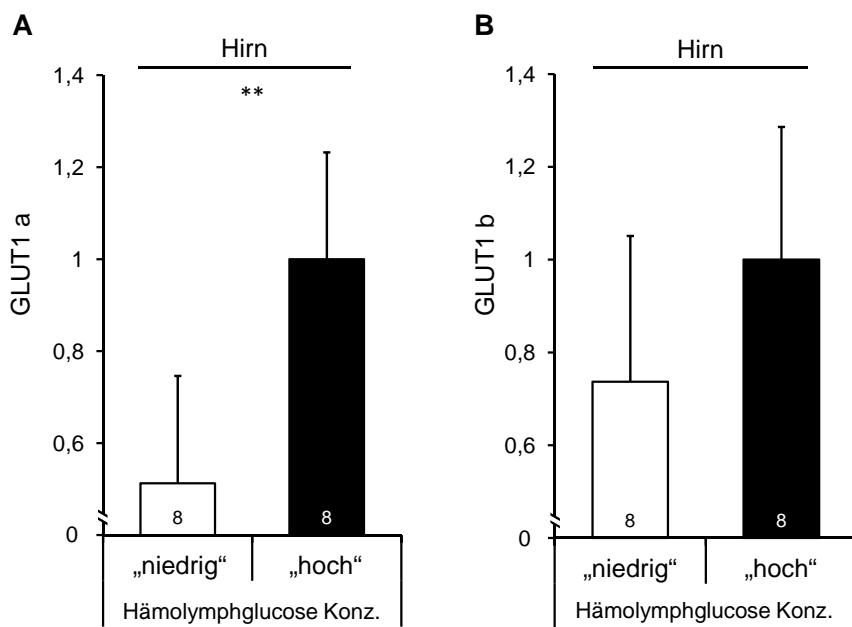


Abbildung 25: GLUT1-Proteinexpression im Bienenhirn in Abhängigkeit des Hämolympghlucosespiegels. 3 h nach der Fütterung mit 30 μ l Saccharoselösung erfolgte die Hämolympghlucose-Bestimmung und es wurden Tiere niedriger (< 1 mg/ml Glucose) und hoher (> 1 mg/ml Glucose) Hämolympghlucose selektiert („niedrig“: $0,27 \pm 0,08$ mg/ml, „hoch“: $1,9 \pm 0,49$ mg/ml; Mittelwerte und Standardabweichungen), deren Hirn im Dotblot auf die GLUT1-Isoformen a (A) und b (B) untersucht wurde. Normierte Mittelwerte mit Standardabweichungen sind dargestellt. Ungepaarter t-Test; **: $p \leq 0,01$. Die Zahlen in den Balken geben die Anzahl der Versuchstiere an.

Bei der Proteinexpression im Gehirn waren zunächst auch keine signifikanten Effekte sichtbar. Bei genauerem Betrachten fiel jedoch anhand der Standardabweichung deutlich auf, dass nur die Tiere im hungrigen Zustand (vor Fütterung), nicht aber nach Fütterung, eine stark heterogene Gruppe in Bezug auf die Expression von GLUT1 a darstellten (siehe Abbildung 26). Diese heterogene Gruppe repräsentierte offenbar eine Mischung aus Individuen mit hohem und niedrigem Glucosespiegel, die sich - wie in Abbildung 25 gezeigt - in ihrer GLUT1 a-Expression deutlich unterschieden, im Mittel aber etwa dasselbe, stark streuende Expressionsniveau ergaben wie die heterogene Gruppe vor Fütterung. Da GLUT1 a nach Fütterung eine geringe Streuung aufwies, lag der Schluss nahe, dass die Expression des Transporters bei Fütterung - ebenso wie der Hämolympghlucosespiegel in vorangegangenen Experimenten - einer schnellen Hochregulation unterliegen musste, die aber ausschließlich bei Tieren mit niedrigem Glucosespiegel vor Fütterung zum Tragen kam. Bei Tieren mit hohem Glucosespiegel schien GLUT1 a bereits vor der Fütterung auf einem hohen Niveau zu sein und unterlag dadurch vermutlich keiner weiteren Regulation bei Fütterung.

Dies stützte die Vermutung eines funktionellen Zusammenhangs zu einer internen, glucosevermittelten Belohnung und zur Lernfähigkeit.

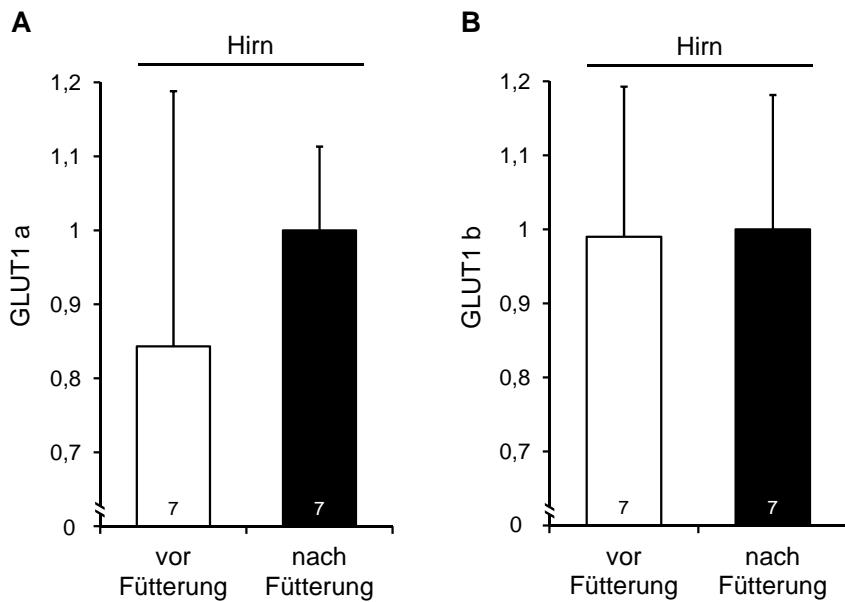


Abbildung 26: Die Regulation der GLUT1-Proteinexpression im Bienenhirn bei Fütterung. Die Proteinexpression der GLUT1-Isoformen a (A) und b (B) wurde bei 21 h gehungerten Tieren (vor Fütterung) oder 30 min nach der Fütterung mit 30 μ l Saccharoselösung im Dotblot bestimmt. Die hohe Standardabweichung von GLUT1 a im gehungerten Zustand weist auf Heterogenität innerhalb der Gruppe hin, die durch Fütterung verschwindet. Dargestellt sind normierte Mittelwerte und Standardabweichungen. Ungepaarter t-Test. Die Zahlen in den Balken geben die Anzahl der Versuchstiere an.

3.5.4 Die Lokalisation des Glucosetransporters GLUT1 a im Bienenhirn

Die bisherigen Experimente deuteten darauf hin, dass speziell der Glucosetransporter GLUT1 a im Bienenhirn einer Regulation in Verbindung mit der Hämolympgh glucose unterliegt und möglicherweise in Prozesse der appetitiven Belohnung involviert ist. Demnach stellte die Frage nach der Lokalisation des Transporters im Gehirn einen weiteren interessanten Punkt dar. GLUT1 ist neben GLUT3 der im Säugerhirn häufigste Glucosetransporter und befindet sich hauptsächlich in Hirn-Endothelzellen und Astrozyten. Der größte Teil ist dabei in den Plasmamembranen lokalisiert, jedoch finden sich auch Transporter im Zytoplasma [66].

Die immunhistologische Färbung von Schnitten des Bienenhirns mit dem oben verwendeten Antikörper gegen GLUT1 a zeigte eine weitläufige Präsenz des Antigens im Gehirn und ergab im Allgemeinen eine starke Färbung in Nervenfasern und Trakten. Abbildung 27A zeigt die Färbung von Axonen im Zentrum der Antennalloben, dem primären olfaktorischen Neuronal, sowie Fasern im lateralen Protocerebrum, einem Hirnareal höherer Ordnung. Beide Hirnregionen repräsentieren wichtige Konvergenzbereiche des Geruchs- und Belohnungspfads beim assoziativen Lernen [207]. Ein dritter Konvergenzbereich, das sekundäre olfaktorische Areal des Pilzkörpers, blieb selbst ungefärbt. Axone extrinsischer Neurone der α -Loben hingegen, welche in den oder aus dem Pilzkörper heraus projizieren und diesen

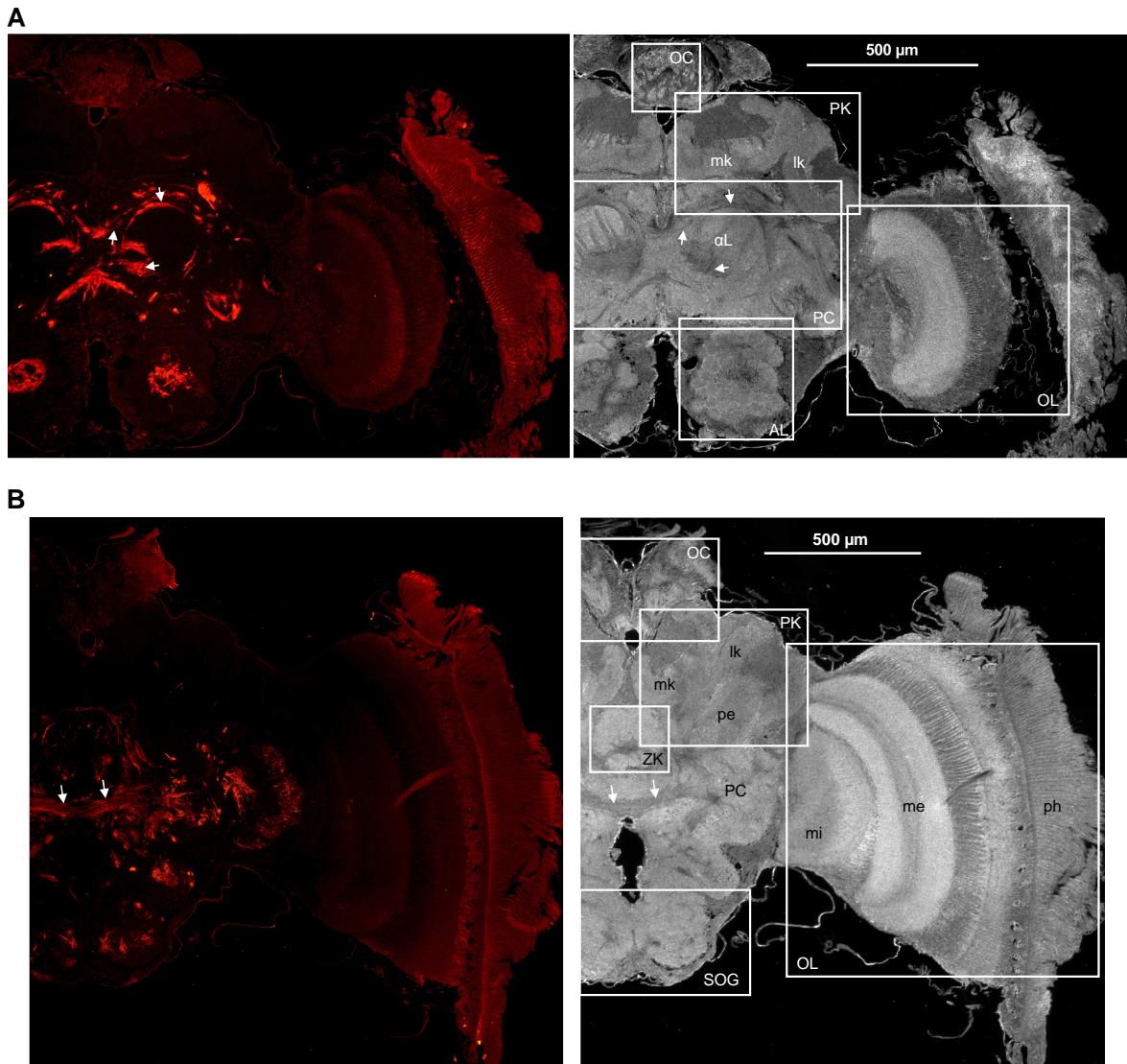


Abbildung 27: Frontalschnitt des Bienenhirns in Höhe der α -Loben (A) und des Unterschlundganglions (B). Links: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen nach Immunfärbung mit dem Antiserum GLUT1 a und sekundärem CyTM3-makiertem IgG. Rechts: Phasenkontrast-Aufnahmen derselben Schnitte. Die groben Gehirnregionen sind mit Rechtecken markiert. AL: Antennallobus; PC: Protocerebrum; α L: α -Lobus des Pilzkörpers; PK: Pilzkörper; mk: medianer Kelch des Pilzkörpers; lk: lateraler Kelch des Pilzkörpers; pe: Pedunkel des PK; SOG: Unterschlundganglion (Suboesophageal Ganglion); OC: Ocellen; OL: Optische Loben; mi: Medulla interna der optischen Loben; me: Medulla externa der optischen Loben; ph: Photorezeptoren. Axone von extrinsischen Neuronen der α -Loben (A) und die Faserbündel einer Kommissur (B) sind mit Pfeilen markiert.

mit anderen Neuropilen verbinden [192], wurden detektiert. Darüber hinaus zeigten sich gefärbte Bereiche in den Ocellen (OC) sowie den optischen Loben (OL).

Die optischen Loben (OL) sind in Abbildung 27B noch deutlicher erkennbar. Sie dienen der Perzeption und Verarbeitung optischer Reize, ähnlich wie die menschliche Retina [216]. Eine besonders starke Färbung zeigten sie in Fasern der Medulla interna (mi) sowie basal in den Membranbereichen der Photorezeptoren (ph). Weiterhin waren auch in diesem Präpa-

rat Fasern und Trakte über viele Hirnbereiche zu erkennen, insbesondere eine Kommissur, die Areale der beiden Hemisphären, möglicherweise die optischen Loben, miteinander verbindet.

3.6 Die Untersuchung potenzieller Vermittler der glucoseabhängigen Verhaltensmodulation in der Honigbiene

Im Folgenden stellte sich die Frage, welche molekularen Signale und Signalwege, über den Glucosetransporter hinaus, an der Einstellung des Hämolympghlucosespiegels in der Honigbiene und der Vermittlung des glucoseabhängigen Verhaltens beteiligt sind. Dabei kamen verschiedene Kandidaten in Betracht, die bei bereits bekannten, die Glucose- und Nährstoffhomeostase regulierenden Systemen wichtige Funktionen übernehmen (siehe Abbildung 28).

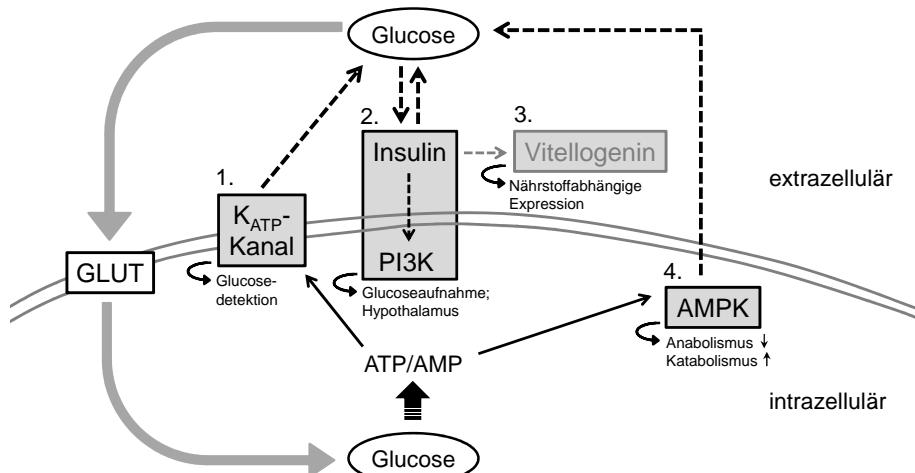


Abbildung 28: Schematische Darstellung bekannter Moleküle und Signalwege bei der Nährstoff- und Glucosehomeostase. 1.: K_{ATP} -Kanäle sind beim Säuger essenziell für die Glucose-detection, sowohl im Pankreas bei der Insulinsekretion als auch in glucosesensitiven Neuronen des Hypothalamus. 2.: Die PI3K als Teil des Insulin-Signalwegs spielt eine entscheidende Rolle bei der insulinvermittelten Glucoseaufnahme aus dem Blutkreislauf und ist im Hypothalamus an der zentralen Energiehomeostase beteiligt. 3: Vitellogenin unterliegt bei Insekten einer nährstoffabhängigen Expression. Die Beziehung zur Hämolympghlucose ist unbekannt. 4.: Die AMPK wird bei Energiemangel aktiviert und führt beim Säuger u.a. zur erhöhten Glucoseaufnahme in die Zelle. Diese Kandidaten (1.-4.) kommen neben dem Glucosetransporter (GLUT) als Modulatoren des Hämolympghlucosespiegels in der Honigbiene in Betracht.

So wurden in den folgenden Experimenten die Effekte der Aktivierung und Inhibition von K_{ATP} -Kanälen, die bei der Glucosendetektion im Säuger eine Rolle spielen, sowie des Insulin-Signalwegs durch Manipulation der Phosphoinositid-3-Kinase (PI3K) auf die Hämolympghlucose und die Zuckerwasserempfindlichkeit der Biene untersucht. Weiterhin wurde eine vergleichende Betrachtung der Expression des Dotterprotein-Vorläufers Vitellogenin (Vg) mit der Hämolympghlucose und der Zuckerwasserempfindlichkeit vorgenommen. Auch

die Wirkung des AMPK-Aktivators AICAR in diesem Zusammenhang und die Aktivität der Kinase im Bienenhirn in Abhängigkeit des Fütterungsstatus wurden näher überprüft.

3.6.1 ATP-sensitive Kaliumkanäle haben keinen Einfluss auf die Hämolympghglucose und die Zuckerwasserempfindlichkeit

K_{ATP} -Kanäle spielen eine wichtige Rolle als Glucose-Sensorsystem in den Zellen vieler Gewebe wie Muskeln, Niere, Gehirn und insbesondere dem Pankreas. Sie öffnen und schließen sich in Abhängigkeit der ATP-Verfügbarkeit und vermitteln so über das Membranpotential verschiedene zelluläre und systemische Funktionen, die mit dem Glucosehaushalt in Verbindung stehen (vgl. Abbildung 28). In der Honigbiene selbst ist bisher nichts über funktionelle K_{ATP} -Kanäle bekannt, jedoch verfügt die Fruchtfliege (*Drosophila melanogaster*) in endokrinen Zellen der Corpora Cardiaca über ein konserviertes Glucose-Sensorsystem mit K_{ATP} -Kanälen.

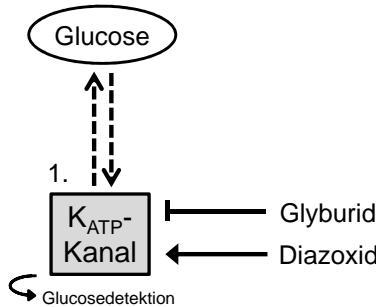


Abbildung 29: Pharmakologische Manipulation von K_{ATP} -Kanälen. Diazoxid öffnet K_{ATP} -Kanäle, was die Ausbildung eines Ruhepotentials an der Zellmembran ermöglicht. Glyburid ist ein Kanalblocker, der durch Schließung der Kanäle eine Depolarisation der Membran nach sich zieht, was z.B. im Pankreas die Insulinsekretion auslöst.

In den folgenden Experimenten sollten die Auswirkungen einer pharmakologischen Manipulation von potenziellen K_{ATP} -Kanälen in der Honigbiene im Zusammenhang mit der Hämolympghglucose und der Zuckerwasserempfindlichkeit aufgeklärt werden. Hierzu wurden der K_{ATP} -Kanal-Öffner Diazoxid sowie der K_{ATP} -Kanal-Blocker Glyburid eingesetzt (siehe Abbildung 29).

Eine Glyburid-Injektion bewirkt beim Säuger einen schnelleren Abfall der Blutglucose. Remedi und Nichols erzielten durch die Injektion von 30 μ g Glyburid einen erniedrigten Glucosespiegel bei Mäusen innerhalb von 15 min [186]. Auch bei *Drosophila*-Larven wurde der Inhibitor bereits eingesetzt und wirkte sich auf die Hämolympghglucose aus [125]. Die Injektion von 40 μ M Glyburid (Endkonzentration; entspricht etwa Remedi und Nichols) in die Honigbiene unmittelbar vor der Fütterung (20 μ l Saccharoselösung) zeigte jedoch keinen Effekt auf den Hämolympghglucosespiegel, weder 10 min noch 30 min nach Fütterung (nicht gezeigt). Auch die Zuckerwasserempfindlichkeit blieb 10 min, 30 min sowie 3 h nach Injektion unbeeinflusst (nicht gezeigt).

Die Injektion von $100 \mu\text{M}$ Diazoxid (Endkonzentration) verursachte ebenso keine Effekte bei der Hämolympgh glucose und der Zuckerwasserempfindlichkeit 30 min und 3 h nach Injektion (Fütterung: $20 \mu\text{l}$ Saccharoselösung 1 h vor Injektion; nicht gezeigt). Die Effektivität von Diazoxid in dieser Konzentration konnte in Säugern *in vivo* durch die Erhöhung der Blutglucose und die Herabsetzung der Insulinsekretion demonstriert werden [183, 237]. Damit ist davon auszugehen, dass K_{ATP} -Kanäle als Sensor- und Regulationssystem der Hämolympgh glucose in der Honigbiene nicht dieselbe Rolle spielen wie beim Säuger.

3.6.2 Der Insulin-Signalweg

Der Insulin-Signalweg nimmt beim Säuger eine Hauptfunktion im Energiehaushalt ein und scheint auch bei vielen Insekten eine konservierte Funktion zu haben. Insulin dockt an den Insulinrezeptor an, der intrazellulär durch Phosphorylierungen den Insulin-Signalweg in Gang setzt. Eine wichtige Komponente ist die Phosphoinositid-3-Kinase (PI3K). Sie vermittelt unter anderem blutzuckersenkende Wirkungen von Insulin, wie die Translokation, aber auch Neusynthese von Glucosetransportern beim Säuger [42, 131, 184]. Insulin und der Insulin-Signalweg haben aber auch zentrale Wirkungen, z.B. im Hypothalamus (vgl. Abbildung 28). Auch bei *Drosophila* konnte eine nährstoffabhängige Aktivität des Insulin-Signalwegs gezeigt werden, der am Glucosehaushalt beteiligt ist [112, 191]. Die Honigbiene besitzt zwei charakterisierte insulinähnliche Peptide (Insulin-like Peptides, ILPs) und Komponenten des Insulin-Signalwegs, wie den Insulinrezeptor und das Insulinrezeptor-Substrat, die mit dem sozialen Sammelverhalten und den Nährstoffspeichern in Verbindung stehen [10, 227]. Aus diesem Grund war die Untersuchung des Insulin-Signalwegs bei der Regulation der Hämolympgh glucose und dem damit in Verbindung stehenden Verhalten in dieser Arbeit von Interesse.

Zur Manipulation des Insulin-Signalwegs dienten Wortmannin und LY294002, zwei In-

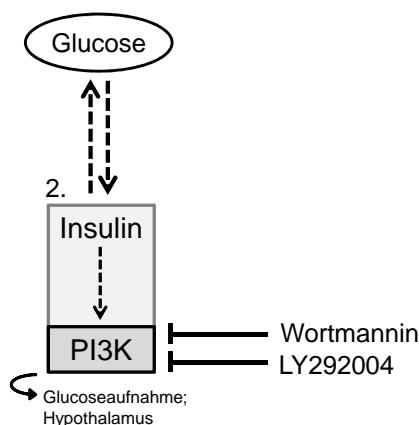


Abbildung 30: Pharmakologische Inhibition der PI3K. Wortmannin und LY294002 sind Inhibitoren der PI3K, welche eine Komponente des Insulin-Signalwegs darstellt.

hibitoren der Phosphoinositid-3-Kinase (siehe Abbildung 30). Wortmannin blockiert die katalytische Untereinheit der PI3K irreversibel und ist ein gängiger PI3K-Inhibitor, der sowohl bei Vertebraten als auch bei Invertebraten, wie *Drosophila* oder *Bombyx mori*, eingesetzt wird [145, 154, 188, 222]. Auch LY294002 ist ein bereits in Invertebraten bestätigter, spezifischer Blocker, der die katalytische Untereinheit im Gegensatz zu Wortmannin reversibel bindet [188]. Die katalytische Untereinheit der PI3K existiert im Bienengenom als vorhergesagte Proteinsequenz (NCBI Accession: XP_623897).

3.6.2.1 Die Manipulation der Phosphoinositid-3-Kinase und der Einfluss auf die Zuckerwasserempfindlichkeit Die Versuchstiere wurden jeweils 2 h vor der Injektion der PI3K-Inhibitoren Wortmannin oder LY294002 mit 20 μ l Saccharoselösung gefüttert und vor der Injektion sowie zu zwei weiteren Zeitpunkten, 30 min und 2 h nach Injektion, auf ihre Zuckerwasserempfindlichkeit getestet. Dabei wurde die Veränderung des „Sucrose Response Score“ vor und nach der Injektion beobachtet (Δ Sucrose Response Score = Sucrose Response Score nach Injektion - Sucrose Response Score vor Injektion).

Wortmannin wurde in zwei verschiedenen Konzentrationen eingesetzt, 100 nM und 1 μ M (Endkonzentration). Während bei 1 μ M Wortmannin zu keinem Zeitpunkt ein Effekt auftrat (nicht gezeigt), so zeigte der „Sucrose Response Score“ bei 100 nM Wortmannin 30 min nach Injektion einen signifikant geringeren Anstieg als bei Kontrolltieren (siehe Abbildung 31). Wortmannin übte demnach einen inhibitorischen Effekt auf die Zuckerwasserempfind-

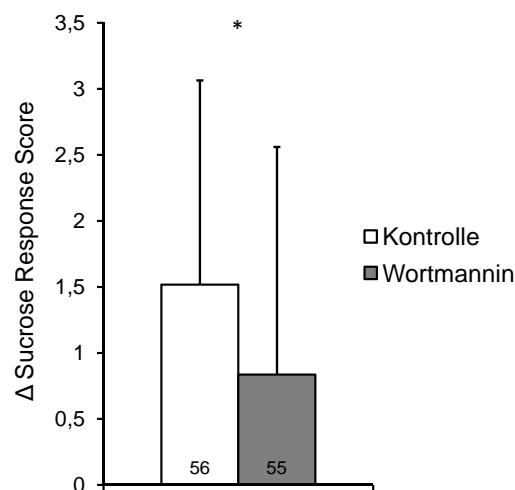


Abbildung 31: Der PI3K-Inhibitor Wortmannin reduziert die Zuckerwasserempfindlichkeit. Die Tiere wurden 2 h vor dem Experiment mit 20 μ l Saccharoselösung gefüttert und unmittelbar vor der Injektion mit 100 nM (Endkonzentration) Wortmannin oder 50% DMSO (Kontrolle) in 2 Gruppen gleicher Zuckerwasserempfindlichkeit aufgeteilt. 30 min nach Injektion wurde ein zweiter Test auf die Zuckerwasserempfindlichkeit durchgeführt. Dargestellt ist der Anstieg des „Sucrose Response Score“ 30 min nach der Injektion im Vergleich zum „Sucrose Response Score“ vor der Injektion (Δ Sucrose Response Score). Mann-Whitney Rangtest; *: $p \leq 0,05$. Die Zahlen in den Balken geben die Anzahl der Versuchstiere an.

lichkeit aus.

LY294002 wurde ebenfalls in zwei Konzentrationen, 15 und 150 μ M, injiziert. Auch hier zeigte sich mit einer Konzentration von 15 μ M eine Tendenz in Richtung einer Reduktion der Zuckerwasserempfindlichkeit, die jedoch nicht signifikant war ($n = 46/47$; $p = 0,09$; nicht gezeigt).

Die herabgesetzte Reaktionsbereitschaft infolge der Inhibition des Insulin-Signalwegs steht im Einklang mit der bei der Biene beschriebenen Erhöhung der *ILP*-Expression bei niedriger Nährstoffverfügbarkeit [10]. Blieb zu klären, ob die durch Wortmannin verursachte Verhaltensmodulation auf eine Erhöhung der Hämolympghucose zurückzuführen war.

3.6.2.2 Die Inhibition der Phosphoinositid-3-Kinase hat keinen Einfluss auf die Hämolympghucose Wieder wurden beide PI3K-Inhibitoren, Wortmannin und LY294002, in den Konzentrationen eingesetzt, bei denen sie (zumindest Wortmannin) einen Effekt in der Zuckerwasserempfindlichkeit aufgezeigt hatten (100 nM bzw. 15 μ M). Auch die Messung der Hämolympghucose erfolgte zu denselben Zeitpunkten vor und nach der Injektion wie bereits die Bestimmung der Zuckerwasserempfindlichkeit mit derselben Fütterung (20 μ l Saccharoselösung 2 h vor Injektion). Es war jedoch in beiden Fällen zu keinem der Zeitpunkte ein Effekt der Inhibitoren auf den Hämolympgh glucosespiegel festzustellen (Wortmannin siehe Abbildung 32; LY294002 nicht gezeigt).

Der Insulin-Signalweg scheint demnach keinen Einfluss auf die Einstellung des Glucose-

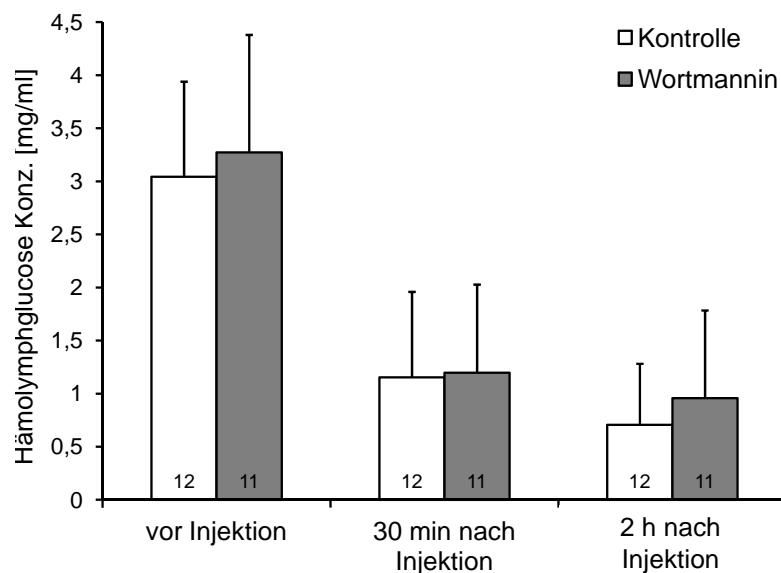


Abbildung 32: Der PI3K-Inhibitor Wortmannin hat keinen Effekt auf die Hämolympgh glucose. Die Tiere wurden 2 h vor der Injektion von Wortmannin (100 nM Endkonzentration) oder 50% DMSO (Kontrolle) mit 20 μ l Saccharoselösung gefüttert. Die Bestimmung der Hämolympgh glucose erfolgte 20 min vor sowie 30 min und 2 h nach der Injektion. Mittelwerte und Standardabweichungen sind dargestellt. Ungepaarter t-Test. Die Zahlen in den Balken geben die Anzahl der Versuchstiere an.

spiegels zu haben. Die Effekte auf die Zuckerwasserempfindlichkeit können so entweder auf eine der Hämolympghglucose nachgeschaltete Funktion des Insulin-Signalwegs oder auf die Vermittlung glucoseunabhängiger Wirkungen zurückzuführen sein. Beispielsweise sind ILPs auch an der Signalverarbeitung anderer Nährstoffe beteiligt [38]. Darüber hinaus vermittelt die PI3K nicht nur durch Insulin, sondern auch durch diverse Wachstumsfaktoren induzierte Prozesse [197, 242].

3.6.3 Die Vitellogenin-Expression korreliert nicht mit der Hämolympheglucose und der Zuckerwasserempfindlichkeit: Unterschiede zwischen Sommerbienen und Bienen im Winterflughäus

Die Expression des Speicherproteins Vitellogenin (Vg) im Fettkörper der Honigbiene erfordert eine ausreichende Nährstoffverfügbarkeit und ist eng an den Proteinkonsum gekoppelt [31]. Während des Stadiums als Stockarbeiterin weist die Biene hohe Vg-Titer auf, die das Sammelverhalten (das sich auch in der Zuckerwasserempfindlichkeit widerspiegelt) unterdrücken. Mit dem Abbau der Nährstoffspeicher, der mit Erreichen des Sammlerinnen-Status einhergeht, wird die Vg-Expression reduziert und das Sammelverhalten induziert [7, 70]. Parallelen zum Hämolympgh glucosespiegel sind jedoch nicht bekannt (vgl. Abbildung 33).

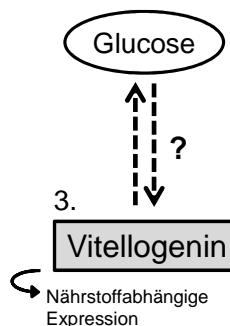


Abbildung 33: Schematische Darstellung eines hypothetischen Zusammenhangs zwischen Vitellogenin und Glucose. Vitellogenin wird in Abhängigkeit von verfügbaren Aminosäuren exprimiert. Gibt es auch einen Zusammenhang zur Glucoseverfügbarkeit?

Einen guten Ansatzpunkt, um eine potenzielle Verbindung zwischen dem glykämischen Status und der Vg-Expression zu untersuchen, lieferte eine genauere Betrachtung der im Winter im Flughäus untergebrachten Tiere. Sie werden im Winter, wenn natürlicherweise keine Flieger verfügbar sind, üblicherweise für alle Experimente eingesetzt. Dennoch ist keine genauere Charakterisierung ihrer physiologischen Eigenschaften bekannt.

Im Rahmen dieser Arbeit hat sich herausgestellt, dass sich vor allem Stockbienen im Winterflughäuschen anhand ihres Hämolympheglucosegehalts von tatsächlichen Sommertieren (Stock im Freien) unterschieden. Während frisch gefangene Stockbienen im Sommer einen sehr hohen Glucosespiegel im Vergleich zu Fliegern aufwiesen, befand sich die Hämolymphe der Fliegen im Sommer ebenfalls im Bereich der Stockbienen.

lymphglucosekonzentration von Stockbienen im Winterflughäus auf demselben niedrigen Niveau wie dem der Flieger. Der Glucosespiegel der Stockbienen im Winterflughäus war damit hoch signifikant niedriger als der der Stockbienen im Sommer (siehe Abbildung 34).

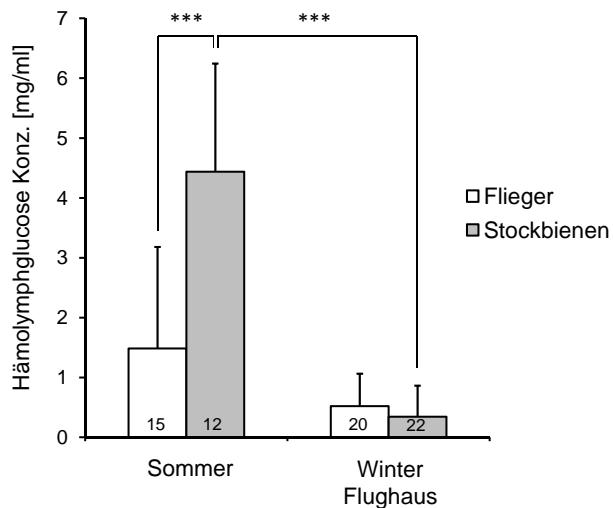


Abbildung 34: Bienen im Winterflughäus sind bezüglich ihres Glucosespiegels mit Sommertieren nicht identisch. Die Hämolympghucose frisch gefangener Flieger und Stockbienen wurde im Sommer (Stock im Freien) und im Winter (Stock im Flughäus) bestimmt. Mittelwerte und Standardabweichungen sind dargestellt. Die Zahlen in den Balken geben die Anzahl der Versuchstiere an. Ungepaarter t-Test; ***: $p \leq 0,001$.

Die in dieser Arbeit beschriebene Abhängigkeit zwischen Hämolympghucose und Zuckerrwasserempfindlichkeit („Sucrose Response Score“) blieb dabei immer bestehen und unterschied sich dort signifikant zwischen Fliegern und Stockbienen, wo auch signifikante Unterschiede im Glucosespiegel aufgetreten waren (nur teilweise gezeigt; siehe Abbildung 35C, D).

So stellte sich die Frage, ob sich auch das Verhältnis der Vg-Expression bei Stockbienen und Fliegern im Winterflughäus im Vergleich zu Sommertieren verändert und mit der Hämolympghucose und der Zuckerrwasserempfindlichkeit korreliert. Um die vermuteten Parallelen aufzudecken, wurde in denselben Tieren eine Bestimmung der Vitellogeninmenge im Abdomen, in dem sich die Zellen des Vg-exprimierenden Fettkörpers befinden [173], vorgenommen. Hierzu wurde ein innerhalb der Arbeitsgruppe selbst hergestellter monoklonaler Antikörper im ELISA verwendet. Der Antikörper wurde durch die Immunisierung von Mäusen mit einem Homogenat aus Bieneneiern, welche sehr große Mengen an Vitellogenin enthalten, gewonnen. Die Spezifität des Antikörpers wurde ebenfalls bereits in einem Westernblot auf Bieneneier bestätigt (nicht gezeigt), der eine einzige Bande bei etwa 200 kDa aufwies (Vg NCBI Accession: AJ517411; 201 kDa).

In Abbildung 35A ist klar zu erkennen, dass entgegen der Erwartung Stockbienen im Winterflughäus, trotz ihres niedrigen Glucosespiegels und der hohen Zuckerrwasserempfindlichkeit, so hohe Vitellogeninmengen besaßen, dass sie nicht von natürlichen Winterbienen

in einem Stock im Freien zu unterscheiden waren. Die Vg-Expression der Stockbienen im Flughause war damit selbst signifikant größer als bei Sommer-Stockbienen ($0,27 \pm 0,18$; Mittelwert und Standardabweichung normiert auf Winter-Stockbienen im Freien; nicht gezeigt). Die Vg-Mengen der Flieger hingegen waren niedrig und unterschieden sich nicht von Sommer-Fliegern im Freien (nicht gezeigt).

Um dieses überraschende Ergebnis zu bestätigen, wurden zusätzlich repräsentative histologische Abdomen-Präparate von Winterbienen im Flughause und im Freien gefertigt. Die Schnitte zeigten wie erwartet eine Färbung der Fettkörper-Zellen, die eine Schicht entlang

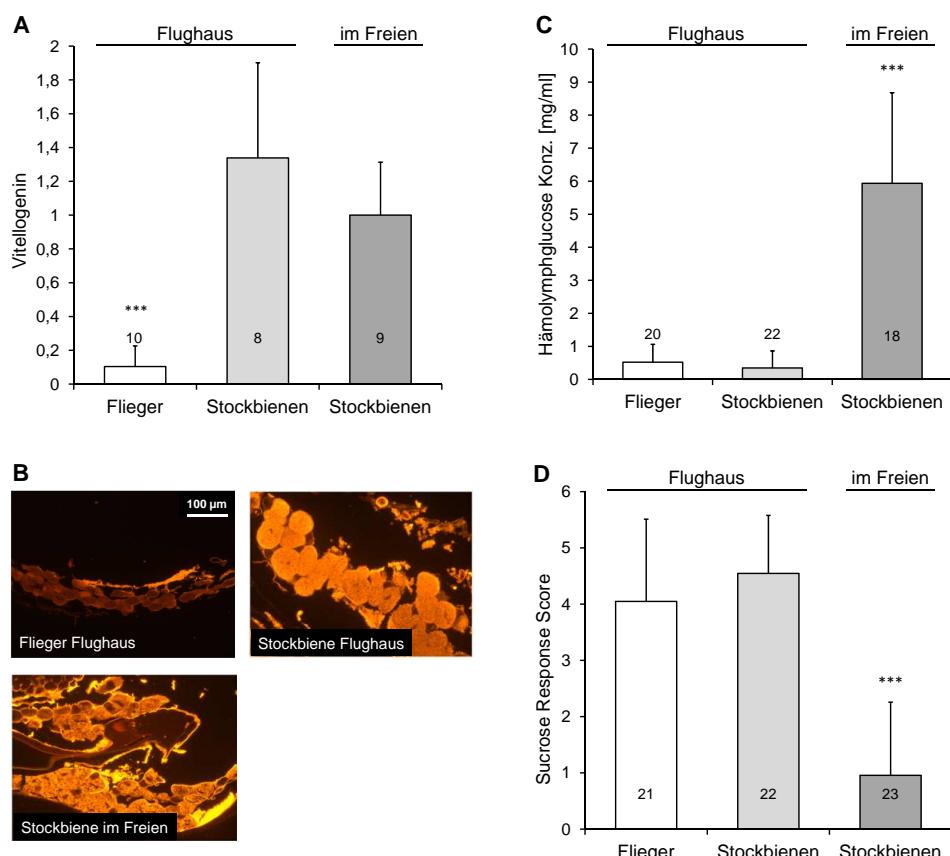


Abbildung 35: Die Vitellogenin-Proteinexpression zeigt keine Parallelen zur Hämolympghglucose und Zuckerrwasserempfindlichkeit. A: Immunologische Bestimmung der im Abdomen enthaltenen Vg-Menge im ELISA. Es wurden Homogenat-Verdünnungsreihen des Abdomens mit primärem Vg-Antikörper und sekundärem Antikörper (Alkalische Phosphatase-Konjugat) gefärbt. Dargestellt sind Mittelwerte und Standardabweichungen der normierten Steigungen der Absorptionswerte. **B:** Immunologischer Nachweis von Vg in histologischen Fettkörper-Präparaten. Gezeigt sind fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen CyTM3-gefärbter Querschnitte der Abdomenmitte im ventralen oder dorsalen Körperwandbereich. **C:** Die Hämolympghglucose wurde ohne Fütterung nach dem Fangen bestimmt. Mittelwerte und Standardabweichungen sind dargestellt. **D:** Direkt nach dem Fangen wurde die Zuckerrwasserempfindlichkeit getestet. Diese ist als Mittelwert des Sucrose Response Score mit Standardabweichung aufgetragen. Alle Resultate stammen von Winterbienen, die aus einem Stock im Freien oder aus dem Flughause abgesammelt wurden. Die Versuche in A, C, und D beinhalten dieselben Tiere. Ungepaarter t-Test; ***: $p \leq 0,001$. Die Zahlen in/über den Balken geben die Anzahl der Versuchstiere an.

der Körperwand bilden. Diese waren sowohl bei natürlichen Stockbienen als auch bei Stockbienen aus dem Flughaus sichtbar stärker immungefärbt als bei Fliegern und unterstützten so die im ELISA erlangten Resultate der Vitellogenin-Quantifizierung (siehe Abbildung 35B).

Damit konnte gezeigt werden, dass kein direkter Zusammenhang zwischen der Hämolympghucose und der Vitellogenin-Expression besteht, was gleichzeitig die vermuteten Parallelen zwischen Zuckerwasserempfindlichkeit und Vitellogenin-Verfügbarkeit widergelegt.

3.6.4 Die AMP-abhängige Proteinkinase (AMPK) als Vermittler des glucoseabhängigen Verhaltens

Die AMP-abhängige Proteinkinase (AMPK) als zentraler zellulärer Energiesensor in eukaryotischen Zellen reagiert auf Schwankungen des ATP/AMP-Verhältnisses. Sobald das Energieniveau sinkt, AMP also ansteigt, wird die Kinase aktiviert und dämmt anabolische, ATP verbrauchende Stoffwechselwege ein, während sie durch die Aktivierung katabolischer Stoffwechselwege die ATP-Verfügbarkeit fördert (vgl. Abbildungen 28 und 36) [94]. Umgekehrt ist sie bei Energieüberschuss inaktiv. Die AMPK ist dabei sowohl an der zellulären als auch an der systemischen Energiehomeostase beteiligt und ihre Verbindung zu zentralen Verhaltensmodulationen, insbesondere dem Fressverhalten, wurde bereits belegt [12, 158]. Auch bei *Drosophila* nimmt die AMPK eine ausschlaggebende Rolle bei der Energiehomeostase ein [117]. Für die Honigbiene sind zwei Untereinheiten der AMPK als vorhergesagte Proteinsequenzen zu finden (NCBI Accessions: α -Untereinheit XP_623371; β -Untereinheit XP_393160).

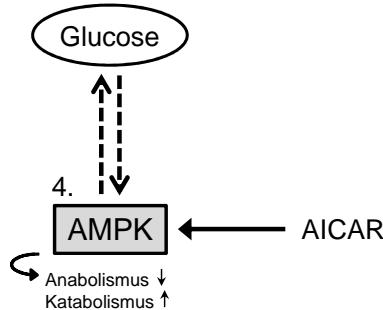


Abbildung 36: Pharmakologische Aktivierung der AMPK. AICAR bildet in der Zelle ein AMP-Analogon und wirkt so als AMPK-Aktivator. Es werden Prozesse aktiviert, die zur Energiegewinnung dienen, wie z.B. eine erhöhte Glucoseaufnahme und Glykolyse.

Die nachfolgenden Experimente beschäftigten sich mit der Wirkung des Adenosin-Analogons AICAR, einem AMPK-Aktivator (siehe Abbildung 36), auf den Hämolympghucosespiegel, die Zuckerwasserempfindlichkeit sowie das appetitive Lernen und Gedächtnis in der Honigbiene. Weiterhin wurde die AMPK-Aktivität im Bienenhirn zu verschiedenen Zeiten nach Fütterung betrachtet.

3.6.4.1 Der AMPK-Aktivator AICAR erhöht den Hämolympghlucosespiegel In verschiedenen Arbeiten wurde bereits gezeigt, dass die Aktivierung der AMP-abhängigen Proteinkinase zu einer erhöhten Glucoseaufnahme in Skelettmuskeln und zu einer Erniedrigung der Blutglucose führt [14, 41]. Es liegen aber auch Studien vor, die von einer Reduktion der Glucoseaufnahme infolge einer AMPK-Aktivierung durch AICAR in Adipozyten berichten [83, 194].

Der Effekt einer AICAR-Injektion gängiger Konzentration (2 mM) auf den Glucosespiegel der Biene ist in Abbildung 37 dargestellt. Zu sehen ist, dass AICAR-behandelte Tiere 30 min nach Injektion einen höheren Glucosespiegel aufwiesen als PBS-injizierte Tiere, obwohl sich beide Gruppen vor Injektion (1,5 h nach Fütterung) auf dem gleichen gykämischen Niveau befunden hatten. Offenbar führte AICAR zu einer verlangsamten Abnahme des Glucosegehalts nach Fütterung, was erste Hinweise auf die Beteiligung des AMPK-Signalwegs an der Einstellung des Hämolympghlucosespiegels der Biene gab.

Möglicherweise führte AICAR auch hier, ähnlich wie in Ratten-Adipozyten [83, 194], zu einer Verlangsamung der Glucoseaufnahme, sodass diese länger in der Hämolymphe verblieb. Eine Inaktivierung ATP-verbrauchender Stoffwechselwege, die durch AMPK vermittelt werden, wie die Glykogensynthese, können ebenfalls eine Rolle gespielt haben [74].

Im Bezug auf die Expression der *GLUT1*-mRNA wurden 30 min nach AICAR-Injektion im Hirn und im Körper keine Effekte sichtbar (nicht gezeigt). Es wurden jedoch im Rahmen dieser Arbeit keine Untersuchungen auf Proteinebene durchgeführt, sodass dennoch nicht ausgeschlossen ist, dass eine Veränderung der GLUT1-Expression in die AICAR-

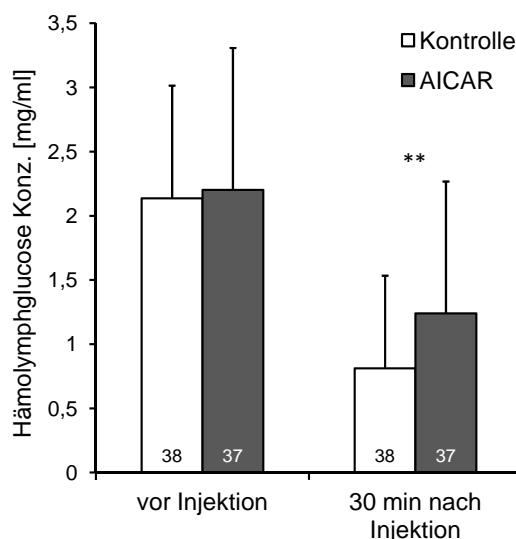


Abbildung 37: AICAR führt zu einem erhöhten Hämolympghlucosespiegel. Die Tiere wurden 1,5 h vor der AICAR- bzw. Kontroll-Injektion (2 mM Endkonzentration/PBS) mit 20 μ l Saccharoselösung gefüttert. Die Bestimmung des Glucosespiegels erfolgte 20 min vor und 30 min nach Injektion. Mittelwerte und Standardabweichungen sind dargestellt. Ungepaarter t-Test; **: $p \leq 0,01$. Die Zahlen in den Balken geben die Anzahl der Versuchstiere an.

vermittelte Erhöhung des Glucosespiegels involviert ist. In Ratten-Adipozyten ist die verminderte Glucoseaufnahme durch AICAR-Behandlung an eine Reduktion von Glucosetransportern (GLUT4) in der Plasmamembran gekoppelt [83, 194], während umgekehrt AICAR- bzw. AMPK-vermittelte Steigerungen der GLUT-mRNA-Expression sowie Protein-Oberflächenexpression in Muskelgewebe bekannt sind [108, 136, 246].

3.6.4.2 Der AMPK-Aktivator AICAR erniedrigt die Zuckerwasserempfindlichkeit und verschlechtert das Lernen und Gedächtnis Sollte die Hypothese zutreffen, dass AICAR durch die Einstellung des Hämolympghlucosespiegels die Vermittlung des glucoseabhängigen Verhaltens beeinflusst, waren demnach bei einer identischen AICAR-Behandlung auch Effekte bei der Zuckerwasserempfindlichkeit und bei der Konditionierung zu erwarten. So wurde zu dem Zeitpunkt 30 min nach Injektion, zu dem sich der Glucosespiegel auf einem erhöhten Niveau befand, zum einen die Zuckerwasserempfindlichkeit bestimmt, zum anderen ein Konditionierungsexperiment mit 3 Trials durchgeführt.

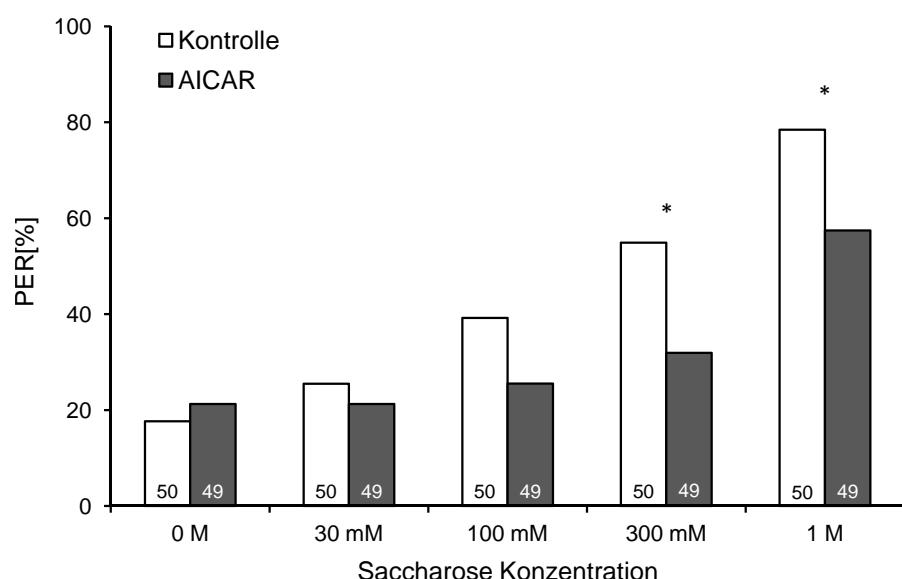


Abbildung 38: AICAR erniedrigt die Zuckerwasserempfindlichkeit des PER. Die Tiere wurden 1,5 h vor dem Experiment mit 20 μ l Saccharoselösung gefüttert und unmittelbar vor der Injektion mit 2 mM (Endkonzentration) AICAR oder PBS (Kontrolle) in 2 Gruppen gleicher Zuckerwasserempfindlichkeit aufgeteilt. 30 min nach Injektion wurde ein zweiter Test der Zuckerwasserempfindlichkeit durchgeführt. Dargestellt ist der Prozentsatz der mit dem Rüsselreflex (PER) auf die Saccharose reagierenden Tiere im zweiten Test. Fisher Exact Test; *: $p \leq 0,05$. Die Zahlen in den Balken geben die Anzahl der Versuchstiere an.

In beiden Fällen konnte bestätigt werden, dass AICAR das Verhalten in der zu erwartenden Richtung beeinflusst. Die Zuckerwasserempfindlichkeit war bei den höchsten Konzentrationen (300 mM und 1 M) signifikant reduziert (siehe Abbildung 38) und entsprechend konnte auch ein verringelter Prozentsatz an Tieren verzeichnet werden, die die Reaktion

auf den CS im Zuge der Akquisition (2. und 3. Trial) wie auch beim Gedächtnisabruft nach 2 Stunden erlernt hatten (siehe Abbildung 39). Der Abruf nach 1 Tag wies keine Effekte mehr auf.

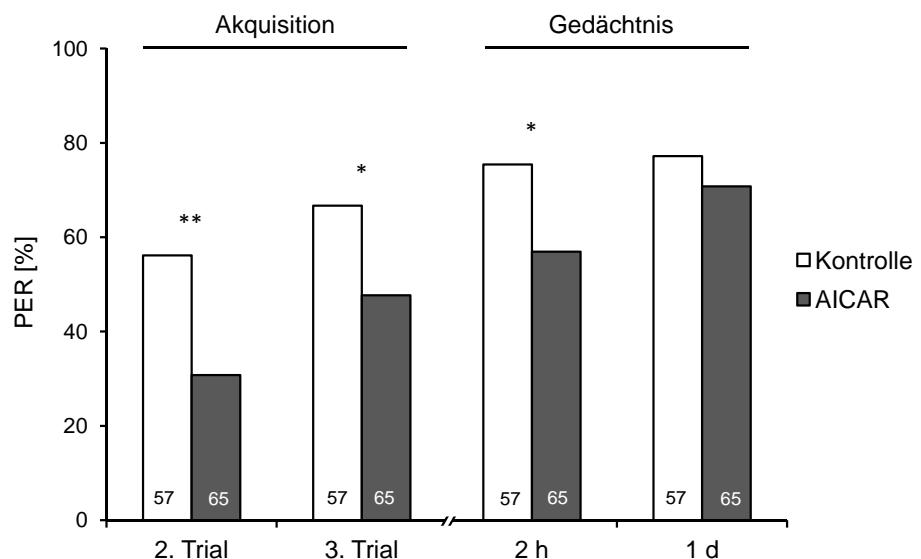


Abbildung 39: AICAR verschlechtert das appetitiven Lernen und Gedächtnis. Die Tiere wurden 1,5 h vor der AICAR- bzw. Kontroll-Injektion (2 mM Endkonzentration/PBS) mit 20 μ l Saccharoselösung gefüttert. 30 min nach der Injektion erfolgte das Training mit 3 Trials. Dargestellt ist der Prozentsatz der mit dem Rüsselreflex (PER) auf den CS reagierenden Tiere. Fisher Exact Test; *: $p \leq 0,05$; **: $p \leq 0,01$. Die Zahlen in den Balken geben die Anzahl der Versuchstiere an.

Leider konnten durch Injektion des ATP-kompetitiven AMPK-Inhibitors Compound C in einer Konzentration von 35 μ M keine gegenteiligen Effekte erzielt werden. In dieser Konzentration konnte innerhalb dieser Arbeitsgruppe eine Aktivitätserhöhung der AMPK durch ADP-Freisetzung unterdrückt werden [137]. Es war aber lediglich eine Tendenz zu einer erhöhten Zuckerwasserempfindlichkeit 30 min nach Injektion zu erkennen (nicht gezeigt). Eine weitere Untersuchung von Konzentrations- und Zeitreihen der Compound C-Injektion sowie der Auswirkungen auf die Hämolympghlucose und das Lernverhalten waren im Rahmen dieser Arbeit nicht mehr möglich und sollte in weiterführenden Experimenten berücksichtigt werden.

3.6.4.3 Die AMPK-Aktivität im Bienenhirn verändert sich in Abhängigkeit des Fütterungszustands Die Behandlung mit dem AMPK-Aktivator AICAR erlaubte gleichzeitig die Manipulation des Glucosespiegels und des Verhaltens der Honigbiene und legte eine wichtige Funktion der AMPK bei der Einstellung des Hämolympghlucosespiegels und somit an der Basis des glucoseabhängigen Verhaltens nahe. Im Weiteren sollte geklärt werden, ob die AMPK-Aktivität im Bienenhirn auch im Zusammenhang mit der Fütterung auf natürlichem Wege moduliert wird.

Die AMPK-Aktivität wurde immunologisch mithilfe zweier kommerzieller Antikörper bestimmt. Dabei richtete sich ein Antikörper gegen AMPK α , die katalytische alpha-Untereinheit der AMPK, ein anderer gegen die alpha-Untereinheit mit einer Phosphorylierung an Threonin 172 (phospho-AMPK α). Eine Phosphorylierung an dieser Stelle geht mit einer 50- bis 100-fachen Aktivitätssteigerung einher [92] und diente so im Verhältnis zur gesamten alpha-Untereinheit als Indikator für die AMPK-Aktivität.

Zunächst wurde die Präsenz von AMPK und phospho-AMPK im Bienenhirn sowie die Spezifität der Antikörper im Westernblot überprüft (siehe Abbildung 40). Beide Antikörper detektierten jeweils eine spezifische Bande zwischen 50 und 64 kDa, wobei die Bande mit dem phosphorylierten Protein erwartungsgemäß etwas höher lag. Die humane AMPK α hat eine Größe von 62 kDa, die vorausgesagte alpha-Untereinheit der Biene 56 kDa mit einer Identität von 65% (NCBI Accession XP_623371).

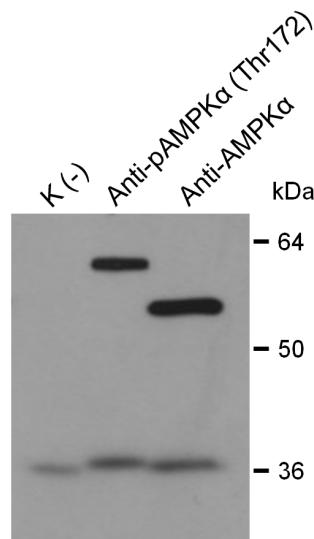


Abbildung 40: AMPK α - und phospho-AMPK α im Bienenhirn. Dargestellt ist die Immunfärbung eines Bienenhirn-Homogenats (2 Hirne in 200 μ l Homogenisierungspuffer) mit den kommerziellen Antikörpern AMPK α (mittlere Spur) und phospho-AMPK α (Thr172; rechte Spur) im Westernblot. Die Antikörper wurden in einer Verdünnung von jeweils 1:1000 eingesetzt. Eine Negativkontrolle ohne Primärantikörper (K(-); linke Spur) wurde mitgeführt. Die Verdünnung des sekundären anti-Kaninchen IgG (Peroxidas-Konjugat) betrug 1:10000.

Um eine potenzielle fütterungsbedingte Aktivitätsänderung der AMPK im Bienenhirn aufzuklären, wurde die AMPK-Aktivität mithilfe der oben beschriebenen Antikörper zu verschiedenen Zeiten nach der Fütterung (5 min, 3 h und 18 h) bestimmt. Die in Abbildung 41 dargestellten Resultate machen deutlich, dass die AMPK-Aktivität tatsächlich in Abhängigkeit des Fütterungszustandes moduliert wurde. Dabei zeigte sich eine signifikant niedrigere Aktivität direkt nach der Fütterung (5 min) im Vergleich zu 3 h nach Fütterung, während sich die AMPK im gehungerten Zustand (18 h) auf einem mittleren Aktivitätsniveau befand.

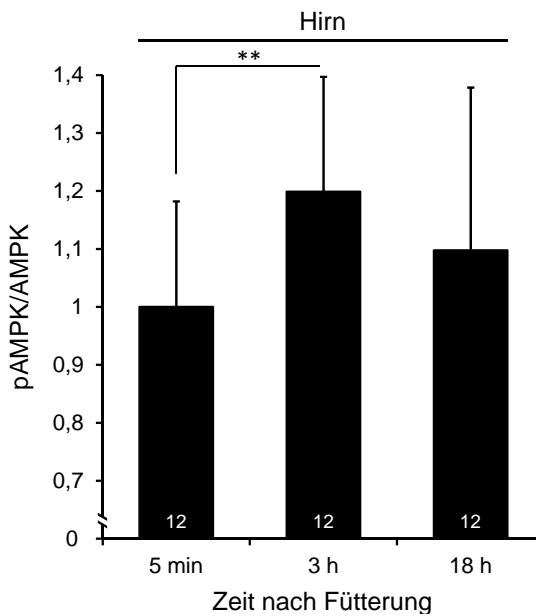


Abbildung 41: Die AMPK-Aktivität im Bienenhirn zu verschiedenen Zeiten nach Fütterung. Die Tiere wurden 18 h gehungert und ihre Gehirne wurden 5 min bzw. 3 h nach Fütterung mit 30 μ l Saccharoselösung oder im hungrigen Zustand (18 h) präpariert. Im ELISA wurden jeweils phospho-AMPK α (pAMPK) sowie gesamt-AMPK α (AMPK) im gleichen Homogenat bestimmt und ins Verhältnis gesetzt. Mittelwerte und Standardabweichungen der Verhältnisse sind dargestellt. Ungepaarter t-Test; **: $p \leq 0,01$. Die Zahlen in den Balken geben die Anzahl der Versuchstiere an.

Somit liegt die Vermutung nahe, dass auch bei der Biene zumindest kurzfristige zentrale Regulationsprozesse des Energiehaushalts durch AMPK gesteuert werden und sie möglicherweise als Vermittler nahrungsbezogener Verhaltensmodulationen fungiert.

3.7 Verschiedene physiologische Merkmale unterliegen bei der Honigbiene saisonalen Unterschieden

Die Lebensbedingungen der Bienen unterscheiden sich im Sommer und im Winter drastisch. Im Sommer fliegen die Bienen aus, sammeln Nahrung und legen Vorräte an, was einen hohen Umsatz an Tieren erfordert. So wird ständig neue Brut produziert und großgezogen. Den Winter hingegen verbringen langlebige Wintertiere ausschließlich im Stock, wobei sie die im Sommer gesammelten Nahrungsvorräte aufbrauchen. Demnach unterscheiden sich auch die physiologischen Voraussetzungen von Winter- und Sommertieren. Ein Beispiel hierfür ist die Vitellogenin-Expression [75], jedoch wurden im Laufe dieser Arbeit weitere Aspekte deutlich, die ebenso auf saisonale Schwankungen hindeuteten.

3.7.1 Die Dynamik des Hämolympghlucosespiegels im Winter

Zunächst fiel auf, dass die Injektion von Glucose vor dem Training, die im Sommer eine Verschlechterung des appetitiven Gedächtnisses hervorrief (siehe Abbildung 16), im Winter zu

keinem Gedächtnisdefizit führte ($n = 47$ bis 58 ; nicht gezeigt). So wurde im Folgenden untersucht, ob auch generell der Zusammenhang zwischen Hämolympghglucose und Zuckerwasserempfindlichkeit (siehe Abbildung 14) im Winter verloren gegangen war. Dies konnte aber ausgeschlossen werden, da die Analyse von 101 Wintertieren immer noch eine signifikante Korrelation ergab (Spearman Korrelation; $r = -0,6$; $p \leq 0,001$; nicht gezeigt).

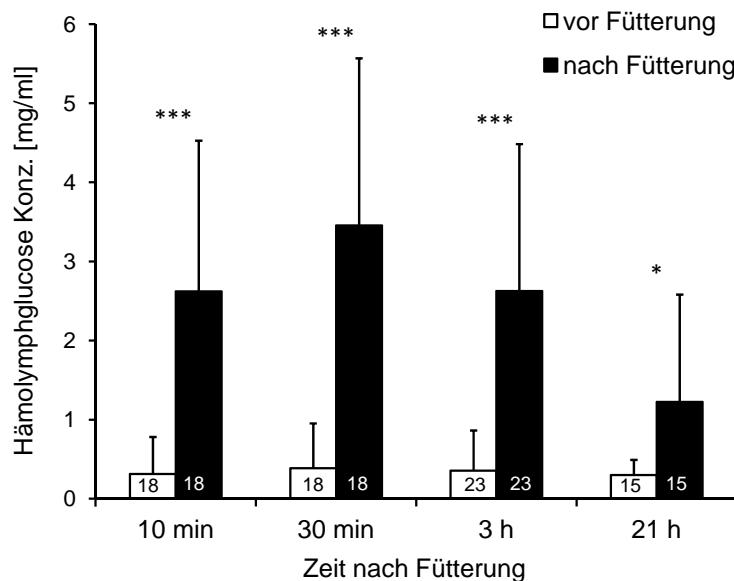


Abbildung 42: Kinetik des Hämolympghglucosespiegels nach Fütterung. Der Glucosespiegel jeden Tieres wurde vor der Fütterung mit $30 \mu\text{l}$ Saccharoselösung und zu mindestens einem weiteren Zeitpunkt gemessen (gepaarter t-Test; *: $p \leq 0,05$; ***: $p \leq 0,001$). Der Glucosespiegel vor der Fütterung unterscheidet sich zwischen den verschiedenen Zeitpunkten nicht (ungepaarter t-Test). Mittelwerte und Standardabweichungen sind dargestellt. Die Zahlen in den Balken geben die Anzahl der Versuchstiere an.

Der dynamische Verlauf des Glucosespiegels nach Fütterung wies jedoch leichte Veränderungen im Vergleich zum Verlauf im Sommer auf (siehe Abbildung 42). Während dieser seinen Höhepunkt bereits 10 min nach der Fütterung erlangt hatte (siehe Abbildung 11), war das Maximum im Winter bei gleicher Behandlung dagegen erst nach 30 min erreicht. Zusätzlich fiel auf, dass der Hämolympghglucosespiegel sogar 21 h nach der Fütterung noch leicht erhöht war.

Die Veränderung in der Dynamik des Glucosespiegels war so vermutlich auch der Grund für das oben beschriebene Ausbleiben eines Gedächtnis-Effekts bei der Glucose-Injektion im Winter. Durch eine Verschiebung oder Verlängerung seines kritischen Zeitfensters war der fütterungs- bzw. US-bedingte Anstieg des Hämolympghglucosespiegels so möglicherweise von der Glucose-Injektion entkoppelt (vgl. Abschnitt 3.4.2).

3.7.2 Die Expression von *GLUT1 a* bei Stockbienen und Fliegern

Ein weiteres Phänomen, das bei getrennter Betrachtung im Sommer und im Winter deutlich wurde, war die thorakale Expression von *GLUT1 a* bei Stockbienen und Fliegern. Während Flieger im Winterflughäus höhere Mengen der Glucosetransporter-mRNA aufwiesen als Sommer-Flieger im Freien, verhielt es sich bei Stockbienen im Winter (Stock im Freien) und im Sommer genau umgekehrt (siehe Abbildung 43). Ihr Expressionsniveau im Thorax war im Sommer höher als im Winter.

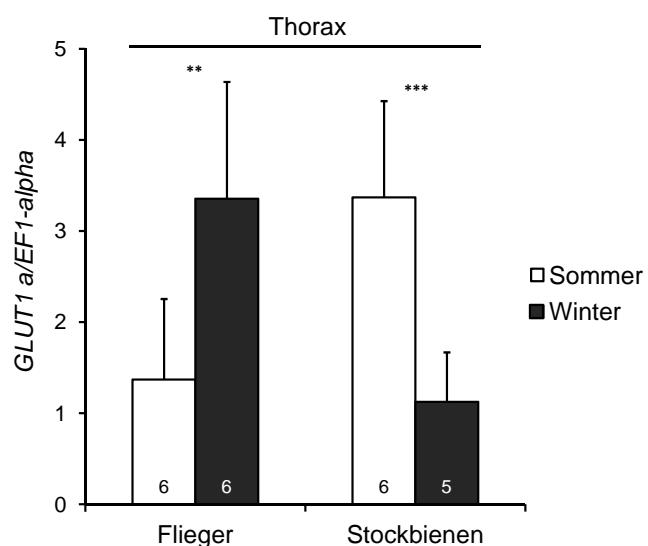


Abbildung 43: Saisonale Unterschiede in der thorakalen mRNA-Expression der *GLUT1*-Isoform a bei Fliegern und Stockbienen. Alle Sommertiere sowie die Winter-Stockbienen stammten aus einem Stock im Freien, die Winter-Flieger aus einem Stock im Flughäus. Die Kopienzahl der *GLUT1* mRNA wurde auf Elongationsfaktor (*EF1-alpha*) mRNA normiert. Mittelwerte und Standardabweichungen sind dargestellt. Ungepaarter t-Test; **: $p \leq 0,01$; ***: $p \leq 0,001$. Die Zahlen in den Balken geben die Anzahl der Versuchstiere an.

Unterschiede zwischen Sommer- und Wintertieren manifestieren sich demnach auch auf Ebene des Glucosetransports. Es ist denkbar, dass die veränderte Kinetik des Glucosespiegels nach Fütterung ebenfalls mit Veränderungen der *GLUT1*-Expression zusammenhängt.

4 Diskussion

Bei der Kommunikation zwischen Körper und Gehirn, die beim systemischen Energiehaushalt unerlässlich ist, spielt die Blutglucose beim Säugetier als Indikator des metabolischen Zustands eine zentrale Rolle.

Die Resultate dieser Arbeit legen die Bedeutung der Hämolympghglucose als internes Signal zur Anpassung des appetitiven Verhaltens, insbesondere des Lernens und der Gedächtnisbildung, an den metabolischen Zustand der Honigbiene dar. Erstmals wurde gezeigt, dass das appetitive Lernen und Gedächtnis in Abhängigkeit des Hämolympghglucosespiegels modulierbar ist und sich die appetitive Belohnung in schnellen Änderungen interner Glucosekonzentrationen widerspiegelt.

Darüber hinaus wurden molekulare Vermittler identifiziert, die mit der Regulation des Hämolympghglucosespiegels in Zusammenhang stehen und appetitive Verhaltensaspekte beeinflussen.

4.1 Die Heterogenität des Hämolympghglucosespiegels - eine Verhaltensspezifizierung

Im ersten Teil dieser Arbeit wurde zunächst demonstriert, dass der Glucosegehalt in der Hämolymphe der Honigbiene sehr großen Schwankungen unterliegt und - im Gegensatz zum Säugersystem - stark auf Veränderungen des Fütterungszustands reagiert. So zeigte sich bei gehungerten Tieren mit ausgesprochen niedrigem Glucosespiegel nach der Fütterung mit 30 μ l Saccharoselösung innerhalb von 10 min ein enormer Anstieg auf etwa das Fünffache der Glucosekonzentration im gehungerten Zustand. Auch frühere Arbeiten bestätigten bereits dieses Phänomen einer schnellen und ausgeprägten Dynamik des Hämolympghglucosespiegels infolge der Nahrungsaufnahme [2, 55, 234]. Während bei diesen Studien jedoch vielmehr der Konsum im Vordergrund stand, sprich die Betrachtung beim Fressen maßgebender Zuckermengen, bewies die vorliegende Arbeit darüber hinaus die Relevanz eines geringfügigen appetitiven Stimulus für die Modulation des internen Glucosestatus.

Beim Lernen und Gedächtnis spielt der unkonditionierte Stimulus eine wichtige Rolle als appetitive Belohnung, welche der Biene an sensorische Eingänge der Antennen und des Rüssels präsentiert wird, und nur aus minimalen Mengen tatsächlich konsumierter Saccharoselösung besteht. Diese appetitive Belohnung (1x oder 3x jeweils etwa 1,6 μ l Saccharoselösung) führte aber dennoch zu einem deutlichen Anstieg der internen Glucosekonzentration innerhalb von 10 min, was in dieser Arbeit zum ersten Mal demonstriert wurde und eine Signalfunktion der Hämolympghglucose, möglicherweise im Zusammenhang mit appetitiven Verhaltensmodulationen, vermuten lässt.

Diese potenzielle Signalfunktion wird zudem durch die in dieser Arbeit erstmals erlangten Befunde untermauert, dass sowohl die Zuckerwasserempfindlichkeit als auch vor allem

die Effizienz des appetitiven Lernens und Gedächtnisses der Biene durch den Hämolympghlucosespiegel bestimmt werden. So wurde einerseits eine stabile negative Korrelation zwischen dem aktuellen Glucosespiegel der Tiere und ihrer Reaktionsbereitschaft auf gustatorische Stimuli aufgedeckt. Andererseits wiesen Tiere mit niedrigem im Vergleich zu hohem Hämolympghlucosegehalt vor dem Training eine weitaus effektivere Akquisition und ein besseres Gedächtnis auf, welches wiederum durch eine Glucose-Injektion vor dem Training reduziert werden konnte.

Eine interessante Auffälligkeit bot dabei die Erkenntnis, dass verschiedene Individuen - trotz gleicher Behandlung - eine stark heterogene Gruppe bezüglich ihres Hämolympghlucosespiegels und dessen dynamischen Veränderungen beim Hungern und der Futteraufnahme bilden. Die Untersuchungen im Laufe dieser Arbeit beschränkten sich zwar häufig auf die beiden Extreme dieses Phänotyps (Tiere mit sehr hoher oder sehr niedriger Glucosekonzentration), es wurde jedoch anhand der Betrachtung der individuellen Abnahme des Glucosespiegels nach Fütterung deutlich, dass die Bienenpopulation vielmehr ein Kontinuum von Individuen mit unterschiedlich schnellen dynamischen Veränderungen des Hämolympghlucosespiegels darstellt und demnach auch breit gestreute individuelle Verhaltenszüge birgt. Der aktuelle, individuelle Hämolympghlucosespiegel war so gleichzeitig auch maßgebend für den Anstieg der internen Glucosekonzentration infolge der Fütterung selbst kleinster Mengen wie bei der appetitiven Belohnung im Zuge der Konditionierung. Während niedrige Glucosespiegel einen drastischen Anstieg gewährleisteten, blieb er bei Individuen mit bereits hohen Glucosekonzentrationen völlig aus, woraus sich die Folgerung ergibt, dass auch die appetitive Belohnung im Zuge des Lernens innerhalb der Bienenpopulation in verschiedensten Ausprägungen verarbeitet wird.

Erklären lässt sich der selektive Anstieg der Glucosekonzentration vermutlich durch den rückkoppelnden Regulationsmechanismus des Zuckertransports über den Proventriculus, der von der Verfügbarkeit des bereits in der Hämolymphe vorhandenen metabolisierbaren Zuckers gesteuert wird. So konnte von Blatt und Roces dargelegt werden, dass eine Injektion von Trehalose, Glucose und Fructose in die Hämolymphe von Bienen die Zuckerentleerung des Kropfes nach Fütterung verringert [34]. Weitreichende Konsequenzen heterogener Hämolympghlucosespiegel sowie insbesondere daraus resultierende dynamische Veränderungen, die sich auf die Verhaltensebene übertragen lassen, wurden hingegen erst in der vorliegenden Arbeit offenbart.

Es ist bekannt, dass die metabolische Rate von Bienen hoch variabel ist und die Zuckertransportrate in den Mitteldarm und die Hämolymphe sowie auch die Konzentration der Hämolymphzucker beeinflussen kann [32, 33]. Möglicherweise ist sie ausschlaggebend für das Phänomen der unterschiedlichen Zustände und dynamischen Verläufe des Hämolympghlucosespiegels gleich behandelter Individuen. Deskriptive Befunde beschreiben Änderungen der metabolischen Rate im Zusammenhang mit der Umgebungstemperatur [32] sowie die Erhöhung der thoraxspezifischen metabolischen Rate und metabolischen Kapazität bei der Entwicklung von der Stockarbeiterin zum Flieger [98]. Darüber hinaus wurden auch Moti-

vationszustände beim Sammelflug mit der metabolischen Rate in Verbindung gebracht. Die Belohnungsstärke, die Flussrate der Zuckerlösung an der Futterquelle, wirkt sich dabei fördernd auf die metabolische Rate aus [24, 161]. Welche Konsequenzen die Variabilität der metabolischen Rate jedoch für das Zusammenspiel zwischen Metabolismus und Verhalten trägt, wurde bislang noch nicht geklärt. Die Resultate der vorliegenden Arbeit liefern mit dem Hämolympghlucosespiegel erstmals ein potenzielles physiologisches Verbindungsglied, dessen konkrete Eigenschaften sich mit der metabolischen Rate ändern und so Verhaltensmodulationen induzieren können.

Die Erhöhung der metabolischen Rate sowie der metabolischen Kapazität bei der Entwicklung von der Stockarbeiterin zum Flieger wurde hauptsächlich mit der Befähigung der Sammlerin in Zusammenhang gebracht, weite Strecken zu fliegen und gleichzeitig die Last ihrer Tracht zu tragen [98]. In Anbetracht der neuen Befunde aus dieser Arbeit, die auch Unterschiede zwischen dem glykämischen Niveau bei Fliegern und Stockbienen (aus Stöcken im Freien) offenbarten, ist es denkbar, dass eine erhöhte metabolische Rate die Flieger darüber hinaus befähigt, aufgrund ihres niedrigeren Hämolympghlucosespiegels eine höhere Zuckerwasserempfindlichkeit und ein effizienteres Lernen und Gedächtnis auszubilden, um ihrer Aufgabe als Sammler gerecht zu werden. Eine Steigerung der metabolischen Rate, wie sie im Zuge der appetitiven Belohnung beim Sammelflug beobachtet wurde [24, 161], könnte durch Modulationen des Glucosespiegels und dessen Dynamik während des Lernens zusätzlich die Belohnungsstärke und infolgedessen die Effizienz des Lernens und Gedächtnisses beeinflussen.

Charakteristische Verläufe des Hämolympghlucosespiegels haben so möglicherweise eine physiologische Bedeutung bei der Belohnungsverarbeitung sowie der Modifikation und Abstimmung des appetitiven Lernverhaltens einzelner Individuen und sind an der Spezifizierung des Verhaltens und der Aufgabenteilung im sozialen Bienenstaat beteiligt.

Über welche Wege die Hämolympghlucose die Zuckerwasserempfindlichkeit sowie das Lernen und die Gedächtnisbildung beeinflussen kann, wird in den folgenden Kapiteln diskutiert.

4.1.1 Die Modulation des Fressverhaltens: zustandsabhängige Anpassungen der Sensorik

Es ist ein bekanntes Phänomen, dass das Fressverhalten von den internen energetischen Bedürfnissen des Organismus, sprich dem Motivationszustand, moduliert werden kann. Dabei ist die Kommunikation zwischen Körper und Hirn von großer Bedeutung. Im Säugersystem sind Neurone des nucleus arcuatus im Hypothalamus in der Lage, auf hormonelle „Hunger-“ und „Sättigungssignale“ wie Leptin, Insulin, und Ghrelin, aber auch direkt auf Änderungen der Glucoseverfügbarkeit im Blut zu reagieren [140, 164, 206]. Dieser Gehirnbereich ist für seine Wirkung auf die Nahrungsaufnahme sowie Motivations- und Belohnungssysteme bekannt. Neurone des nucleus arcuatus produzieren Neuropeptide, wie die stark orexigenen (Appetit anregenden) Peptide NPY (Neuropeptid Y) und AgRP (Agouti-related

Protein). Die Ablation der NPY/AgRP-Neurone führt zu Hypophagie [89, 146], während die zentrale Injektion der Peptide eine übermäßige Futteraufnahme hervorruft [124, 141]. Auch die zentrale Glucosedetektion ist durch die Regulation neuropeptiderger Signalwege für die Kontrolle des Fressverhaltens von Bedeutung [20].

Ein Aspekt, der dabei in Abhängigkeit des Sättigungszustands die Reizprozessierung und damit die Futtersuche und -aufnahme begünstigt, ist die Erhöhung der Sensitivität gegenüber Futterreizen auf der Ebene verschiedener sensorischer Modalitäten, wie Gustatorik und Olfaktorik. So konnte bei Nagetieren und Affen gezeigt werden, dass die neuronale Aktivität sowohl im Zuge der olfaktorischen als auch der gustatorischen Reizprozessierung vom Sättigungszustand abhängt [175, 187] und durch hypothalamische Neuropeptide [95], Leptin [119, 123, 209] oder Insulin [175] modulierbar ist.

Bei Insekten sind die Auswirkungen des Ernährungsstatus auf die Sensorik und die resultierenden Verhaltensweisen sowie deren molekulare Verbindungsstellen ebenfalls Ziel vieler Untersuchungen. Fütterung reduziert die Zuckerwasserempfindlichkeit des Rüsselreflexes in verschiedenen Insekten wie der Biene und der Schmeißfliege *Phormia regina* [71, 79]. In der Heuschrecke konnte anhand der Feuerrate der maxillaren gustatorischen Sensillen gezeigt werden, dass die Empfindlichkeit gegenüber Aminosäuren von der Aminosäuren-Verfügbarkeit in der Hämolymphe beeinflusst wird und durch Aminosäuren-Injektion herabgesetzt werden kann [214]. Die Injektion von Trehalose in die Hämolymphe der Schmeißfliege senkte deren Reaktion auf Zuckerwasser, was auf eine Rolle der verfügbaren Nährstoffe bei der sensorischen Modulation des Fressverhaltens von Insekten hindeutet [6].

Die Wirkung der verfügbaren Glucose hingegen, welche beim Säugetier als Indikator des metabolischen Zustands im Mittelpunkt der systemischen Energieregulation steht, wurde bisher nicht mit Veränderungen der sensorischen Sensitivität in Verbindung gebracht. Die in der vorliegenden Arbeit gefundene negative Korrelation zwischen der Hämolympf-glucose der Biene und ihrer gustatorischen Sensitivität gegenüber Zuckerwasser liefert so einerseits einen weiteren Befund, der die nährstoffabhängige Modulation der sensorischen Prozessierung bei Insekten unterstützt. Darüber hinaus aber deckt sie zusätzliche Parallelen zwischen metabolischen Regulationsmechanismen von Säugern und Insekten auf, was die Bedeutung des Insektensystems für die Untersuchung und Aufklärung pathologischer Fehlfunktionen bei Stoffwechselerkrankungen sowie deren Behandlungsstrategien bekräftigt.

So wurden unlängst auch neuronale Mechanismen aufgedeckt, die unter Einfluss von Neuropeptiden die Sensitivität olfaktorischer Rezeptorneurone (ORN) in *Drosophila* modulieren und das Verhalten beeinflussen [110, 188]. Es wurde beispielsweise gezeigt, dass das *Drosophila*-Homolog des Säuger-Neuropeptids NPY, sNPF (short neuropeptide F), eine präsynaptische Fazilitation in den ORN hervorruft, welche notwendig für die verstärkte duftgesteuerte Futtersuche bei hungrigen Tieren ist. Hunger führte dabei in den ORN zu einer Erhöhung der Expression des sNPF-Rezeptorgens (*sNPFR1*), was von einem künstlichen Insulin-Signal unterdrückt werden konnte [188]. Eine weitere Studie belegt die Ein-

bindung NPY- und insulinähnlicher Signale beim Fressverhalten, wobei die zentrale Überexpression des NPY-Rezeptor-Homologs (*NPFR1*) die Bereitschaft zur Aufnahme schädlichen Futters in satten Larven steigerte. Dieses Verhalten tritt normalerweise nur bei Larven auf Futterentzug auf und konnte durch die Hochregulation des Insulinrezeptors unterbunden werden [239]. Die natürliche Herkunft des Insulin-Signals und so auch die metabolischen Signale an der Basis dieser neuronalen Mechanismen sind jedoch ungeklärt, ebenso wie die Frage nach einem Zusammenhang zur Glucoseverfügbarkeit.

Die Hämolympghglucose, welche in dieser Arbeit erstmals bei Insekten durch eine stabile negative Korrelation mit der sensorischen, gustatorischen Sensitivität in Zusammenhang gebracht wurde, repräsentiert demnach eine neue, physiologische Komponente, die sich nachweislich mit dem Ernährungszustand ändert und das Fressverhalten moduliert. Sie stellt einen Kandidaten als physiologisch-dynamischen Eingang eines säugerähnlichen Kreislaufs zur Anpassung der sensorischen Sensitivität und des Fressverhaltens an den Ernährungszustand dar und liefert so einen weiteren Faktor in einem potenziell konservierten homeostatischen System.

4.1.2 Das appetitive Lernen und Gedächtnis - eine Frage der Belohnung

Änderungen der sensorischen Empfindlichkeit und damit der Reizprozessierung gehen häufig auch mit Modulationen des Lernens und der Gedächtnisbildung einher. Die Verbindung zwischen Zuckerwasserempfindlichkeit und appetitivem Lernen und Gedächtnis kommt bei der Biene beim olfaktorischen und taktilen Lernen zum Ausdruck [169, 201]. Zuckerwasser dient dabei als Belohnung und unterschiedliche Sensitivitäten führen durch die modulierte Reizverarbeitung beim Lernprozess zu individuellen Belohnungsstärken [200]. Demnach war zu erwarten, dass die durch den Status des Hämolympghglucosespiegels gesteuerte Zuckerwasserempfindlichkeit sich auch auf das appetitive Lernen und Gedächtnis der Biene auswirkt. Es stellte sich tatsächlich heraus, dass die Hämolympghglucose vor dem Training maßgebend für die Effizienz der Akquisition und des Gedächtnisses war. Tiere, die auf den konditionierten Duft reagierten, wiesen einen geringeren Glucosespiegel vor dem Training auf als Tiere, die keine Reaktion zeigten. Darüber hinaus verschlechterte eine künstliche Erhöhung des Glucosespiegels vor dem Training durch eine Glucose-Injektion in die Hämolymphe das Gedächtnis. Dies zeigt, dass die modulatorische Signalfunktion der Hämolympghglucose in der Honigbiene nicht nur die sensorische Reizprozessierung und Empfindlichkeit betrifft, sondern auch komplexere Verhaltensweisen wie das appetitive Lernen und Gedächtnis steuert.

Es gibt zwar einige bereits identifizierte metabolische Signale, die sich auf sensorische Aspekte beim Fressverhalten auswirken (siehe Abschnitt 4.1.1), und zudem ist bekannt, dass die sensorische Sensitivität das Lernverhalten beeinflusst [169, 201]. Tatsächlich liegen aber nur sehr wenige Studien vor, die eine explizite Verbindung zwischen den metabolischen Signalen, welche die Sensorik modulieren, und dem appetitiven Lernen und Gedächtnis beschreiben.

Kommunikationsmechanismen auf neuronaler Ebene, die im Zusammenhang mit dem Sättigungszustand den Belohnungswert und das appetitive Lernverhalten kontrollieren, wurden hingegen bereits in Säugetieren sowie unlängst auch in *Drosophila* aufgedeckt. Sie schließen wiederum in beiden Fällen neuropeptidvermittelte Signale ein. Bei Ratten bewirkt die zentrale Injektion des Neuropeptids NPY einen Anstieg der Belohnungsstärke von Futter und Drogen und steigert die konditionierte Reaktion auf Heroin und Kokain [116, 151]. Weitere Neuropeptid produzierende Neurone des Hypothalamus, die Orexin-Neurone, haben direkte neuronale Verbindungen zu dopaminergen Neuronen des Belohnungssystems und ihre Aktivität geht mit der Ausbildung futter- und drogeninduzierter konditionierter Platzpräferenzen einher [72, 96]. Bei der Fruchtfliege sind für die Vermittlung zwischen dem Sättigungszustand und dem appetitiven Gedächtnis neben dem NPY-Homolog (dNPF) ebenfalls dopaminerge Neurone von Bedeutung, die in die Pilzkörper projizieren. So konnten Krashes und Waddell demonstrieren, dass die Stimulierung der dNPF-Neurone einen Futterentzug nachahmt und das Gedächtnis satter Tiere verbessert, wobei die Expression des dNPF-Rezeptors in den dopaminergen Neuronen und deren Inhibition für die Gedächtnissteigerung notwendig ist. Ihre Aktivierung hingegen verschlechterte das Gedächtnis bei hungrigen Fliegen.

Dennoch wurde bislang nicht gezeigt, durch welche physiologischen Faktoren die Information über den energetischen Status des Körpers ins Gehirn übertragen wird, wo sie Modulationen des appetitiven Lernverhaltens generiert. In dieser Arbeit wurde erstmals die Hämolympghucose der Honigbiene als metabolischen Indikator des Ernährungszustands und so als maßgebenden Faktor nicht nur für die sensorische, gustatorische Empfindlichkeit, sondern überdies auch für die Effizienz des appetitiven Lernens und Gedächtnisses identifiziert.

Die Resultate der vorliegenden Arbeit lassen jedoch vermuten, dass die Hämolympgh glucose unabhängig von ihrer negativen Wirkung auf die sensorische Sensitivität und Belohnung einen weiteren, akuten Effekt beim appetitiven Lernen und Gedächtnis der Biene ausübt. Darauf deutet der enorme Anstieg des Hämolympgh glucosespiegels im Zuge der appetitiven Belohnung hin, der in dieser Arbeit erstmals beschrieben wurde und selektiv den „guten Lernern“ mit zuvor niedrigem Glucosespiegel zugeordnet werden konnte. Spielt dieser schnelle Anstieg über die sensorische Belohnung hinaus eine Rolle als internes Belohnungssignal?

4.1.2.1 Der Anstieg des Glucosespiegels - eine interne Belohnung? In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass die Hämolympgh glucose als metabolisches Signal zustandsabhängig die gustatorische Sensitivität beeinflusst und sich so auch erwartungsgemäß negativ auf das appetitive Lernen und Gedächtnis auswirkt. Ferner wurde jedoch eine weitere Eigenschaft des Hämolympgh glucosespiegels offenbart. Demnach treten charakteristische dynamische Veränderungen des Glucosespiegels infolge der appetitiven Belohnung auf, welche ebenfalls durch den aktuellen Glucosegehalt der Hämolymphe vorgegeben sind. Niemals

zuvor wurde gezeigt, dass sich so geringfügige Nahrungsstimuli, die bei einer Konditionierung als Belohnung relevant sind (unkonditionierter Stimulus, US), in einem Anstieg der internen Glucosekonzentration widerspiegeln können, was der appetitiven Belohnung eine wesentlich weitreichendere Bedeutung zukommen lässt.

Es ist bekannt, dass Nahrung und ihr kalorischer Wert beim Säuger wie auch beim Insekt intern und unabhängig von der äußeren Sensorik detektiert, bewertet und auch erlernt werden kann. So präferieren Mäuse den Geschmack nährstofffreien Wassers, welcher mit einer nährstoffhaltigen Mageninjektion kombiniert wurde, vor dem Geschmack ohne Nährstoffzufuhr [182] und es konnte gezeigt werden, dass sich die Futteraufnahme in Abwesenheit von Geschmacksrezeptoren direkt auf das dopaminerige Belohnungszentrum im Maushirn auswirkt, über das auch die geschmackliche Belohnung verarbeitet wird [62]. Neueste Studien bei *Drosophila* belegen, dass Mutanten der Zuckerrezeptoren *Gr5a* und *Gr64a* sowie des *pox-neuro*-Gens, welches chemosensorische Neurone spezifiziert, zwar den Geschmack von Zucker nicht wahrnehmen, ihn aber intern detektieren. Sie bevorzugen so den Verzehr von zuckerangereichertem Agar vor reinem Agar und von metabolisierbaren vor nicht metabolisierbaren Zuckern [69]. Es wurde auch gezeigt, dass Fliegen sich appetitiv auf einen Duft konditionieren lassen, selbst wenn der belohnende Zucker geschmacklos ist und keine Erregung der gustatorischen Rezeptorneurone auslöst, jedoch einen Nährwert besitzt [81]. Burke und Waddell fanden bei einer zweiminütigen Paarung eines Duftes mit geschmacklosem, aber nahrhaftem Zuckers als Futterquelle bereits unmittelbar nach dem Training eine Präferenz für diesen Duft [43].

Diese Arbeiten geben Hinweise auf eine generelle interne Detektion und belohnende Eigenschaft von Nahrung, die unabhängig von der äußeren Sensorik wahrgenommen wird. In der vorliegenden Arbeit wird erstmals ein konkretes metabolisches Signal benannt, nämlich der Anstieg des Hämolympghlucosespiegels unmittelbar nach Verabreichung selbst kleinstter Zuckermengen, welches als maßgebende Belohnungseigenschaft in Frage kommt. Messbare Veränderungen des internen Milieus nach der Aufnahme geringfügiger Nahrungsstimuli über nur wenige Sekunden wie bei der Konditionierung sind bisher nicht identifiziert worden. Es wurde klar herausgestellt, dass diese Eigenschaft vom momentanen Ernährungsstatus abhängig ist und ein stärkerer Anstieg - und demnach eine stärkere Belohnung - bei Individuen mit zuvor niedrigem Glucosespiegel zu beobachten ist als bei Tieren mit höherem Hämolympghlucosegehalt. Zudem führte die Verhinderung eines Konzentrationsanstiegs der Hämolympghlucose innerhalb von 10 min nach der Belohnung durch eine Glucose-Injektion hungriger Tiere vor dem Training zu einer Verschlechterung des Gedächtnisses. Dieser Befund untermauert die Bedeutung des internen, durch Glucose vermittelten Signals für das zustandsabhängige appetitive Gedächtnis und wurde als metabolische Belohnung erstmals einem kritischen Zeitfenster unmittelbar nach dem US zugeordnet.

Dieses Modell wird von einzelnen Arbeiten unterstützt, wie beispielsweise einer Studie von Wright et. al., die beschreibt, dass die Honigbiene allein durch die Stimulation der sensorischen Eingänge an den Antennen mit Zuckerwasser zwar lernt, jedoch ein weitaus labile-

res Gedächtnis aufweist als bei einer zusätzlichen Darreichung der Belohnung an den Rüssel [238]. Der Befund deckt sich mit der hier demonstrierten Notwendigkeit eines postprandialen Anstiegs der internen Glucosekonzentration infolge des appetitiven unkonditionierten Stimulus für die einwandfreie Effizienz des Gedächtnisses der Biene. Darüber hinaus wird die in der vorliegenden Arbeit beschriebene Bedeutung des Hämolympghlucosespiegels als bedingt dynamisches Element und so als zustandsabhängiger interner Belohnungsfaktor von einer Studie in *Drosophila* bekräftigt, welche eine geschmacksunabhängige Präferenz kalorienreichen Futters vor kalorisch wertlosem Futter im hungrigen Zustand entdeckte, die mit der Abnahme von Trehalose und Glucose in der Hämolymphe korrelierte [69]. Ein bereits hoher Glucosespiegel vor der Nahrungsaufnahme könnte demnach auch bei weiteren Organismen wie der Fruchtfliege ursächlich für das Ausbleiben eines zusätzlichen, belohnenden Anstiegs der internen Glucosekonzentration sein, der unabhängig von der äußeren Sensorik wahrgenommen wird und in der vorliegenden Arbeit erstmals beschrieben wurde.

So unterstreichen die Resultate der vorliegenden Arbeit eine wesentliche Funktion der Hämolympghlucose bei der Modulation des appetitiven Lernens und Gedächtnisses in Abhängigkeit des Ernährungsstatus. Es deutet vieles darauf hin, dass sie als metabolisches Signal das Lernverhalten über zwei Wege beeinflusst. Einerseits durch die Anpassung der

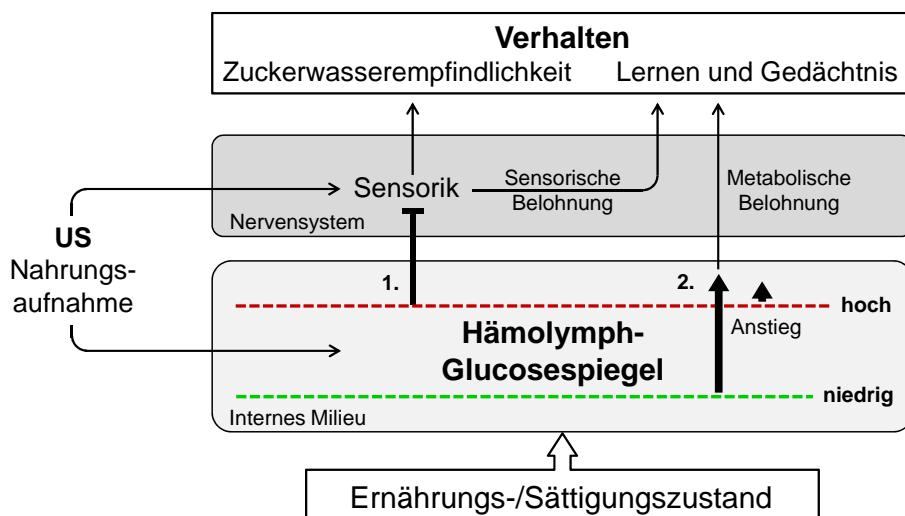


Abbildung 44: Modell zur Wirkung der Hämolympghlucose auf die Zuckerwasserempfindlichkeit sowie das Lernen und Gedächtnis. Die Hämolympghlucose als Verbindungsglied zwischen dem Energiestatus und dem Verhalten beeinflusst das Lernen und die Gedächtnisbildung über zwei Wege. 1.: Ein hoher Glucosespiegel regelt die sensorische Sensitivität herunter. Die Zuckerwasserempfindlichkeit sowie die sensorische Belohnung des appetitiven unkonditionierten Stimulus (US) beim Lernen werden vermindert, sodass bei satten Tieren das Lernen und die Gedächtnisbildung verschlechtert werden. 2.: Bei einem niedrigen, nicht aber einem hohen Glucosespiegel steigt die Hämolympghlucose bei Nahrungsaufnahme bzw. dem US im Zuge der Konditionierung kurzfristig stark an und stellt in Abhängigkeit der momentanen Bedürfnisse die Stärke der metabolischen Belohnung dar. Diese wirkt sich positiv auf Lernen und Gedächtnis aus.

Sensorik an den Energiebedarf, sodass bei einem aktuell hohen Glucosespiegel die sensorische Integration des äußeren Belohnungsreizes abgeschwächt wird und das Lernen und die Gedächtnisbildung herabgesetzt. Andererseits bestimmt das momentane glykämische Niveau aber auch über die Ausprägung eines Anstiegs des Hämolympghlucosespiegels, der durch die Ingestion des appetitiven, unkonditionierten Stimulus herbeigeführt wird und als interne, metabolische Belohnung integriert werden könnte, die das Lernverhalten zusätzlich zustandsabhängig reguliert (vgl. Abbildung 44).

Es ist denkbar, dass diese Verhaltensspezifizierung durch den metabolischen Zustand auch bei der Arbeitsteilung der Bienen zum Tragen kommt. So ist möglicherweise der Hämolympghlucosespiegel ein ursächlicher Faktor für die Fähigkeit der Flieger im Vergleich zur Stockbiene ein außerordentlich gutes appetitives Gedächtnis auszubilden, um stabile Assoziationen zwischen Blütendüften und ihrer Belohnung herzustellen und so optimale Erträge beim Sammelflug zu erzielen. Die breit gestreute Heterogenität des Glucosespiegels in der Fliegerpopulation lässt zudem Parallelen mit feineren Verhaltensspezifizierungen innerhalb der Flieger vermuten. Pollen- und Nektarsammler zeichnen sich bekanntlich durch unterschiedliche Zuckerwasserempfindlichkeiten aus [199]. Sie erhalten ihre spezifischen Verhaltenszüge möglicherweise durch charakteristische dynamische Hämolympghlucosespiegel, die ihre Belohnungsprozessierung und so ihre Sammeleigenschaften bestimmen.

4.1.3 **Vitellogenin versus Hämolympghlucose bei der Verhaltensspezifizierung**

Spezifische Verhaltenszüge der Honigbiene, speziell bei der sozialen Arbeitsteilung und der Entwicklung von der Stockarbeiterin zur Sammlerin, wurden bisher häufig mit Veränderungen des Proteinstatus, insbesondere des Dotterproteins Vitellogenin, in Zusammenhang gebracht. Dieses antioxidative Speicherprotein scheint nicht nur für die Lebensdauer der Tiere essenziell zu sein [8, 208], sondern auch über das Einsetzen des Sammelverhaltens und damit einhergehende Änderungen sensorischer Eigenschaften zu entscheiden [7, 9, 70]. Bei der Reifung hin zum Sammlerinnenstatus treten mit der Abnahme des Vitellogenin-Titers charakteristische Merkmale auf, wie die Erhöhung der Zuckerwasserempfindlichkeit [7, 177] sowie ein verbessertes assoziatives Lernen und Gedächtnis [201, 202].

In der vorliegenden Arbeit stellte sich die Frage, ob die Hämolympghlucose, welche hier erstmals mit ähnlichen Verhaltensmodulationen in Verbindung gebracht wurde, mit der Vitellogenin-Expression korreliert und so möglicherweise parallel reguliert wird. Die Resultate ließen erkennen, dass natürliche Stockbienen (im Sommer) einen weitaus höheren Hämolympghlucosegehalt aufweisen als Flieger und darüber hinaus in Übereinstimmung mit bisherigen Untersuchungen größere Mengen abdominalen Vitellogenins besitzen. Die Untersuchung von Stockbienen und Fliegern im Winterflughäus ergab hingegen für beide Gruppen gleichermaßen geringe Hämolympghlucosespiegel und bot so eine optimale Grundlage zur Ermittlung von Zusammenhängen zwischen Stockbienen- und Fliegerstatus sowie ihren sensorischen Eigenschaften und der Glucose- und Vitellogeninverfügbarkeit.

Bei der gleichzeitigen Betrachtung der abdominalen Vitellogenin-Proteinmenge sowie

dem Hämolympghlucosespiegel und der Zuckerwasserempfindlichkeit in denselben Tieren aus dem Winterflughäus zeigte sich einerseits, dass keine grundsätzlichen Parallelen zwischen der Vitellogenin- und der Glucoseverfügbarkeit vorliegen und unabhängige Regulationsmechanismen existieren müssen. Stockbienen konnte demnach eine hohe Vg-Expression bei gleichzeitig niedrigem Glucosespiegel nachgewiesen werden. Noch interessanter stellte sich aber die Erkenntnis dar, dass Stockbienen trotz ihres hohen Vg-Expressionsniveaus eine sehr geringe Reaktionsbereitschaft gegenüber Zuckerwasser zeigten, die so sämtliche, bisher festgehaltenen Untersuchungen entkräftet, welche Vitellogenin als Schlüsselauslöser für sensorische Veränderungen nahelegten. Vielmehr offenbart sich auch hier wieder der in dieser Arbeit aufgedeckte stabile Zusammenhang zwischen einem niedrigen Hämolympghlucosespiegel und einer hohen Zuckerwasserempfindlichkeit.

Die Tatsache, dass aber dennoch die Bienen innerhalb des Stocks diejenigen repräsentierten, welche hohe Vitellogenin-, aber niedrige Glucosemengen aufwiesen, lässt darauf schließen, dass Vitellogenin zwar potenziell eine Rolle bei der Regulation des Flugverhaltens zukommt, die begleitenden sensorischen Verhaltensänderungen aber eher durch Modulationen des Hämolympghlucosespiegels bestimmt werden. Dies liefert erste Hinweise auf eine entkoppelte Regulation des Flugverhaltens und der sensorischen Sensitivität bei der Entwicklung von der Stockarbeiterin zur Sammlerin.

4.2 Die Regulation des Glucosetransporters GLUT1 bei der Honigbiene

Passive Glucosetransporter (GLUT) bei Säugern sind Gegenstand intensiver Forschung und es wurde bereits eine Vielzahl von Funktions- und Regulatonsmechanismen im Zusammenhang mit dem Energie- und Glucosestatus aufgedeckt. Im Gegensatz dazu existieren nur sehr wenige Erkenntnisse, was den GLUT-vermittelten Glucosetransport und die funktionelle Beteiligung am Energiehaushalt der Insekten anbelangt. Es ist seit längerem bekannt, dass die Glucose-Absorption im Mitteldarm der Biene ein passiver Prozess ist [54], doch erst neuere Studien belegen überhaupt die Existenz funktioneller, GLUT-ähnlicher Transportproteine in verschiedenen Insekten-Geweben. So wurden im Mitteldarm der Feuerwanze *Dysdercus peruvianus* [30], der Zikade *Nilaparvata lugens* [181] und der Schlupfwespe *Aphidius ervi* [46] Glucosetransporter mit Sequenzhomologien zu Säuger-Transportern und ähnlichen biochemischen Eigenschaften entdeckt. In der Feuerameise *Solenopsis invicta* wurde weiterhin ein GLUT8-ähnlicher Glucosetransporter charakterisiert, der im Gehirn, im Fettkörper, im Mittel- und Dickdarm, den Malpighischen Gefäßen sowie den Ovarien und Hoden exprimiert wird [50]. 2010 erschien die erste Arbeit, die von einer GLUT-vermittelten Glucoseabsorption *in vivo* berichtet [30].

Die vorliegende Arbeit beweist nicht nur erstmals die Expression der beiden *GLUT1*-Gene des Bienengenoms im Gehirn und im Körper der Honigbiene sowie die Expression der GLUT1-Proteine im Bienenhirn. Sie liefert darüber hinaus zum ersten Mal bei Insekten Hinweise auf eine Regulation des Glucosetransporters im Zusammenhang mit dem

Ernährungs- und Glucosestatus, was Parallelen zur Glucosehomeostase des Säugersystems offenlegt.

4.2.1 GLUT1 im Körper der Honigbiene

Es war zunächst anhand von real-time PCR-Quantifizierungen zu beobachten, dass die mRNA der beiden Isoformen *GLUT1 a* und *GLUT1 b* im Körper in unterschiedlichem Maße exprimiert werden. So zeichnete sich in verschiedenen Experimenten ab, dass *GLUT1 a* die im Körper überwiegende Isoform darstellt. Bei einer genaueren Betrachtung der *GLUT1*-Expression (die sich auf die Flieger beschränkte) zeigte sich zudem, dass lediglich der im Körper der Biene dominierende Transporter *GLUT1 a* einer Regulation in Abhängigkeit des Hämolympghucosegehalts unterlag, wobei die *GLUT1 b*-Expression durchweg konstant blieb.

Schnelle *GLUT1 a*-Expressionseffekte innerhalb von 30 min nach Fütterung als Antwort auf akute Zustandsänderungen waren nicht ersichtlich. Dennoch wurde deutlich, dass das Expressionsniveau von *GLUT1 a* bei Tieren mit dauerhaft verschiedenen metabolischen Voraussetzungen divergierte. Der individuelle Hämolympgh glucosespiegel und dessen Dynamik, der, wie oben beschrieben, innerhalb der Bienenpopulation eine starke Heterogenität aufweist, schien demnach mit der *GLUT1 a*-Expression in Zusammenhang zu stehen. So wurde Tieren mit sehr niedrigem Glucosespiegel 3 h nach der Fütterung mit 30 μ l Saccharoselösung eine signifikant höhere *GLUT1 a*-Expression im Körper nachgewiesen als Tieren mit sehr hohem Glucosegehalt.

Dies weist erste Parallelen zum Säugetier auf, dessen *GLUT*-Expression in Verbindung mit dem glykämischen Status schon vielfach belegt wurde und darüber hinaus bei akuten und chronischen Signalen differentiell reguliert werden kann [65, 130, 213]. So geht Diabetes mit einer Herabregulation der muskulären *GLUT1*- und *GLUT4*-Biosynthese einher, die vermutlich einen Großteil zur Beeinträchtigung des Glucosetransports beiträgt [121]. Zudem wird in der Skelettmuskulatur der Ratte die *GLUT4*-mRNA bei andauernder Hyperglykämie zwar herunterreguliert, akute Signale wirken sich dagegen nicht auf die Genexpression, sondern lediglich auf Proteinebene aus [65]. Die Resultate der vorliegenden Arbeit und die aufgedeckten Ähnlichkeiten zum Säugersystem bieten Grund zu der Annahme, dass der Glucosetransporter *GLUT1 a* ebenso bei der Biene eine bedeutende Funktion bei der Glucosehomeostase und der Vermittlung der Glucoseaufnahme aus dem Kreislauf in die Zellen übernimmt. Der Transporter stellt demnach einen Faktor dar, der eine mögliche funktionelle Einheit mit der individuellen Kinetik des Hämolympgh glucosespiegels bildet, wobei eine höhere Expressionsrate eine rasche Aufnahme der Glucose und demnach eine schnellere Dynamik des Hämolympgh glucosespiegels gewährleistet.

Bei der vergleichenden Untersuchung von Fliegern und Stockbienen (im Freien) war ein Zusammenhang zwischen der *GLUT1 a*-Expression im Körper und dem Hämolympgh glucosegehalt nicht direkt ersichtlich. Während die Stockbienen im Vergleich zu den Fliegern immer einen höheren Glucosespiegel aufwiesen, konnte bei der *GLUT1 a*-Quantifizierung

im Körper (im Thorax und im Abdomen) zunächst kein Unterschied festgestellt werden. Erst die getrennte Betrachtung der verschiedenen spezialisierten Arbeiterinnen im Sommer und im Winter offenbarte signifikante Unterschiede bei der thorakalen *GLUT1 a*-Expression, die in Abhängigkeit der Jahreszeit in entgegengesetzter Richtung auftraten. Während das Expressionsniveau des Transporters im Thorax der Flieger im Sommer signifikant geringer war als im Winter, fiel es bei Stockbienen im Sommer signifikant höher aus. Anhand dieses Befundes ließ sich innerhalb beider Gruppen ebenso ein zumindest tendenzieller Zusammenhang zwischen der saisonalen *GLUT1 a*-Expression und der Hämolympgh glucose ableiten. Flieger zeigten im Sommer eine Tendenz in Richtung eines höheren Glucosespiegels (siehe Abbildung 34, $p = 0,057$), Stockbienen hingegen im Winter (nicht gezeigt; $p = 0,09$). So wiesen Flieger und Stockbienen immer dann einen tendenziell höheren Glucosespiegel auf, wenn die thorakale Genexpression des Glucosetransporters *GLUT1 a* in Abhängigkeit der Jahreszeit niedrig war. Dies stützt die in der vorliegenden Arbeit postulierte Hypothese, dass die Isoform a des Glucosetransporters *GLUT1* bei der Honigbiene an der Regulation des Hämolympgh glucosegehalts beteiligt ist und erweitert sie neben der Regulation des individuellen Glucosespiegels auf die mögliche Einstellung saisonal verursachter Änderungen des glykämischen Niveaus. Da es sich bei diesem Befund aber lediglich um Tendenzen und bisher nicht um signifikante Resultate handelt, bedarf es weiteren Experimenten, um einen Zusammenhang zu bestätigen.

Als Ursache für die unterschiedliche Präsenz der *GLUT1 a*-mRNA kommen auch hier individuelle metabolische Raten in Betracht (vgl. Abschnitt 4.1), die von Blatt und Roces als hoch variabel innerhalb der Bienenpopulation beschrieben wurden [34] und demnach einen unterschiedlichen Energiebedarf bei verschiedenen Individuen nach sich zieht. Dies wird von der Erkenntnis unterstützt, dass Glucosetransporter beim Säuger auch in Abhängigkeit der energetischen Bedürfnisse bestimmter Zellen und Gewebe exprimiert werden können [51, 67, 107]. Beispielsweise führt Bewegung zu einem erhöhten Energieverbrauch in Muskeln, was eine Steigerung der muskulären *GLUT4*-Expression zur Folge hat [107].

So ist es denkbar, dass die metabolische Rate über einen *GLUT1 a*-vermittelten, individuellen Hämolympgh glucosespiegel charakteristische Verhaltensspezifizierungen bei der Honigbiene verursacht.

4.2.2 Der Glucosetransporter im Bienenhirn

Im Kopf und im Gehirn der Honigbiene war insbesondere bei Fliegern eine durchgehend recht hohe und stabile Expressionsrate der *GLUT1 a*- und *GLUT1 b*-mRNA zu verzeichnen, was auf die mögliche Grundversorgung und Wechselwirkung des Transporters mit der energetisch kostspieligen neuronalen Ebene schließen lässt. Die mRNA-Expression blieb sowohl akut (30 min) infolge der Fütterung konstant, wie auch - im Gegensatz zum Körper - bei langfristig verschiedenen metabolischen Voraussetzungen. So zeigten sich keine Expressionsunterschiede bei Tieren mit sehr hohem und sehr niedrigem Hämolympgh glucosegehalt 3 h nach identischer Fütterung.

Die konstante Genexpression von *GLUT1 a* und *GLUT1 b* im Gehirn schloss aber dennoch zustandsabhängige Anpassungen des Glucosetransports durch Expressionsveränderungen auf Proteinebene nicht aus. So sind auch bei Säugetieren Expressionseffekte auf posttranskriptionaler und posttranslationaler Ebene bekannt, die sich unabhängig von der *GLUT1*-mRNA-Menge durch eine varierte Translationseffizienz oder Proteinstabilität vollziehen [35, 130, 213]. Bei der Untersuchung der Transportproteine *GLUT1 a* und *GLUT1 b* mithilfe selbst hergestellter Antikörper stellte sich heraus, dass auch im Bienenhirn *GLUT1 a* trotz konstanter Genexpression einer Regulation in Abhängigkeit des Hämolympghglucosespiegels unterliegt, während *GLUT1 b* unverändert bleibt. Sofern sich anhand des mRNA-Expressionsniveaus eine Aussage treffen lässt, liegt demnach eine in Abhängigkeit des Hämolympghglucosespiegels entgegengesetzte Regulation des Transporters im Körper und im Gehirn vor. Während bei Tieren mit langfristig höherem Hämolympghglucosegehalt im Körper eine geringere Menge *GLUT1 a*-mRNA zu verzeichnen war, konnte im Hirn eine erhöhte Präsenz des *GLUT1 a*-Transportproteins festgestellt werden.

Als besonders interessant stellte sich hierbei die Erkenntnis dar, dass ein akuter Anstieg der *GLUT1 a*-Expression nach Fütterung durch den Hämolympghglucosespiegel vor der Fütterung bedingt zu sein scheint. So befand sich die *GLUT1 a*-Expression nach Fütterung kurzfristig auf demselben hohen Niveau, obwohl sie sich bei Tieren mit zuvor niedrigem Glucosespiegel als signifikant niedriger erwies als bei Tieren mit zuvor hohem Hämolympghglucosegehalt. Dies zeigt bemerkenswerte Parallelen zu dem akuten Anstieg der Hämolympghglucosekonzentration bei Fütterung auf, der in dieser Arbeit erstmals selektiv Tieren mit zuvor niedrigem Glucosespiegel zugeschrieben wurde. Die Resultate geben so Grund zu der Annahme, dass der Anstieg des Hämolympghglucosespiegels und der *GLUT1 a*-Expression im Gehirn eine funktionelle Einheit bilden und der Transporter durch akute glucosevermittelte Signale aus dem Körper reguliert wird.

Demnach liegt der Schluss nahe, dass auch infolge der beim Lernen relevanten appetitiven Belohnung, die im Zuge dieser Arbeit als hinreichender Auslöser eines akuten Anstiegs der internen Glucosekonzentration identifiziert wurde, einen Anstieg der *GLUT1 a*-Expression im Gehirn zur Folge hat. Infolgedessen kommt der Transporter als wichtiger Faktor in Frage, der einer potenziellen internen Belohnung eine schnelle Signalvermittlung ins Gehirn ermöglicht. So ergibt sich für zukünftige Studien, auch im Säugersystem, die Frage, ob ein kurzfristiger Anstieg des GLUT-vermittelten Glucosetransports für die nahrungsbezogene Belohnungsprozessierung notwendig ist.

4.3 Der Insulin-Signalweg als Verhaltensmodulator - stromabwärts der Hämolympghglucose?

Im Zuge dieser Arbeit ergab sich auch die Frage nach molekularen Vermittlern zur Anpassung des individuellen Glucosespiegels der Biene, deren pharmakologische Manipulation die Hämolympghglucose und infolge dessen auch das neu entdeckte glucoseabhängige Ver-

halten beeinflussen. So wurden zunächst die PI3K-Inhibitoren Wortmannin und LY294002 eingesetzt, um eine potenzielle Funktion des Insulin-Signalwegs in diesem Zusammenhang zu ermitteln.

Die PI3K spielt eine wichtige Rolle bei der intrazellulären Signaltransduktion eukaryotischer Zellen und ist als entscheidende Komponente am Insulin-Signalweg beteiligt. Die Manipulation und Inhibition der PI3K beim Säugetier hat Konsequenzen für die Glucosehomöostase und führt zu einem diabetischen, adipösen Phänotyp mit erhöhtem Blutzuckerspiegel [76, 111, 131, 184]. Auch bei Insekten wurden durch eine PI3K-Inhibition bereits ähnliche Modulationen sowohl des Fressverhaltens als auch der Nährstoffverfügbarkeit festgestellt [38, 154, 188]. Eine Funktion der PI3K und des Insulin-Signalwegs bei der Einstellung des Hämolympghlucosespiegels der Biene ist dagegen bislang nicht bekannt. Lediglich gibt es wenige Hinweise darauf, dass Insulinsignale, möglicherweise in Verbindung mit dem Proteinstatus, an der Aufgabenteilung der Arbeiterinnen beteiligt sind [10, 173].

Zur Aufklärung von potenziellen insulin- und glucosevermittelten Verhaltenseffekten wurden gängige Konzentrationen der Inhibitoren [76, 122, 145, 188, 222], die auch bereits in verschiedenen Insekten angewandt wurden [154, 188], einmalig injiziert und ihre Effekte auf die Zuckerwasserempfindlichkeit sowie den Hämolympghlucosespiegel in Zeitreihen-Messungen betrachtet. Die Untersuchungen ergaben, dass keiner der beiden Inhibitoren innerhalb von 3 h Einfluss auf die Hämolympghlucose nahm. Dennoch wurde die Zuckerwasserempfindlichkeit kurzfristig von Wortmannin (und von LY294002 tendenziell) herunterreguliert.

Eine Sensitivitätsänderung, deren Ursprung in insulinvermittelten Modulationen des Hämolympghlucosespiegels liegt, wurde durch diesen Befund zunächst entkräftet. Dennoch gibt er erstmals in der Honigbiene Hinweise auf einen direkten Zusammenhang zwischen dem Insulin-Signalweg und Veränderungen der sensorischen Eigenschaften. Es konnte zwar bereits eine höhere Expression des *Insulin-like Peptide 1* der Honigbiene (*AmILP1*) bei Fliegern im Vergleich zu bekannteren besser genährten und weniger sensiblen Stockarbeiterinnen nachgewiesen werden [10, 177]. Zudem führte die Herunterregulation des Insulinrezeptor-Substrats, eines der PI3K übergeordneten Proteins im Insulin-Signalweg, mittels RNAi zu einer Veränderung der Futterauswahl [227]. Eine direkte Beeinflussung der sensorischen Empfindlichkeit wurde jedoch nicht festgestellt.

Auffällig bei der Honigbiene ist die scheinbar entgegengesetzte Wechselwirkung zwischen Insulinsignalen und der Nährstoffverfügbarkeit sowie dem appetitiven Verhalten im Vergleich zu Säugetieren und anderen Insekten. Bei letzteren treten Insulinsignale verstärkt infolge hoher Nährstoffmengen auf und eine Inhibition geht mit einer künstlichen Hungersituation einher, die sich unter anderem in einer gesteigerten sensorischen Sensitivität äußern [38, 112, 188]. So existiert die Hypothese, dass der Insulin-Signalweg als konserviertes molekulares System eine neue Funktion in der Biene zur Regulation der sozialen Arbeitsteilung übernommen hat. Eine erhöhte Expression und Sensitivität gegenüber Insulinsignalen bei Fliegern soll demnach eine verstärkte Reaktion auf Nährstoffreduktionen ermöglichen

und an der Einleitung und Aufrechterhaltung des Sammelverhaltens beteiligt sein [10, 173]. Die in der vorliegenden Arbeit demonstrierte Reduktion der sensorischen Sensitivität durch den PI3K-Inhibitor Wortmannin unterstützt diese früheren Befunden durch einen weiteren sensorischen Aspekt, der mit dem Sammelverhalten in Verbindung gebracht wird [177].

Es bietet sich weiterhin Grund zu der Annahme, dass die in dieser Arbeit als Verhaltensmodulator identifizierte Hämolympghglucose - obwohl sie durch die PI3K-Inhibition nicht beeinflusst wurde - als potenzieller, dem Insulin-Signalweg übergeordneter Faktor zu einer insulinvermittelten Regulation der Zuckerwasserempfindlichkeit und des Sammelverhaltens beiträgt.

Ausschließen lässt sich aber dennoch nicht, dass eine PI3K-Inhibition durch andere Nährstoffe verursachte Verhaltensaspekte oder auch insulinunabhängige PI3K-Signale betrifft [38, 197, 242].

4.4 Die Frage nach ATP-sensitiven Kaliumkanälen in der Honigbiene

K_{ATP} -Kanäle sind bei Säugetieren an der Glucosendetektion, sowohl im Pankreas zur regulierten Insulinsekretion als auch in glucosesensitiven Neuronen, beteiligt. Sie vermitteln zelluläre Reaktionen, indem sie sich in Abhängigkeit der ATP-Verfügbarkeit öffnen und schließen und so das Membranpotenzial beeinflussen. Ihre bisher völlig unbekannte Bedeutung in der Honigbiene, speziell für die Regulation der Hämolympghglucose, war Bestandteil dieser Arbeit. Während die entscheidende Funktion der K_{ATP} -Kanäle bei Säugetieren und *Drosophila* anhand der Blut- bzw. Hämolymphzucker modulierenden Effekte von pharmakologischen Kanalöffnern und -blockern demonstriert werden konnte [125, 183, 186], schien diese Manipulation bei der Biene keine Auswirkung zu haben. Wie im Ergebnisteil ausführlich beschrieben, konnten bei der Injektion gängiger Konzentrationen des K_{ATP} -Kanalöffners Diazoxid und des Inhibitors Glyburid weder Konsequenzen für die Hämolympghglucose noch für die Zuckerwasserempfindlichkeit festgestellt werden. Es konnte im Rahmen dieser Arbeit aber nicht bestätigt werden, dass Diazoxid und Glyburid tatsächlich zu einer Aktivierung bzw. Inhibition von K_{ATP} -Kanälen in der Biene führen. Hierzu müssten zunächst glucose-sensitive Zellen in der Biene identifiziert werden, welche im folgenden, beispielsweise in Calcium-Imaging Studien, auf ihre Reaktion gegenüber der Pharmaka untersucht werden müssten. Die Frage nach K_{ATP} -Kanälen und ihrer Wirkung in der Honigbiene bleibt daher weitgehend offen.

4.5 Die AMP-abhängige Proteinkinase bei der Glucosehomeostase der Biene

Die pharmakologische Manipulation der PI3K und der K_{ATP} -Kanäle bei der Honigbiene induzierten keine Veränderung des Hämolympghglucosespiegels und konnten demnach nicht zur weiteren Bestätigung einer internen Regulation appetitiver Verhaltensaspekte über die Hämolympghglucose herangezogen werden. Ganz anders verhielt es sich bei der AMP-abhängigen Proteinkinase (AMPK), deren parallele Beeinflussung des Hämolympghglucose-

gehalts, der Zuckerwasserempfindlichkeit und des appetitiven Lernens mithilfe des AMPK-Aktivators AICAR eindrucksvoll demonstriert werden konnte. AICAR wurde dabei in einer gängigen Konzentration eingesetzt, deren Wirksamkeit zur Aktivitätssteigerung der AMPK in einer Vielzahl von Studien *in vitro* und *in vivo*, auch bei Insekten, bewiesen wurde [14, 83, 154].

So konnte zunächst gezeigt werden, dass AICAR offenbar die Abnahme des Hämolympghlucosespiegels verzögert und folglich nach 30 min zu einem erhöhten Glucosespiegel führt. Dies gibt erstmals bei der Honigbiene Hinweise auf eine Funktion der AMPK beim Energie- und Glucosehaushalt. Überdies rief die durch AICAR ausgelöste Anhebung des Glucosespiegels gleichzeitig eine Reduktion der gustatorischen Sensitivität sowie ein Lern- und Gedächtnisdefizit hervor und stützt damit die in dieser Dissertation postulierte Hypothese, dass die Hämolympghlucose einen entscheidenden Faktor für appetitive Verhaltensmodulationen darstellt.

Es wurde schon häufig demonstriert, dass eine hohe AMPK-Aktivität mit einer gesteigerten Futteraufnahme einhergeht, die zum Großteil auf ihre zentralen Effekte im Hypothalamus zurückzuführen ist, wo sie den systemischen Energiehaushalt kontrolliert [12, 158]. Dort stimuliert sie beispielsweise die Ausschüttung orexigener, Appetit steigernder Neuropeptide und wird durch hormonelle „Hungersignale“ aus dem Körper aktiviert [12, 132, 210]. Eine gesteigerte Nahrungsaufnahme konnte in dieser Arbeit jedoch als Auslöser für den erhöhten Hämolympghlucosespiegel ausgeschlossen werden, da die zuvor gleich eingestellten Tiere nach der AICAR-Injektion keinen Futterkontakt mehr hatten. Dies legt nahe, dass die AMPK der Biene eine Hauptfunktion bei der internen Regulation des Hämolympghlucosespiegels ausübt, die nicht Folge eines verstärkten appetitiven Verhaltens ist. Vielmehr ist davon auszugehen, dass die AMPK-abhängige Erhöhung des Glucosespiegels ursächlich für die Reduktion der Zuckerwasserempfindlichkeit und der Effizienz des appetitiven Lernens ist.

Der Anstieg des Hämolympghlucosespiegels durch AICAR schien zunächst bisherigen Studien zu widersprechen, wonach AICAR beim Nager und, wie kürzlich gezeigt, auch beim Seidenspinner eine Senkung des Blut- bzw. Hämolymphzuckerspiegels bewirkt [14, 154]. Beim Säuger sind Blutzucker senkende Effekte vermutlich hauptsächlich einer erhöhten Glucoseaufnahme in die Zellen durch die Expression und Translokation muskulärer Glucosetransporter zuzuschreiben [41, 59, 136]. Dennoch lassen sich die Befunde in der Biene aufgrund anderer bekannter AMPK vermittelter Effekte plausibel erklären. Demnach kommt es einerseits nicht in allen Geweben zu einer AMPK vermittelten Steigerung der Glucoseaufnahmen. Vielmehr konnte in Adipozyten eine AICAR- und AMPK-induzierte Verminderung der Glucoseaufnahme nachgewiesen werden [83, 194]. Zudem begünstigt die AMPK den Glykogenabbau, was im Rattenmuskel bereits mittels AICAR demonstriert wurde [74].

So ist es denkbar, dass die in dieser Dissertation durch AICAR induzierte Erhöhung des Hämolympghlucosespiegels der Biene auf einen gesteigerten Glykogenabbau zurückzuführen ist. Glykogen befindet sich in relativ geringen, aber dennoch signifikanten Men-

gen in Flugmuskeln und im Fettkörper der Biene [28, 56, 171]. Gerade bei einer kurzfristigen, künstlichen Aktivierung der AMPK, die keiner natürlichen Hungersituation oder Energie zehrenden Aktivität entspricht, ist ein, zumindest vorübergehender, Anstieg der verfügbaren Glucose nachvollziehbar, auch wenn er sich nicht mit Studien aus Säugetieren deckt. Über einen längeren Zeitraum würde eine AICAR-Behandlung vermutlich auch bei der Biene den Hämolympghlucosespiegel verringern und infolgedessen die senorische Sensitivität und das appetitive Lernen und Gedächtnis steigern. So konnte auch beim Seidenspinner erst 6 h nach der AICAR-Injektion eine Senkung des Hämolymphzuckerspiegels beobachtet werden [154].

Ob die AMPK bei der Biene ausschließlich in der Peripherie als Modulator des Hämolympghlucosespiegels agiert und damit die Basis eines zustandsabhängigen Kreislaufs bildet oder ob sie darüber hinaus, wie beim Säuger, auch zentrale Funktionen übernimmt, wurde ebenfalls im Zuge dieser Arbeit näher betrachtet.

4.5.1 Die AMPK im Bienenhirn

Bei Säugetieren wird die zentrale Aktivität der AMPK, die letztendlich zu Modulationen des Fressverhaltens führt, von verschiedenen hormonellen Signalen, aber auch der Glucoseverfügbarkeit selbst, gesteuert [12, 158]. Große Mengen Glucose hemmen dabei die AMPK-Aktivität im Hypothalamus und dämmen die Nahrungsaufnahme ein. Zudem wurde eine hohe AMPK-Expression im Gehirn bereits mit positiven Effekten auf die Gedächtnisbildung in Zusammenhang gebracht [88].

Zur Klärung einer potenziell zentralen und zustandsabhängigen Funktion der AMPK bei der Biene wurde eine nähere Untersuchung der physiologischen AMPK-Aktivität im Bienenhirn zu verschiedenen Zeitpunkten nach Fütterung vorgenommen. Dabei stellte sich heraus, dass die AMPK tatsächlich signifikanten Aktivitätsänderungen in Abhängigkeit des Fütterungszustands unterliegt und 5 min nach Fütterung eine signifikant geringere Aktivität aufweist als nach 3 h.

Dies deutet zunächst auf eine schnelle, sättigungsbedingte Inhibition der AMPK im Bienenhirn hin, was auf Parallelen zur AMPK-Regulation im Säugersystem schließen lässt. Literaturrecherchen zufolge liefert der Befund zudem erstmals bei Invertebraten Hinweise auf eine physiologische Regulation der AMPK im Hirn durch Nahrungsstimuli. Zwar liegen mehrere Studien vor, welche Störungen des Energiehaushalts durch die genetische oder pharmakologische Manipulation der AMPK beschreiben [117, 154]. Umgekehrt konnten aber bisher keine kurzfristigen Aktivitätsänderungen durch Nahrungsaufnahme, speziell im Gehirn, nachgewiesen werden.

Interessanterweise wies die AMPK im Bienenhirn jedoch 18 h nach Fütterung ein mittleres Aktivitätsniveau auf und nicht wie erwartet ein noch höheres als nach 3 h. Die vergleichende Betrachtung des Hämolympghlucosespiegels nach Fütterung weist aber bemerkenswerte Eigenschaften auf, die Grund zu der Annahme geben, dass die AMPK im Bienenhirn nicht nur einer Regulation in Abhängigkeit des Sättigungsstatus unterliegt, sondern

speziell durch die Hämolympghglucose moduliert wird. So befindet sich der Glucosespiegel 5 min nach Fütterung in einer starken Anstiegsphase, 3 h nach Fütterung hingegen in einer schnellen Abstiegsphase, während er sich nach 18 h kaum mehr verändert. Dies legt die Vermutung nahe, dass die AMPK im Gehirn auf Änderungen der internen Glucosekonzentration reagiert und nicht auf den glykämischen Status *per se*.

Ausgehend von dieser Hypothese sollte auch die AMPK-Aktivitätsregulation im Bienenhirn, ähnlich wie der Hämolympghglucosespiegel und dessen Dynamik, bei verschiedenen Individuen der Bienenpopulation unterschiedlich ausgeprägt sein. Da Tiere mit einem dynamischeren Glucosespiegel und einem stärkeren Anstieg (und Abfall) der internen Glucosekonzentration im Zuge der appetitiven Belohnung ein weitaus besseres Gedächtnis bilden, ist eine essenzielle Funktion der AMPK bei der internen Belohnungsverarbeitung auf neuronaler Ebene denkbar. Vermutlich ist die Aktivitätssteigerung im Zuge der schnellen Abnahme des Glucosespiegels nach der Belohnung entscheidend für die Effizienz des Gedächtnisses. So konnte innerhalb der Arbeitsgruppe bereits gezeigt werden, dass eine künstliche AMPK-Aktivierung im Gehirn zu einer Gedächtnisverbesserung führt [137].

Diese Befunde legen den Schluss nahe, dass die AMPK bei der Honigbiene zum einen in der Peripherie an der Einstellung des Hämolympghglucosespiegels beteiligt ist und darüber sensorische Modulationen vermittelt, die sich in Veränderungen der Zuckerwasserempfindlichkeit und des appetitiven Lernverhaltens äußern. Zum anderen hat sie möglicherweise eine zusätzliche zentrale Funktion, die im Gegenzug auf Veränderungen der internen Glucosekonzentration reagiert und damit bei der internen Belohnungsverarbeitung eine Rolle spielt.

Dabei ist aber nicht auszuschließen, dass eine AICAR-Injektion das Verhalten neben der Wirkung auf die Hämolympghglucose zusätzlich über zentrale Effekte beeinflusst. Aufgrund des Befundes, dass eine ausschließlich zentrale Aktivierung der AMPK das Gedächtnis der Biene verbessert [137], ist jedoch davon auszugehen, dass AICAR entweder nicht zentral wirkt oder die sensorischen Effekte des erhöhten Hämolympghglucosespiegels überwiegen.

4.6 Fazit

Die Befunde dieser Arbeit machen erstmals die essenzielle Funktion der Hämolympghglucose als Modulator des appetitiven Verhaltens, insbesondere bei Lern- und Gedächtnisprozessen, deutlich. Der Status des Hämolympghglucosespiegels beeinflusst dabei die sensorischen Eigenschaften und das Lernverhalten. Zudem haben dynamische Veränderungen des Glucosespiegels offenbar eine kritische Funktion als akutes, internes Belohnungssignal beim appetitiven Lernen.

Das Expressionsmuster einer Isoform des Glucosetransporters *GLUT1* steht einerseits in Zusammenhang mit langfristig heterogenen glykämischen Voraussetzungen und liefert damit ertste Parallelen zwischen einer glucoseabhängigen *GLUT1*-Regulation bei Insekten

und Säugern. Darüber hinaus wird das Glucosetransportprotein im Gehirn akut infolge einer Fütterung und parallel zu Veränderungen des Glucosespiegels hochreguliert. GLUT1 stellt somit einen wichtigen Kandidaten als Vermittler eines internen, glucoseinduzierten Belohnungssignals dar. Es stellt sich daher für die Zukunft die Frage, ob die appetitive Belohnung tatsächlich mit einer kurzfristigen Steigerung der Glucose-Transportrate im Gehirn einher geht und ob diese auch im Säugersystem bedeutend für die Belohnungsprozessierung in Verbindung mit dem appetitiven Lernen und Gedächtnis ist.

Des Weiteren ist an der Regulation des Hämolympghlucosespiegels und den Verhaltensmodulationen die AMPK beteiligt, deren Aktivierung durch AICAR sowohl den Glucosespiegel erhöht als auch die Zuckerwasserempfindlichkeit sowie die Lern- und Gedächtniseffizienz senkt. Im Gehirn verändert sich die AMPK-Aktivität zusätzlich in Abhängigkeit des Fütterungszustands und eine Regulation durch schnelle Veränderungen des Hämolympghlucosespiegels liegt nahe. Die AMPK kommt demnach als glucoseabhängiges Schlüsselenzym bei der internen neuronalen Belohnungsprozessierung in Frage. Deshalb ist eine nähere Charakterisierung potenziell kritischer Aktivierungsmuster der zentralen AMPK bei der appetitiven Belohnung und die Auswirkungen auf das Lernverhalten, auch beim Säugling, für die Zukunft interessant.

Literatur

- [1] J. D. Abisgold and S. J. Simpson. The physiology of compensation by locusts for changes in dietary protein. *J exp Biol*, 129:329–346, 1987.
- [2] M. A. Abou-Seif, V. Maier, J. Fuchs, M. Mezger, E. F. Pfeiffer, and M. Bounias. Fluctuations of carbohydrates in haemolymph of honeybee (*Apis mellifica*) after fasting, feeding and stress. *Horm Metab Res*, 25(1):4–8, Jan 1993.
- [3] T. W. Abrams, K. A. Karl, and E. R. Kandel. Biochemical studies of stimulus convergence during classical conditioning in *Aplysia*: dual regulation of adenylate cyclase by Ca^{2+} /calmodulin and transmitter. *J Neurosci*, 11(9):2655–2665, Sep 1991.
- [4] L. Aguilar-Bryan and J. Bryan. Molecular biology of adenosine triphosphate-sensitive potassium channels. *Endocr Rev*, 20(2):101–135, Apr 1999.
- [5] B. Ahrén. Autonomic regulation of islet hormone secretion—implications for health and disease. *Diabetologia*, 43(4):393–410, Apr 2000.
- [6] T. Amakawa. Effects of age and blood sugar levels on the proboscis extension of the blow fly *Phormia regina*. *J Insect Physiol*, 47(2):195–203, Feb 2001.
- [7] G. Amdam, K. K. Norberg, R. Page, J. Erber, and R. Scheiner. Downregulation of vitellogenin gene activity increases the gustatory responsiveness of honey bee workers (*Apis mellifera*). *Behav Brain Res*, 169(2):201–205, May 2006.
- [8] G. V. Amdam and S. W. Omholt. The regulatory anatomy of honeybee lifespan. *J Theor Biol*, 216(2):209–228, May 2002.
- [9] G. V. Amdam and S. W. Omholt. The hive bee to forager transition in honeybee colonies: the double repressor hypothesis. *J Theor Biol*, 223(4):451–464, Aug 2003.
- [10] S. A. Ament, M. Corona, H. S. Pollock, and G. Robinson. Insulin signaling is involved in the regulation of worker division of labor in honey bee colonies. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 105(11):4226–4231, Mar 2008.
- [11] S. A. Ament, Y. Wang, and G. E. Robinson. Nutritional regulation of division of labor in honey bees: toward a systems biology perspective. *Wiley Interdiscip Rev Syst Biol Med*, 2(5):566–576, 2010.
- [12] U. Andersson, K. Filipsson, C. R. Abbott, A. Woods, K. Smith, S. R. Bloom, D. Carling, and C. J. Small. AMP-activated protein kinase plays a role in the control of food intake. *J Biol Chem*, 279(13):12005–12008, Mar 2004.
- [13] E. L. Arrese and J. L. Soulages. Insect fat body: energy, metabolism, and regulation. *Annu Rev Entomol*, 55:207–225, 2010.

- [14] W. G. Aschenbach, M. F. Hirshman, N. Fujii, K. Sakamoto, K. F. Howlett, and L. J. Goodyear. Effect of AICAR treatment on glycogen metabolism in skeletal muscle. *Diabetes*, 51(3):567–573, Mar 2002.
- [15] F. M. Ashcroft, D. E. Harrison, and S. J. Ashcroft. Glucose induces closure of single potassium channels in isolated rat pancreatic beta-cells. *Nature*, 312(5993):446–448, 1984.
- [16] F. M. Ashcroft and M. Kakei. ATP-sensitive K⁺ channels in rat pancreatic beta-cells: modulation by ATP and Mg²⁺ ions. *J Physiol*, 416:349–367, Sep 1989.
- [17] R. Augustin. The protein family of glucose transport facilitators: It's not only about glucose after all. *IUBMB Life*, 62(5):315–333, May 2010.
- [18] B. J. Bacskaï, B. Hochner, M. Mahaut-Smith, S. R. Adams, B. K. Kaang, E. R. Kandel, and R. Y. Tsien. Spatially resolved dynamics of cAMP and protein kinase A subunits in Aplysia sensory neurons. *Science*, 260(5105):222–226, Apr 1993.
- [19] G. A. Badr, J. Tang, F. Ismail-Beigi, and T. S. Kern. Diabetes downregulates GLUT1 expression in the retina and its microvessels but not in the cerebral cortex or its microvessels. *Diabetes*, 49(6):1016–1021, Jun 2000.
- [20] I. Bady, N. Marty, M. Dallaporta, M. Emery, J. Gyger, D. Tarussio, M. Foretz, and B. Thorens. Evidence from Glut2-null mice that glucose is a critical physiological regulator of feeding. *Diabetes*, 55(4):988–995, Apr 2006.
- [21] C. H. Bailey, D. Bartsch, and E. R. Kandel. Toward a molecular definition of long-term memory storage. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 93(24):13445–13452, Nov 1996.
- [22] C. H. Bailey and E. R. Kandel. Structural changes accompanying memory storage. *Annu Rev Physiol*, 55:397–426, 1993.
- [23] L. Bailey. The action of the proventriculus of the worker honeybee, *Apis mellifera* L. *J Exp Biol*., 29:310–327, 1952.
- [24] N. M. Balderrama, L. O. Almeida, and J. A. Núñez. Metabolic rate during foraging in the honeybee. *J Comp Physiol B*, 162(5):440–447, 1992.
- [25] R. Bejar, R. Yasuda, H. Krugers, K. Hood, and M. Mayford. Transgenic calmodulin-dependent protein kinase II activation: dose-dependent effects on synaptic plasticity, learning, and memory. *J Neurosci*, 22(13):5719–5726, Jul 2002.
- [26] J. Berger, C. Biswas, P. P. Vicario, H. V. Strout, R. Saperstein, and P. F. Pilch. Decreased expression of the insulin-responsive glucose transporter in diabetes and fasting. *Nature*, 340(6228):70–72, Jul 1989.

- [27] A. Betourne, A. M. Bertholet, E. Labroue, H. Halley, H. S. Sun, A. Lorsignol, Z.-P. Feng, R. J. French, L. Penicaud, J.-M. Lassalle, and B. Frances. Involvement of hippocampal CA3 K(ATP) channels in contextual memory. *Neuropharmacology*, 56(3):615–625, Mar 2009.
- [28] R. Beutler. Über den Blutzucker der Biene (Apis mellifica). *Die Naturwissenschaften*, 31:487–491, 1936.
- [29] G. J. Biessels, A. Kamal, G. M. Ramakers, I. J. Urban, B. M. Spruijt, D. W. Erkelens, and W. H. Gispen. Place learning and hippocampal synaptic plasticity in streptozotocin-induced diabetic rats. *Diabetes*, 45(9):1259–1266, Sep 1996.
- [30] T. D. Bifano, T. G. P. Alegria, and W. R. Terra. Transporters involved in glucose and water absorption in the *Dysdercus peruvianus* (Hemiptera: Pyrrhocoridae) anterior midgut. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol*, 157(1):1–9, Sep 2010.
- [31] M. M. G. Bitondi and S. Z. L. P. The relationship between level of pollen in the diet, vitellogenin and juvenile hormone titres in Africanized *Apis mellifera* workers. *J Apic Res*, 35 (1):27–37, 1996.
- [32] J. Blatt and F. Roques. Haemolymph sugar levels in foraging honeybees (*Apis mellifera carnica*): dependence on metabolic rate and in vivo measurement of maximal rates of trehalose synthesis. *J Exp Biol*, 204(Pt 15):2709–2716, Aug 2001.
- [33] J. Blatt and F. Roques. The control of the proventriculus in the honeybee (*Apis mellifera carnica* L.) I. A dynamic process influenced by food quality and quantity? *J Insect Physiol*, 48(6):643–654, Jun 2002.
- [34] J. Blatt and F. Roques. The control of the proventriculus in the honeybee (*Apis mellifera carnica* L.) II. Feedback mechanisms. *J Insect Physiol*, 48(7):683–691, Jul 2002.
- [35] R. J. Boado, H. Tsukamoto, and W. M. Pardridge. Evidence for translational control elements within the 5'-untranslated region of GLUT1 glucose transporter mRNA. *J Neurochem*, 67(4):1335–1343, Oct 1996.
- [36] M. Bounias. Les alpha-glucosidases et la glycémie chez l'abeille noire *Apis mellifica*, *mellifica* L. In *Proc. 25th Int. Congr. Apic Res., APIMONDIA, Grenoble, 8-14 September, 304-307*, 1975.
- [37] R. Bourchuladze, B. Frenguelli, J. Blendy, D. Cioffi, G. Schutz, and A. J. Silva. Deficient long-term memory in mice with a targeted mutation of the cAMP-responsive element-binding protein. *Cell*, 79(1):59–68, Oct 1994.
- [38] J. S. Britton, W. K. Lockwood, L. Li, S. M. Cohen, and B. A. Edgar. Drosophila's insulin/PI3-kinase pathway coordinates cellular metabolism with nutritional conditions. *Dev Cell*, 2(2):239–249, Feb 2002.

- [39] J. C. Brüning, D. Gautam, D. J. Burks, J. Gillette, M. Schubert, P. C. Orban, R. Klein, W. Krone, D. Müller-Wieland, and C. R. Kahn. Role of brain insulin receptor in control of body weight and reproduction. *Science*, 289(5487):2122–2125, Sep 2000.
- [40] N. J. Bryant, R. Govers, and D. E. James. Regulated transport of the glucose transporter GLUT4. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 3(4):267–277, Apr 2002.
- [41] E. S. Buhl, N. Jessen, O. Schmitz, S. B. Pedersen, O. Pedersen, G. D. Holman, and S. Lund. Chronic treatment with 5-aminoimidazole-4-carboxamide-1-beta-D-ribofuranoside increases insulin-stimulated glucose uptake and GLUT4 translocation in rat skeletal muscles in a fiber type-specific manner. *Diabetes*, 50(1):12–17, Jan 2001.
- [42] C. L. Buller, R. D. Loberg, M.-H. Fan, Q. Zhu, J. L. Park, E. Vesely, K. Inoki, K.-L. Guan, and F. C. Brosius, 3rd. A GSK-3/TSC2/mTOR pathway regulates glucose uptake and GLUT1 glucose transporter expression. *Am J Physiol Cell Physiol*, 295(3):C836–C843, Sep 2008.
- [43] C. J. Burke and S. Waddell. Remembering nutrient quality of sugar in Drosophila. *Curr Biol*, 21(9):746–750, May 2011.
- [44] S. A. Bustin. Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays. *J Mol Endocrinol*, 25(2):169–193, Oct 2000.
- [45] J. H. Byrne and E. R. Kandel. Presynaptic facilitation revisited: state and time dependence. *J Neurosci*, 16(2):425–435, Jan 1996.
- [46] S. Caccia, M. Casartelli, A. Grimaldi, E. Losa, M. de Eguileor, F. Pennacchio, and B. Giordana. Unexpected similarity of intestinal sugar absorption by SGLT1 and apical GLUT2 in an insect (*Aphidius ervi*, Hymenoptera) and mammals. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 292(6):R2284–R2291, Jun 2007.
- [47] D. Carling and D. G. Hardie. 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, Jun 1989.
- [48] I. Castan, J. Wijkander, V. Manganiello, and E. Degerman. Mechanisms of inhibition of lipolysis by insulin, vanadate and peroxovanadate in rat adipocytes. *Biochem J*, 339 (Pt 2):281–289, Apr 1999.
- [49] V. F. Castellucci, E. R. Kandel, J. H. Schwartz, F. D. Wilson, A. C. Nairn, and P. Green-gard. Intracellular injection of the catalytic subunit of cyclic AMPdependent protein kinase simulates facilitation of transmitter release underlying behavioral sensitization in Aplysia. *Proc Natl Acad Sci USA*, 77(12):7492–7496, 1980.

- [50] M.-E. Chen, S. P. Holmes, and P. V. Pietrantonio. Glucose transporter 8 (GLUT8) from the red imported fire ant, *Solenopsis invicta* Buren (Hymenoptera: Formicidae). *Arch Insect Biochem Physiol*, 62(2):55–72, Jun 2006.
- [51] C. Choeiri, W. Staines, and C. Messier. Immunohistochemical localization and quantification of glucose transporters in the mouse brain. *Neuroscience*, 111(1):19–34, 2002.
- [52] C. Choeiri, W. Staines, T. Miki, S. Seino, and C. Messier. Glucose transporter plasticity during memory processing. *Neuroscience*, 130(3):591–600, 2005.
- [53] C. Choeiri, W. A. Staines, T. Miki, S. Seino, J.-M. Renaud, K. Teutenberg, and C. Messier. Cerebral glucose transporters expression and spatial learning in the K-ATP Kir6.2(-/-) knockout mice. *Behav Brain Res*, 172(2):233–239, Sep 2006.
- [54] K. Crailsheim. Intestinal transport of sugars in the honeybee (*Apis mellifera* L.). *J Insect Physiol*, 34, No. 9:839–845, 1988.
- [55] K. Crailsheim. Regulation of food passage in the intestine of the honeybee (*Apis mellifera* L.). *J Insect Physiol*, 34, No. 2:85–90, 1988.
- [56] K. Crailsheim and U. Panzenböck. Glycogen in honeybee queens, workers and drones (*Apis mellifera carnica* Pollm.). *J Insect Physiol*, 43(2):155–165, Feb 1997.
- [57] K. Crailsheim, L. Schneider, N. Hrassnigg, G. Buhlmann, U. Brosch, R. Gmeinbauer, and S. B. Pollen consumption and utilization in worker honeybees (*apis mellifera carnica*): Dependence on individual age and function. *J Insect Physiol*, 38(6):409–419, 1992.
- [58] D. A. Cross, P. W. Watt, M. Shaw, J. van der Kaay, C. P. Downes, J. C. Holder, and P. Cohen. Insulin activates protein kinase B, inhibits glycogen synthase kinase-3 and activates glycogen synthase by rapamycin-insensitive pathways in skeletal muscle and adipose tissue. *FEBS Lett*, 406(1-2):211–215, Apr 1997.
- [59] D. J. Cuthbertson, J. A. Babraj, K. J. W. Mustard, M. C. Towler, K. A. Green, H. Wackerhage, G. P. Leese, K. Baar, M. Thomason-Hughes, C. Sutherland, D. G. Hardie, and M. J. Rennie. 5-aminoimidazole-4-carboxamide 1-beta-D-ribofuranoside acutely stimulates skeletal muscle 2-deoxyglucose uptake in healthy men. *Diabetes*, 56(8):2078–2084, Aug 2007.
- [60] P. K. Dash, B. Hochner, and E. R. Kandel. Injection of the cAMP-responsive element into the nucleus of *Aplysia* sensory neurons blocks long-term facilitation. *Nature*, 345(6277):718–721, Jun 1990.
- [61] S. P. Davies, N. R. Helps, P. T. Cohen, and D. G. Hardie. 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, Dec 1995.
- [62] I. E. de Araujo, A. J. Oliveira-Maia, T. D. Sotnikova, R. R. Gainetdinov, M. G. Caron, M. A. L. Nicolelis, and S. A. Simon. Food reward in the absence of taste receptor signaling. *Neuron*, 57(6):930–941, Mar 2008.
- [63] R. Dentin, Y. Liu, S.-H. Koo, S. Hedrick, T. Vargas, J. Heredia, J. Yates, 3rd, and M. Montminy. Insulin modulates gluconeogenesis by inhibition of the coactivator TORC2. *Nature*, 449(7160):366–369, Sep 2007.
- [64] P. Detimary, S. Dejonghe, Z. Ling, D. Pipeleers, F. Schuit, and J. C. Henquin. The changes in adenine nucleotides measured in glucose-stimulated rodent islets occur in beta cells but not in alpha cells and are also observed in human islets. *J Biol Chem*, 273(51):33905–33908, Dec 1998.
- [65] D. Dimitrakoudis, T. Ramlal, S. Rastogi, M. Vranic, and A. Klip. Glycaemia regulates the glucose transporter number in the plasma membrane of rat skeletal muscle. *Biochem J*, 284 (Pt 2):341–348, Jun 1992.
- [66] R. Duelli and W. Kuschinsky. Brain glucose transporters: relationship to local energy demand. *News Physiol Sci*, 16:71–76, Apr 2001.
- [67] R. Duelli, M. H. Maurer, and W. Kuschinsky. Decreased glucose transporter densities, rate constants and glucose utilization in visual structures of rat brain during chronic visual deprivation. *Neurosci Lett*, 250(1):49–52, Jun 1998.
- [68] T. P. Durkin, C. Messier, P. de Boer, and B. H. Westerink. Raised glucose levels enhance scopolamine-induced acetylcholine overflow from the hippocampus: an in vivo microdialysis study in the rat. *Behav Brain Res*, 49(2):181–188, Aug 1992.
- [69] M. Dus, S. Min, A. C. Keene, G. Y. Lee, and G. S. B. Suh. Taste-independent detection of the caloric content of sugar in *Drosophila*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 108(28):11644–11649, Jul 2011.
- [70] H. Engels, W. und Fahrerthorst. Alters- und kastenspezifische Veränderungen der Haemolymph-Protein-Spektren bei *Apis mellifacia*. *Wilhelm Roux Archiv*, 174:285–296, 1974.
- [71] D. R. Evans and V. G. Dethier. The regulation of taste thresholds for sugars in the blowfly. *J Insect Physiol*, 1:3 – 17, 1957.
- [72] J. Fadel and A. Y. Deutch. Anatomical substrates of orexin-dopamine interactions: lateral hypothalamic projections to the ventral tegmental area. *Neuroscience*, 111(2):379–387, 2002.

- [73] C. L. Farrell and W. M. Pardridge. Blood-brain barrier glucose transporter is asymmetrically distributed on brain capillary endothelial luminal and abluminal membranes: an electron microscopic immunogold study. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 88(13):5779–5783, Jul 1991.
- [74] S. Fediuc, M. P. Gaidhu, and R. B. Ceddia. Inhibition of insulin-stimulated glycogen synthesis by 5-aminoimidazole-4-carboxamide-1-beta-D-ribofuranoside-induced adenosine 5'-monophosphate-activated protein kinase activation: interactions with Akt, glycogen synthase kinase 3-3alpha/beta, and glycogen synthase in isolated rat soleus muscle. *Endocrinology*, 147(11):5170–5177, Nov 2006.
- [75] P. Fluri, M. Lüscher, H. Wille, and L. Gerig. Changes in weight of the pharyngeal gland and haemolymph titres of juvenile hormone and vitellogenin in worker honeybees. *J Insect Physiol*, 28:61–68, 1982.
- [76] L. C. Foukas, M. Claret, W. Pearce, K. Okkenhaug, S. Meek, E. Peskett, S. Sancho, A. J. H. Smith, D. J. Withers, and B. Vanhaesebroeck. Critical role for the p110alpha phosphoinositide-3-OH kinase in growth and metabolic regulation. *Nature*, 441(7091):366–370, May 2006.
- [77] H. R. Friedman and P. S. Goldman-Rakic. Activation of the hippocampus and dentate gyrus by working-memory: a 2-deoxyglucose study of behaving rhesus monkeys. *J Neurosci*, 8(12):4693–4706, Dec 1988.
- [78] J. E. Friedman, R. W. Dudek, D. S. Whitehead, D. L. Downes, W. R. Frisell, J. F. Caro, and G. L. Dohm. Immunolocalization of glucose transporter GLUT4 within human skeletal muscle. *Diabetes*, 40(1):150–154, Jan 1991.
- [79] A. Friedrich, U. Thomas, and U. Müller. 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, May 2004.
- [80] N. Fujii, N. Jessen, and L. J. Goodyear. Amp-activated protein kinase and the regulation of glucose transport. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 291(5):E867–E877, Nov 2006.
- [81] M. Fujita and T. Tanimura. Drosophila evaluates and learns the nutritional value of sugars. *Curr Biol*, 21(9):751–755, May 2011.
- [82] S. Fulton, P. Pissios, R. P. Manchon, L. Stiles, L. Frank, E. N. Pothos, E. Maratos-Flier, and J. S. Flier. Leptin regulation of the mesoaccumbens dopamine pathway. *Neuron*, 51(6):811–822, Sep 2006.
- [83] M. P. Gaidhu, R. L. S. Perry, F. Noor, and R. B. Ceddia. Disruption of AMPKalpha1 signaling prevents AICAR-induced inhibition of AS160/TBC1D4 phosphorylation and glucose uptake in primary rat adipocytes. *Mol Endocrinol*, 24(7):1434–1440, Jul 2010.

- [84] W. T. Garvey, T. P. Huecksteadt, and M. J. Birnbaum. Pretranslational suppression of an insulin-responsive glucose transporter in rats with diabetes mellitus. *Science*, 245(4913):60–63, Jul 1989.
- [85] G. Gäde and L. Auerswald. Mode of action of neuropeptides from the adipokinetic hormone family. *Gen Comp Endocrinol*, 132(1):10–20, Jun 2003.
- [86] K. Gerozissis and G. Kyriaki. Brain insulin: regulation, mechanisms of action and functions. *Cell Mol Neurobiol*, 23(1):1–25, Feb 2003.
- [87] N. Gervasi, P. Tchenio, and T. Preat. PKA Dynamics in a Drosophila Learning Center: Coincidence Detection by Rutabaga Adenylyl Cyclase and Spatial Regulation by Dunce Phosphodiesterase. *Neuron*, 65(4):516–29, 2010.
- [88] F. Gomez-Pinilla, S. Vaynman, and Z. Ying. Brain-derived neurotrophic factor functions as a metabotrophin to mediate the effects of exercise on cognition. *Eur J Neurosci*, 28(11):2278–2287, Dec 2008.
- [89] E. Gropp, M. Shanabrough, E. Borok, A. W. Xu, R. Janoschek, T. Buch, L. Plum, N. Balthasar, B. Hampel, A. Waisman, G. S. Barsh, T. L. Horvath, and J. C. Brüning. Agouti-related peptide-expressing neurons are mandatory for feeding. *Nat Neurosci*, 8(10):1289–1291, Oct 2005.
- [90] K. R. Guidugli, A. M. Nascimento, G. V. Amdam, A. R. Barchuk, S. Omholt, Z. L. P. Simões, and K. Hartfelder. Vitellogenin regulates hormonal dynamics in the worker caste of a eusocial insect. *FEBS Lett*, 579(22):4961–4965, Sep 2005.
- [91] A. Gumà, J. R. Zierath, H. Wallberg-Henriksson, and A. Klip. Insulin induces translocation of GLUT-4 glucose transporters in human skeletal muscle. *Am J Physiol*, 268(4 Pt 1):E613–E622, Apr 1995.
- [92] D. G. Hardie. The AMP-activated protein kinase pathway—new players upstream and downstream. *J Cell Sci*, 117(Pt 23):5479–5487, Nov 2004.
- [93] D. G. Hardie, I. P. Salt, S. A. Hawley, and S. P. Davies. AMP-activated protein kinase: an ultrasensitive system for monitoring cellular energy charge. *Biochem J*, 338 (Pt 3):717–722, Mar 1999.
- [94] D. G. Hardie, J. W. Scott, D. A. Pan, and E. R. Hudson. Management of cellular energy by the AMP-activated protein kinase system. *FEBS Lett*, 546(1):113–120, Jul 2003.
- [95] A. B. Hardy, J. Aïoun, C. Baly, K. A. Julliard, M. Caillol, R. Salesse, and P. Duchamp-Viret. Orexin A modulates mitral cell activity in the rat olfactory bulb: patch-clamp study on slices and immunocytochemical localization of orexin receptors. *Endocrinology*, 146(9):4042–4053, Sep 2005.

- [96] G. C. Harris, M. Wimmer, and G. Aston-Jones. A role for lateral hypothalamic orexin neurons in reward seeking. *Nature*, 437(7058):556–559, Sep 2005.
- [97] J. W. . Harris and J. Woodring. Effects of stress, age, season, and source colony on levels of octopamine, dopamine and serotonin in the honey bee (*Apis mellifera* L.) brain. *J Insect Physiol*, 38(1):29–35, 1992.
- [98] J. M. Harrison. Caste-specific changes in honey bee flight capacity. *Physiol Zool*, 59:175 –187, 1986.
- [99] A. Haselton, E. Sharmin, J. Schrader, M. Sah, P. Poon, and Y.-W. C. Fridell. Partial ablation of adult *Drosophila* insulin-producing neurons modulates glucose homeostasis and extends life span without insulin resistance. *Cell Cycle*, 9(15):3063–3071, Aug 2010.
- [100] A. T. Haselton and Y.-W. C. Fridell. Adult *Drosophila melanogaster* as a model for the study of glucose homeostasis. *Aging (Albany NY)*, 2(8):523–526, Aug 2010.
- [101] S. A. Hawley, M. Davison, A. Woods, S. P. Davies, R. K. Beri, D. Carling, and D. G. Hardie. Characterization of the AMP-activated protein kinase 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):27879–27887, Nov 1996.
- [102] S. A. Hawley, D. A. Pan, K. J. Mustard, L. Ross, J. Bain, A. M. Edelman, B. G. Frenquelli, and D. G. Hardie. Calmodulin-dependent protein kinase kinase-beta is an alternative upstream kinase for AMP-activated protein kinase. *Cell Metab*, 2(1):9–19, Jul 2005.
- [103] T. Hayashi, J. F. Wojtaszewski, and L. J. Goodyear. Exercise regulation of glucose transport in skeletal muscle. *Am J Physiol*, 273(6 Pt 1):E1039–E1051, Dec 1997.
- [104] D. O. Hebb. *The organization of behavior: a neuropsychological theory*. Wiley, 1949.
- [105] J. J. G. Hillebrand, D. de Wied, and R. A. H. Adan. Neuropeptides, food intake and body weight regulation: a hypothalamic focus. *Peptides*, 23(12):2283–2306, Dec 2002.
- [106] B. A. Hirayama, H. C. Wong, C. D. Smith, B. A. Hagenbuch, M. A. Hediger, and E. M. Wright. Intestinal and renal Na+/glucose cotransporters share common structures. *Am J Physiol*, 261(2 Pt 1):C296–C304, Aug 1991.
- [107] J. O. Holloszy. Regulation by exercise of skeletal muscle content of mitochondria and GLUT4. *J Physiol Pharmacol*, 59 Suppl 7:5–18, Dec 2008.
- [108] B. F. Holmes, D. P. Sparling, A. L. Olson, W. W. Winder, and G. L. Dohm. Regulation of muscle GLUT4 enhancer factor and myocyte enhancer factor 2 by AMP-activated protein kinase. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 289(6):E1071–E1076, Dec 2005.

- [109] J. D. Hommel, R. Trinko, R. M. Sears, D. Georgescu, Z.-W. Liu, X.-B. Gao, J. J. Thurmon, M. Marinelli, and R. J. DiLeone. Leptin receptor signaling in midbrain dopamine neurons regulates feeding. *Neuron*, 51(6):801–810, Sep 2006.
- [110] R. Ignell, C. M. Root, R. T. Birse, J. W. Wang, D. R. Nässel, and A. M. E. Winther. Presynaptic peptidergic modulation of olfactory receptor neurons in *Drosophila*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 106(31):13070–13075, Aug 2009.
- [111] N. T. Ihle, G. Paine-Murrieta, M. I. Berggren, A. Baker, W. R. Tate, P. Wipf, R. T. Abraham, D. L. Kirkpatrick, and G. Powis. The phosphatidylinositol-3-kinase inhibitor PX-866 overcomes resistance to the epidermal growth factor receptor inhibitor gefitinib in A-549 human non-small cell lung cancer xenografts. *Mol Cancer Ther*, 4(9):1349–1357, Sep 2005.
- [112] T. Ikeya, M. Galic, P. Belawat, K. Nairz, and E. Hafen. Nutrient-dependent expression of insulin-like peptides from neuroendocrine cells in the CNS contributes to growth regulation in *Drosophila*. *Curr Biol*, 12(15):1293–1300, Aug 2002.
- [113] N. P. Illsley. Glucose transporters in the human placenta. *Placenta*, 21(1):14–22, Jan 2000.
- [114] D. E. James, R. Brown, J. Navarro, and P. F. Pilch. Insulin-regulatable tissues express a unique insulin-sensitive glucose transport protein. *Nature*, 333(6169):183–185, May 1988.
- [115] D. E. James, M. Strube, and M. Mueckler. Molecular cloning and characterization of an insulin-regulatable glucose transporter. *Nature*, 338(6210):83–87, Mar 1989.
- [116] D. C. Jewett, C. J., L. A. S., S. D. W., and T. T. Effects of neuropeptide Y, insulin, 2-deoxyglucose, and food deprivation on food-motivated behavior. *Psychopharmacology*, 120:267–71, 1995.
- [117] E. C. Johnson, N. Kazgan, C. A. Bretz, L. J. Forsberg, C. E. Hector, R. J. Worthen, R. Onyenwoke, and J. E. Brenman. Altered metabolism and persistent starvation behaviors caused by reduced AMPK function in *Drosophila*. *PLoS One*, 5(9), 2010.
- [118] N. Jurdak and R. B. Kanarek. Sucrose-induced obesity impairs novel object recognition learning in young rats. *Physiol Behav*, 96(1):1–5, Jan 2009.
- [119] M. Jyotaki, N. Shigemura, and Y. Ninomiya. Modulation of sweet taste sensitivity by orexigenic and anorexigenic factors. *Endocr J*, 57(6):467–475, 2010.
- [120] B. B. Kahn, M. J. Charron, H. F. Lodish, S. W. Cushman, and J. S. Flier. Differential regulation of two glucose transporters in adipose cells from diabetic and insulin-treated diabetic rats. *J Clin Invest*, 84(2):404–411, Aug 1989.

- [121] B. B. Kahn, L. Rossetti, H. F. Lodish, and M. J. Charron. Decreased in vivo glucose uptake but normal expression of GLUT1 and GLUT4 in skeletal muscle of diabetic rats. *J Clin Invest*, 87(6):2197–2206, Jun 1991.
- [122] P. Kaliman, F. Viñals, X. Testar, M. Palacín, and A. Zorzano. Disruption of GLUT1 glucose carrier trafficking in L6E9 and Sol8 myoblasts by the phosphatidylinositol 3-kinase inhibitor wortmannin. *Biochem J*, 312 (Pt 2):471–477, Dec 1995.
- [123] K. Kawai, K. Sugimoto, K. Nakashima, H. Miura, and Y. Ninomiya. Leptin as a modulator of sweet taste sensitivities in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 97(20):11044–11049, Sep 2000.
- [124] M. S. Kim, M. Rossi, S. Abusnana, D. Sunter, D. G. A. Morgan, C. J. Small, C. M. B. Edwards, M. M. Heath, S. A. Stanley, L. J. Seal, J. R. Bhatti, D. M. Smith, M. A. Ghatei, and S. R. Bloom. Hypothalamic localization of the feeding effect of agouti-related peptide and alpha-melanocyte-stimulating hormon. *Diabetes*, 49, No.2:177–182, 2000.
- [125] S. K. Kim and E. J. Rulifson. Conserved mechanisms of glucose sensing and regulation by Drosophila corpora cardiaca cells. *Nature*, 431(7006):316–320, Sep 2004.
- [126] S. R. Kimball, C. V. Jurasinski, J. Lawrence, Jr, and L. S. Jefferson. Insulin stimulates protein synthesis in skeletal muscle by enhancing the association of eIF-4E and eIF-4G. *Am J Physiol*, 272(2 Pt 1):C754–C759, Feb 1997.
- [127] M. Klatte and P. Bauer. Accurate Real-time Reverse Transcription Quantitative PCR. *Methods Mol Biol*, 479:61–77, 2009.
- [128] B. Klein, W. Kuschinsky, H. Schröck, and F. Vetterlein. Interdependency of local capillary density, blood flow, and metabolism in rat brains. *Am J Physiol*, 251(6 Pt 2):H1333–H1340, Dec 1986.
- [129] M. Klein and E. R. Kandel. Mechanism of calcium current modulation underlying presynaptic facilitation and behavioral sensitization in Aplysia. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 77(11):6912–6916, Nov 1980.
- [130] A. Klip and A. Marette. Acute and chronic signals controlling glucose transport in skeletal muscle. *J Cell Biochem*, 48(1):51–60, Jan 1992.
- [131] Z. A. Knight, B. Gonzalez, M. E. Feldman, E. R. Zunder, D. D. Goldenberg, O. Williams, R. Loewith, D. Stokoe, A. Balla, B. Toth, T. Balla, W. A. Weiss, R. L. Williams, and K. M. Shokat. A pharmacological map of the PI3-K family defines a role for p110alpha in insulin signaling. *Cell*, 125(4):733–747, May 2006.

- [132] D. Kohno, H. Sone, S. Tanaka, H. Kurita, D. Gantulga, and T. Yada. AMP-activated protein kinase activates neuropeptide Y neurons in the hypothalamic arcuate nucleus to increase food intake in rats. *Neurosci Lett*, 499(3):194–198, Jul 2011.
- [133] M. J. Krashes, S. DasGupta, A. Vreede, B. White, J. D. Armstrong, and S. Waddell. A neural circuit mechanism integrating motivational state with memory expression in *Drosophila*. *Cell*, 139(2):416–427, Oct 2009.
- [134] A. K. Kumagai, Y. S. Kang, R. J. Boado, and W. M. Pardridge. Upregulation of blood-brain barrier GLUT1 glucose transporter protein and mRNA in experimental chronic hypoglycemia. *Diabetes*, 44(12):1399–1404, Dec 1995.
- [135] N. Kuramoto, M. E. Wilkins, B. P. Fairfax, R. Revilla-Sanchez, M. Terunuma, K. Tamaki, M. Iemata, N. Warren, A. Couve, A. Calver, Z. Horvath, K. Freeman, D. Carling, L. Huang, C. Gonzales, E. Cooper, T. G. Smart, M. N. Pangalos, and S. J. Moss. Phospho-dependent functional modulation of GABA(B) receptors by the metabolic sensor AMP-dependent protein kinase. *Neuron*, 53(2):233–247, Jan 2007.
- [136] E. J. Kurth-Kraczek, M. F. Hirshman, L. J. Goodyear, and W. W. Winder. 5' AMP-activated protein kinase activation causes GLUT4 translocation in skeletal muscle. *Diabetes*, 48(8):1667–1671, Aug 1999.
- [137] T. Laeger. *Der Einfluss des Sättigungszustandes auf appetitive sensorische Prozessierung, Lernen und Gedächtnisbildung: Die Rolle der 5' Adenosinmonophosphat-aktivierten Proteinkinase*. PhD thesis, Universität des Saarlandes, 2007.
- [138] T. K. T. Lam, A. Pocai, R. Gutierrez-Juarez, S. Obici, J. Bryan, L. Aguilar-Bryan, G. J. Schwartz, and L. Rossetti. Hypothalamic sensing of circulating fatty acids is required for glucose homeostasis. *Nat Med*, 11(3):320–327, Mar 2005.
- [139] G. Lee and J. H. Park. Hemolymph sugar homeostasis and starvation-induced hyperactivity affected by genetic manipulations of the adipokinetic hormone-encoding gene in *Drosophila melanogaster*. *Genetics*, 167(1):311–323, May 2004.
- [140] B. E. Levin. Metabolic sensors: viewing glucosensing neurons from a broader perspective. *Physiol Behav*, 76(3):397–401, Jul 2002.
- [141] A. S. Levine and J. E. Morley. Neuropeptide Y: a potent inducer of consummatory behavior in rats. *Peptides*, 5(6):1025–1029, 1984.
- [142] J. E. Liljenquist, G. L. Mueller, A. D. Cherrington, U. Keller, Chiasson J-L, J. M. Perry, W. W. Lacy, and D. Rabinowitz. Evidence for an important role of glucagon in the regulation of hepatic glucose production in normal man. *J Clin Invest*, 59(2):369–374, Feb 1977.

- [143] X. Lin, A. Taguchi, S. Park, J. A. Kushner, F. Li, Y. Li, and M. F. White. Dysregulation of insulin receptor substrate 2 in beta cells and brain causes obesity and diabetes. *J Clin Invest*, 114(7):908–916, Oct 2004.
- [144] B. Liss and J. Roeper. Molecular physiology of neuronal K-ATP channels (review). *Mol Membr Biol*, 18(2):117–127, 2001.
- [145] S. J. Liu, A. H. Zhang, H. L. Li, Q. Wang, H. M. Deng, W. J. Netzer, H. Xu, and J. Z. Wang. Overactivation of glycogen synthase kinase-3 by inhibition of phosphoinositol-3 kinase and protein kinase C leads to hyperphosphorylation of tau and impairment of spatial memory. *J Neurochem*, 87(6):1333–1344, Dec 2003.
- [146] S. Luquet, F. A. Perez, T. S. Hnasko, and R. D. Palmiter. NPY/AgRP neurons are essential for feeding in adult mice but can be ablated in neonates. *Science*, 310(5748):683–685, Oct 2005.
- [147] R. M. Lynch, L. S. Tompkins, H. L. Brooks, A. A. Dunn-Meynell, and B. E. Levin. Localization of glucokinase gene expression in the rat brain. *Diabetes*, 49(5):693–700, May 2000.
- [148] M. Maffei, J. Halaas, E. Ravussin, R. E. Pratley, G. H. Lee, Y. Zhang, H. Fei, S. Kim, R. Lallone, and S. Ranganathan. Leptin levels in human and rodent: measurement of plasma leptin and ob RNA in obese and weight-reduced subjects. *Nat Med*, 1(11):1155–1161, Nov 1995.
- [149] F. Maher, S. J. Vannucci, and I. A. Simpson. Glucose transporter proteins in brain. *FASEB J*, 8(13):1003–1011, Oct 1994.
- [150] A. Marette, D. Dimitrakoudis, Q. Shi, C. D. Rodgers, A. Klip, and M. Vranic. Glucose rapidly decreases plasma membrane GLUT4 content in rat skeletal muscle. *Endocrine*, 10(1):13–18, Feb 1999.
- [151] T. Maric, A. Cantor, H. Cuccioletta, S. Tobin, and U. Shalev. Neuropeptide Y augments cocaine self-administration and cocaine-induced hyperlocomotion in rats. *Peptides*, 30(4):721–726, Apr 2009.
- [152] A. S. Marsin, L. Bertrand, M. H. Rider, J. Deprez, C. Beaujouy, M. F. Vincent, G. Van den Berghe, D. Carling, and L. Hue. Phosphorylation and activation of heart PFK-2 by AMPK has a role in the stimulation of glycolysis during ischaemia. *Curr Biol*, 10(20):1247–1255, Oct 2000.
- [153] S. J. Martin, P. D. Grimwood, and R. G. Morris. Synaptic plasticity and memory: an evaluation of the hypothesis. *Annu Rev Neurosci*, 23:649–711, 2000.
- [154] Y. Matsumoto, E. Sumiya, T. Sugita, and K. Sekimizu. An invertebrate hyperglycemic model for the identification of anti-diabetic drugs. *PLoS One*, 6(3):e18292, 2011.

- [155] R. Menzel. Searching for the memory trace in a mini-brain, the honeybee. *Learn Mem*, 8:53–62, 2001.
- [156] R. Menzel and U. Müller. Learning and memory in honeybees: from behavior to neural substrates. *Annu Rev Neurosci*, 19:379–404, 1996.
- [157] C. Messier. Glucose improvement of memory: a review. *Eur J Pharmacol*, 490(1-3):33–57, Apr 2004.
- [158] Y. Minokoshi, T. Alquier, N. Furukawa, Y.-B. Kim, A. Lee, B. Xue, J. Mu, F. Foufelle, P. Ferré, M. J. Birnbaum, B. J. Stuck, and B. B. Kahn. AMP-kinase regulates food intake by responding to hormonal and nutrient signals in the hypothalamus. *Nature*, 428(6982):569–574, Apr 2004.
- [159] Y. Minokoshi, Y.-B. Kim, O. D. Peroni, L. G. D. Fryer, C. Müller, D. Carling, and B. B. Kahn. Leptin stimulates fatty-acid oxidation by activating AMP-activated protein kinase. *Nature*, 415(6869):339–343, Jan 2002.
- [160] U. Müller. Learning in honeybees: from molecules to behaviour. *Zoology (Jena)*, 105(4):313–320, 2002.
- [161] L. Moffatt. Changes in the metabolic rate of the foraging honeybee: effect of the carried weight or of the reward rate? *J Comp Physiol A*, 186(3):299–306, Mar 2000.
- [162] K. A. Morris, Q. Chang, E. G. Mohler, and P. E. Gold. Age-related memory impairments due to reduced blood glucose responses to epinephrine. *Neurobiol Aging*, 31(12):2136–2145, Dec 2010.
- [163] C. D. Morrison and H.-R. Berthoud. Neurobiology of nutrition and obesity. *Nutr Rev*, 65(12 Pt 1):517–534, Dec 2007.
- [164] C. D. Morrison, G. J. Morton, K. D. Niswender, R. W. Gelling, and M. W. Schwartz. Leptin inhibits hypothalamic Npy and Agrp gene expression via a mechanism that requires phosphatidylinositol 3-OH-kinase signaling. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 289(6):E1051–E1057, Dec 2005.
- [165] G. J. Morton. Hypothalamic leptin regulation of energy homeostasis and glucose metabolism. *J Physiol*, 583(Pt 2):437–443, Sep 2007.
- [166] P. R. Moult and J. Harvey. Hormonal regulation of hippocampal dendritic morphology and synaptic plasticity. *Cell Adh Migr*, 2(4):269–275, 2008.
- [167] M. Mueckler, C. Caruso, S. A. Baldwin, M. Panico, I. Blench, H. R. Morris, W. J. Allard, G. E. Lienhard, and H. F. Lodish. Sequence and structure of a human glucose transporter. *Science*, 229(4717):941–945, Sep 1985.

- [168] U. Mueller. Prolonged Activation of cAMP-Dependent Protein Kinase during Conditioning Induces Long-Term Memory in Honeybee. *Neuron*, 27(1):159–68, 2000.
- [169] S. Mujagic, J. Sarkander, B. Erber, and J. Erber. Sucrose acceptance and different forms of associative learning of the honey bee (*Apis mellifera L.*) in the field and laboratory. *Frontiers in Behavioral Neuroscience*, 4 (46):1–11, 2010.
- [170] M. N. Awad and C. Messier. The relationship between impaired glucose tolerance, type 2 diabetes, and cognitive function. *J Clin Exp Neuropsychol*, 26(8):1044–1080, Nov 2004.
- [171] A. Neukirch. Dependence of the life span of the honeybee (*Apis mellifica*) upon flight performance and energy consumption. *J. Comp. Physiol.*, 146:35–40, 1982.
- [172] C. G. Nichols, S. L. Shyng, A. Nestorowicz, B. Glaser, J. Clement, 4th, G. Gonzalez, L. Aguilar-Bryan, M. A. Permutt, and J. Bryan. Adenosine diphosphate as an intracellular regulator of insulin secretion. *Science*, 272(5269):1785–1787, Jun 1996.
- [173] K.-A. Nilsen, K. E. Ihle, K. Frederick, M. K. Fondrk, B. Smedal, K. Hartfelder, and G. V. Amdam. Insulin-like peptide genes in honey bee fat body respond differently to manipulation of social behavioral physiology. *J Exp Biol*, 214(Pt 9):1488–1497, May 2011.
- [174] A. L. Olson and J. E. Pessin. Structure, function, and regulation of the mammalian facilitative glucose transporter gene family. *Annu Rev Nutr*, 16:235–256, 1996.
- [175] J. Pager, I. Giachetti, A. Holley, and J. Le Magnen. A selective control of olfactory bulb electrical activity in relation to food deprivation and satiety in rats. *Physiol Behav*, 9(4):573–579, Oct 1972.
- [176] D. A. Pan and D. G. Hardie. 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, Oct 2002.
- [177] T. Pankiw and R. E. Page, Jr. 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, Aug 1999.
- [178] P. C. Passier, H. G. Vullings, J. H. Diederend, and D. J. Van der Horst. Trehalose inhibits the release of adipokinetic hormones from the corpus cardiacum in the African migratory locust, *Locusta migratoria*, at the level of the adipokinetic cells. *J Endocrinol*, 153(2):299–305, May 1997.
- [179] I. P. Pavlov. Conditioned reflexes: An investigation of the physiological activity of the cerebral cortex. *Annals of Neuroscience*, 17, 1927.

- [180] F. Ponton, M.-P. Chapuis, M. Pernice, G. A. Sword, and S. J. Simpson. Evaluation of potential reference genes for reverse transcription-qpcr studies of physiological responses in *drosophila melanogaster*. *J Insect Physiol*, 57(6):840–850, Jun 2011.
- [181] D. R. G. Price, H. S. Wilkinson, and J. A. Gatehouse. Functional expression and characterisation of a gut facilitative glucose transporter, NIHT1, from the phloem-feeding insect *Nilaparvata lugens* (rice brown planthopper). *Insect Biochem Mol Biol*, 37(11):1138–1148, Nov 2007.
- [182] A. Puerto, J. A. Deutsch, F. Mólina, and P. L. Roll. Rapid discrimination of rewarding nutrient by the upper gastrointestinal tract. *Science*, 192(4238):485–487, Apr 1976.
- [183] U. Quast and N. S. Cook. In vitro and in vivo comparison of two K⁺ channel openers, diazoxide and cromakalim, and their inhibition by glibenclamide. *J Pharmacol Exp Ther*, 250(1):261–271, Jul 1989.
- [184] M. J. Quon, H. Chen, B. L. Ing, M. L. Liu, M. J. Zarnowski, K. Yonezawa, M. Kasuga, S. W. Cushman, and S. I. Taylor. Roles of 1-phosphatidylinositol 3-kinase and ras in regulating translocation of GLUT4 in transfected rat adipose cells. *Mol Cell Biol*, 15(10):5403–5411, Oct 1995.
- [185] J. Rícný, S. Tucek, and J. Nováková. Acetylcarnitine, carnitine and glucose diminish the effect of muscarinic antagonist quinuclidinyl benzilate on striatal acetylcholine content. *Brain Res*, 576(2):215–219, Apr 1992.
- [186] M. S. Remedi and C. G. Nichols. Chronic antidiabetic sulfonylureas in vivo: reversible effects on mouse pancreatic beta-cells. *PLoS Med*, 5(10):e206, Oct 2008.
- [187] E. T. Rolls, Z. J. Sienkiewicz, and S. Yaxley. 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, Jan 1989.
- [188] C. M. Root, K. I. Ko, A. J., and J. W. Wang. Presynaptic facilitation by neuropeptide signaling mediates odor-driven food search. *Cell*, 145(1):133–144, Apr 2011.
- [189] U. Rothe and W. Nachtigall. Flight of the honey bee. IV. Respiratory quotients and metabolic rates during sitting, walking and flying. *J Comp Physiol B*, 158:739–749, 1989.
- [190] S. G. Roy, I. A. Hansen, and A. S. Raikhel. Effect of insulin and 20-hydroxyecdysone in the fat body of the yellow fever mosquito, *Aedes aegypti*. *Insect Biochem Mol Biol*, 37(12):1317–1326, Dec 2007.
- [191] E. J. Rulifson, S. K. Kim, and R. Nusse. Ablation of insulin-producing neurons in flies: growth and diabetic phenotypes. *Science*, 296(5570):1118–1120, May 2002.

- [192] J. Rybak and R. Menzel. Anatomy of the mushroom bodies in the honey bee brain: the neuronal connections of the alpha-lobe. *J Comp Neurol*, 334(3):444–465, Aug 1993.
- [193] B. Sacktor. Regulation of intermediary metabolism, with special reference to the control mechanisms in insect flight muscle. *Adv Insect Physiol*, 7:267–347, 1970.
- [194] I. P. Salt, J. M. Connell, and G. W. Gould. 5-aminoimidazole-4-carboxamide ribonucleoside (AICAR) inhibits insulin-stimulated glucose transport in 3T3-L1 adipocytes. *Diabetes*, 49(10):1649–1656, Oct 2000.
- [195] V. Sanchez-Margálet, I. D. Goldfine, C. J. Vlahos, and C. K. Sung. Role of phosphatidylinositol-3-kinase in insulin receptor signaling: studies with inhibitor, LY294002. *Biochem Biophys Res Commun*, 204(2):446–452, Oct 1994.
- [196] M. J. Sanders, P. O. Grondin, B. D. Hegarty, M. A. Snowden, and D. Carling. Investigating the mechanism for AMP activation of the AMP-activated protein kinase cascade. *Biochem J*, 403(1):139–148, Apr 2007.
- [197] A. Sato, J. Sunayama, K.-i. Matsuda, K. Tachibana, K. Sakurada, A. Tomiyama, T. Kiyama, and C. Kitanaka. Regulation of neural stem/progenitor cell maintenance by PI3K and mTOR. *Neurosci Lett*, 470(2):115–120, Feb 2010.
- [198] R. Scheiner, A. Baumann, and W. Blenau. Aminergic control and modulation of honeybee behaviour. *Curr Neuropharmacol*, 4(4):259–276, Oct 2006.
- [199] R. Scheiner, A. Kuritz-Kaiser, R. Menzel, and J. Erber. Sucrose responsiveness and behavioral plasticity in honey bees (*Apis mellifera*). *Apidologie*, 35:133–142, 2004.
- [200] R. Scheiner, A. Kuritz-Kaiser, R. Menzel, and J. Erber. Sensory responsiveness and the effects of equal subjective rewards on tactile learning and memory of honeybees. *Learn Mem*, 12(6):626–635, 2005.
- [201] R. Scheiner, R. E. Page, and J. Erber. Responsiveness to sucrose affects tactile and olfactory learning in preforaging honey bees of two genetic strains. *Behav Brain Res*, 120(1):67–73, Apr 2001.
- [202] R. Scheiner, R. E. Page, and J. Erber. 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, Sep 2001.
- [203] F. C. Schuit, P. Huypens, H. Heimberg, and D. G. Pipeleers. Glucose sensing in pancreatic beta-cells: a model for the study of other glucose-regulated cells in gut, pancreas, and hypothalamus. *Diabetes*, 50(1):1–11, Jan 2001.
- [204] W. Schultz. Predictive reward signal of dopamine neurons. *J Neurophysiol*, 80(1):1–27, Jul 1998.

- [205] W. Schultz, P. Apicella, and T. Ljungberg. 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, Mar 1993.
- [206] M. W. Schwartz, A. J. Sipols, J. L. Marks, G. Sanacora, J. D. White, A. Scheurink, S. E. Kahn, D. G. Baskin, S. C. Woods, and D. P. Figlewicz. Inhibition of hypothalamic neuropeptide Y gene expression by insulin. *Endocrinology*, 130(6):3608–3616, Jun 1992.
- [207] M. Schwärzel and U. Müller. Dynamic memory networks: dissecting molecular mechanisms underlying associative memory in the temporal domain. *Cell Mol Life Sci*, 63(9):989–998, May 2006.
- [208] S.-C. Seehuus, K. Norberg, U. Gimsa, T. Krekling, and G. V. Amdam. Reproductive protein protects functionally sterile honey bee workers from oxidative stress. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 103(4):962–967, Jan 2006.
- [209] N. Shigemura, R. Ohta, Y. Kusakabe, H. Miura, A. Hino, K. Koyano, K. Nakashima, and Y. Ninomiya. Leptin modulates behavioral responses to sweet substances by influencing peripheral taste structures. *Endocrinology*, 145(2):839–847, Feb 2004.
- [210] H. Shimizu, H. Arima, M. Watanabe, M. Goto, R. Banno, I. Sato, N. Ozaki, H. Nagasaki, and Y. Oiso. Glucocorticoids increase neuropeptide Y and agouti-related peptide gene expression via adenosine monophosphate-activated protein kinase signaling in the arcuate nucleus of rats. *Endocrinology*, 149(9):4544–4553, Sep 2008.
- [211] A. J. Silva, J. H. Kogan, P. W. Frankland, and S. Kida. CREB and memory. *Annu Rev Neurosci*, 21:127–148, 1998.
- [212] A. T. Sim and D. G. Hardie. The low activity of acetyl-CoA carboxylase in basal and glucagon-stimulated hepatocytes is due to phosphorylation by the AMP-activated protein kinase and not cyclic AMP-dependent protein kinase. *FEBS Lett*, 233(2):294–298, Jun 1988.
- [213] I. A. Simpson, N. M. Appel, M. Hokari, J. Oki, G. D. Holman, F. Maher, E. M. Koehler-Stec, S. J. Vannucci, and Q. R. Smith. Blood-brain barrier glucose transporter: effects of hypo- and hyperglycemia revisited. *J Neurochem*, 72(1):238–247, Jan 1999.
- [214] S. J. Simpson and C. L. Simpson. Mechanisms controlling modulation by haemolymph amino acids of gustatory responsiveness in the locust. *J exp Biol*, 168:269–287, 1992.
- [215] A. J. Sipols, D. G. Baskin, and M. W. Schwartz. Effect of intracerebroventricular insulin infusion on diabetic hyperphagia and hypothalamic neuropeptide gene expression. *Diabetes*, 44(2):147–151, Feb 1995.

- [216] R. E. Snodgrass. *Anatomy of the honey bee*. Comstock Pub. Associates (Ithaca), 1984.
- [217] D. Spanswick, M. A. Smith, V. E. Groppi, S. D. Logan, and M. L. Ashford. Leptin inhibits hypothalamic neurons by activation of ATP-sensitive potassium channels. *Nature*, 390(6659):521–525, Dec 1997.
- [218] M. R. Spasic, P. Callaerts, and K. K. Norga. *Drosophila alicorn* is a neuronal maintenance factor protecting against activity-induced retinal degeneration. *J Neurosci*, 28(25):6419–6429, Jun 2008.
- [219] B. G. Stanley, V. Willett, 3rd, H. W. Donias, L. H. Ha, and L. C. Spears. The lateral hypothalamus: a primary site mediating excitatory amino acid-elicited eating. *Brain Res*, 630(1-2):41–49, Dec 1993.
- [220] D. Stapleton, E. Woollatt, K. I. Mitchelhill, J. K. Nicholl, C. S. Fernandez, B. J. Michell, L. A. Witters, D. A. Power, G. R. Sutherland, and B. E. Kemp. AMP-activated protein kinase isoenzyme family: subunit structure and chromosomal location. *FEBS Lett*, 409(3):452–456, Jun 1997.
- [221] A. M. Stranahan and M. P. Mattson. Impact of energy intake and expenditure on neuronal plasticity. *Neuromolecular Med*, 10(4):209–218, 2008.
- [222] L. Sui, J. Wang, and B.-M. Li. Role of the phosphoinositide 3-kinase-Akt-mammalian target of the rapamycin signaling pathway in long-term potentiation and trace fear conditioning memory in rat medial prefrontal cortex. *Learn Mem*, 15(10):762–776, Oct 2008.
- [223] G. J. Taborsky, Jr. The physiology of glucagon. *J Diabetes Sci Technol*, 4(6):1338–1344, Nov 2010.
- [224] B. Thorens, H. K. Sarkar, H. R. Kaback, and H. F. Lodish. Cloning and functional expression in bacteria of a novel glucose transporter present in liver, intestine, kidney, and beta-pancreatic islet cells. *Cell*, 55(2):281–290, Oct 1988.
- [225] A. L. Toth and G. E. Robinson. Worker nutrition and division of labour in honeybees. *Animal Behaviour*, 69:427–435, 2005.
- [226] S. Unoki, Y. Matsumoto, and M. Mizunami. Roles of octopaminergic and dopaminergic neurons in mediating reward and punishment signals in insect visual learning. *Eur J Neurosci*, 24(7):2031–2038, Oct 2006.
- [227] Y. Wang, N. S. Mutti, K. E. Ihle, A. Siegel, A. G. Dolezal, O. Kaftanoglu, and G. V. Amdam. Down-regulation of honey bee IRS gene biases behavior toward food rich in protein. *PLoS Genetics*, 6(4):e1000896, 2010.

- [228] P. Weisová, C. G. Concannon, M. Devocelle, J. H. M. Prehn, and M. W. Ward. Regulation of glucose transporter 3 surface expression by the AMP-activated protein kinase mediates tolerance to glutamate excitation in neurons. *J Neurosci*, 29(9):2997–3008, Mar 2009.
- [229] D. E. Wheeler, N. Buck, and J. D. Evans. Expression of insulin pathway genes during the period of caste determination in the honey bee, *Apis mellifera*. *Insect Mol Biol*, 15(5):597–602, Oct 2006.
- [230] D. E. Wheeler and J. K. Kawooya. Purification and characterization of honey bee vitellogenin. *Arch Insect Biochem Physiol*, 14(4):253–267, 1990.
- [231] D. Wicher. Metabolic regulation and behavior: how hunger produces arousal - an insect study. *Endocr Metab Immune Disord Drug Targets*, 7(4):304–310, Dec 2007.
- [232] D. Wicher, H.-J. Agricola, S. Söhler, M. Gundel, S. H. Heinemann, L. Wollweber, M. Stengl, and C. Derst. Differential receptor activation by cockroach adipokinetic hormones produces differential effects on ion currents, neuronal activity, and locomotion. *J Neurophysiol*, 95(4):2314–2325, Apr 2006.
- [233] C. Wilson, G. G. Nomikos, M. Collu, and H. C. Fibiger. Dopaminergic correlates of motivated behavior: importance of drive. *J Neurosci*, 15(7 Pt 2):5169–5178, Jul 1995.
- [234] J. Woodring, M. Boulden, S. Das, and G. Gädé. Studies on blood sugar homeostasis in the honeybee (*Apis mellifera*, L.). *J Insect Physiol*, 39, No.1:89–97, 1993.
- [235] A. Woods, S. R. Johnstone, K. Dickerson, F. C. Leiper, L. G. D. Fryer, D. Neumann, U. Schlattner, T. Wallimann, M. Carlson, and D. Carling. LKB1 is the upstream kinase in the AMP-activated protein kinase cascade. *Curr Biol*, 13(22):2004–2008, Nov 2003.
- [236] S. C. Woods, R. J. Seeley, D. Porte, Jr, and M. W. Schwartz. Signals that regulate food intake and energy homeostasis. *Science*, 280(5368):1378–1383, May 1998.
- [237] M. E. Woodske, T. Yokoe, B. Zou, L. C. Romano, T. C. Rosa, A. Garcia-Ocana, L. C. Alonso, C. P. O'Donnell, and B. J. McVerry. Hyperinsulinemia predicts survival in a hyperglycemic mouse model of critical illness. *Crit Care Med*, 37(9):2596–2603, Sep 2009.
- [238] G. A. Wright, J. A. Mustard, S. M. Kottcamp, and B. H. Smith. Olfactory memory formation and the influence of reward pathway during appetitive learning by honey bees. *J Exp Biol*, 210(Pt 22):4024–4033, Nov 2007.
- [239] Q. Wu, Z. Zhao, and P. Shen. Regulation of aversion to noxious food by *Drosophila* neuropeptide Y- and insulin-like systems. *Nat Neurosci*, 8(10):1350–1355, Oct 2005.

- [240] G. R. Wyatt. The biochemistry of insect hemolymph. *Annu Rev Entomol*, 6:75–102, 1961.
- [241] G. R. Wyatt and G. F. Kalf. The chemistry of insect hemolymph II. Trehalose and other carbohydrates. *J Gen Physiol*, 40(6):833–847, 1957.
- [242] K. Yamada and T. Nabeshima. Brain-derived neurotrophic factor/TrkB signaling in memory processes. *J Pharmacol Sci*, 91(4):267–270, Apr 2003.
- [243] T. Yamauchi, J. Kamon, Y. Minokoshi, Y. Ito, H. Waki, S. Uchida, S. Yamashita, M. Noda, S. Kita, K. Ueki, K. Eto, Y. Akanuma, P. Froguel, F. Foufelle, P. Ferre, D. Carling, S. Kimura, R. Nagai, B. B. Kahn, and T. Kadowaki. Adiponectin stimulates glucose utilization and fatty-acid oxidation by activating AMP-activated protein kinase. *Nat Med*, 8(11):1288–1295, Nov 2002.
- [244] J. C. Yin, J. S. Wallach, M. Del Vecchio, E. L. Wilder, H. Zhou, W. G. Quinn, and T. Tully. Induction of a dominant negative CREB transgene specifically blocks long-term memory in Drosophila. *Cell*, 79(1):49–58, Oct 1994.
- [245] W. Zhao, H. Chen, H. Xu, E. Moore, N. Meiri, M. J. Quon, and D. L. Alkon. Brain insulin receptors and spatial memory. Correlated changes in gene expression, tyrosine phosphorylation, and signaling molecules in the hippocampus of water maze trained rats. *J Biol Chem*, 274(49):34893–34902, Dec 1999.
- [246] D. Zheng, P. S. MacLean, S. C. Pohnert, J. B. Knight, A. L. Olson, W. W. Winder, and G. L. Dohm. Regulation of muscle GLUT-4 transcription by AMP-activated protein kinase. *J Appl Physiol*, 91(3):1073–1083, Sep 2001.

Abkürzungsverzeichnis

A	Ampere, Stromstärke
ADP	Adenosindiphosphat
AgRP	Agouti-related Protein
AICAR	5-Aminoimidazol-4-Carboxamid 1- β -D-Ribofuranosid
AKH	Adipokinetisches Hormon
AMP	Adenosinmonophosphat
AMPK	Adenosinmonophosphat-aktivierte Proteinkinase
ATP	Adenosintriphosphat
AZ	Adenylatzyklase
bp	Basenpaare
BSA	Bovines Serumalbumin
C _t	Threshold cycle
Ca ²⁺	Calcium-Ion
CaMK	Ca ²⁺ /Calmodulin-abhängige Proteinkinase
cAMP	Zyklisches Adenosinmonophosphat
CC	Corpora Cardiaca
cDNA	copy-DNA, komplementäre DNA
CS	Konditionierter Stimulus
Cy3	Carbocyanin 3
d	Tag
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Deoxyribonucleinsäure
dNPF	<i>Drosophila</i> NPF
dNTPs	Nukleosidtriphosphate
dsDNA	Doppelstrang-DNA
dT	Deoxythymidin
EDTA	Ethyldiamintetraacetat
EF1 alpha	Elongationsfaktor 1 alpha
ELISA	Enzyme-linked Immunosorbent Assay
for	Forward-Primer
G-6-P	Glucose-6-Phosphat
G/C-Gehalt	Guanin/Cytosin-Gehalt
g	9,81 m/s ² , Erdschwerebeschleunigung
g	Gramm
GLUT	Glucosetransporter
H ₂ O dest.	destilliertes Wasser

h	Stunde
IgG	Immunglobulin G
ILP	Insulin-like Peptide, Insulinähnliches Hormon
K ⁺	Kalium-Ion
K _{ATP} -Kanal	ATP-sensitiver Kaliumkanal
k	Kilo, 10 ³
kDa	Kilodalton
KLH	Keyhole-Limpet-Hämocyanin
l	Liter
LKB1	Leberkinase B1
μ	Mikro, 10 ⁻⁶
m	Milli, 10 ⁻³
M	Molar, mol pro Liter
min	Minute
mRNA	messenger RNA
n	Nano, 10 ⁻⁹
NaCl	Natriumchlorid
NaHCO ₃	Natriumhydrogencarbonat
NCBI	National Center for Biotechnology Information
nm	Nanometer
NPF	Neuropeptid F
NPY	Neuropeptid Y
OD	Optische Dichte
ORN	Olfaktorische Rezeptorneurone
pAMPK	Phospho-AMPK
PBS	Phosphate buffered saline
PCR	Polymerase Chain Reaction, Polymerase-Kettenreaktion
PER	Proboscis Extension Reflex, Rüsselreflex
PI3K	Phosphoinositid-3-Kinase
PKA	Protein kinase A
rev	Reverse-Primer
RNA	Ribonucleinsäure
rRNA	ribosomale RNA
RT	Raumtemperatur
SDS	Sodium dodecylsulfat, Natriumdodecylsulfat
SDS-PAGE	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese
sec	Sekunde
sNPF	short Neuropeptid F
ssDNA	single-stranded DNA, Einzelstrang-DNA

TAE	Tris-Acetat-EDTA
TE	Tris-EDTA
Thr	Threonin
US	Unkonditionierter Stimulus
v/v	Volume per volume, Volumenprozent
V	Volt, Spannung
Vg	Vitellogenin
w/v	Weight per volume, Gewichtsprozent
Z-Chem	Zentrales Chemikalienlager der Universität des Saarlandes

Danksagung

Ich bedanke mich sehr herzlich bei meinem Doktorvater Prof. Dr. Uli Müller für die Gelegenheit, ein so spannendes Thema bearbeiten zu dürfen. Danke für die Freiheit, die mir beim Arbeiten geboten wurde, für inspirierende Gespräche und „abgefahren“ Ideen.

Vielen Dank an Herrn Prof. Dr. Mathias Montenarh für die Übernahme der Zweitkorrektur.

Bei Herrn Prof. Dr. Jörn Walter und Arbeitsgruppe möchte ich mich dafür bedanken, dass sie mir ihren qPCR-Cycler so freundlich und unkompliziert zur Verfügung gestellt haben.

Ein sehr großes Dankeschön geht an die gesamte Arbeitsgruppe Müller, die aufgrund ihrer Freundlichkeit und Offenheit immer für ein gutes Arbeitsklima und neuen Ansporn sorgte und durch ihre ausgesprochene Hilfsbereitschaft nicht unwesentlich zum Gelingen dieser Arbeit beitragen hat.

Meiner Kollegin Angelika Gardezi gilt dabei ein spezieller Dank, zunächst für die wunderschönen „Bildchen“ und insbesondere auch für die hingebungsvolle Pflege unserer Bienchen, mit der sie den ganzen Laden am laufen hielt.

Vielen lieben Dank auch an Iris Fuchs, die mir neben ihrer tatkräftigen Hilfe im Labor auch täglich sonnige Mittagspausen verschaffte.

Ich möchte mich besonders herzlich bei meiner Kollegin und Freundin Dr. Tina Martin dafür bedanken, dass sie durch ihre emotionale, kulinarische und sportliche Unterstützung nicht selten für die Erhöhung meiner Frustrationsgrenze sorgte.

Besten Dank an alle Hiwis, ganz besonders Anna-Maria Miederer, die mir fleißig zur Hand gingen und zu meinen Resultaten beitrugen.

Für das Korrekturlesen meiner Arbeit bedanke ich mich herzlich bei Dr. Tina Martin, meiner langjährigen Leidensgenossin Anika-Maria Zimmermann, meiner Mutter, Dr. Bärbel Heidtmann und Dr. Susanne Meuser.

Meinem Freund Dominik Muth danke ich von Herzen für seine Geduld mit mir und seine unermüdliche Unterstützung in privaten, beruflichen und logischen Angelegenheiten.

Ein ganz besonderer Dank geht an meine Eltern Ruth und Klaus Rether sowie meine ganze Familie. Danke - einfach für alles.