

# Physiologische Grundlagen der Arbeitsteilung bei der Honigbiene (*Apis mellifera* L.)

vorgelegt von  
Karoline Franz

von der Fakultät VI  
der Technischen Universität Berlin  
zur Erlangung des akademischen Grades  
Dr. rer. nat.

genehmigte Dissertation

1. Gutachter: Prof. Dr. J. Erber, Berlin
2. Gutachter: PD Dr. W. Blenau, Potsdam

Tag der wissenschaftlichen Aussprache: 18. Januar 2007

Berlin, 2007

D 83



## **Danksagung**

In erster Linie danke ich Herrn Prof. Dr. J. Erber für die Überlassung des Themas und die Betreuung dieser Arbeit. Ich danke ihm für seine Unterstützung und seine uneingeschränkte Gesprächsbereitschaft bei allen Fragen und Problemen. Dank gilt auch Herrn PD Dr. Wolfgang Blenau für die Co-Betreuung meiner Arbeit, für hilfreiche Gespräche und Hilfe in allen Belangen dieser Arbeit. Diese Arbeit wurde gefördert von der Deutschen Forschungsgemeinschaft im Rahmen des Graduiertenkollegs 837 „Functional Insect Science“. Ich danke Herrn Prof. Dr. B. Walz für sein Engagement im Graduiertenkolleg. Herrn PD Dr. Arnd Baumann sei für die herzliche Betreuung und seine Hilfe während meines molekularbiologischen Exkurses am Forschungszentrum Jülich gedankt. Bei Petra Ehling bedanke ich mich für die tatkräftige Unterstützung bei der qRT-PCR. Dank gilt auch Dr. Sebastian Wachten für hilfreiche Diskussionen und die Herstellung der fluoreszenzmarkierten dsRNA. Herrn PD Dr. O. Baumann danke ich für seine Hilfestellung bei der Fluoreszenzmikroskopie. Dr. Jana Schlenstedt sei für ihre Hilfe bei immunhistologischen Kontrollexperimenten gedankt. Dr. Ricarda Scheiner-Pietsch danke ich für ihre unermüdliche Hilfsbereitschaft und für viele hilfreiche Diskussionen, sowie für die Korrektur der englischen Zusammenfassung. Dr. Stephan Haupt sei vor allem für die Zusammenarbeit bei der Immunhistologie, seine technische Unterstützung bei der Elektrophysiologie sowie für viele hilfreiche Diskussionen gedankt. Joachim Buchholz danke ich für seine technische Unterstützung. Dr. Benedikt Polacek danke ich für die liebevolle Pflege der Bienenvölker, die jederzeit eine zuverlässige Quelle für Versuchstiere waren. Grzegorz Lehmann, Tomasz Olszewski und Birgit Klose sei für ihre tatkräftige Unterstützung bei den Verhaltensversuchen gedankt. André Gaudnek danke ich für die Programmierung von „Grentrack“. Andreas Behrends und Samir Mujagic sowie allen Mitgliedern der Arbeitsgruppe gilt Dank für die freundliche Arbeitsatmosphäre. Ich danke allen Mit-Doktoranden im Graduiertenkolleg für die Zusammenarbeit und die gute Atmosphäre bei diversen offiziellen und inoffiziellen Veranstaltungen im GK.

Besonderer Dank gilt Sven Knapinski für seine unbeirrbar moralische Unterstützung. Und natürlich auch für die Zusammenarbeit bei der Herstellung doppesträngiger RNA.

Nicht zuletzt gilt mein besonderer Dank meiner Familie, die mich bis heute in all meinen Entscheidungen kompromisslos unterstützt hat und die mir immer zur Seite steht.



# Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurden verschiedene Aspekte der physiologischen Grundlagen der Arbeitsteilung bei der Honigbiene untersucht. Besondere Beachtung fand dabei die Untersuchung des biogenen Amins Tyramin, welches die gustatorische Empfindlichkeit von Bienen moduliert und dadurch, unter Zugrundelegung der Schwellenhypothese, einen wichtigen Einfluss auf die Arbeitsteilung hat. Mit Hilfe immunhistologischer Färbungen von Gehirnschnitten wurde die Verteilung des biogenen Amins Tyramin sowie des Tyramin-Rezeptors AmTYR1 im Bienenhirn lokalisiert. Die Tyramin-ähnliche Immunreaktion detektierte das Vorkommen von Tyramin in allen Neuropilen des Bienenhirns und des suboesophagealen Ganglions, mit Ausnahme der Antennalloben sowie der Pedunculi und Loben der Pilzkörper. Der AmTYR1-Rezeptor wurde von dem Antikörper in allen Neuropilen des Bienenhirns detektiert. Dabei wurden keine Unterschiede zwischen Pollen- und Nichtpollensammlerinnen, frisch geschlüpften Bienen und Winterbienen festgestellt. Dieser Befund lässt auf eine weit reichende modulatorische Rolle von Tyramin in fast allen Neuropilen des Bienenhirns schließen. Des Weiteren wurde die Rolle von Tyramin bei der Modulation visueller Rezeptorpotentiale mit Hilfe von Elektroretinogrammen untersucht und mit der von Oktopamin verglichen. Sowohl Tyramin als auch Oktopamin verstärkten die Reizantwort visueller Rezeptoren auf monochromatische Lichtreize signifikant sowohl bei Pollen- als auch bei Nichtpollensammlerinnen. Beide biogenen Amine erhöhen also die Empfindlichkeit für visuelle Stimuli auf Rezeptorebene. Es wurde der Effekt einer RNA-Interferenz des *Amtyr1*-Gens durch Injektion von dsRNA in das Gehirn von frisch geschlüpften Bienen sowie von Winterbienen auf die gustatorische Empfindlichkeit untersucht. Die Injektion von *Amtyr1*-dsRNA verringerte die gustatorische Empfindlichkeit bei frisch geschlüpften Bienen im Vergleich zu Tieren, denen eine Kontrollsubstanz injiziert worden war. Auf Winterbienen hatte die Injektion jedoch keinen Effekt. In einer quantitativen real-time PCR wurden anschließend die *Amtyr1*-mRNA-Mengen der frisch geschlüpften Versuchstiere untersucht. Die *Amtyr1*-mRNA-Mengen von unbehandelten Tieren sowie von *Amtyr1*-dsRNA-behandelten Tieren waren dabei signifikant geringer als von Tieren, denen eine Kontrollsubstanz injiziert worden war. Schließlich wurde in verhaltenspharmakologischen Experimenten die modulatorische Rolle von Tyramin und Oktopamin auf die lokomotorische und phototaktische Aktivität von Sammlerinnen untersucht. Weder Tyramin noch Oktopamin zeigten dabei einen modulatorischen Einfluss

auf die untersuchten Verhaltensparameter. Außerdem wurde untersucht, inwieweit sich Pollen- und Nichtpollensammlerinnen bezüglich dieser Verhaltensparameter voneinander unterscheiden. Pollensammlerinnen zeigten eine signifikant größere lokomotorische Aktivität als Nichtpollensammlerinnen. Dieser Unterschied war unabhängig von den gustatorischen Empfindlichkeiten der Versuchstiere. Dagegen wurde kein Unterschied in der phototaktischen Aktivität zwischen Pollen- und Nichtpollensammlerinnen festgestellt.

Die Ergebnisse der immunhistologischen Präparationen sowie der elektrophysiologischen Ableitungen zeigen, dass Tyramin eine wichtige modulatorische Funktion im Gehirn der Honigbiene zukommt. Die Ergebnisse deuten darauf hin, dass sich die Rolle von Tyramin dabei insbesondere bei der Modulation olfaktorischer Reizinformation von der des strukturell sehr nahe verwandten Oktopamin unterscheiden könnte. Die Ergebnisse der verhaltensphysiologischen Untersuchungen zeigen erstmals, dass von der Gustatorik unabhängige Unterschiede zwischen verschiedenen Sammlertypen bestehen. Sie deuten weiterhin darauf hin, dass die Empfindlichkeiten für verschiedene sensorische Modalitäten sowie die lokomotorische Aktivität unabhängig voneinander reguliert werden, was die Bedeutung der Schwellenhypothese für die Arbeitsteilung der Honigbiene stützt.

# Abstract

In this study, different aspects of the physiological background of division of labour in honey bees were examined with special emphasis on the biogenic amine tyramine. Tyramine modulates the gustatory responsiveness of honey bees and thereby has an important impact on division of labour according to the threshold hypothesis. By means of immunohistological staining of brain slices the occurrence of tyramine and of the tyramine-receptor AmTYR1 was localized in the honey bee brain. Tyramine-like immunoreactivity was detected in all neuropils of the brain and the subesophageal ganglion except for the antennal lobes and the pedunculi and lobes of the mushroom bodies. AmTYR1-like immunoreactivity was detected in all neuropils of the brain. No difference between pollen foragers and non-pollen foragers or between newly emerged bees and winter bees was detected with respect to immunohistological staining. These results suggest a modulatory role of tyramine in almost all neuropils of the bee brain. The role of tyramine in the modulation of visual receptor potentials was studied by means of electrophysiological recordings of the retinae (electroretinogram) and compared to the role of octopamine. Both tyramine and octopamine significantly increased the responses of visual receptors to monochromatic light stimuli. This was observed in pollen foragers and in non-pollen foragers. Furthermore, the effect of RNA-interference of the *Amtyr1*-gene on the gustatory responsiveness of newly emerged bees and of winter bees was tested by injecting *Amtyr1*-dsRNA into the brain of the animals. The injection of *Amtyr1*-dsRNA significantly decreased the gustatory responsiveness of newly emerged bees compared to bees whose brains were injected with a control substance. There was no effect of a dsRNA-injection in winter bees. The *Amtyr1*-mRNA-level of untreated animals and of *Amtyr1*-dsRNA-injected animals was significantly higher than that of animals which received a control substance. Finally, in behavioural pharmacological experiments the modulatory role of tyramine and octopamine in the motor and phototactic activities of honey bee foragers was tested. Neither the injection of tyramine nor that of octopamine had a modulatory influence on the behaviours studied. It was also tested whether there are differences in their motor activity or phototactic behaviour between pollen foragers and non-pollen foragers. Pollen foragers displayed a significantly higher motor activity than non-pollen foragers, independent of their gustatory responsiveness. There were no differences between these two foraging groups in their phototactic behaviour.

The results of the immunohistological preparations and of the electrophysiological recordings demonstrate an important modulatory function of tyramine in the honey bee brain. The results suggest a different role of tyramine than of octopamine in the modulation of the processing of olfactory stimuli. The results of the behavioural physiological experiments show for the first time differences between individuals with different foraging roles that are independent of their gustatory responsiveness. The behavioural results suggest furthermore that the sensitivities for different sensory modalities and/or the motor activity are regulated independently of each other, supporting the threshold hypothesis in honey bee division of labour.

# Inhaltsverzeichnis

<b>ZUSAMMENFASSUNG</b>	<b>5</b>
<b>ABSTRACT</b>	<b>7</b>
<b>ABBILDUNGSVERZEICHNIS</b>	<b>12</b>
<b>1 EINLEITUNG</b>	<b>15</b>
1.1 Arbeitsteilung bei der Honigbiene	15
1.2 Arbeitsteilung und Empfindlichkeit für sensorische Reize	16
1.3 Biogene Amine	17
1.4 Die Neuropile des Bienenhirns	21
1.5 Ziele der Arbeit	29
<b>2 MATERIAL &amp; METHODEN</b>	<b>33</b>
<b>2.1 allgemeine Methoden</b>	<b>33</b>
2.1.1 Versuchstiere	33
2.1.2 Einspannen der Tiere	33
2.1.3 Proboscis Extension Response (PER) als gustatorischer Verhaltenstest	33
<b>2.2 Immunhistologie: Tyramin-ähnliche Immunreaktion (TA-IR) und Tyramin-Rezeptor-ähnliche Immunreaktion (AmTYR1-IR)</b>	<b>34</b>
2.2.1 Präparation und Herstellung der Schnitte	34
2.2.2 Tyramin-ähnliche Immunreaktion	35
2.2.3 Tyramin-Rezeptor-ähnliche Immunreaktion	35
2.2.4 Kontrollexperimente	36
2.2.5 Dokumentation	36
<b>2.3 Elektrophysiologie: Elektretinogramm (ERG)</b>	<b>36</b>
2.3.1 Reizgebung	37
2.3.2 Ableitung der ERG	38
2.3.3 Pharmaka	38
2.3.4. Versuchsablauf und Injektion	38
2.3.5 Auswertung der ERG	39
2.3.6 Statistische Auswertung der Daten	40

<b>2.4 RNA-Interferenz</b>	<b>41</b>
2.4.1 Test der Injektionsmethode mit fluoreszenzmarkierter doppelsträngiger RNA (dsRNA)	42
2.4.2 Reinigung und Trennung von Nukleinsäuren	42
2.4.3 Herstellung doppelsträngiger RNA (dsRNA)	44
2.4.4 Injektion der dsRNA in das Gehirn und Inkubation	47
2.4.5 Modulation der gustatorischen Schwellen durch dsRNA-Injektion	48
2.4.6 Statistische Auswertung der Daten	48
2.4.7 Präparation der RNA aus Bienenköpfen	48
2.4.8 Erststrangsynthese: Umschreiben von mRNA in Einzelstrang-cDNA (sscDNA)	49
2.4.9 Herstellung von Amtyr1- und $\beta$ -Aktin-DNA-Fragmenten: PCR (Polymerase-Kettenreaktion) und Gelelektrophorese	49
2.4.10 Herstellung der Standardreihen aus den Amtyr1- und $\beta$ -Aktin-DNA-Fragmenten	51
2.4.11 quantitative real-time PCR (qRT-PCR)	51
2.4.12 Auswertung der qRT-PCR durch die LightCycler Software	52
2.4.13 Standardisierung der gemessenen Werte	53
2.4.14 Proteinbestimmung	53
2.4.15 Statistische Auswertung der Daten	54
<b>2.5 Lokomotorische Aktivität und phototaktisches Verhalten</b>	<b>54</b>
2.5.1 Pharmakologie: Versuchsablauf	55
2.5.2 Pharmaka	56
2.5.3 Datenaufnahme	56
2.5.4 Pharmakologie: Statistische Auswertung der Daten	57
2.5.5 Unterschiede zwischen Pollen- und Nichtpollensammlerinnen: Versuchsablauf und Datenaufnahme	58
2.5.6 Unterschiede zwischen Pollen- und Nichtpollensammlerinnen: Statistische Auswertung der Daten	59
<b>3 ERGEBNISSE</b>	<b>61</b>
<b>3.1 Immunhistologie: Tyramin-ähnliche Immunreaktion</b>	<b>61</b>
3.1.1 Spezifität des primären Antikörpers	61
3.1.2 Immunhistologische Färbung	61
3.1.3 Tyramin-immunreaktive Somata und Vergleich mit Oktopamin	61
3.1.4 Tyramin-ähnliche Immunreaktion in den Neuropilen und Vergleich mit Oktopamin	65
<b>3.2 Immunhistologie: Tyramin-Rezeptor-ähnliche Immunreaktion und Vergleich mit Tyramin-ähnlicher Immunreaktion</b>	<b>68</b>
3.2.1 Spezifität des primären Antikörpers	68
3.2.2 Tyramin-Rezeptor-ähnliche Immunreaktion in den Neuropilen	69
<b>3.3 Elektroretinogramm (ERG)</b>	<b>87</b>
3.3.1 Wirkung der Pharmakaapplikation auf das ERG von Nicht-Pollen-Sammlerinnen	87
3.3.2 Vergleich der Wirkung der Pharmakaapplikation von Pollen- und Nicht-Pollen-Sammlerinnen	108

<b>3.4 RNA-Interferenz</b>	<b>110</b>
3.4.1 Test der Injektionsmethode mit fluoreszenzmarkierter doppelsträngiger RNA (dsRNA)	110
3.4.2 Modulation der gustatorischen Schwellen durch dsRNA-Injektion	111
3.4.3 Effekt der dsRNA-Injektion auf die <i>Amtyr1</i> -mRNA	113
<b>3.5 Effekt von OA und TA auf PER, lokomotorische Aktivität und phototaktisches Verhalten</b>	<b>115</b>
3.5.1 Effekt von OA und TA auf die PER	115
3.5.2 Effekt von OA und TA auf die lokomotorische Aktivität	115
3.5.3 Effekt von OA und TA auf das phototaktische Verhalten	116
<b>3.6 Locomotorische Aktivität und phototaktisches Verhalten von Pollen- und Nichtpollensammlerinnen</b>	<b>119</b>
3.6.1 Locomotorische Aktivität	119
3.6.2 Phototaktisches Verhalten: Laufwege zu den Lichtquellen	122
3.6.3 Phototaktisches Verhalten: Laufzeiten zu den Lichtquellen	126
<b>4 DISKUSSION</b>	<b>133</b>
4.1 TA-IR und AmTYR1-IR im Bienenhirn und die Funktion von Tyramin	133
4.2 Modulation visueller Reizinformation durch TA und OA	136
4.3 Herunterregulierung des AmTYR1-Rezeptors	138
4.4 Modulation der motorischen und phototaktischen Aktivität durch OA und TA	140
4.5 Locomotorische Aktivität und phototaktisches Verhalten von Pollen- und Nichtpollensammlerinnen	142
4.6 Ausblick	145
<b>ABKÜRZUNGEN</b>	<b>147</b>
<b>LITERATURVERZEICHNIS</b>	<b>151</b>
<b>ANHANG</b>	<b>163</b>
Herstellung der dsRNA: Amplifizierte DNA-Fragmente von <i>Amtyr1</i>	163
Hergestellte DNA-Fragmente zur Verwendung als Standards in der real-time-PCR	164

# Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1.....	37
Abbildung 2.....	39
Abbildung 3.....	45
Abbildung 4.....	56
Abbildung 5.....	62
Abbildung 6.....	73
Abbildung 7.....	73
Abbildung 8.....	74
Abbildung 9.....	74
Abbildung 10.....	75
Abbildung 11.....	75
Abbildung 12.....	76
Abbildung 13.....	76
Abbildung 14.....	77
Abbildung 15.....	77
Abbildung 16.....	78
Abbildung 17.....	78
Abbildung 18.....	79
Abbildung 19.....	79
Abbildung 20.....	80
Abbildung 21.....	80
Abbildung 22.....	81
Abbildung 23.....	81
Abbildung 24.....	82
Abbildung 25.....	82
Abbildung 26.....	83
Abbildung 27.....	83
Abbildung 28.....	84
Abbildung 29.....	84
Abbildung 30.....	85
Abbildung 31.....	86
Abbildung 32.....	87
Abbildung 33.....	88

Abbildung 34.....	90
Abbildung 35.....	91
Abbildung 36.....	91
Abbildung 37.....	93
Abbildung 38.....	93
Abbildung 39.....	94
Abbildung 40.....	95
Abbildung 41.....	95
Abbildung 42.....	97
Abbildung 43.....	97
Abbildung 44.....	98
Abbildung 45.....	99
Abbildung 46.....	100
Abbildung 47.....	101
Abbildung 48.....	102
Abbildung 49.....	102
Abbildung 50.....	104
Abbildung 51.....	104
Abbildung 52.....	105
Abbildung 53.....	106
Abbildung 54.....	107
Abbildung 55.....	108
Abbildung 56.....	109
Abbildung 57.....	109
Abbildung 58.....	109
Abbildung 59.....	110
Abbildung 60.....	111
Abbildung 61.....	112
Abbildung 62.....	112
Abbildung 63.....	112
Abbildung 64.....	113
Abbildung 65.....	114
Abbildung 66.....	115
Abbildung 67.....	116
Abbildung 68.....	117
Abbildung 69.....	117
Abbildung 70.....	118

## Abbildungsverzeichnis

---

Abbildung 71.....	119
Abbildung 72.....	120
Abbildung 73.....	120
Abbildung 74.....	121
Abbildung 75.....	121
Abbildung 76.....	122
Abbildung 77.....	123
Abbildung 78.....	124
Abbildung 79.....	124
Abbildung 80.....	125
Abbildung 81.....	125
Abbildung 82.....	126
Abbildung 83.....	126
Abbildung 84.....	127
Abbildung 85.....	128
Abbildung 86.....	128
Abbildung 87.....	129
Abbildung 88.....	130
Abbildung 89.....	130
Abbildung 90.....	131
Abbildung 91.....	131
Abbildung 92.....	140

# 1 Einleitung

## 1.1 Arbeitsteilung bei der Honigbiene

Arbeitsteilung ist das grundlegende Funktionsprinzip des Zusammenlebens sozialer Hymenopteren in einer Kolonie. Jedes Individuum erfüllt bestimmte Aufgaben, die in ihrem Zusammenspiel das Überleben der Gemeinschaft sichern. Bei der Honigbiene findet diese Arbeitsteilung auf verschiedenen Ebenen statt. Zum einen setzt sich ein Bienenvolk aus drei Kasten mit jeweils unterschiedlichen Aufgaben zusammen: der Königin, deren Hauptaufgabe darin besteht, Eier zu legen, den männlichen Drohnen sowie den sterilen Arbeiterinnen. Die Arbeiterinnen übernehmen in verschiedenen Abschnitten ihres Lebens unterschiedliche Aufgaben. Während sie in den ersten Lebenswochen an der Aufzucht der Brut, am Bau der Waben und anderen Tätigkeiten innerhalb des Bienenstocks beteiligt sind, werden sie ab einem Alter von etwa 3 Wochen zu Sammelbienen, die den Stock verlassen, um Nahrung in die Kolonie einzutragen. Auf ihren Sammelflügen sammeln sie dabei proteinhaltigen Blütenpollen als Nahrung für die Larven, zuckerhaltigen Nektar, der dem Volk als Kohlenhydrat-Quelle dient, sowie Wasser und Propolis, der als antibiotischer Belag zum Auskleiden der Wabenzellen verwendet wird (Seeley 1995). Neben dieser altersspezifischen Arbeitsteilung kann man auch innerhalb einer Altersgruppe eine individuelle Spezialisierung auf bestimmte Aufgaben beobachten. So findet man unter den Sammlerinnen Tiere, die sich hauptsächlich auf das Sammeln von Pollen oder Nektar beschränken (Fewell & Page 2000). Andere Tiere zeigen keine Präferenz und sammeln beide Substanzen, während wiederum andere auf das Sammeln von Wasser spezialisiert sind. Der Bedarf an verschiedenen Spezialistinnen variiert mit wechselnden Bedingungen innerhalb und außerhalb der Kolonie, wie z.B. der Menge an Brut oder der aktuellen Blütentracht und damit dem Pollenaufkommen in der Natur (Pankiw et al. 1998; Dreller et al. 1999; Fewell & Page 2000). Das Volk reagiert auf solche Veränderungen mit einem dem Bedarf angepassten Anteil an entsprechenden Arbeiterinnen. Wie ein solcher Anpassungsdruck, der auf das Volk wirkt, auf physiologischer Ebene das Verhalten der individuellen Biene reguliert, ist unklar. Die Schwellen-Hypothese geht davon aus, dass sich die einzelnen Tiere in ihrer Wahrnehmungsschwelle für sensorische Reize unterscheiden, die mit der Ausführung bestimmter Aufgaben verbunden sind. Überschreitet die Reizintensität die intrinsische Schwelle eines Tieres, führt

es die mit dem Reiz assoziierte Aufgabe aus. (Robinson 1992; Beshers & Fewell 2001; Page & Erber 2002).

### **1.2 Arbeitsteilung und Empfindlichkeit für sensorische Reize**

Die Sammelrolle einer Biene ist mit ihrer gustatorischen Empfindlichkeit für Sucrose korreliert (Page et al. 1998; Scheiner et al. 2003). Für Bienen stellt Sucrose einen wichtigen Reiz dar; der zuckerhaltige Nektar ist sowohl Nahrung der Bienen als auch Belohnung für die Sammlerinnen, mit deren Hilfe sie den Weg zu einer Futterquelle und deren Charakteristika lernen (Scheiner et al. 2004). Viele Pollensammlerinnen reagieren bei Stimulation der Antennen mit Wasser und mit niedrigen Zuckerkonzentrationen mit einer Rüsselreaktion, der so genannten „Proboscis Extension Response“ (PER), während Nektarsammlerinnen meist erst auf höher konzentrierte Sucroselösungen reagieren. Pankiw & Page (2000) zeigten außerdem, dass bereits im Alter von einer Woche die Zuckerwasser-Empfindlichkeit einer Biene in gleicher Weise mit ihrer späteren Sammelrolle korreliert. Zudem korreliert die Konzentration des Nektars, den eine Nektarsammlerin in ihrem Honigmagen in die Kolonie einbringt, mit der gustatorischen Empfindlichkeit desselben Tieres im Alter von einer Woche. Es scheint also für jedes Tier eine intrinsische gustatorische Schwelle zu bestehen, die mit seiner Rolle als Sammlerin in Zusammenhang steht.

Die Empfindlichkeit für Sucrose ist mit der Empfindlichkeit für andere Reizmodalitäten korreliert. Eine hohe Empfindlichkeit für Sucrose geht einher mit einer hohen Empfindlichkeit für gustatorische Pollen-Stimuli sowie für olfaktorische Citral-Stimuli (Scheiner et al. 2004). Auch das antennale Abtastverhalten ist intensiver bei Bienen mit einer hohen Sucrose-Empfindlichkeit (Scheiner et al. 2005). Erber et al. (2006) zeigten, dass bei Nektarsammlerinnen die phototaktische Aktivität mit ihren gustatorischen Empfindlichkeiten für Sucrose korreliert, während bezüglich der motorischen Aktivität keine Unterschiede zwischen gustatorisch empfindlichen und unempfindlichen Tieren bestehen. Humphries et al. (2005) zeigten, dass frisch geschlüpfte Bienen aus einer Kolonie, die auf das bevorzugte Sammeln von Pollen hin selektiert worden war, eine größere motorische Aktivität zeigten als Tiere aus einer Kolonie, die gegen das Sammeln von Pollen selektiert worden war. Bei unselektierten Bienen zeigten sie darüber hinaus eine höhere motorische Aktivität bei Tieren mit hoher gustatorischer Empfindlichkeit als bei Tieren mit geringer gustatorischer Empfindlichkeit für Sucrose.

Bisher gibt es keinen experimentellen Beleg dafür, dass die Empfindlichkeiten für verschiedene Modalitäten unabhängig voneinander gesteuert werden. Das deutet darauf hin, dass die Unterschiede in den sensorischen Empfindlichkeiten die Folge eines übergeordneten Regulierungsmechanismus sein könnten (Scheiner et al. 2004). Als regulierendes Element auf neuronaler Ebene spielen dabei biogene Amine eine wichtige Rolle. Es wurde gezeigt, dass biogene Amine die Schwellen für sensorische Modalitäten verändern können (Page & Erber 2002; Scheiner et al. 2006).

### 1.3 Biogene Amine

Biogene Amine sind eine wichtige Gruppe neuroaktiver Substanzen, die als Neurotransmitter, Neurohormone oder Neuromodulatoren den Zustand und die Aktivität von Zellen beeinflussen (Blenau & Baumann 2001; Roeder 1993; Roeder 2005). Sie werden von Interneuronen synthetisiert, die oft großflächige Projektionen in den Neuropilen des Gehirns zeigen und somit gleichzeitig auf eine große Zahl anderer Neurone wirken können (Baumann et al. 2002; Bicker 1999; Bicker & Menzel 1989; Hammer 1993). Biogene Amine werden aus Aminosäuren gebildet und wirken meist durch Bindung an spezifische, metabotrope Rezeptoren, die so genannten G-Protein-gekoppelten Rezeptoren (GPCR) (Hiripi et al. 1994; Blenau & Baumann 2001). Dopamin, Serotonin und Histamin sind biogene Amine, die sowohl bei Vertebraten als auch bei Invertebraten vorkommen. Adrenalin und Noradrenalin wurden dagegen nur bei Vertebraten nachgewiesen. An ihre Stelle treten bei Invertebraten die Phenolamine Oktopamin (OA) und Tyramin (TA) (David & Coulon 1985; Evans 1985; Evans 1993; Osborne 1996). TA entsteht durch Decarboxylierung der Aminosäure Tyrosin (Livingstone & Tempel 1983). Das Enzym Tyramin- $\beta$ -Hydroxylase katalysiert die Hydroxylierung von TA zu OA (Monastirioti et al. 1996). TA ist also das Vorgängermolekül bei der Biosynthese von OA.

#### *G-Protein-gekoppelte Rezeptoren (GPCR)*

GPCR sind integrale Membranproteine, die aus 7 Transmembran-Domänen bestehen, welche über jeweils 3 intra- und extrazelluläre Schleifen miteinander verbunden sind. Der N-Terminus liegt extrazellulär und ist oft glycosyliert (Probst et al. 1992). Der C-Terminus liegt intrazellulär. Cystein-Reste am intracellulären Ende werden oft über angehängte Palmitoylreste in der Cytoplasmamembran verankert, wodurch eine vierte intrazelluläre Schleife entsteht, die der Struktur zusätzlich Stabilität verleiht. Der Ligand bindet durch Interaktion mit spezifischen Aminosäureresten in der Bindungstasche des Rezeptors, die von

den Transmembran-Domänen gebildet wird (Ji et al. 1998). Dadurch verändert der Rezeptor seine Konformation. Der aktivierte Rezeptor interagiert mit einem assoziierten GTP-bindenden Protein (G-Protein). Je nach Typ des G-Proteins hat seine Aktivierung über eine Signalkaskade eine Änderung der intracellulären Konzentration sekundärer Botenstoffe, wie z.B. cAMP oder  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen, zur Folge (Blenau & Baumann 2001; Blenau & Baumann 2003). Diese können Proteinkinasen aktivieren, welche Proteine phosphorylieren und dadurch deren funktionellen Eigenschaften verändern können.

### *Oktopamin und Tyramin*

Die biogenen Amine Dopamin, Serotonin und OA sind in der Honigbiene gut untersucht. Für Dopamin wurden in der Biene 3 Rezeptoren kloniert (Blenau et al. 1998; Humphries et al. 2003; Beggs et al. 2005), während für Serotonin und OA bisher jeweils 1 Rezeptor bekannt ist (Grohmann et al. 2003; Schlenstedt 2005). TA dagegen wurde lange Zeit nicht als eigenständiges biogenes Amin erkannt, sondern lediglich als Vorgängermolekül bei der Biosynthese von OA betrachtet. Erst durch die Klonierung eines TA-spezifischen Rezeptors bei *Drosophila melanogaster* (Saudou et al. 1990; Arakawa et al. 1990), bei *Locusta* (Vanden Broeck et al. 1995), bei *Bombyx mori* (Ohta et al. 2003) sowie durch Blenau et al. (2000) bei der Honigbiene wurde deutlich, dass TA eine spezifische neuromodulatorische Rolle spielen muss. Blumenthal (2003) lieferte den ersten Nachweis für die physiologische Bedeutung eines TA-Rezeptors. Er zeigte, dass TA in *Drosophila* die  $\text{Cl}^-$ -Permeabilität Malpighischer Gefäße moduliert. Auf molekularer Ebene hat der TA-Rezeptor einen zum OA-Rezeptor antagonistischen Effekt. Die Aktivierung heterolog exprimierter AmTYR1-Rezeptoren und von TA-Rezeptoren in Membran-Homogenaten von Bienenhirnen hemmen die Forskolin-induzierte cAMP-Synthese (Blenau & Baumann 2000; Mustard et al. 2005). Die Aktivierung des in HEK293-Zellen exprimierten OA-Rezeptors der Honigbiene AmOCT1 führt dagegen zu einer erhöhten intrazellulären Konzentration von cAMP sowie von  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen (Grohmann et al. 2003). Aufgrund ihrer strukturellen Ähnlichkeit binden sowohl TA also auch OA in hohen Konzentrationen auch an den jeweils anderen Rezeptor. Während 50 nM OA in mit *Amoa1* transient transfizierten HEK-Zellen bereits einen deutlichen Anstieg von  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  zur Folge hat, hat TA erst im mikromolaren Bereich einen Effekt (Grohmann et al. 2003). Entsprechend ist die  $\text{EC}_{50}$ -Konzentration von TA für den AmTYR1-Rezeptor ca. 20 Mal niedriger als für OA (Blenau et al. 2000).

### *Modulation sensorischer Schwellen durch biogene Amine*

Biogene Amine modulieren das Verhalten der Honigbiene (Scheiner et al. 2006). Während die modulatorischen Eigenschaften von OA gut untersucht sind, ist die Wirkung von TA auf Verhaltensebene bislang kaum bekannt. OA führt in der Regel zu einer Verstärkung einer Aktivität, Empfindlichkeit für einen Reiz bzw. einer Reizantwort. Bei Stress steuert OA beispielsweise das Einsetzen der „fight or flight“-Reaktion, analog zum adrenergen System der Vertebraten (Adamo et al. 1995; Roeder et al. 2003). OA spielt auch eine Rolle bei der Erregbarkeit von Grillen, die einem aggressiven Verhalten vorausgeht (Stevenson et al. 2000). Scheiner et al. (2002) zeigten, dass Füttern von TA oder OA oder eine Injektion der Substanzen in den Thorax die gustatorische Empfindlichkeit von Bienen für Zuckerwasser, gemessen mit Hilfe der PER, erhöht, während eine Injektion von Dopamin die Wahrscheinlichkeit für eine Proboscisreaktion auf einen Sucrose-Stimulus hin verringert. Pankiw & Page (2003) zeigten ebenfalls eine erhöhte gustatorische Empfindlichkeit nach Füttern von OA.

Auch die Schwelle für olfaktorische Stimuli wird in der Biene durch biogene Amine moduliert. Die Injektion von OA in das Gehirn führt zu einer erhöhten olfaktorischen Empfindlichkeit, die sich in einem spontanen Ausstrecken der Proboscis äußert, während Dopamin und Serotonin den gegenteiligen Effekt haben (Mercer & Menzel 1982). OA senkt auch die Wahrnehmungsschwelle für Brutpheromon (Barron et al. 2002), sowie für den Geruch von toter Brut (Spivak et al. 2002). Auch die Gedächtnisbildung bei der olfaktorischen Konditionierung wird durch OA verstärkt. Durch Injektion in die Pilzkörperkelche kann OA die durch das Neuron VUMmx1 vermittelte Sucrose-Belohnung beim olfaktorischen Lernen ersetzen (Hammer & Menzel 1998). Die TA-Rezeptor-Mutante *hono* in *Drosophila*-Larven zeigt ein reduziertes olfaktorisches Verhalten, beispielsweise in der Vermeidung von Gerüchen wie Ethylacetat oder Benzaldehyd, was auf eine Rolle von TA im olfaktorischen System hindeutet (Kutsukake et al. 2000; Nagaya et al. 2002).

Auch im visuellen System zeigt OA einen verstärkenden Effekt (Erber et al. 1993). Eine Injektion von OA in die Lobula verstärkt den richtungsspezifischen antennalen Reflex auf einen visuellen Bewegungsreiz, während Serotonin den entgegengesetzten Effekt hat (Erber & Kloppenburg 1995). Außerdem erhöht eine Injektion von OA die Feldpotentiale, die durch Aktivierung einer Population bewegungssensitiver Neurone in der Lobula entstehen (Kloppenburger & Erber 1995). Kloppenburg (1990) untersuchte mit Hilfe elektrophysiologischer Ableitungen der visuellen Rezeptoren, sogenannten Elektoretinogrammen (ERG), die modulatorische Wirkung von OA auf die Reizantworten

auf einen Lichtreiz hin. Er fand, dass eine Injektion von OA in die Kopfkapsel die ERG-Amplituden vergrößert. Eine systemische Applikation von OA auf das Gehirn sowie die Injektion von OA in verschiedene Gehirnbereiche verstärkt auch die Reizantwort in den Pilzkörpern auf einen Lichtreiz (Mercer & Erber 1983). Pribbenow & Erber (1996) zeigten, dass eine Injektion von OA in den Dorsallobus die spontane motorische Aktivität der Antennen verstärkt, während Serotonin wiederum den gegenteiligen Effekt zeigt. Dieser Effekt auf Motoneurone kann auch direkt am Muskel durch Ableitung der Aktivität des Fast Pedicellus Flexor-Muskels beobachtet werden. Saraswati et al. (2003) zeigten, dass *Drosophila*-Larven, bei denen die Umsetzung von OA zu TA durch eine Mutation der Tyramin- $\beta$ -Hydroxylase gestört war, eine reduzierte motorische Aktivität gegenüber Wildtyp-Larven aufwiesen. OA scheint also im Gegensatz zu TA einen stimulierenden Einfluss auf die motorische Aktivität zu haben. Diese Vermutung wird bekräftigt durch den Befund, dass die motorische Aktivität durch das Füttern des TA-Antagonisten Yohimbin stimuliert wird (Saraswati et al. 2003).

Der Einfluss, den biogene Amine auf die Empfindlichkeit für sensorische Reize haben, könnte ein Hinweis darauf sein, dass biogene Amine bei der Anpassung der Kolonie an veränderliche Bedingungen regulierend wirken. Der OA-Gehalt von Bienen, die tote Brut aus dem Stock entfernen, ist höher als von Bienen, die ein solches hygienisches Verhalten nicht zeigen (Spivak et al. 2002). Außerdem ist der OA-Gehalt in den Antennalloben von Sammlerinnen, unabhängig von ihrem Alter, höher als der von Ammenbienen (Schulz & Robinson 1999). Schulz & Robinson (2001) zeigten außerdem, dass sich durch Füttern von OA der Übergang zur Sammelaktivität von Arbeiterinnen in einer Kolonie beschleunigen lässt. TA dagegen scheint diesen Prozess zu verlangsamen. Diese Studien deuten auf eine mögliche Bedeutung der Amine für die Arbeitsteilung hin.

Die Sammelrolle scheint also auf neuronaler Ebene reguliert zu werden, wobei biogene Amine eine entscheidende Rolle spielen könnten. Die Bedeutung von TA ist bisher kaum untersucht. Bisherige Befunde zu seiner modulatorischen Wirkung auf das gustatorische System deuten auf eine mögliche Rolle bei der Arbeitsteilung hin. In Bezug auf eine mögliche Bedeutung für das Sammelverhalten ist auch die Lage des TA-Rezeptor-Genes im Bienen-Genom interessant. Es liegt in einem (*pln2*) von bisher 3 identifizierten Quantitative Trait Loci (QTL), die mit dem Pollen-Sammelverhalten in Zusammenhang stehen (Hunt et al. 1995; Page et al. 2000). Damit ist *Amyr1* ein Kandidatengen für die Regulation des

Sammelverhaltens. Effekte, die durch Applikation von TA beobachtet wurden, wurden mitunter durch Bindung von TA an OA-spezifische Rezeptoren erklärt (Braun & Bicker 1992). Die Charakterisierung von TA ist besonders unter dem Gesichtspunkt der Abgrenzung seiner Eigenschaften von denen von OA von Interesse.

### **1.4 Die Neuropile des Bienenhirns**

Das Vorkommen von TA im Gehirn der Honigbiene wurde bislang nicht untersucht. Die Lokalisierung einer neuroaktiven Substanz in den Neuropilen kann jedoch wichtige Hinweise auf ihre Funktion geben. Die Neuropile des Bienenhirns werden im Folgenden dargestellt.

#### *optische Loben*

Die Verarbeitung visueller Reize findet in den drei sequentiell angeordneten lateralen Neuropilen des Protocerebrums, den optischen Loben, statt. Die Weiterleitung der Information erfolgt dabei in Form retinotoper Säulen, in denen Interneurone und intrinsische Zellen die retinale Anordnung der aufgenommenen Erregung an die optischen Ganglien weitergeben (Mobbs 1985). Die retinalen Axone projizieren, abhängig von ihrer spektralen Empfindlichkeit, in eine definierte Schicht des äußeren optischen Lobus, der Lamina. 3 Typen retinaler Rezeptorzellen, von denen einer auch empfindlich ist für polarisiertes Licht, projizieren die Erregung von der Retina ohne synaptische Interaktionen in der Lamina direkt in den mittleren optischen Lobus, die Medulla. Die Hauptaufgabe der Lamina besteht darin, die Erregung von Rezeptoren gleicher Blickrichtung auf die monopolaren Laminaneurone zu bündeln, welche die Reizantwort dann aufsummieren und über das äußere optische Chiasma auf die Medulla übertragen. Sogenannte T-Zellen sind ebenfalls an der Informationsübertragung von der Lamina auf die Medulla beteiligt. Außerdem wird auf Ebene der Lamina über eine systematische Vernetzung der Laminaneurone, der amakrinen und tangentialen Zellen, die die verschiedenen retinotopen Säulen miteinander verbinden, eine Kontrastverstärkung sowie eine erste Verarbeitung zum richtungsspezifischen Sehen vorgenommen. Die Fasern der retinotopen Säulen in der Medulla verlaufen in parallelen Schichten aus horizontal verlaufenden Neuronen und lateralen Verzweigungsmustern transmedullärer (Tm-) und amakriner Zellen sowie Verzweigungen von T- und Y-Fasern. Tm-Fasern durchziehen die Medulla in ihrer ganzen horizontalen Ausdehnung und reichen zum Teil bis in die Lobula. Charakteristisch für die Medulla ist eine hohe Dichte amakriner Zellen, die die retinotopen Säulen innerhalb der Medulla miteinander vernetzen bzw. die Säulen verschiedener medullärer Ebenen miteinander verbinden. Die Anzahl der Säulen bleibt

die gleiche wie in der Lamina. Jede Säule erhält Information erster Ordnung aus den retinalen Axonen sowie Information zweiter Ordnung aus monopolaren Laminazellen und tangentialen Zellen. Die Medulla steht über Tm-Zellen sowie T- und Y-Zellen mit dem innersten optischen Neuropil, der Lobula, in Verbindung. Über das innere optische Chiasma wird die Orientierung der retinotopen Säulen durch die Überkreuzung der Verschaltungsneurone ein weiteres Mal umgekehrt, gewissermaßen wieder in die Ausgangsorientierung zurück. Die Anzahl retinotoper Säulen wird dabei drastisch reduziert, die Reizinformation also ein weiteres Mal gebündelt. Die Anordnung der Neurone in Säulen verliert im proximalen Teil der Lobula ihre Struktur. In der Medulla und Lobula findet eine Farbcodierung von Lichtreizen statt. Die Zellen zeigen differenzierte Erregungsmuster je nach Wellenlänge bzw. Intensität des Lichtreizes. Bestimmte Neurone zeigen antagonistische Reaktionen auf Licht unterschiedlicher Wellenlänge. Die Neurone zeigen dabei entweder ein breites oder schmales Spektrum chromatischer Spezifität. Neurone in der Medulla und Lobula zeigen eine Erregung auf einen Bewegungsreiz hin (Hertel 1980). In der Lobula liegen Zellen, die außerdem auch eine Spezifität für die Richtung einer Bewegung aufweisen (Erber & Kloppenburg 1995; Kloppenburg & Erber 1995). In der Medulla liegt darüber hinaus eine Relaisstation polarisationssensitiver Rezeptoren (Homberg et al. 2003). Die Somata der intrinsischen optischen Neurone liegen in der Somarinde, die die optischen Ganglien umgeben, oder im Bereich der inneren und äußeren optischen Chiasmata (Ribi & Scheel 1981). Sinakevitch et al. (2005) zeigten, dass extrinsische oktopaminerge Zellen, deren Somata in einem Cluster im ventromedianen Protocerebrum medial der Antennalloben liegen, in die optischen Loben projizieren. Kreissl et al. (1994) und Sinakevitch et al. (2005) zeigten außerdem, dass Projektionen in den optischen Loben aus Zellen stammten, deren Somata in einem lateral und posterior der Antennalloben gelegenen Cluster liegen. Efferenzen aus Medulla und Lobula projizieren in die optischen Foci des lateralen Protocerebrums, wo eine Verarbeitung des visuellen Inputs mit anderen Reizmodalitäten stattfindet (Hertel 1980; Mobbs 1985). Interneurone aus dem polarisations-sensitiven Bereich der Medulla projizieren in die optischen Tuberkel des Protocerebrums, von wo aus die Erregung an den lateralen akzessorischen Lobus des Protocerebrums übermittelt wird (Homberg et al. 2003). Diese stehen über die Isthmus-Trakte mit dem Zentralkörper in Verbindung. Außerdem projizieren Neurone aus der Medulla und der Lobula in die Calyces der ipsi- und contralateralen Pilzkörper (Gronenberg 1986; Ehmer & Gronenberg 2002).

### *Pilzkörper*

Bei den Pilzkörpern (*corpora pedunculata*) handelt es sich um ein paarig angeordnetes Neuropil im Protocerebrum der Biene. Die intrinsischen Neurone, die Kenyon-Zellen, weisen alle eine ähnliche charakteristische Morphologie auf. Die dendritischen Verzweigungen dieser Neurone bilden je Pilzkörper zwei distal gelegene, schalenförmige Strukturen, den medianen und den lateralen Calyx (Menzel 1994; Strausfeld et al. 1998). Die Calyces sind die Haupteingangs-Regionen der Pilzkörper und bestehen aus je drei kreisförmigen, konzentrischen und modalitätsspezifischen Unterregionen: der Lippe, dem Kragen und dem basalen Ring (Mobbs 1982, Gronenberg 2001). Diese Untereinheiten sind wiederum in strukturelle und funktionelle Zonen unterteilt (Strausfeld 2002). Die Somata der Kenyon-Zellen liegen im Inneren und in der äußeren Umgebung der Calyx-Schalen. Die parallel verlaufenden Axone der beiden ipsilateralen Calyces verschmelzen zu einer stielartigen Struktur, dem Pedunculus, und projizieren anschließend in eine der beiden Ausgangs-Regionen des Neuropils, den nach frontal projizierenden  $\alpha$ -Lobus (oder vertikalen Lobus) oder den nach median projizierenden  $\beta$ -Lobus (oder medianen Lobus), bzw. verzweigen sich, um in beide Loben zu projizieren. Die morphologische und funktionelle Unterteilung der Calyces setzt sich aufgrund des parallelen Verlaufs der projizierenden Axone in Pedunculus und den Loben fort und erscheint dort in immunhistologisch gefärbten Präparaten als gebänderte Struktur (Schürmann & Erber 1990; Mobbs 1982; Strausfeld et al. 1998; Strausfeld et al. 2000; Strausfeld 2002). In das Calyx-Neuropil projizieren extrinsische, afferente Neurone aus den sensorischen Neuropilen. Afferenten Fasern aus den Antennalloben projizieren über den medianen, lateralen und mediolateralen antennoglomerulären Trakt (mAGT, lAGT und mlAGT) in die Lippe und den basalen Ring des ipsilateralen Calyx (Abel et al 2001; Müller et al. 2002). Projektionen aus der Medulla verlaufen über den anterioren superioren optischen Trakt (ASOT) in den basalen Ring sowie den Kragen der ipsi- und contralateralen Calyces. Afferente Fasern aus der Lobula projizieren unabhängig vom ASOT in den basalen Ring und Kragen der ipsilateralen Calyces (Gronenberg 1986; Ehmer & Gronenberg 2002). Der basale Ring und der Kragen erhalten zudem Input von mechanosensorischen und gustatorischen Interneuronen (Gronenberg 2001; Schröter & Menzel 2003; Strausfeld 2002). In frontalen Gehirnschnitten bilden die aus dem basalen Ring projizierenden intrinsischen Axone im querschnittenen  $\alpha$ -Lobus eine dorsale Bande, an die sich ventral ein Bande mit Projektionen aus dem Kragen und eine dritte mit Projektionen aus der Lippe anschließen. Das untere Drittel des  $\alpha$ -Lobus, der sogenannte  $\gamma$ -Lobus (Strausfeld 2002), besteht aus den Fortsätzen von *clawed* Kenyonzellen der Klasse II, die dendritische

Verzweigungen in allen drei Calyx-Untereinheiten ausbilden und deren Somata außerhalb der Pilzkörper-Schalen liegen (Strausfeld 2002). Efferente Fasern ziehen von den Loben zum Protocerebrum oder in einem Feedback-Loop zu den ipsilateralen oder contralateralen Calyces bzw. zu den ipsilateralen  $\beta$ -Loben oder Pedunculi (Gronenberg 1987; Ito et al. 1998, Grünewald 1999; Rybak & Menzel 1993). Außerdem erhalten die Loben auch afferente Fasern aus dem Protocerebrum (Strausfeld et al. 2000). Die Pilzkörper stellen ein Konvergenzzentrum verschiedener Reizmodalitäten dar. Obwohl Projektionsneurone aus den Antennalloben bereits bimodale Reizantworten zeigen, erfolgt eine Integration mit visuellem, gustatorischem und mechanosensorischem Input auf der Ebene der Pilzkörper (Homberg 2005). Die Pilzkörper spielen unter anderem eine wichtige Rolle bei der olfaktorischen Informationsverarbeitung (olfaktorisches Lernen) (Hammer & Menzel 1995 und 1998), und möglicherweise auch bei der zeitlichen Integration sensorischer Signale (Erber et al. 1987, Schürmann 1987), sowie für das Kurz- (Erber et al. 1980, Zars et al. 2000) und Langzeitgedächtnis (Pascual & Pr eat 2001). Die Konvergenz von olfaktorischem und visuellem Input legt außerdem nahe, dass die Pilzkörper die Orte der Interaktion von olfaktorischem und visuellem Lernen darstellen (Gerber & Smith 1998; Homberg 1995).

### *Zentralkomplex*

Der Zentralkomplex ist eine unpaarige Gruppe untereinander verbundener Neuropile, die im Zentrum des Gehirns liegen. Er besteht aus der protocerebralen Br ucke sowie dem Zentralkörper, der aus einer oberen und einer unteren Untereinheit sowie aus zwei Noduli besteht. Neben intrinsischen Neuronen, die Projektionsfelder ausschließlich in den Neuropilen des Zentralkomplexes aufweisen, finden sich auch extrinsische Zellen, die den Zentralkomplex mit den übrigen Neuropilen des Gehirns stark vernetzen (Homberg 1985, Mobbs 1985). Aufgrund ihrer Verzweigungsstruktur in den Neuropilen des Zentralkomplexes lassen sich dabei jeweils 2 Typen von Neuronen unterscheiden: tangentielle Zellen oder Großfeld-Neurone projizieren in der protocerebralen Br ucke, bzw. in einer oder mehreren diskreten horizontalen Ebenen der oberen und/oder unteren Untereinheit des Zentralkörpers und unterteilen sie dadurch in horizontale Schichten. Die jeweilige(n) Schicht(en) des Zentralkörpers bzw. die protocerebrale Br ucke werden dabei in ihrer gesamten lateralen Ausdehnung innerviert. Je nach Projektionsmuster in den Neuropilen des Zentralkomplexes werden die tangentialen Zellen in diffus oder fächerförmig projizierende Zellen unterteilt. Columnare oder Kleinfeld-Neurone bilden diffuse, sich überlappende säulenförmige Projektionsfelder in den Neuropilen aus, die bestimmte Bereiche innerhalb einer Schicht,

verschiedene Schichten innerhalb eines Neuropils oder auch bestimmte Neuropile des Zentralkomplexes miteinander vernetzen. Die relativ geringe Anzahl direkter Verbindungen zwischen der oberen und unteren Einheit des Zentralkörpers legt die Vermutung nahe, dass die Informationsverarbeitung in diesen beiden Neuropilen eher parallel als seriell vonstatten geht (Hanesch et al. 1989; Müller et al. 1997). Die columnaren Neurone stellen Verbindungen zwischen der rechten und linken Hälfte des Zentralkomplexes her. Durch das diskrete Verzweigungsmuster dieser Zellen sind die Protocerebrale Brücke und der Zentralkörper in jeweils 16 vertikale Säulen unterteilt. Die Projektionsbereiche der tangentialen und columnaren Zellen stehen also senkrecht aufeinander und bilden eine dreidimensionale Schichtung der Neuropile. Je nach Lage der Somata, des Verzweigungsmusters innerhalb der Neuropile des Zentralkomplexes und der Projektionen im Protocerebrum werden die Neurone des Zentralkomplexes weiter in verschiedene Gruppen unterteilt (Hanesch et al. 1989; Homberg 1985; Müller et al. 1997; Vitzthum et al. 1996). Die Somata der columnaren Zellen liegen im lateralen posterioren Protocerebrum in der Nähe der lateralen Calyces oder in der Pars intercerebralis. Die Somata der tangentialen Zellen sind zusätzlich im ventro-medianen Protocerebrum zwischen den Antennalloben und dem oesophagealen Foramen zu finden (Homberg 1985; Müller et al. 1997; Sinakevitch et al. 2005; Vitzthum et al. 1996). Über die beiden Isthmus-Trakte sowie das paarige anteriore Bündel projizieren Axone aus dem Zentralkomplex in die lateralen akzessorischen Loben des Protocerebrums bzw. in die protocerebralen Loben zwischen den  $\alpha$ -Loben und den Calyces der Pilzkörper (Homberg 1985). Bei *Schistocerca* besteht eine Verbindung zwischen der protocerebralen Brücke und den posterioren optischen Tuberkeln (Homberg 1991; Vitzthum et al. 1996). Eine Aufgabe des Zentralkomplexes besteht darin, sensorische Reize verschiedener Modalitäten bzw. aus verschiedenen Gehirnregionen miteinander zu verknüpfen und mit absteigenden Interneuronen zu koordinieren (Strausfeld 1976). Die zentrale Lage des Zentralkomplexes im Zentrum des Gehirns sowie seine topographische Organisation legen eine Rolle bei der Integration von Signalen aus rechter und linker Gehirnhälfte nahe. Intrinsic Neurone sind an der Verarbeitung visueller, mechanischer oder gustatorischer Reize beteiligt bzw. zeigen eine multimodale Erregbarkeit (Homberg 1985; Milde 1988). Die meisten diffus projizierenden extrinsischen Neurone sind multimodal, während einige der fächerförmig projizierenden extrinsischen Neurone auf visuelle, chemische oder mechanische Stimuli nicht oder nur schwach reagieren und dann keine Präferenz für eine bestimmte Reizmodalität zeigen (Homberg 1985). Der Zentralkomplex spielt eine wichtige Rolle bei komplexen motorischen Vorgängen wie dem Laufen, Fliegen oder der Stridulation bei Orthopteren

(Homberg 1994; Huber 1967; Otto 1971). Bei *Drosophila melanogaster* wirken sich strukturelle Mutationen des Zentralkomplexes auf das motorische Verhalten aus, was sich z.B. in einer reduzierten Laufaktivität und Laufgeschwindigkeit (Strauss & Heisenberg 1993) oder einem eingeschränkten Flugverhalten (Ilius et al. 1994) der Mutanten äußert. Interneurone des Zentralkomplexes zeigen bei *Schistocerca gregaria* eine Reizantwort auf polarisiertes Licht, was eine Rolle des Zentralkomplexes bei der räumlichen Navigation mit Hilfe des Himmelskompasses nahe legt (Homberg 2004; Homberg & Müller 1995; Rossel 1993; Vitzthum et al. 2002).

### *medianes und laterales Protocerebrum*

Efferenzen aus den sensorischen Neuropilen projizieren in das mediane und laterale Protocerebrum, wo die verschiedenen Reizinformationen integriert und weiter verarbeitet werden. In die optischen Foci des lateralen Protocerebrums sowie die optischen Tuberkel projizieren visuelle Afferenzen aus den optischen Ganglien (Hertel 1980, Mobbs 1985). In den lateralen akzessorischen Loben überschneiden sich visuelle Afferenzen mit Projektionen aus den Isthmus-Trakten, über die dieses Areal mit dem Zentralkomplex in Verbindung steht (Homberg 2003). Der Zentralkörper steht darüber hinaus in direktem Kontakt mit dem gesamten den Zentralkörper umgebenden protocerebralen Bereich sowie über die anterioren Bündel mit dem protocerebralen Bereich zwischen den  $\alpha$ -Loben und den Calyces der Pilzkörper (Homberg 1985). Aus den Antennalloben projizieren olfaktorische bzw. mechanosensorische antennoglomeruläre Trakte (AGT's) in verschiedene Bereiche des Protocerebrums, wo ihre Projektionsfelder teilweise mit visuellen Afferenzen überlappen (Maronde 1991). Während der laterale AGT (LAGT) zu dem lateralen Horn zieht, hat der mediane AGT (mAGT) ein breiteres Projektionsgebiet im Protocerebrum. Die Fasern des mediolateralen AGT's (mlAGT) bilden Afferenzen zum lateralen Protocerebrum sowie zu dem protocerebralen Bereich, der die  $\alpha$ -Loben der Pilzkörper umgibt (Abel et al. 2001). Im lateralen Lobus des Protocerebrums bestehen möglicherweise absteigende Bahnen zu motorischen Zentren (Kanzaki et al. 1991). Afferente und efferente Fasern verbinden die Loben der Pilzkörper mit dem Protocerebrum (Ito et al. 1998; Rybak & Menzel 1993; Strausfeld et al. 2000).

### *Deutocerebrum*

Antennal- und Dorsallobus bilden zusammen das deutocerebrale Neuromer (Snodgrass 1984). Die Antennalloben sind glomeruläre Neuropile, die die erste Relaisstation für olfaktorische

Reize aus den Antennen darstellen. Die Glomeruli enthalten Projektionen der chemosensorischen Rezeptoren aus den antennalen Sensillen und sind über anaxonale, inhibitorische lokale Interneurone untereinander verschaltet. Die Glomeruli befinden sich im peripheren Bereich der Antennalloben, während das zentrale Neuropil aus einem Geflecht intrinsischer und extrinsischer Fasern besteht. Über Projektionsneurone verlässt die Reizinformation die Antennalloben und wird über den medianen, den lateralen sowie den mediolateralen antennoglomerulären Trakt in die ipsilateralen Pilzkörper und das Protocerebrum weitergeleitet (Mobbs 1982; Abel et al. 2001; Müller et al. 2002). In diesen Neuropilen sowie in den Antennalloben selbst überschneiden sich die Projektionsfelder mit denen des VUMmx1-Neurons, welches beim olfaktorischen Lernen die Belohnung durch Sucrose vermittelt (Hammer 1993). Die Projektionsneurone der Antennalloben zeigen bimodale Reizantworten auf mechanosensorische, olfaktorische bzw. gustatorische Stimuli (Homborg 1984). Antennale Mechanorezeptoren projizieren außerdem in das mediane und laterale posteriore Protocerebrum, wo ihre dendritischen Felder teilweise mit visuellen Projektionen überlappen (Maronde 1991). In den Dorsallobus projizieren Afferenzen aus den Antennalloben sowie aus den gustatorischen und mechanosensorischen Sensillen der Antennen. Hier liegen auch antennale Motorneurone; der Dorsallobus stellt also das sensorische und motorische Zentrum der Antennen dar (Kloppenburg 1995; Kloppenburg et al. 1987; Homborg 2005).

### *Tritocerebrum und Suboesophageales Ganglion*

Das suboesophageale Ganglion besteht aus den drei verschmolzenen Neuromeren der Mandibeln, Maxillen und des Labiums. In das Tritocerebrum und das suboesophageale Ganglion projizieren über die Maxillar- und Labialnerven gustatorische Afferenzen aus den Sensillen der Proboscis. Vermutlich projizieren auch gustatorische Projektionen aus dem Dorsallobus in das suboesophageale Ganglion (Rehder 1988, Haupt 2005). Diese Neuropile stellen also das gustatorische Verarbeitungszentrum des Gehirns dar. Gustatorische Interneurone projizieren aus dem suboesophagealen Ganglion in die Calyces der Pilzkörper (Schröter & Menzel 2003). Das suboesophageale Ganglion steht außerdem über auf- und absteigende Fasern mit dem Halskonnektiv in Verbindung. Hammer (1993) identifizierte ein gustatorisches Interneuron im maxillaren Neuomer des suboesophagealen Ganglions, das die Sucrose-Belohnung als unconditionierten Stimulus beim assoziativen olfaktorischen Lernen vermittelt (VUMmx1-Neuron). Das VUMmx1-Neuron hat ausgedehnte bilaterale

Projektionsfelder im suboesophagealen Ganglion selbst, in den Glomeruli der Antennalloben, im lateralen Protocerebrum sowie in den Lippen und dem basalen Ring der Pilzkörper.

### *Das Vorkommen von Oktopamin, Oktopamin-Rezeptoren sowie der Expression der Rezeptorgene *Amoct1* und *Amtyr1**

Die Lokalisierung einer neuroaktiven Substanz im Nervensystem kann wichtige Hinweise auf ihre Funktion geben. Mit immunhistologischen Methoden können Neurotransmitter und ihre Rezeptoren im Gewebe detektiert werden. Durch *in situ*-Hybridisierung lassen sich die Transkriptionsmuster von Rezeptorgenen lokalisieren. Untersuchungen zur Verteilung von Oktopamin und des Oktopaminrezeptors AmOCT1 im Gehirn der Honigbiene wurden mit Hilfe von immunhistologischen Färbungen sowie von *in situ*-Hybridisierungen durchgeführt. Grohmann (2001) lokalisierte das Vorkommen von *Amoct1*-mRNA in den Somata der Kenyon-Zellen, der optischen Loben, im Protocerebrum, im suboesophagealen Ganglion sowie in den Somata, die die Antennalloben umgeben. Immunhistologische Färbungen von Gehirnschnitten zeigten eine ausgeprägte Oktopamin-Rezeptor-ähnliche Immunreaktion (AmOCT1-IR) in den Pedunculi und Loben der Pilzkörper, in den optischen Loben, dem Zentralkörper, im suboesophagealen Ganglion sowie in den Antennalloben. Darüber hinaus zeigten die Kenyon-Zellen und die Calyces eine schwache AmOCT1-IR.

Kreissl et al. (1994) und Sinakevitch et al. (2005) untersuchten die Verteilung von Oktopamin-ähnlicher Immunreaktion (OA-IR) im Bienenhirn. Sie fanden eine ausgeprägte OA-IR in den optischen Loben. Oktopamin moduliert also vermutlich in allen drei optischen Ganglien die visuelle Reizverarbeitung. Der Zentralkörper zeigte eine starke OA-IR, die in der unteren Untereinheit besonders deutlich ausgeprägt war. Intrinsische Kenyon-Zellen zeigten keine OA-IR. In die Calyces projizieren allerdings afferente Fasern, die im basalen Ring eine starke und in Kragen und Lippe eine schwache OA-IR zeigten. Diese Afferenzen wurden als Projektionen des VUMmx1-Neurons diskutiert (Kreissl et al. 1994, Sinakevitch et al. 2005). Außerdem zeigen efferente Fasern des  $\gamma$ -Lobus OA-IR. Sinakevitch et al. (2005) deuteten diesen Befund als Hinweis auf die modulatorische Rolle von Oktopamin beim olfaktorischen Lernen, bei dem dem  $\gamma$ -Lobus in *Drosophila* eine wichtige Bedeutung zugeschrieben wird (Zars et al. 2000). Die Antennalloben zeigten sowohl in ihrem Zentrum als auch im Bereich der Glomeruli deutliche OA-IR. Oktopamin scheint also bei der olfaktorischen Informationsverarbeitung bereits in den Antennalloben beteiligt zu sein.

Blenau et al. (2000) fanden für die *Amtyr1*-mRNA das gleiche ubiquitäre Transkriptionsmuster im Bienenhirn wie es Grohmann (2001) für *Amoct1* beschrieben hat. Dieser Befund lässt vermuten, dass auch immunhistologische Untersuchungen eine allgegenwärtige Verbreitung von Tyraminrezeptoren zeigen.

### 1.5 Ziele der Arbeit

1. Das erste Ziel der vorliegenden Arbeit besteht darin, die neuromodulatorische Bedeutung von TA in der Honigbiene genauer zu untersuchen und von der Rolle von OA zu differenzieren. Dies erfolgt mit Hilfe verschiedener methodischer Ansätze:

- Mit Hilfe von immunhistologischen Färbungen von Gehirnschnitten soll das Vorkommen von TA und des Rezeptors AmTYR1 lokalisiert werden. Die Tyramin-ähnliche Immunreaktion (TA-IR) soll Aufschluss über das Vorkommen tyraminerger Neurone im Bienenhirn geben, während eine Tyramin-Rezeptor-ähnliche Immunreaktion (AmTYR1-IR) die Verteilung des AmTYR1-Rezeptors zeigen soll. Die Lokalisierung von Tyramin und einem zugehörigen Rezeptor in den Neuropilen des Bienenhirns kann wichtige Hinweise auf die Wirkungsorte von Tyramin im Gehirn geben und somit auf die Reizmodalitäten, deren Verarbeitung möglicherweise durch Tyramin moduliert wird. Daraus lassen sich mögliche Unterschiede und Gemeinsamkeiten der Bedeutung von Tyramin und Oktopamin ableiten.
- Die Wirkung von OA auf das visuelle System wurde in zahlreichen Studien untersucht (Kloppenburger (1990); Erber et al. 1993; Erber & Kloppenburger 1995; Kloppenburger & Erber 1995). In der vorliegenden Arbeit soll der physiologische Effekt einer Injektion von TA auf die visuellen Rezeptorpotentiale bei Stimulation mit einem Lichtreiz mit Hilfe von Elektretinogrammen (ERG) untersucht werden und mit der Wirkung von OA verglichen werden.
- Die Wirkung von OA und TA auf die Laufaktivität sowie die phototaktische Aktivität von Sammlerinnen soll mit Hilfe eines Verhaltensexperimentes untersucht werden. Dadurch soll die modulatorische Bedeutung dieser biogenen Amine für ein von der visuellen Empfindlichkeit der Versuchstiere abhängiges Verhalten untersucht und von einem möglichen Einfluss auf die lokomotorische Aktivität differenziert werden. Ein modulatorischer Effekt von OA oder TA auf die phototaktische Aktivität könnte dabei

in Zusammenhang stehen mit einem möglichen Effekt dieser Substanzen auf der Ebene der visuellen Rezeptoren, die in ERG untersucht werden.

- Mit Hilfe der RNAi-Technik soll die funktionelle Bedeutung des AmTYR1-Rezeptors für die gustatorische Empfindlichkeit untersucht werden.

### RNA-Interferenz

Bei der RNA-Interferenz (RNAi) handelt es sich um eine Methode des posttranskriptionalen Gen-Silencing, mit der die Synthese von Proteinen gezielt herunterreguliert werden kann. Dazu wird doppelsträngige RNA (dsRNA) injiziert, deren antisense-Strang komplementär zu der mRNA des Gens („Zielgen“) ist, welches herunterreguliert werden soll. Im Cytoplasma wird die dsRNA von einer spezifischen Endonuclease, dem sog. Dicer, erkannt und in 21-27 Nukleotide lange Fragmente zerschnitten. Diese siRNA- („small interference-RNA“) Fragmente sind durch 2 Nucleotide lange Überstände am 3'-Ende („sticky ends“) charakterisiert. Die siRNA-Fragmente assoziieren mit Proteinkomponenten zu dem sog. RISC-Komplex (RNA-induced silencing complex“), der u.a. bisher nicht identifizierte Nuclease-Slicer enthält. Die siRNA wird entwunden, die beiden komplementären Stränge voneinander gelöst und der sense-Strang abgespalten. Der antisense-Strang bleibt weiter in dem Komplex gebunden. Wird nun im Zellkern das Zielgen exprimiert und die mRNA synthetisiert, bindet sie im Cytoplasma an das im RISC-Komplex gebundene komplementäre Fragment und wird von dem Nuclease-Slicer zerschnitten. Die zerschnittene mRNA ist hochgradig instabil und wird von zelleigenen Nucleasen abgebaut. Es kann somit nicht zu einer Translation der mRNA kommen und es findet keine Proteinsynthese statt.

Bei der RNAi handelt es sich eigentlich um einen Mechanismus eukaryotischer Zellen, mit dem sie sich vor der Expression fremder, z.B. viraler Gene zu schützen (Waterhouse et al. 2001). Durch Synthese doppelsträngiger RNA, die komplementär zu den viralen Gen-Sequenzen ist, wird eine Expression der fremden Gene verhindert (Übersicht bei Scherer & Rossi 2003). Durch Injektion von dsRNA mit einem komplementären Strang zu einem im Genom des Versuchsorganismus enthaltenen Zielgen kann jedoch auch eine endogene Genexpression unterdrückt werden.

Die RNAi-Methode wurde erstmals von Fire et al. (1998) in *C. elegans* beschrieben. In der Honigbiene wurde diese Methode bisher in wenigen Studien erfolgreich angewandt. Farooqui et al. (2003) injizierten dsRNA, um eine Expression des OA-Rezeptors AmOAR

zu inhibieren und fanden im Verhaltensexperiment einen inhibierenden Effekt der Behandlung auf das olfaktorische Lernen, bei dem OA eine wichtige Rolle spielt. Farooqui et al. (2004) zeigten außerdem in Western Blots, dass eine RNAi-Behandlung die Expression des *AmOAI*-Gens (Grohmann et al. 2003) in der Biene unterdrückt. Gatehouse et al. (2004) zeigten eine Reduktion der Amylase-Aktivität nach Injektion von hypopharyngealer Amylase-Gen-dsRNA in das Abdomen von Bienen-Sammlerinnen. Amdam et al. (2003) reduzierten durch dsRNA-Injektion in Eier sowie in adulte Bienen die Menge an Vitellogenin-mRNA deutlich. Amdam et al. (2006) zeigten darüber hinaus, dass sich eine Unterdrückung des Vitellogenin-Gens durch RNAi auch auf die gustatorische Empfindlichkeit von Arbeiterinnen auswirkt. Zhou et al. (2005) nahmen bei Termiten (*Reticulitermes flavipes*) durch einen RNAi-induzierten Knock-down zweier Hexamerin-Gene gezielt Einfluss auf die Differenzierung von der Arbeiterkaste zur Soldatenkaste.

2. Das zweite Ziel dieser Arbeit besteht darin, mögliche Unterschiede zwischen Pollen- und Nicht-Pollensammlerinnen zu detektieren. Dies geschieht unter Beachtung ihrer gustatorischen Empfindlichkeit für Sucrose, da alle bisher gezeigten Unterschiede zwischen den Sammler-Typen mit ihrer gustatorischen Empfindlichkeit korrelierten, und daher ein kausaler Zusammenhang in Form eines gemeinsamen übergeordneten Regulationsmechanismus vermutet wird (Scheiner et al. 2004; Humphries et al. 2005). In der vorliegenden Arbeit werden die motorische Aktivität sowie das phototaktische Verhalten von Pollen- und Nichtpollensammlerinnen untersucht. Finden sich Unterschiede zwischen diesen beiden Sammlertypen, die unabhängig von den gustatorischen Empfindlichkeiten sind, so spräche das möglicherweise für unabhängige Regulationsmechanismen für gustatorische und visuelle Empfindlichkeiten bzw. die motorische Aktivität, was die Schwellenhypothese stützen würde.



# 2 Material & Methoden

## 2.1 allgemeine Methoden

### 2.1.1 Versuchstiere

Als Versuchstiere dienten Honigbienen (*Apis mellifera* L.).

Sammlerinnen wurden bei der Rückkehr von einem Sammelflug am Stockeingang abgefangen. Pollensammlerinnen wurden dabei von Nichtpollensammlerinnen unterschieden anhand der Pollenfracht, die sie an den Hinterbeinen trugen. Die Tiere wurden in Glasbehältern mit Schaumstoffverschluss ins Labor transportiert.

Frisch geschlüpfte Bienen stammten aus einer Brutwabe, die 1-2 Tage vor dem Schlupf der Brut aus dem Stock in einen Brutschrank (34°C, 80% Luftfeuchtigkeit) überführt worden war. 1-24 h nach dem Schlupf wurden die Bienen von der Wabe in eine Plastikwanne abgefegt und für Versuche mit einer Pinzette aus der Wanne gesammelt.

Im Winter wurde ein kleines Volk von Winterbienen in einem Freiflugraum bei konstanten Bedingungen gehalten (12 h Tag-Nacht-Rhythmus, 20-24°C, 50-60% rel. Luftfeuchtigkeit). Die Tiere hatten unbegrenzten Zugang zu einer Saccharoselösung (50% w/v), Pollen und Wasser. Versuchstiere wurden direkt aus dem Stock gesammelt.

### 2.1.2 Einspannen der Tiere

Versuchstiere wurden bei 4°C nahezu bis zur Bewegungslosigkeit gekühlt und mit Hilfe von Klebeband in Messingröhrchen so eingespannt, dass der Kopf eines Tieres auf dem oberen Rand des Röhrchens auflag (Erber et al. 1997). Frisch geschlüpfte Bienen wurden ohne Herunterkühlen eingespannt. Antennen und Proboscis der eingespannten Tiere blieben frei beweglich. Zur Präparation von Gehirnen für immunhistologische Färbungen sowie für elektrophysiologische Ableitungen wurde die Kopfkapsel der eingespannten Tiere dorsal mit einem Wachs-Kolophonium-Gemisch fixiert.

### 2.1.3 Proboscis Extension Response (PER) als gustatorischer Verhaltenstest

Die Antennen eines Versuchstieres wurden mit Wasser und Sucroselösungen zunehmender Konzentrationen (0,1%; 0,3%; 1%; 3%; 10%; 30% w/v) kurz berührt und beobachtet, ob das

Tier mit einem Ausstrecken der Proboscis („proboscis extension response“, PER) auf den Stimulus reagiert. Der Abstand zwischen 2 Stimulationen betrug mindestens 2 min. Die Summe der positiven Reaktionen wurde für jedes Tier in einem „gustatory response score“ (GRS) zusammengefasst und diente als Maß für die individuelle gustatorische Empfindlichkeit (Pankiw & Pagae 2001; Scheiner et al. 1999).

## **2.2 Immunhistologie: Tyramin-ähnliche Immunreaktion (TA-IR) und Tyramin-Rezeptor-ähnliche Immunreaktion (AmTYR1-IR)**

### **2.2.1 Präparation und Herstellung der Schnitte**

Sammlerinnen und frisch geschlüpfte Bienen wurden in Messingröhrchen eingespannt und die Köpfe fixiert (s. 2.1.2). Ein Fenster wurde frontal zwischen den beiden Komplexaugen, Antennengelenken und dem medianen Ocellus in die Kopfkapsel geschnitten und das Gehirn mit kaltem Fixativ umspült. Als Fixativ wurde für die TA-IR 5% Glutaraldehyd in 0,1 M Cacodylat-Puffer mit 10 g/l Na-Bisulfit, pH 7,5 verwendet; für die AmTYR1-IR wurde 4% Paraformaldehyd in 0,1 M Sörensen Phosphatpuffer (=SPB: 0,05 M  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  und 0,15 M  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , pH 7,4) verwendet. Tracheen und Drüsengewebe wurden entfernt, der Kopf wurde abgetrennt und mit der frontalen Seite nach unten in einem Wachs-Kolophoniumgemisch fixiert. Das Gehirn wurde von posterior aus der Kopfkapsel herauspräpariert und weitere 4 bis 12 h fixiert. Fixierte Gehirne wurden in 10% Gelatine eingebettet und in 4% Paraformaldehyd 1-24 h nachfixiert. Aus den fixierten Gelatineblöcken wurden mit einem Vibratom (FTB Vibracut) 50 bzw. 100  $\mu\text{m}$  dicke frontale, horizontale oder sagittale Schnitte hergestellt. Für die TA-IR wurde das Messingröhrchen, in dem das Tier eingespannt war, während der Präparation auf einem Peltier-Kühlelement (eingestellte Temperatur =  $1^\circ\text{C}$ ) gekühlt. Alle Inkubationsschritte der Gehirnschnitte wurden auf einem Schüttler durchgeführt.

### 2.2.2 Tyramin-ähnliche Immunreaktion

Zur Detektion Tyramin-ähnlicher Immunaktivität wurde ein kommerzieller, polyklonaler Antikörper von Chemicon (AB 124) verwendet. Der Antikörper wurde in Kaninchen gegen Glutaraldehyd-gekoppeltes p-Tyramin hergestellt.

Gehirnschnitte wurden 10 min in

0,05 M Tris-Puffer mit 8,5 g/l Na-Bisulfit, pH 7,5 (= "Puffer 1")

bei Raumtemperatur (RT) gewaschen. Freie Aldehydgruppen wurden mit 0,1 M Na-Borohydrid (10 min, RT) reduziert. Nach wiederholtem Waschen in Puffer 1 (3 × 10 min, RT) wurden die Schnitte zum Blocken unspezifischer Bindungen in 3% Normal Goat Serum (NGS) in Puffer 1 inkubiert (1 h, RT). Die Inkubation im primären Antikörper erfolgte in der Verdünnung 1:500 in Puffer 1 mit 1% NGS und 0,2% Triton (48 h, 4°C). Nach Waschen in

0,05 M Tris-Puffer mit 8,5 g/l NaCl, pH 7,5 (= „Puffer 2“)

(4 × 30 min, RT) wurde im sekundären Antikörper (Alexa Fluor 555 goat-anti-rabbit, Molecular Probes) in der Verdünnung 1:100 in Puffer 2 mit 1% NGS und 0,2% Triton inkubiert (über Nacht, 4°C). Nach erneutem Waschen in Puffer 2 (5 × 10 min, RT) wurden die Schnitte in 2 Verdünnungsschritten mit Glycerin in Puffer 2 (30 min in 50%, dann 1 h in 80%) aufgeklärt und dann in 80% Glycerin auf Objektträger aufgezogen.

### 2.2.3 Tyramin-Rezeptor-ähnliche Immunreaktion

Zur Detektion des Tyramin-Rezeptors AmTYR1 wurde ein Antikörper der Firma Pineda verwendet, der von PD Dr. Arnd Baumann (Forschungszentrum Jülich) zusätzlich aufgereinigt wurde. Der Antikörper wurde in Kaninchen gegen ein Fusionsprotein aus dem N-Terminus des Rezeptors und einem Maltosebindeprotein gebildet. Das Kaninchenserum wurde affinitätschromatographisch aufgereinigt und für die immunhistologische Färbung von Gehirnschnitten verwendet.

Die Gehirnschnitte wurden mehrmals in SPB mit 0,5% Triton gewaschen (4 × 30 min) und dann 1 h bei RT in NGS-Blockingmedium inkubiert (3% NGS mit 0,5% Triton in SPB). Es folgte die Inkubation im primären Antikörper in der Verdünnung 1:500 (78 h, 4°C). Nach erneutem Waschen in SPB mit 0,5% Triton (4 × 30 min) folgte die Inkubation im sekundären

Antikörper (Alexa Fluor 555 goat-anti-rabbit, Molecular Probes) in der Verdünnung 1:100 (über Nacht, 4°C). Anschließend wurden die Schnitte in SPB gewaschen ( $4 \times 1$  h, RT) und in Glycerin (erst 50%, dann 80% in PBS, je 1 h) aufgeklart. Schließlich wurden die Schnitte in 80% Glycerin auf Objektträger aufgezogen.

### 2.2.4 Kontrollexperimente

Die Spezifität des primären Tyramin-Antikörpers wurde durch Präinkubation mit Tyramin der Konzentrationen  $10^{-7}$  M,  $10^{-5}$  M und  $10^{-3}$  M getestet. Die Kreuzreaktivität des Antikörpers mit Oktopamin wurde durch Präinkubation mit Oktopamin der Konzentrationen  $10^{-7}$  M,  $10^{-5}$  M und  $10^{-3}$  M getestet. Nach Präinkubation (1h, RT) wurde der Antikörper wie in 2.2.2 zur immunhistologischen Färbung von Gewebeschnitten eingesetzt.

Die Spezifität der AmTYR1-IR wurde getestet, indem an Stelle des primären Antikörpers mit dem Präimmunserum des Kaninchens inkubiert wurde, welches später mit dem Rezeptor-Fusionsprotein immunisiert wurde. Es wurde in den Verdünnungstufen 1:500, 1:200 und 1:100 inkubiert und ansonsten wie in 2.2.3 verfahren. In einem weiteren Kontrollexperiment wurde der Tyramin-Rezeptor-Antikörper von Inkubation mit den Gewebeschnitten mit dem Fusionsprotein aus Rezeptor-N-Terminus und Maltosebindenproteinen präinkubiert. Es wurden die Fusionsprotein-Konzentrationen  $1 \mu\text{g/ml}$ ,  $2 \mu\text{g/ml}$  und  $6 \mu\text{g/ml}$  getestet. Anschließend wurde weiter wie in 2.2.3 beschrieben verfahren.

### 2.2.5 Dokumentation

Betrachtung und Dokumentation aller fluoreszenzmarkierten Präparate erfolgte an einem Fluoreszenzmikroskop (Olympus BH-2) mit Digitalkamera (Colorview II, SoftImaging, Münster, mit Analysis Software) und einem konfokalen Laser-Scanning-Mikroskop (Leica DMRXE mit Leica LCS Lite (Leica Microsystems) Software bzw. Zeiss LSM 510 mit Zeiss Software).

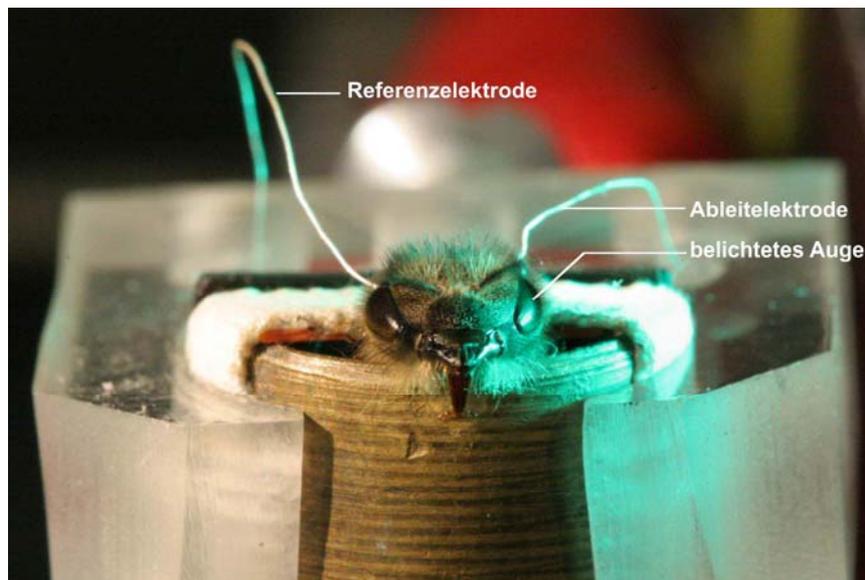
## 2.3 Elektrophysiologie: Elektroretinogramm (ERG)

Die Wirkung biogener Amine auf das visuelle System wurde durch extrazelluläre elektrophysiologische Ableitung aus dem Bereich der Photorezeptoren vor bzw. nach systemischer Injektion biogener Amine untersucht. Für jedes Tier wurden

Elektroretinogramme für unterschiedliche relative Lichtintensitäten aufgenommen und eine Intensitätskennlinie erstellt.

### 2.3.1 Reizgebung

Als Reiz dienten grüne Lichtblitze ( $\lambda = 520 \text{ nm}$ ) aus einer LED-Lichtquelle (Typ O-SLM-G102), die für eine Dauer von 300 ms ein Auge vollständig beleuchteten (Abbildung 1: Biene in der Versuchsanordnung zur Ableitung von ERG). Die Lichtintensität betrug ca. 10 klx (350 mA, 1 W) beim Auftreffen auf das Auge (gemessen mit 351 Power Meter, United Detector). Mit Hilfe von Graufiltern wurde die Lichtintensität auf 5 weitere Intensitätsstufen herunterreguliert (3, 6, 12, 25 und 50%). Das Auge wurde für jede Intensität, beginnend mit der niedrigsten, mit 4 im Abstand von 20 s aufeinander folgenden Lichtblitzen gereizt. Nach 2 min wurde zur jeweils nächst höheren Lichtintensität übergegangen. Die Lichtquelle war in einem Abstand von 3 cm vor dem beleuchteten Auge positioniert und beleuchtete das ganze Auge. Aus dem der Lichtquelle abgewandten Auge wurde mit der Referenzelektrode abgeleitet. Es wurde nicht beleuchtet und war zusätzlich mit lichtundurchlässiger Farbe abgedeckt. Die Reizgebung wurde durch die Spike 2-Software über einen digitalen Ausgang des Datenaufnahmesystems (Micro 1401, CED, Cambridge) in Verbindung mit einem Reed-Relais kontrolliert.



**Abbildung 1:** Biene in der Versuchsanordnung zur Ableitung von ERG

### 2.3.2 Ableitung der ERG

Potentiale wurden mit einer Silber/Silberchloridelektrode der Stärke 36 AWG (= 125  $\mu\text{m}$  Durchmesser) differentiell abgeleitet, d.h. es wurde die Spannungsdifferenz zwischen Ableit- und Referenzelektrode gemessen. Die Ableitung der Potentiale erfolgte in einem Faraday'schen Käfig. Das Versuchstier war über das Messingröhrchen, in dem es fixiert war, geerdet. Die Signale wurden über einen differenziellen Vorverstärker (EXT-01C, npi) zu einem Verstärker (DPA 2F, npi) geleitet und insgesamt 200-fach verstärkt. Das Signal wurde Tiefpass-gefiltert (3 kHz), ein Hochpassfilter wurde nicht verwendet. Über ein Datenaufnahmesystem (Micro 1401, CED, Cambridge) wurde das Signal digitalisiert. Die Datenaufnahme und -speicherung erfolgte wie die Stimuluskontrolle mit Hilfe eines Programms für Spike 2-Software (CED, Cambridge). Die Signale wurden während der Ableitung mit einem Oszilloskop dargestellt.

### 2.3.3 Pharmaka

Es wurden die biogenen Amine Oktopamin (DL-Oktopamin-Hydrochlorid, Sigma) in den Konzentrationen  $10^{-3}$ ,  $10^{-4}$ ,  $10^{-5}$  und  $10^{-6}$  M sowie Tyramin (Tyramin-Hydrochlorid, Sigma) in den Konzentrationen  $10^{-3}$ ,  $10^{-4}$  und  $10^{-5}$  M injiziert. Der Tyramin-Antagonist Yohimbin (Yohimbin-Hydrochlorid, Sigma) wurde in der Konzentration  $10^{-3}$  M alleine und in Koninjektion mit Tyramin ( $10^{-4}$  M) und Oktopamin ( $10^{-4}$  M) appliziert. Die Substanzen waren in MOPS-Puffer (270 mM NaCl; 3,2 mM KCl; 1,2 mM  $\text{CaCl}_2$ ; 10 mM  $\text{MgCl}_2$ ; 10 mM Morpholinopropansulfonsäure) mit  $10^{-2}$  M L-Ascorbinsäure (Sigma) gelöst.

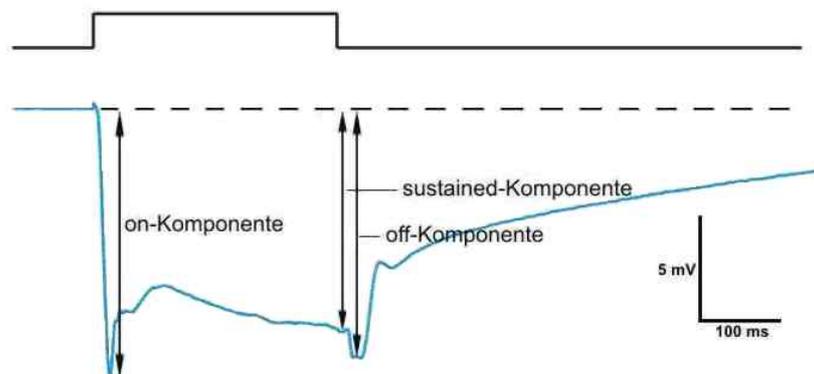
### 2.3.4. Versuchsablauf und Injektion

Pollen- und Nichtpollen-Sammlerinnen wurden in Messingröhrchen eingespannt und die Köpfe fixiert (s. 2.1.2). 30 min nach dem Einspannen wurden die Tiere mit 30% (w/v) Zuckerwasserlösung satt gefüttert. Weiteres Füttern erfolgte jede Stunde bis max. 1 h vor Versuchsbeginn. Insgesamt waren die Versuchstiere max. 3 h lang eingespannt. Vor Versuchsbeginn wurden die Tiere in einer feuchten Kammer (ca. 70% Luftfeuchte) aufbewahrt. Mit einem Skalpell wurde ein Schnitt in den mediodorsalen Bereich der Komplexaugen gemacht und in jedes Auge eine Elektrode dicht unter die Cuticula in den Rezeptorbereich des Auges eingeführt. Außerdem wurde für die spätere Pharmakainjektion ein Fenster in die Kopfcuticula geschnitten (wie in 2.2.1), der ausgeschnittene Cuticula“deckel“ jedoch nicht abgenommen. 30 min nach Einsetzen der Elektroden wurde der

GRS für die Versuchstiere ermittelt (2.1.3). Es wurden ausschließlich Tiere mit einem  $GRS \geq 5$ , d.h. sehr empfindliche Bienen für den Versuch verwendet. Nach GRS-Messung wurden die Elektroden an die Ableitungsapparatur angeschlossen und ein stabiles Signal hergestellt. Nach einer 5-minütigen Phase der Dunkeladaptation wurde die erste Kennlinie aufgenommen (s. 2.3.5). Die Aufnahme einer Kennlinie dauerte ca. 15 min. Nach diesem ersten Durchgang wurde die Substanz injiziert, ohne das Versuchstier in der Apparatur zu bewegen. Dazu wurde unter einer Stereolupe vorsichtig der Deckel von dem Fenster in der Kopfcuticula abgenommen und mit Hilfe eines Mikromanipulators ein 1  $\mu$ l-Tropfen der gelösten Substanz aus einer Mikroliterspritze (10  $\mu$ l, Hamilton) in die Kopfhämolymphe abgesetzt. Das Fenster wurde nach Injektion wieder mit dem Cuticuladeckel verschlossen. Nach einer Inkubationszeit von 20 min wurde das ERG für die 6 Lichtintensitäten ein zweites Mal aufgenommen.

### 2.3.5 Auswertung der ERG

Es wurden die 3 charakteristischen Komponenten der ERG-Potentialkurven ausgewertet (Abb. 2): die Amplitude der on-Reaktion, die Amplitude der sustained-Komponente sowie die Amplitude der off-Reaktion. Die sustained-Komponente stellt die Potentiale der Rezeptoren (Retinulazellen) dar, während an der on- und off-Reaktion Potentiale der optischen Ganglien, insbesondere der Lamina, beteiligt sind (Goldsmith 1960; Heisenberg 1971; Menzel 1971). Die sustained-Reaktion sinkt während der Beleuchtung des Auges erst ab und erreicht dann ein Plateau. Deshalb wurde die sustained-Komponente genau zum Zeitpunkt des Abschaltens des Lichtreizes, also 300 ms nach Reizbeginn, gemessen. Von der on- und off-Komponenten wurde jeweils die maximale Amplitude bestimmt.



**Abbildung 2:** Elektretinogramm der Biene mit den charakteristischen Komponenten.

Aus den 4 Messungen für jede Lichtintensität vor bzw. nach Pharmakainjektion wurde für jedes Tier eine mittlere Intensitäts-Reaktionskurve erstellt. Da die Absolut-Werte der einzelnen Tiere nicht unmittelbar miteinander verglichen werden können, wurde die Kurve für jedes Tier normiert. Dabei wurde die Amplitude, die bei der höchsten Reizintensität vor der Pharmakainjektion gemessen wurde, als 100% festgesetzt. Alle anderen bei geringeren Reizintensitäten bzw. nach Pharmakainjektion gemessenen Werte wurden zu diesem Wert in Relation gesetzt (= „relative Reizantwort“).

Bildet man für jede Lichtintensität die Differenz aus der relativen Reizantwort vor und nach Injektion und berechnet man aus diesen Differenzen für jedes Tier den Mittelwert, so ergibt sich für jede Behandlungsgruppe ein relativer Wert („Deltaprozent“), der den Behandlungseffekt für die verschiedenen Lichtintensitäten zusammenfasst. Dieser Deltaprozent-Wert dient als Maß für die Unterschiede zwischen den Reizantworten vor und nach Injektion in den verschiedenen Behandlungsgruppen und stellt den Parameter für die statistische Auswertung dar. Für jede TA- oder OA-injizierte Behandlungsgruppe sowie für die Koninjektionen mit YOH wurden die ERG von mindestens 8 Pollen- bzw. Nicht-Pollensammlerinnen bestimmt, für die Ringer-Behandlungsgruppe wurden die ERG von 11, für die YOH-Behandlungsgruppe von 10 Tieren bestimmt. Es wurden jeweils die Deltaprozent-Werte für die on-, die off- sowie die sustained-Reaktion berechnet.

### 2.3.6 Statistische Auswertung der Daten

Die Deltaprozent-Werte jeder Behandlungsgruppe wurden mit Hilfe des D’Agostino & Pearson Omnibus Normality Tests auf Normalverteilung getestet. Die Deltaprozent-Werte der sustained-Reaktion waren für jede Behandlungsgruppe normalverteilt ( $p \geq 0,053$ ), während die Werte der on- ( $p \geq 0,0004$ ) und der off-Reaktion ( $p \geq 0,007$ ) nicht in jeder Behandlungsgruppe Normalverteilung aufwiesen. Zur Auswertung der sustained-Reaktion werden also parametrische, zur Auswertung der on- und off-Reaktion dagegen nichtparametrische Testverfahren angewandt.

Um zu testen, ob die verschiedenen Behandlungen einen Effekt auf die ERG haben, wurde für jede Behandlungsgruppe überprüft, ob die mittleren Deltaprozent-Werte als Maß für den Behandlungseffekt signifikant verschieden von 0 sind. Dazu wurde für die sustained-Komponente der parametrische One Sample t-Test, für die on- und die off-Reaktion der nichtparametrische Wilcoxon Signed Rank Test verwendet.

Um darüber hinaus zu testen, ob der Behandlungseffekt einer Gruppe von dem der Ringer-Kontrolle signifikant abweicht, wurde ihr Deltaprozent-Wert mit dem von Ringer in einem t-

Test (für die sustained-Komponente) bzw. einem Mann-Whitney-Test (für die on- und off-Komponente) auf einen signifikanten Unterschied hin verglichen. Um den Effekt verschiedener Konzentrationen von OA oder TA im Vergleich zur Ringer-Kontrolle zu untersuchen, wurden die entsprechenden Deltaprozent-Werte der sustained-Komponente zuerst mit einer One-way ANOVA auf signifikante Unterschiede geprüft, danach wurde mit dem Dunnett's Multiple Comparison Post-Test jede Behandlung mit dem der Ringer-Kontrolle verglichen. Entsprechend wurde mit Hilfe des nichtparametrischen Kruskal-Wallis-Tests und des Dunn's Multiple Comparison Post-Tests für die on- und die off-Komponente verfahren.

Um zu testen, ob zwischen der verwendeten Amin-Konzentration und dem Behandlungseffekt eine Dosis-Wirkungs-Abhängigkeit besteht, wurden die Deltaprozent-Werte der verschiedenen OA- bzw. TA-Konzentrationen in einem ANOVA Post Test auf einen linearen Trend hin untersucht.

Um schließlich den Effekt einer Koinjektion von Yohimbin zu testen, wurden für die sustained-Komponente die Deltaprozent-Werte der einfachen Injektion von  $10^{-4}$ M OA bzw. TA, der Koinjektion mit Yohimbin sowie der Ringer-Kontrolle zuerst mit einer One-way ANOVA auf signifikante Unterschiede geprüft und danach mit dem Bonferroni's Multiple Comparison Post-Test miteinander verglichen. Entsprechend wurden die Deltaprozent-Werte der on- und der off-Komponente mit dem Kruskal-Wallis Test und dem Dunn's Multiple Comparison Test miteinander verglichen.

## 2.4 RNA-Interferenz

Um die Rolle des Tyraminrezeptors AmTYR1 bei der Modulation gustatorischer Empfindlichkeiten zu untersuchen, wurde doppelsträngige Rezeptor-RNA in das Gehirn injiziert, um die Translation des Rezeptors mit Hilfe von RNA-Interferenz zu unterdrücken. Gustatorische Empfindlichkeiten wurden mit Hilfe der PER (s. 2.1.3) ermittelt. Auf RNA-Ebene wurde der Erfolg der Interferenz bei frisch geschlüpften Bienen mit Hilfe von quantitativer real-time PCR (qRT-PCR) überprüft.

### **2.4.1 Test der Injektionsmethode mit fluoreszenzmarkierter doppelsträngiger RNA**

#### **(dsRNA)**

Frisch geschlüpfte Bienen und Pollensammlerinnen wurden in Messingröhrchen fixiert (2.1.2). Mit einem Skalpell wurde ein V-förmiger Schnitt in die Kopfcuticula zwischen den drei Ocellen angebracht. An der Spitze einer 5 µl Hamilton-Spritze wurde über einen Silikonschlauch eine Borosilikat-Glaskapillare befestigt. Mit Hilfe eines Mikromanipulators wurde die Spitze der Glaskapillare ca. 2 mm tief in den Schnitt eingeführt und 0,5 µl der Lösung in den Ocellartrakt injiziert. Es wurden fluoreszenzmarkierte (Alexa Fluor 546-14-UTP, Molecular Probes) sowie unmarkierte dsRNA des Green Fluorescent Protein-Gens (= GFP; 33,3 ng/µl in TE-Puffer) injiziert. Nach Injektion wurden die Bienen aus dem Messingröhrchen befreit und in einen Käfig (12 × 8 × 6 cm) gesetzt, in dem sie sich frei bewegen konnten und unbegrenzten Zugang zu einer Saccharoselösung (50% w/v) hatten. Die Käfige wurden in ein großes Bienenvolk gestellt, so dass die Versuchstiere von dem Volk optimal mit Nährstoffen versorgt werden konnten. Ein Teil der Bienen wurde während der Inkubation in einem Brutschrank (34°C, 80% Luftfeuchtigkeit) gehalten. Der Injektionserfolg wurde nach 6 h, 24 h, 48 h und 96 h überprüft. Das Überleben der Tiere in den Käfigen wurde jeden Tag überprüft.

Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden die Tiere mit einer Pinzette aus dem Käfig gefangen, in Metallröhrchen eingespannt und unter gekühltem PFA wurde das Gehirn aus der Kopfkapsel herauspräpariert (2.2.1). Nach Fixierung über Nacht wurden die Gehirne mehrmals in PBS gespült (4 × 20 min, RT) und in einer Alkoholreihe entwässert (Ethanol 30%, 50%, 70%, 90%, absolut (2 ×); je 10 min). Nach Aufklaren der Gehirne in Methylsalicylat wurden sie unter dem Mikroskop auf Fluoreszenzanfärbung überprüft (s. 2.2.5). Zur besseren Dokumentation wurde ein Teil der Gehirne anschließend in einer Alkoholreihe rehydriert, in Gelatine eingebettet und Vibratomschnitte hergestellt (Behandlung wie in 2.2.1).

### **2.4.2 Reinigung und Trennung von Nukleinsäuren**

#### *Phenol-Chloroform-Extraktion*

RNA- und DNA-Lösungen wurden durch eine Phenol-Chloroform-Extraktion von Verunreinigungen wie Proteinen oder Membranbestandteilen befreit. Dazu wurde die Lösung mit mindestens dem gleichen Volumen einer 1:1-Mischung aus 1 × TE-gesättigtem Phenol und Chloroform versetzt. Die Phasen wurden gemischt (Vortex) und durch Zentrifugation

(16000 × g, 3 min, RT) wieder getrennt. Gegebenenfalls wurde der wässrige Überstand abgenommen und der Vorgang wiederholt. Anschließend wurde der wässrige Überstand mit mindestens dem gleichen Volumen Chloroform gereinigt, um Phenolreste zu entfernen. Die Lösung wurde erneut zentrifugiert und anschließend die RNA bzw. DNA in der wässrigen Phase mit Ethanol präzipitiert.

### *Ethanol-Präzipitation*

Die RNA- bzw. DNA-Lösung wurde mit 0,3 M LiCl und mindestens dem 2-fachen Volumen Ethanol (abs.) versetzt. Die DNA-Lösungen wurden sofort zentrifugiert (19000 × g, 20 min - 1h, 4°C). Bei RNA-Lösungen wurden die Nukleinsäuren bei – 20°C präzipitiert (mindestens 15 min) und durch anschließende Zentrifugation (19000 × g, 1h, 4°C) pelletiert. Das Pellet wurde mit 70% Ethanol gewaschen und nach erneuter Zentrifugation (19000 × g, 5 min, 4°C) entweder bei 30°C im Heizblock oder im Ölpumpenvakuum (SpeedVac) getrocknet. Zur Aufbewahrung wurde das Pellet in 20 µl TE-Puffer resuspendiert und bei -20°C gelagert.

### *Agarose-Gel-Elektrophorese*

Nukleinsäuren wurden in einem Spannungsfeld in einem Agarosegel der Größe nach aufgetrennt. Dazu wurde ein Agarosegel aus 2% (w/v) Agarose in 1 × TBE (50 mM Tris/Borsäure, pH 7,8; 1 mM EDTA, pH 8,0) hergestellt und mit 1 µg/µl Ethidiumbromid versetzt, um DNA-Fragmente im UV-Licht sichtbar zu machen. Je 5 µl der Probe wurden mit 2 µl Probenpuffer (100 mM EDTA; 20% (w/v) Ficoll 400; 0,01% (w/v) Bromphenolblau; 0,01% (w/v) Xylencyanol) versetzt und in die Taschen des Gels gefüllt. Als Laufpuffer wurde 1 × TBE verwendet; die angelegte Spannung betrug ca. 100 V. Als DNA-Größenstandard wurde ein λ-DNA/EcoRI+HindIII-Standard (0,5 µg/µl, MBI Fermentas) benutzt. Die Fragmentgrößen dieses Standards waren 21226, 5148, 4973, 4268, 3530, 2027, 1904, 1584, 1375, 947, 831, 564 und 125 Bp.

Durch Betrachtung des Ethidiumbromid-behandelten Gels unter UV-Licht (Transilluminator TI 2, Biometra), und Vergleich der fluoreszierenden Nukleinsäure-Banden mit dem DNA-Größenstandard konnte entschieden werden, ob die Nukleinsäure-Fragmente in den Proben der erwarteten Größe entsprachen.

### 2.4.3 Herstellung doppelsträngiger RNA (dsRNA)

#### *Transformation und Amplifikation*

Die vollständige cDNA des *Amtyr1*-Gens lag in einem pBluescript SK<sup>-</sup>-Vektor vor und wurde von Dr. W. Blenau (Universität Potsdam) zur Verfügung gestellt. Die Plasmide wurden per Hitzeschock-Transformation in kompetente XL-1-*Escherichia coli*-Zellen transformiert. Dazu wurden 60 ng des Plasmids auf 200 µl einer Lösung kompetenter Zellen gegeben, 5 min auf Eis und 15 min bei 4°C inkubiert. Durch einen Hitzeschock (42°C, 100 s) wurden die Zellen permeabel und konnten die Plasmide aufnehmen. Anschließend wurden die Zellen in 2 ml LB-Medium (pro Liter H<sub>2</sub>O: 10 g Ptrypton, 10 g NaCl, 5 g Hefeextrakt, pH 7, autoklaviert) für 1 h bei 37°C auf einem Schüttler inkubiert, auf Amp<sup>+</sup>-Agarplatten ausgestrichen und über Nacht bei 37°C inkubiert. 2 ml LB-Amp<sup>+</sup>-Medium wurden mit einer Kolonie beimpft, über Nacht bei 37°C auf einem Schüttler inkubiert und die Zellen anschließend durch Zentrifugation (14000 x g, 5 min, 4°C) pelletiert.

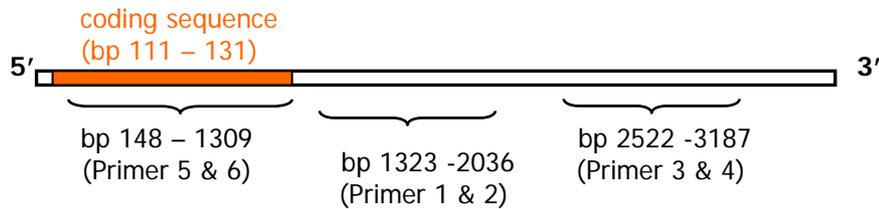
#### *Mini-Plasmid-Präparation (nach Birnboim & Doly 1979)*

Das Pellet wurde in 100 µl Lösung I (50 mM Glucose, 25 mM Tris-HCl (pH 8,0), 10 mM EDTA) resuspendiert und die Zellen durch Zugabe von 200 µl Lösung II (0,2 M NaOH, 1% SDS) 5 min. bei RT lysiert. Anschließend wurden SDS, Proteine und hochmolekulare DNA durch Zugabe von 150 µl Lösung III (5 M Kalium-Acetat, pH 4,8) für 5 Minuten auf Eis gefällt. Nach Zentrifugation (15 min, 4°C) wurde der Überstand abgenommen und die Nukleinsäuren mit dem 2,5-fachen Volumen Ethanol (abs.) für 30 min bei -20°C gefällt (s. 2.4.2 EtOH-Präzipitation). Nach erneuter Zentrifugation (20 min, 4°C) wurde das Pellet mit Ethanol (70%) gewaschen, getrocknet und in 30 µl Wasser aufgenommen. Die Identität des amplifizierten Plasmids wurde über Fragmentlängen nach EcoRI-Restriktion (6 µl der Probe mit 4 µl RNase, 4 µl EcoRI-Restriktionsenzym, 4 µl Puffer und 24 µl Wasser, 1h, 37°C) in einer Agarose-Gelelektrophorese (s. 2.4.2) überprüft.

#### *Polymerase-Kettenreaktion (PCR)*

Es wurden 3 Abschnitte der *Amtyr1*-Sequenz auf dem Plasmid in einer Polymerase-Kettenreaktion (PCR) mit einer Pwo-DNA-Polymerase amplifiziert (Abb. 3). Als Primer dienten die in Tab. 1 aufgeführten Oligonucleotide. Die Primer waren an den jeweiligen 5'-Enden zusätzlich mit einer 20 Bp langen T7-Promotorsequenz ausgestattet. Mit dem Primerpaar #1 und #2 wurde ein 714 Bp langes DNA-Fragment, mit den Primern #3 und #4

ein 666 Bp langes und mit den Primern #5 und #6 ein 1162 Bp langes DNA-Fragment amplifiziert. Die PCR-Fragmente enthielten die Sequenzinformation der cDNA-Bereiche Bp 1323-2036 (Primer #1 und #2), Bp 2522-3187 (Primer #3 und #4) und Bp 148-1309 (Primer #5 und #6) (Sequenzbereiche s. Anhang).



**Abbildung 3:** Schematische Darstellung der Amtyr1-cDNA mit amplifizierten Abschnitten .

**Tabelle 1:** Primer zur Amplifikation von Amtyr1-DNA-Fragmenten aus dem pBluescript SK<sup>-</sup>-Vektor. Unterstrichene Bereiche kennzeichnen die Promotorsequenz für die T7-RNA-Polymerase.

Primer	Sequenz (5'→3')
#1	<u>TAATACGACTCACTATAGGGGGCAACGCTTGT</u> TTATTGC
#2	<u>TAATACGACTCACTATAGGGGAATGGAACGACTTCGGATC</u>
#3	<u>TAATACGACTCACTATAGGGGTATAACAAGCACGTGTG</u>
#4	<u>TAATACGACTCACTATAGGGGAGCTTCCTTTCTTTGC</u>
#5	<u>TAATACGACTCACTATAGGGAGGACTACGACATGACAG</u>
#6	<u>TAATACGACTCACTATAGGGCAACGAATGCGCAACAAC</u>

Ein PCR-Ansatz enthielt jeweils 0,2 µg Matrizen-cDNA, 2,5 U SAWADY-Pwo-DNA-Polymerase (Peqlab), je 100 nM Primer (Sigma-Genosys), je 200 µM dNTP's (Peqlab), 1 × Reaktionspuffer (Peqlab) und 2 mM MgSO<sub>4</sub> und wurde mit Wasser (RNase-frei) auf 50 µl aufgefüllt. Der Ablauf der PCR ist in Tab. 2 wiedergegeben.

**Tabelle 2:** Ablauf der PCR zur Amplifikation der Amtyr1-cDNA-Fragmente aus dem pBluescript SK<sup>-</sup>-Vektor.

Schritt	Temperatur	Zeit	Anzahl Zyklen
Denaturierung	94°C	2 min	1
Denaturierung	94°C	25 s	3
Hybridisierung	52°C	30 s	
Elongation	72°C	75 s	
Denaturierung	94°C	25 s	25
Hybridisierung	68°C	30 s	
Elongation	72°C	75 s	
Elongation	72°C	3 min	1
Kühlung	4°C	-	

Durch ihre 3'→5'-Exonuklease-Aktivität („proofreading“) weist die Pwo-Polymerase eine besonders niedrige Fehlerrate auf. Die PCR-Produkte für die 3 Primerpaare wurden gelelektrophoretisch auf die Amplifikation von Fragmenten der erwarteten Größe kontrolliert (s. 2.4.2).

### *Reinigung der DNA aus dem PCR-Produkt*

Die DNA wurde mit Hilfe des Mini-Elute-PCR-Purification-Kits (Qiagen) nach Herstellerangaben aus dem PCR-Produkt eluiert. Dabei wurde DNA in Anwesenheit hoher Salzkonzentrationen an Silikagel-Partikel einer Säule (Qiagen) gebunden, während dNTP's, Polymerase, Primer und andere Verunreinigungen ausgewaschen wurden. Das in 10µl Wasser gelöste Elutionsprodukt wurde einer Phenol-Chloroform-Extraktion unterzogen und mit Ethanol präzipitiert (s. 2.4.2). Nach Zentrifugation wurde die gefällte DNA in 10 µl Wasser (RNase-frei) resuspendiert und bei -20°C aufbewahrt. Ein Aliquot der gereinigten DNA-Proben wurde in einer Gelelektrophorese aufgetragen, um die Konzentration der Fragmente abschätzen zu können.

### *Transkription der DNA mit T7-RNA-Polymerase und Aufreinigung*

Die DNA-Fragmente aus den PCR mit den 3 Primerpaaren wurden durch Transkription mit einer T7-RNA-Polymerase in RNA umgeschrieben. Dazu wurde das Megascript RNAi Kit (Ambion) nach Herstellerangaben verwendet. In einem PCR-Ansatz befanden sich ca. 1 µg der jeweiligen Matrizen-DNA, 1× T7-Reaktionspuffer (Ambion), je 7,5 mM dNTP's (Ambion) und 2 µl T7 Enzym-Mix, der die T7 RNA-Polymerase enthielt. Die Ansätze

wurden mit Wasser (RNase-frei) auf 20 µl aufgefüllt, gemischt und 3 h lang bei 37°C inkubiert. Um eine optimale Hybridisierung der komplementären Stränge zu erreichen, wurden die Ansätze für 5 min bei 70°C inkubiert und dann auf Raumtemperatur heruntergekühlt. Ein Aliquot aus jedem Ansatz wurde auf ein 1%-Agarosegel aufgetragen, um die Reinheit der Produkte zu überprüfen. In einem DNase/RNase-Verdau (Ambion) wurden verbleibende Nukleotid-Verunreinigungen wie Matrizen-DNA und ssRNA entfernt. In einem abschließenden Schritt wurde die dsRNA durch Zentrifugation durch eine Membran von Proteinen, freien Nukleotiden und Abbauprodukten gereinigt. Die dsRNA wurde mit Injektionspuffer (10 mM Tris-HCl (pH 7,5) 0,1 mM EDTA, RNase-frei) aus dem Membranfilter ausgewaschen. Die Menge und Qualität der Elutionsprodukte wurde photometrisch (Absorption bei 260 nm, s. 2.4.9) und gelelektrophoretisch überprüft (s. 2.4.2). Die Konzentration wurde abschließend normalisiert und betrug schließlich für alle Produkte 1 µg/µl (sowohl für die Rezeptor-dsRNA- als auch für die eGFP-dsRNA-Lösung). Die eGFP-dsRNA-Lösung wurde von S. Knapinski (HU Berlin) zur Verfügung gestellt.

### 2.4.4 Injektion der dsRNA in das Gehirn und Inkubation

Injektionen wurden in frisch geschlüpfte Bienen (Juli 2005) und in Winterbienen (Dezember 2005) durchgeführt (s. 2.4.1). Es wurden jeweils 0,5 µl der in 2.4.3 hergestellten dsRNA-Lösungen bzw. TE-Puffer injiziert.

Die Versuchstiere waren auf 4 Gruppen aufgeteilt:

1. Injektion von dsRNA des *Amtyr1*-Gens = „*Amtyr1*-dsRNA-injizierte Tiere“ (frisch Geschlüpfte: n = 95; Winterbienen: n = 60)
2. Injektion von dsRNA des enhanced Green Fluorescent Protein-Gens (eGFP; 1 µg/µl) = „eGFP-dsRNA-injizierte Tiere“. Das GFP-Gen kommt im Genom von *A. mellifera* nicht vor – eine Injektion von eGFP-RNA dient somit als RNA-injizierte Kontrolle (frisch Geschlüpfte: n = 95; Winterbienen: n = 60)
3. Injektion von Injektionspuffer (10 mM Tris-HCl (pH 7,5) 0,1 mM EDTA, RNase-frei) = „Puffer-injizierte Tiere“ (frisch Geschlüpfte: n = 82; Winterbienen: n = 60)
4. keine Injektion = „unbehandelte Tiere“ (frisch Geschlüpfte: n = 128; Winterbienen: n = 60)

Nach Injektion wurde mit den Tieren wie in 2.4.1 weiter verfahren. Es wurden 20 – 30 Bienen pro Käfig gehalten. Um die Inkubationsbedingungen zu optimieren, wurden die Käfige mit frisch geschlüpfte Bienen in ein großes Bienenvolk gestellt. Winterbienen wurden während

der Inkubation in einem Brutschrank (34°C) gehalten. Die Inkubationszeit betrug 4 Tage. Das Überleben der Tiere in den Käfigen wurde täglich überprüft.

### **2.4.5 Modulation der gustatorischen Schwellen durch dsRNA-Injektion**

Die Versuchstiere wurden mit einer Pinzette aus dem Käfig entnommen und in Messingröhrchen eingespannt (2.1.2). Nach einer Erholungsphase von 1 h wurde die gustatorische Empfindlichkeit der Tiere mit Hilfe der Proboscis Extension Response bestimmt (s. 2.1.3). Danach wurden die Köpfe der Tiere abgetrennt, in Eppendorf-Röhrchen in flüssigem Stickstoff tiefgefroren und bis zur weiteren Verarbeitung bei -80°C gelagert. Eine Auswahl aus jeder Versuchsgruppe wurde anschließend auf die *Amtyr1*-mRNA-Menge mit Hilfe einer quantitativen real time-PCR untersucht.

### **2.4.6 Statistische Auswertung der Daten**

Als Maß für den Effekt der dsRNA-Injektion auf die PER wurden die GRS für die verschiedenen Behandlungsgruppen verglichen. Beim Vergleich der frisch geschlüpften Bienen gingen 119 unbehandelte, 85 eGFP-dsRNA-injizierte, 73 *Amtyr1*-dsRNA-injizierte und 71 Injektionspuffer-injizierte Tiere in die Auswertung ein. Beim Vergleich der Winterbienen gingen 39 unbehandelte, 20 eGFP-dsRNA-injizierte, 20 *Amtyr1*-dsRNA-injizierte und 34 Puffer-injizierte Tiere in die Auswertung ein. Die Daten für die GRS in den Gruppen waren nicht normalverteilt ( $p < 0,05$ ; D'Agostino & Pearson Omnibus Normality Test). Es wurde daher zunächst mit Hilfe des nichtparametrischen Kruskal-Wallis-Tests geprüft, ob signifikante Unterschiede zwischen den Behandlungsgruppen bestehen. Danach wurden mit dem Dunn's Multiple Comparison Post-Test die einzelnen Behandlungsgruppen miteinander auf signifikante Unterschiede verglichen. Zusätzlich wurde die *Amtyr1*-dsRNA-injizierte Gruppe mit Hilfe des Mann-Whitney-Tests mit den einzelnen Kontrollgruppen paarweise verglichen. Obwohl die Daten für die GRS nicht normalverteilt sind, werden in den Abbildungen ihre Mittelwerte mit Standardfehlern dargestellt, da die Medianwerte ganzzahlig sind und durch ihre Darstellung Unterschiede zwischen den Behandlungsgruppen nicht zum Ausdruck kommen.

### **2.4.7 Präparation der RNA aus Bienenköpfen**

Die Gesamt-RNA wurde mit der AGPC-Methode („acid guanidinium-phenol-chloroform“; Chomczynski & Sacchi, 1987) isoliert.

Die gefrorenen Köpfe wurden mit 4 M Guanidinhydrochlorid, 25 mM Natriumcitrat, 0,5% N-Laurylsacosinlösung und 100 mM  $\beta$ -Mercaptoethanol versetzt und in dieser Lösung mit einem Mörser homogenisiert. Cuticulareste wurden mit einem Clearspin ( $3000 \times g$ , 2 min, RT) abzentrifugiert und der Überstand zwei Mal einer Phenol-Chloroform-Extraktion unterzogen, um die Lösung von Verunreinigungen wie Proteinen oder Membranbestandteilen zu befreien (s. 2.4.2). Die RNA im Überstand wurde mit Ethanol über Nacht präzipitiert (s. 2.4.2). Nach Zentrifugation wurde das Pellet im Heizblock getrocknet und sofort für die Erststrangsynthese weiterverarbeitet.

### **2.4.8 Erststrangsynthese: Umschreiben von mRNA in Einzelstrang-cDNA (sscDNA)**

Die Gesamt-RNA wurde mit reverser Transkriptase und Oligo-dT-Primern in Einzelstrang-cDNA (sscDNA) umgeschrieben.

Die RNA und 0,5  $\mu$ g Oligo(dT)<sub>12-18</sub>-Primer (Invitrogen) wurden in 10  $\mu$ l H<sub>2</sub>O (DEPC-behandelt) für 10 min im 60°C-Wasserbad inkubiert. Die Primer-Hybridisierung erfolgte für 2 min auf Eis. Für die cDNA-Synthese wurden zu jeder Probe 25 nmol dNTP-Mix (Amersham), 46 U RNA Guard (Amersham), 1  $\times$  Umschreibepuffer (Invitrogen), 0,5 nmol Dithiothreitol und 500 U M-MLV Reverse Transkriptase (Invitrogen) gegeben, mit H<sub>2</sub>O auf ein Endvolumen von 50  $\mu$ l aufgefüllt und für 1 h bei 37°C inkubiert. Die sscDNA wurde zwei Mal einer Phenol-Chloroform-Extraktion unterzogen (s. 2.4.2) und anschließend zwei Mal mit Chloroform gereinigt, um Phenolreste zu entfernen. Die DNA in der wässrigen Phase wurde mit Ethanol (abs.) gefällt (Zentrifugation  $19000 \times g$ , 1 h, 4°C). Schließlich wurde das Pellet im Ölpumpenvakuum getrocknet, in 20  $\mu$ l TE-Puffer resuspendiert und bei -20°C gelagert.

### **2.4.9 Herstellung von Amtyr1- und $\beta$ -Aktin-DNA-Fragmenten: PCR (Polymerase-Kettenreaktion) und Gelelektrophorese**

Mit 2 zufällig ausgewählten Proben wurde eine PCR durchgeführt, um Amtyr1- und  $\beta$ -Aktin-DNA-Fragmente herzustellen, die bei der quantitativen real-time PCR als Standards benötigt wurden. Als Primer wurden die Oligonukleotide #4082 (5'-Primer) und #4083 (3'-Primer) zur Herstellung des Amtyr1-Fragmentes und die Oligonukleotide #4006 (5'-Primer) und #4007 (3'-Primer) zur Herstellung des  $\beta$ -Aktin-Fragmentes verwendet (Tab. 3) (Herstellung der Primer: operon). Die Länge der zu amplifizierenden Fragmente betrug 152 Bp (Amtyr1) bzw. 151 Bp ( $\beta$ -Aktin). Die PCR-Fragmente sollten die Sequenzinformation der cDNA-Bereiche

Bp 2397-2548 (*Amtyr1*) und Bp 158-308 ( $\beta$ -Aktin) enthalten (Nucleinsäuresequenzen im Anhang).

**Tabelle 3:** Primer zur Amplifikation der PCR-Fragmente  $\beta$ -Aktin und *Amtyr1*

Primer	Sequenz (5'→3')
#4006	CCTATGTTGGTGACGAAGCCC
#4007	GGATGTTCCCTCGGGAGCCAC
#4082	GAAGAACTCTTCTCGTCGCCAA
#4083	ACACACGTGCTTGTATACCACC

Da die Primer in der PCR in einer definierten Konzentration eingesetzt werden müssen, wurde ihre Konzentration photometrisch bestimmt. Dazu wurden sie in  $1 \times$  TE-Puffer verdünnt und ihre Absorption bei 260 nm in einer Quarz-Küvette (Schichtdicke 1 cm) im Photometer (Pharmazia Biotech Ultraspec 3000 UV/Visible Spectrometer) gegen  $1 \times$  TE-Puffer gemessen. Bei der Berechnung der Konzentrationen wurde für Oligonukleotide bei einer  $OD_{260} = 1$  eine Konzentration von 33  $\mu\text{g/ml}$  zugrunde gelegt.

Die PCR wurde mit dem Thermoprime Plus DNA Polymerase System (ABgene) mit einem T3000 Thermocycler (Biometra) durchgeführt. Der PCR-Ansatz (je 50  $\mu\text{l}$ ) enthielt 1  $\mu\text{l}$  der Probe mit der Matrizen-DNA, je 1  $\mu\text{l}$  der beiden jeweiligen Primer (20 pM/Primer), dNTP's (0,4 mM), 1,25 mM  $\text{MgCl}_2$ ,  $1 \times$  Polymerase-Puffer und 2,5 U Thermoprime Polymerase (ABgene). Als Negativkontrolle wurde Wasser anstelle einer Probe verwendet. Der Ablauf der PCR ist in folgender Tabelle (4) wiedergegeben:

**Tabelle 4:** Ablauf der PCR zur Amplifikation der  $\beta$ -Aktin- und *Amtyr1*-Fragmente

Schritt	Temperatur	Zeit	Anzahl Zyklen
Denaturierung	94°C	2 min	1
Denaturierung	94°C	25 s	45
Hybridisierung	62°C	30 s	
Elongation	72°C	20 s	
Elongation	72°C	1 min	1
Kühlung	8°C		

Die PCR-Produkte wurden in einem Agarosegel aufgetrennt (s. 2.4.2). Durch Vergleich mit dem DNA-Größenstandard kann entschieden werden, ob die amplifizierten Produkte in ihrer Größe dem  $\beta$ -Aktin- bzw. dem *Amtyr1*-Fragment entsprechen.

Die Banden wurden mit einem Skalpell aus dem Gel ausgeschnitten und die DNA-Fragmente mit einem Kit (Qiaex, Qiagen) nach Herstellerangaben eluiert. Dabei wurde die Agarose gelöst und die Nukleinsäuren in Anwesenheit hoher Salzkonzentrationen an Silikagel-Partikel gebunden. Verunreinigungen wie Agarose, Proteine, Ethidiumbromid und Salze blieben im Überstand gelöst und konnten abgenommen werden. Die DNA wurde dann mit Wasser ausgewaschen, die Silikagel-Partikel durch Zentrifugation pelletiert und die DNA-Fragmente mit dem Überstand abgenommen.

### **2.4.10 Herstellung der Standardreihen aus den *Amtyr1*- und $\beta$ -Aktin-DNA-Fragmenten**

Die Konzentration der Eluationsprodukte wurde photometrisch bestimmt. Dabei wurde für doppelsträngige DNA bei einer  $OD_{260} = 1$  eine Konzentration von 50  $\mu\text{g/ml}$  zugrunde gelegt. Aus den beiden Proben wurde durch geeignete Verdünnung mit Wasser (RNase-frei) je eine Lösung hergestellt, die  $10^7$  Kopien des jeweiligen Fragmentes enthielt. Diese Lösung wurde in 7 Schritten nacheinander 1:10 verdünnt, so dass in der letzten Verdünnungsstufe  $10^0$ , also praktisch kein Fragment mehr vorlag. Diese 8 Verdünnungsstufen mit je einer definierten Anzahl von Fragmenten wurde bei der real-time PCR als Standardreihe für *Amtyr1* bzw.  $\beta$ -Aktin eingesetzt.

### **2.4.11 quantitative real-time PCR (qRT-PCR)**

Die Menge an  $\beta$ -Aktin- und *Amtyr1*-DNA-Fragmenten in jeder Bienenkopf-Probe wurde in einer qRT-PCR durch den Vergleich mit der jeweiligen Standardreihe ermittelt. Dazu wurde der Master Mix aus dem QuantiTect SYBR Green PCR Kit (Qiagen) verwendet. Er enthält eine HotStarTaq DNA-Polymerase, QuantiTect SYBR Green PCR Puffer (Tris-Cl, KCl,  $(\text{NH}_4)\text{SO}_4$ , 5 mM  $\text{MgCl}_2$ , pH 8,7), einen dNTP-Mix und SYBR Green I als Fluoreszenzfarbstoff. SYBR Green I bindet an alle dsDNA-Moleküle und sendet im gebundenen Zustand bei einer Anregung von 494 nm fluoreszierendes Licht der Wellenlänge 521 nm aus. 10  $\mu\text{l}$  des Master Mix wurden mit 2  $\mu\text{l}$  der Probe mit der Matrizen-DNA und je 1  $\mu\text{l}$  der jew. Primer gemischt und mit Wasser (RNase-frei) auf 20  $\mu\text{l}$  aufgefüllt.

Die Reaktionen wurden in spezielle Kapillaren (LightCycler Capillaries, Roche) im LightCycler (Roche) durchgeführt. Der Ablauf der qRT-PCR ist in folgender Tabelle (5) dargestellt:

**Tabelle 5:** Ablauf der qRT-PCR

Programm	Schritt	Temperatur	Zeit	Zyklen	Detektion
Vorinkubation	Denaturierung	95°C	1 min	1	-
Amplifikation	Denaturierung	95°C	10 s	50	-
	Annealing	63°C	20 s		-
	Amplifikation	72°C	25 s		-
	Messung	72-86°C	-		einfach
Schmelzkurve	Denaturierung	95 °C	0 s	1	-
	Annealing	65°C	15 s		-
	Aufschmelzen	65 → 95°C	0,1°C/s		kontinuierlich
Kühlung		40°C	30 s		-

#### 2.4.12 Auswertung der qRT-PCR durch die LightCycler Software

In der Amtyr1- und der  $\beta$ -Aktin-Standardreihe liegt eine definierte Anzahl des jeweiligen Fragmentes vor. Mit Hilfe dieser Standardreihen wird je eine Kalibrierungsgerade erstellt. Trägt man die bei jedem Zyklus der qRT-PCR gemessene Fluoreszenz gegen die Zyklusnummer auf, ergibt sich eine sigmoide Kurve mit 3 typischen Bereichen: 1. die Hintergrundphase, in der die Konzentration des amplifizierten PCR-Produktes gering und daher lediglich eine Hintergrund-Fluoreszenz zu messen ist. 2. die exponentielle Phase, in der das PCR-Produkt akkumuliert und die Fluoreszenz des Farbstoffes exponentiell zunimmt. 3. die Plateau-Phase, in der die Effizienz der PCR abnimmt und die Produktmenge stagniert, das Fluoreszenzsignal daher konstant bleibt. Berechnet man die 2. Ableitung einer solchen sigmoiden Kurve, zeigt das Maximum der 2. Ableitung den Punkt an, an dem die Kurve von der Hintergrundphase in die exponentielle Phase übertritt. Die Zyklusnummer, bei der das Maximum der 2. Ableitung liegt, nennt man Crossing Point (CP-Wert). Der CP-Wert ist ein individueller Wert für jede Reaktion. Trägt man den CP-Wert für jede Probe der Standardreihe gegen die Ausgangskonzentration an DNA-Fragmenten in der Probe gegeneinander auf, so erhält man eine Kalibrierungsgerade mit charakteristischer Steigung. Die Steigung hängt ab von der Effizienz der Reaktion. Bei einer optimalen Effizienz von 2 (d.h. die DNA-Menge verdoppelt sich bei jedem Zyklus) beträgt die Steigung – 3,3. Mit Hilfe dieser Kalibrierungsgeraden wird die DNA-Ausgangskonzentration in den Proben quantifiziert.

### 2.4.13 Standardisierung der gemessenen Werte

Die Genauigkeit der durch die qRT-PCR ermittelten Werte für die cDNA-Konzentrationen in den Proben wurde von verschiedenen Faktoren beeinflusst. Die Qualität der Präparation und der Aufarbeitung der Proben, die Effizienz der PCR, die Konzentration der Primer sowie die Qualität der Standardreihen hatten einen Einfluss auf das Ergebnis. Um den Einfluss solcher Faktoren zu minimieren, wurden die gemessenen absoluten Werte relativiert.

1. Da die Effizienz der qRT-PCR-Reaktionen zwischen den einzelnen Durchgängen variierte, wurden alle Reaktionen auf eine Effizienz von 2 normiert. Mit der Formel

$$\text{Effizienz} = 10^{(-1/\text{Steigung})}$$

wurde aus der Steigung die Effizienz berechnet und die gemessene cDNA-Konzentration für eine Effizienz von 2 umgerechnet.

2. In jeder Probe wurde neben einem Fragment aus dem *Amtyr1*-Gen auch ein Fragment aus dem  $\beta$ -Aktin-Gen quantitativ amplifiziert. Da  $\beta$ -Aktin für grundlegende Vorgänge wie Zellteilung oder Verschiebung von Organellen in jeder Zelle ständig gebraucht wird, wird davon ausgegangen, dass es konstitutiv exprimiert wird und individuelle Unterschiede zwischen einzelnen Tieren gering sind („housekeeping gene“). Daher wird für jede Probe das Verhältnis der *Amtyr1*- zur  $\beta$ -Aktin-Expression bestimmt, um Unterschiede in der Verarbeitung der einzelnen Proben zu kontrollieren.
3. Um auch individuelle Unterschiede zwischen den Tieren in der  $\beta$ -Aktin-Expression zu kontrollieren, wurde für jede Probe die Gesamt-Proteinmenge bestimmt und die *Amtyr1*-Expression zusätzlich auf den Proteingehalt normiert.

### 2.4.14 Proteinbestimmung

Die Proteinbestimmung erfolgte mit der Amidoschwarz-Methode. Nach dem Homogenisieren der Bienenköpfe (s. 2.4.7), wurde aus jeder Probe ein Aliquot für die Proteinbestimmung entnommen. Zu 2  $\mu$ l der Probe wurden 20  $\mu$ l SDS (10% w/v), 30  $\mu$ l Tris-HCl/1% SDS (pH 7,5) und 60  $\mu$ l TCA (104% w/v) gegeben und mit Wasser auf ein Gesamtvolumen von 310  $\mu$ l aufgefüllt. Als Kontrolle wurde eine BSA Standardreihe mit definierten Proteinmengen (0 – 5  $\mu$ g) eingesetzt. Nach Inkubation (30 min, RT) wurden 200  $\mu$ l dieser Lösung langsam auf einen mit 6% TCA getränkten Miliporefilter (45  $\mu$ m Porengröße, Typ HA), welcher auf der Fritte einer Saugflasche lag, pipettiert. Der Filter wurde erneut mit TCA (6%) gewaschen, um die Proteine zu präzipitieren. Für die Farbreaktion wurde der Filter anschließend für ca. 10 min in Amidoschwarz-Färbelösung (45% Methanol, 10% Essigsäure, 45% H<sub>2</sub>O, 0,5% (w/v))

Amidoschwarz) inkubiert und anschließend mehrmals mit deionisiertem Wasser gewaschen. Schließlich wurde der Filter 30 min unter häufigem Vortexen in Amidoschwarz-Entfärbelösung (50% Ethanol, 25 mM NaOH, 50  $\mu$ M EDTA) ausgewaschen, die Proben in Küvetten überführt und die Absorption der Lösung bei 630 nm im Photometer gemessen. Durch einen Abgleich mit der BSA-Kalibrierungsgeraden wurde aus der Absorption die Proteinkonzentration der Proben bestimmt.

### 2.4.15 Statistische Auswertung der Daten

Als Maß für die *Amtyr1*-mRNA-Menge wird also für jede Probe das mRNA-Verhältnis der Menge des *Amtyr1*-Fragments zu der des  $\beta$ -Aktin-Fragments bestimmt und dann auf die Proteinmenge der jeweiligen Probe normiert („relative mRNA-Menge“). Es wurden die *Amtyr1*-mRNA-Mengen von 12 unbehandelten, 12 eGFP-dsRNA-injizierten, 13 *Amtyr1*-dsRNA-injizierte und 15 Injektionspuffer-injizierte Tiere bestimmt und ausgewertet. Es handelte sich dabei um Versuchstiere, die im vorhergehenden Versuch nach Injektion von dsRNA bzw. Injektionspuffer bereits auf ihre gustatorische Empfindlichkeit getestet wurden. Bei der Auswahl der Tiere wurde darauf geachtet, dass die mittlere gustatorische Empfindlichkeit in den Versuchsgruppen erhalten blieb. Die Daten für die rel. mRNA-Menge in den Gruppen waren z.T. nicht normalverteilt ( $p < 0,05$ ; D'Agostino & Pearson Omnibus Normality Test). Es wurde daher zunächst mit Hilfe des nichtparametrischen Kruskal-Wallis-Tests geprüft, ob signifikante Unterschiede zwischen den Behandlungsgruppen bestehen. Danach wurden mit dem Dunn's Multiple Comparison Post-Test die einzelnen Behandlungsgruppen miteinander auf signifikante Unterschiede verglichen.

## 2.5 Lokomotorische Aktivität und phototaktisches Verhalten

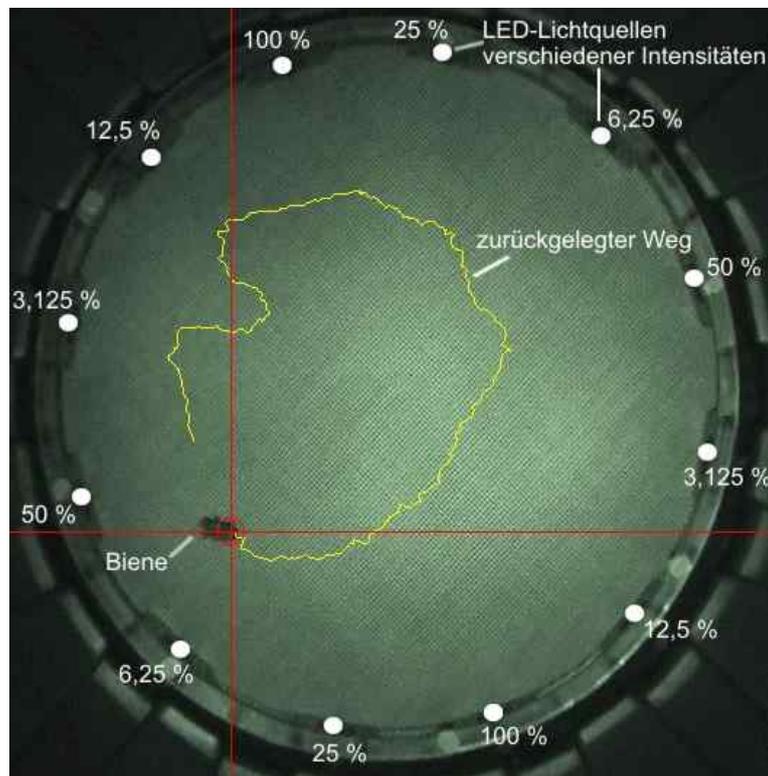
In Verhaltensversuchen wurden die lokomotorische und die phototaktische Aktivität von Sammlerinnen getestet. In einem ersten Versuch wurde der pharmakologische Effekt einer systemischen Applikation von OA bzw. TA auf die spontane lokomotorische Aktivität sowie das phototaktische Verhalten von Nichtpollensammlerinnen getestet. In einem zweiten Versuch wurden die gleichen Parameter bei unbehandelten Pollen- und Nichtpollensammlerinnen untersucht, um zu testen, ob diesbezüglich intrinsische

Unterschiede zwischen den beiden Sammlertypen bestehen. Beide Versuche wurden unter Berücksichtigung der gustatorischen Empfindlichkeiten der Versuchstiere durchgeführt.

### **2.5.1 Pharmakologie: Versuchsablauf**

Nichtpollensammlerinnen wurden in Messingröhrchen eingespannt und bis zum Versuchsbeginn in einer feuchten Kammer aufbewahrt. Nach einer Gewöhnungsphase von 30 min wurden die Tiere mit 30% (w/v) Sucroslösung satt gefüttert. Weiteres Füttern erfolgte ca. alle 60 min bis max. 1 h vor Versuchsbeginn. Mit Hilfe der PER wurden die gustatorischen Empfindlichkeiten (GRS) der Tiere ermittelt (s. 2.1.3). Anschließend wurde einem Versuchstier 1  $\mu$ l einer OA-, TA- oder Kontroll-Lösung in den Thorax injiziert. Nach einer Inkubationszeit von 25 min wurde der GRS des Tieres erneut bestimmt. Anschließend wurden der Biene die Flügel etwa zur Hälfte abgeschnitten, um zu verhindern, dass sie später in der Versuchsanordnung fliegen konnte. Dann wurde das Tier aus dem Messingröhrchen befreit und in eine Plastikbox (11 x 11 x 8 cm) gesetzt, wo sie sich frei bewegen und sich von der Fixierung erholen konnte. Nach 5 min wurde das Tier aus der Plastikbox entnommen und in die Versuchsanordnung gesetzt. Dabei handelte es sich um eine runde, dunkle Arena mit einem Durchmesser von 28,5 cm, in der die Tiere frei umherlaufen konnten (Abbildung 4). In die Wand dieser Dunkelarena waren 3 cm über dem Boden grüne LED-Lichtquellen ( $\lambda = 520$  nm) eingefügt, deren Intensitäten mit Hilfe von Graufiltern in 6 verschiedenen Intensitätsstufen abgestuft wurden (3,125%, 6,25%, 12,5%, 25%, 50% und 100%). 100% entsprachen dabei einer Helligkeit von 350 lx (gemessen direkt an der LED mit 351 Power Meter, United Detector). Lichtquellen der gleichen Intensität waren jeweils einander gegenüber angebracht. Um ein Hochklettern der Tiere an den Seiten zu verhindern, war in 7 cm Abstand über dem Boden ein Gitter angebracht, das die gesamte Versuchsarena überspannte. Nach dem Einsetzen der Tiere in die Arena folgte eine 3-minütige Eingewöhnungsphase im Dunkeln. Versuchstiere, die während dieser Phase keine Aktivität zeigten, wurden vom Versuch ausgeschlossen. Während der letzten 30 s dieser Dunkelphase wurde die spontane lokomotorische Aktivität des Versuchstiers aufgenommen. Dazu wurde die Wegstrecke gemessen, die ein Tier in dieser Zeit zurücklegte. Nach der Dunkelphase wurde eine LED der niedrigsten Intensität (3,125 %) angeschaltet und gewartet, bis sich das Versuchstier auf die Lichtquelle zu bewegte. Sobald das Tier die Lichtquelle erreicht hatte, wurde sie ausgeschaltet und gleichzeitig die LED gleicher Intensität auf der gegenüberliegenden Seite der Arena angeschaltet. Dieser Vorgang wurde 4 Mal wiederholt. Anschließend wurde zur nächst höheren Lichtintensitäten übergegangen und genauso

verfahren. Auf diese Weise wurde die phototaktische Aktivität bei allen 6 Lichtintensitäten getestet. Als Maß für die phototaktische Aktivität eines Tieres wurde die Zeit gemessen, die das Versuchstier zum Zurücklegen der Distanz zwischen den beiden einander gegenüberliegenden Lichtquellen benötigte.



**Abbildung 4:** Biene in der Versuchsanordnung zur Messung der motorischen und phototaktischen Aktivität. Die gelbe Linie gibt die Laufspur wieder, wie sie mit Hilfe des Programms „Grentrack“ erfasst wird.

### 2.5.2 Pharmaka

Die biogenen Amine Oktopamin (DL-Oktopamin-Hydrochlorid, Sigma) und Tyramin (Tyramin-Hydrochlorid, Sigma) wurden in den Konzentrationen  $10^{-2}$ ,  $10^{-3}$  und  $10^{-4}$  injiziert. Die Substanzen waren in MOPS-Puffer (270 mM NaCl; 3,2 mM KCl; 1,2 mM  $\text{CaCl}_2$ ; 10 mM  $\text{MgCl}_2$ ; 10 mM Morpholinopropansulfonsäure) mit  $10^{-2}$  M L-Ascorbinsäure (Sigma) gelöst. Als Kontrolle wurde MOPS-Puffer alleine injiziert.

### 2.5.3 Datenaufnahme

Das Verhalten der Tiere wurde mit einer digitalen Videokamera (Sony DCR-PC 120 E) unter für Bienen unsichtbarem Infrarotlicht aufgenommen und im mp3-Format ausgewertet. Zur

Bestimmung der motorischen Aktivität im Dunkeln wurden die Laufstrecken während der letzten 30 s der Dunkelphase mit einem eigens dafür entwickelten Programm („Grentrack“ von A. Gaudnek) digital gemessen. Die Laufzeiten zu den Lichtquellen als Maß für die phototaktische Aktivität wurden mit Hilfe einer Stoppuhr von Hand gemessen.

### 2.5.4 Pharmakologie: Statistische Auswertung der Daten

Es wurden die gustatorische Empfindlichkeit und die lokomotorische Aktivität von allen Tieren ausgewertet, die während der Dunkelphase aktiv, d.h. in Bewegung waren. Das waren in den verschiedenen Behandlungsgruppen jeweils  $n = 70$  (Ringer-Kontrolle), 69 (OA  $10^{-4}$  M), 57 (OA  $10^{-3}$  M), 70 (OA  $10^{-2}$  M), 63 (TA  $10^{-4}$  M), 66 (TA  $10^{-3}$  M) bzw. 64 (TA  $10^{-2}$  M) Tiere. Da nicht alle Tiere, die während der Dunkelphase lokomotorisch aktiv waren, auch phototaktisches Verhalten zeigten, gingen in die Auswertung der phototaktischen Aktivität entsprechend weniger Tiere ein. Die phototaktische Aktivität wurde für  $n = 55$  (Ringer-Kontrolle), 52 (OA  $10^{-4}$  M), 44 (OA  $10^{-3}$  M), 55 (OA  $10^{-2}$  M), 47 (TA  $10^{-4}$  M), 51 (TA  $10^{-3}$  M) bzw. 54 (TA  $10^{-2}$  M) Tiere ausgewertet.

Es wurden Nichtpollensammlerinnen mit sowohl niedriger („low“, GRS = 0, 1 oder 2) als auch hoher („high“, GRS = 5, 6 oder 7) gustatorischer Empfindlichkeit vor Pharmakainjektion verwendet. Tiere mit einem GRS von 3 oder 4 wurden von dem Versuch ausgeschlossen.

Die GRS wurden als Maß für die gustatorische Empfindlichkeit der Versuchstiere in den verschiedenen Behandlungsgruppen ausgewertet. Die Werte für die GRS in den einzelnen Behandlungsgruppen wurden mit Hilfe des D’Agostino & Pearson Omnibus Normality Tests auf Normalverteilung getestet. Die Werte waren weder vor noch nach Pharmakaapplikation normalverteilt ( $p < 0,05$ ; D’Agostino & Pearson Omnibus Normality Test). Die verschiedenen Behandlungsgruppen unterschieden sich nicht bezüglich ihrer mittleren gustatorischen Empfindlichkeit vor Pharmakainjektion ( $p = 0,942$ ; Kruskal-Wallis-Test). Die Differenz der GRS nach – vor Pharmakainjektion wurde als Maß für den pharmakologischen Effekt der injizierten Substanzen ausgewertet. Auch die Werte für die GRS-Differenzen waren nicht normalverteilt ( $p < 0,05$ ; D’Agostino & Pearson Omnibus Normality Test). Der Effekt der verschiedenen OA- bzw. TA-Behandlungen wurde daher mit Hilfe des nichtparametrischen Kruskal-Wallis-Tests gruppenweise verglichen. Einzelvergleiche der verschiedenen Amin-Behandlungen mit der Ringer-Kontrollgruppe wurden mit Hilfe des nichtparametrischen Mann-Whitney-Tests durchgeführt. Obwohl es sich um nicht normalverteilte Daten handelt, werden die Differenzen der gustatorischen Empfindlichkeiten als Mittelwerte mit

Standardfehlern in einem Balkendiagramm dargestellt, da die Medianwerte ganzzahlig sind und daher die Unterschiede in einer Darstellung der Medianwerte nicht zum Ausdruck kommen.

Die spontan zurückgelegte Wegstrecke („Laufstrecke“) während der letzten 30 s der Dunkelphase diente als Maß für die spontane lokomotorische Aktivität eines Tieres. Die Werte für die Laufwege im Dunkeln waren für die verschiedenen Behandlungsgruppen nicht normalverteilt ( $p < 0,05$ ; D'Agostino & Pearson Omnibus Normality Test). Um den Effekt einer Injektion verschiedener Konzentrationen von OA oder TA im Vergleich zur Ringer-Kontrolle zu untersuchen, wurden die entsprechenden Werte für die Laufstrecken mit Hilfe des nichtparametrischen Kruskal-Wallis-Tests auf signifikante Unterschiede geprüft. Mit Hilfe des Mann-Whitney-Tests wurden außerdem die einzelnen Behandlungsgruppen mit der Ringer-Kontrolle auf signifikante Unterschiede untersucht.

Der Mittelwert der Zeiten, die ein Tier für die 4 Läufe zu einer Lichtquelle benötigte, wurde als Maß für die phototaktische Aktivität eines Tieres ausgewertet („Laufzeit“). Die Werte der Laufzeiten wurden mit Hilfe des D'Agostino & Pearson Omnibus Normality Tests auf Normalverteilung untersucht. Betrachtet man die Laufzeiten in den verschiedenen Behandlungsgruppen für jede Lichtintensität getrennt, findet man keine Normalverteilung der Daten ( $p < 0,05$ ; D'Agostino & Pearson Omnibus Normality Test). Die Daten sind auch nicht normalverteilt, wenn die Laufzeiten der Tiere in den verschiedenen Gruppen über alle Lichtintensitäten gemittelt werden ( $p < 0,05$ ; D'Agostino & Pearson Omnibus Normality Test). Die verschiedenen Behandlungsgruppen werden daher mit Hilfe des nichtparametrischen Kruskal-Wallis Tests auf signifikante Unterschiede in ihrer phototaktischen Aktivität untersucht. Darüber hinaus wurden die Mittelwerte über alle Lichtintensitäten für jede OA- und TA-Behandlungsgruppe mit Hilfe des Mann-Whitney-Tests mit dem der Ringer-Kontrolle verglichen. Eine Korrelation der Laufzeiten mit den Lichtintensitäten wurde mit Hilfe des Spearman-Rho-Tests auf Signifikanz untersucht.

### **2.5.5 Unterschiede zwischen Pollen- und Nichtpollensammlerinnen: Versuchsablauf und Datenaufnahme**

Zur Bestimmung der lokomotorischen und phototaktischen Aktivität von unbehandelten Pollen- und Nichtpollensammlerinnen wurde genauso verfahren wie für die pharmakologisch behandelten Tiere unter 2.5.1 Lediglich in wenigen Punkten bestanden Abweichungen zwischen den beiden Versuchen:

- nach einmaliger PER-Messung wurde den unbehandelten Pollen- und Nichtpollensammlerinnen keine Substanz injiziert. Es folgte sofort das Stutzen der Flügel und das Umsetzen der Tiere in die Plastikbox.
- Die phototaktische Aktivität wurde lediglich bei 3 Lichtintensitäten (25%, 50% und 100%) getestet, wobei 100% einer Helligkeit von 15 lx (gemessen mit 351 Power Meter, United Detector) entsprachen.
- Die Wand der Dunkelarena war mit Paraffinöl beschichtet, um ein Hochklettern der Tiere an den Seiten zu verhindern. Eine Abdeckung der Arena mit einem Gitter war damit nicht mehr nötig.
- Während der letzten 30 s der Dunkelphase wurde außer der zurückgelegten Wegstrecke auch die Zeit aufgenommen, während der das Versuchstier motorisch aktiv, d.h. in Bewegung war.
- Als Maß für die phototaktische Aktivität eines Tieres wurde neben der dafür benötigten Zeit auch die Wegstrecke gemessen, die das Tier zwischen den beiden einander gegenüberliegenden Lichtquellen zurücklegte. Dafür wurden die Laufstrecken von Hand am Bildschirm nachgezeichnet und die zurückgelegte Entfernung mit Hilfe eines Landkartenmessers (Eschenbach) bestimmt.

### **2.5.6 Unterschiede zwischen Pollen- und Nichtpollensammlerinnen: Statistische**

#### **Auswertung der Daten**

Sowohl bei den Pollen- als auch bei den Nichtpollensammlerinnen wurden Tiere mit niedriger („low“, GRS = 0, 1 oder 2) sowie mit hoher („high“, GRS = 5, 6 oder 7) gustatorischer Empfindlichkeit verwendet. Tiere mit einem GRS von 3 oder 4 wurden von dem Versuch ausgeschlossen. Die mittlere gustatorische Empfindlichkeit unterschied sich nicht zwischen den beiden Gruppen ( $p = 0,392$ ; Mann-Whitney-Test;  $n$  (Pollensammlerinnen) = 36;  $n$  (Nichtpollensammlerinnen) = 36).

Die im Dunkeln zurückgelegte Wegstrecke („Laufweg“) sowie die lokomotorisch aktive Zeit („Laufzeit“) während der letzten 30 s der Dunkelphase wurden als Maß für die spontane lokomotorische Aktivität eines Tieres ausgewertet. Die Werte für den Laufweg und die Laufzeit im Dunkeln waren nicht normalverteilt ( $p < 0,05$ ; D'Agostino & Pearson Omnibus Normality Test); die Daten wurden daher mit Hilfe einer nichtparametrischen Statistik ausgewertet. Die Gruppen wurden in Einzelvergleichen mit Hilfe des Mann-Whitney-Tests

miteinander verglichen. Es wurde die lokomotorische Aktivität von 15 Pollensammlerinnen mit niedrigen GRS, 21 Pollensammlerinnen mit hohen GRS, 14 Nichtpollensammlerinnen mit niedrigen GRS und 17 Nichtpollensammlerinnen mit hohen GRS bestimmt. Die Laufgeschwindigkeit wurde für diese Tiere aus dem Quotienten des Laufweges und der Laufzeit errechnet. Die Werte für die Laufgeschwindigkeit waren nicht normalverteilt; sie wurden daher ebenfalls mit Hilfe des Mann-Whitney-Tests miteinander verglichen.

Die Wegstrecke zu einer Lichtquelle hin sowie die dafür benötigte Zeit wurden als Maß für die phototaktische Aktivität eines Tieres ausgewertet. Es wurde jeweils der Mittelwert aus den 4 für jede Lichtintensität gemessenen Läufen ausgewertet. Die Werte für die Laufwege zu einer Lichtquelle hin waren normalverteilt (D'Agostino & Pearson Omnibus Normality Test) für die Gruppe aller Pollensammlerinnen ( $p = 0,054$ ), aller Nichtpollensammlerinnen ( $p = 0,316$ ), sowie für die Untergruppen Pollensammlerinnen mit hohen ( $p = 0,171$ ) bzw. niedrigen GRS ( $p = 0,173$ ) und Nichtpollensammlerinnen mit hohen ( $p = 0,335$ ) bzw. niedrigen GRS ( $p = 0,69$ ). Der Vergleich dieser Gruppen erfolgt daher mit Hilfe des parametrischen Unpaired t-Tests. Betrachtet man für dieselben Gruppen die Laufwege für die verschiedenen Lichtintensitäten getrennt voneinander, so sind die Werte nicht normalverteilt ( $p < 0,05$ ; D'Agostino & Pearson Omnibus Normality Test).

Die Laufwege von Sammlerinnen mit hohen und niedrigen GRS werden, ebenso wie die Laufwege von Pollen- und Nichtpollensammlerinnen, für die verschiedenen Lichtintensitäten mit Hilfe des Mann-Whitney-Testes auf signifikante Unterschiede untersucht. Bei wiederholten Messungen wird das Signifikanzniveau mit dem Bonferroni Post-Test korrigiert („Mann-Whitney-Test nach Bonferroni-Korrektur“).

Für den Vergleich gepaarter Stichproben, wie die Laufwege derselben Tiere bei 3 verschiedenen Lichtintensitäten, wird zunächst mit dem Friedman Test auf signifikante Unterschiede geprüft. Danach wurden Unterschiede zwischen den einzelnen Gruppen mit dem Dunn's Multiple Comparison Post Test detektiert. Die Werte für die Laufzeiten zu einer Lichtquelle hin waren nicht normalverteilt ( $p < 0,05$ ; D'Agostino & Pearson Omnibus Normality Test). Zum Vergleich der Gruppen wurden die gleichen nichtparametrischen Tests wie für die Laufwege verwendet. Die phototaktische Aktivität wurde von 15 Pollensammlerinnen mit niedrigen GRS, 21 Pollensammlerinnen mit hohen GRS, 14 Nichtpollensammlerinnen mit niedrigen GRS und 18 Nichtpollensammlerinnen mit hohen GRS bestimmt.

## 3 Ergebnisse

### 3.1 Immunhistologie: Tyramin-ähnliche Immunreaktion

#### 3.1.1 Spezifität des primären Antikörpers

Die Präinkubation des primären Antikörpers mit  $10^{-7}$  M Tyramin inhibiert die Tyramin-ähnliche Färbung der Gewebeschnitte (Abb. 7), während eine Präinkubation mit  $10^{-5}$  M Oktopamin einen schwachen und erst mit  $10^{-3}$  M Oktopamin einen deutlichen Effekt zeigt. Dieses Ergebnis steht in Übereinstimmung mit der Angabe des Herstellers, nach der die Kreuzreaktivität des Antikörpers mit Oktopamin bei 1:830 liegt. Der verwendete Antikörper besitzt demnach eine hohe Spezifität für Tyramin und es kann davon ausgegangen werden, dass ausschließlich tyraminerge Somata und Projektionen markiert werden.

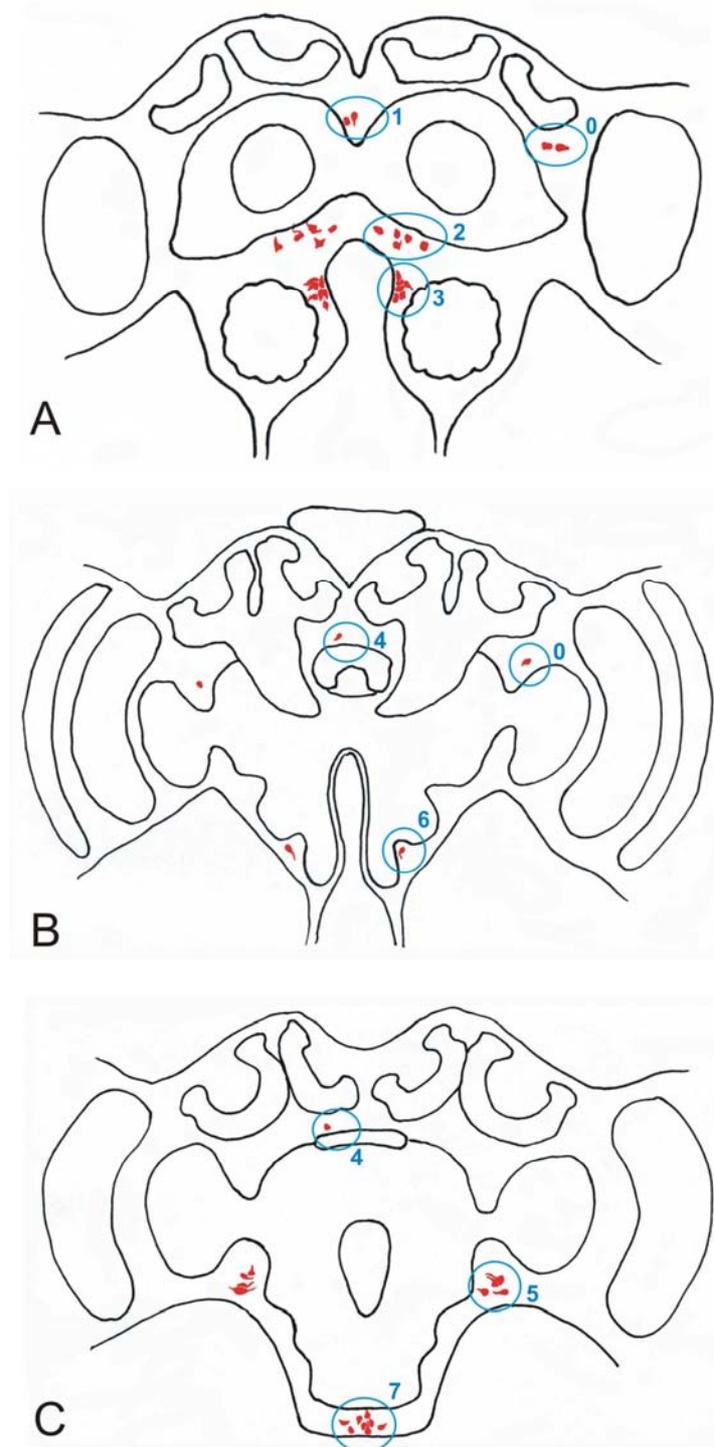
#### 3.1.2 Immunhistologische Färbung

Es wurden Gehirnpräparate von 26 Sammlerinnen (16 Winterbienen und jeweils 5 Nichtpollen- und 5 Pollensammlerinnen) sowie von 9 frisch geschlüpften Tieren immunhistologisch gefärbt und ausgewertet. Die Tyramin-ähnliche Immunreaktion der Neuropile im cerebralen und suboesophagealen Ganglion war intensiv und konsistent. Es wurden Somata und axonale Projektionen in den Neuropilen markiert. Es wurden keine Unterschiede in der Immunfärbung zwischen Winterbienen, Pollen- und Nektarsammlerinnen oder frisch geschlüpften Bienen festgestellt.

#### 3.1.3 Tyramin-immunreaktive Somata und Vergleich mit Oktopamin

Im Gehirn und suboesophagealen Ganglion wurden 8 Tyramin-immunreaktive Somagruppen lokalisiert (Abb. 5). Die Markierung von Somata variierte in ihrem Vorkommen zwischen unterschiedlichen Tieren. Alle beschriebenen Somagruppen mit Ausnahme der VUM-Neurone sind bilateral in den beiden Gehirnhälften angeordnet. In allen Gehirnbereichen, in denen Tyramin-immunreaktive Somata lokalisiert wurden, wurden von Sinakevitch et al. (2005) und größtenteils auch von Kreissl et al. (1994) Oktopamin-immunreaktive

Somacluster beschrieben. Dieser Befund stimmt auch mit der weitgehenden Überlappung der Projektionsfelder in den Neuropilen überein (s. 3.1.4).



**Abbildung 5:** Schematische Darstellung von Frontalansichten des Bienenhirns in verschiedenen Schnittebenen mit Gruppen Tyramin-immunreaktiver Zellkörper. **A:** anteriorer Bereich. **B:** medianer Bereich. **C:** posteriorer Bereich.

Im anterioren dorsalen Protocerebrum wurden nahe der dorsalen Mittellinie 1 bis 2 große Somata detektiert (Gruppe 1). Diese Gruppe entspricht in ihrer Lage der Zellgruppe 1 bei

Kreissl et al. (1994) sowie Cluster G1 bei Sinakevitch et al. (2005). Kreissl et al. (1994) beschreiben 45 Somata in dieser Gruppe, während Sinakevitch et al. (2005) 4 Somata in diesem Bereich detektiert haben. 1 bis 2 Somata wurden im lateralen anterioren Protocerebrum ventral des lateralen Calyx angefärbt (Gruppe 0). Sinakevitch et al. (2005) detektierten hier 3 Somata, während Kreissl et al. (1994) in diesem Bereich keine OA-IR Somata beschreiben. Eine weitere TA-IR Somagruppe im anterioren Protocerebrum besteht aus 4 bis 5 Zellen und liegt beidseitig lateral der anteroventralen Mittellinie und mediodorsal der Antennalloben (Gruppe 2; Abb. 6 und Abb. 9). Sie entspricht in Lage und Verteilung der Somata der Zellgruppe 2 bei Kreissl et al. (1994). Sinakevitch et al. (2005) unterteilten diese Gruppe wegen der verstreuten Anordnung der Somata in zwei Untergruppen. Cluster G2a umfasst die am weitesten median gelegenen Somata dieser Gruppe, während G2b die weiter lateral gelegenen Zellen einschließt. In Gruppe 3 wurden jeweils 5 bis 7 Zellen TA-IR markiert. Sie liegen dicht beieinander im Deutocerebrum, median der Antennalloben (Abb. 6, Abb. 9 und Abb. 26). Dieser Somacluster 3 entspricht Gruppe 3 bei Kreissl et al. (1994) sowie G3a (anteriore Untergruppe) bzw. G3b (weiter posteriore Untergruppe) bei Sinakevitch et al. (2005). Gruppe 4 wurde lediglich in 3 Präparaten angefärbt; 1 bis 3 Somata liegen im dorsalen posterioren Protocerebrum, dorsal des Zentralkörpers. Sinakevitch et al. (2005) detektierten mindestens 45 Oktopamin-immunreaktive Somata im posterioren Protocerebrum dorsal des Zentralkörpers (G4), während Kreissl et al. (1994) lediglich einen einzelnen Zellkörper beiderseits der posterioren oberen Untereinheit des Zentralkörpers beschreibt. Gruppe 5 besteht aus 3 bis 5 TA-IR Somata, die zwischen den lateralen protocerebralen Loben und den Dorsalloben des Deutocerebrums liegen (Abb. 26 und Abb. 28). Sie entspricht Cluster 5 bei Kreissl et al. (1994) und Cluster G5b bei Sinakevitch et al. (2005). Ein einzelner Zellkörper zeigte in der lateralen Somaschicht zwischen Dorsallobus und Tritocerebrum TA-IR (Gruppe 6). Hier wird bei Kreissl et al. (1994) ebenfalls nur 1 Soma je Hemisphäre beschrieben, während Sinakevitch et al. (2005) 9 Somata in diesem Bereich detektierten. Schließlich wurde eine Gruppe aus 5 bis 7 Somata im ventralen suboesophagealen Ganglion markiert (Gruppe 7, Abb. 28). Dabei handelt es sich um median gelegene VUM („ventral unpaired median“)-Neurone sowie kleinere Zellen, die beidseitig der VUM-Neurone angeordnet sind. Kreissl et al. (1994) beschreiben im ventralen suboesophagealen Ganglion für jedes Neuomer eine Somagruppe aus 6 bis 10 Zellen, während Sinakevitch et al. (2005) diese Zellen in insgesamt 5 VUM-Neurone und 6 bis 8 kleinere Zellen unterteilt. In Tab. 6

### 3.1 Ergebnisse Immunhistologie: TA-IR

sind die TA-IR Somata und OA-IR Somata entsprechend ihrer Lage einander gegenübergestellt.

**Tabelle 6:** Vergleich von TA-IR Somagruppen mit OA-IR Somagruppen entsprechende ihrer Lage im Gehirn und suboesophagealen Ganglion. In Klammern ist jeweils die max. Anzahl der beschriebenen Somata pro Gehirnhälfte (Ausnahme: VUM-Neurone) angegeben.

Lage	TA-IR Gruppe	OA-IR Gruppe (Kreissl et al. 1994)	OA-IR Gruppe (Sinakevitch et al. 2005)
Protocerebrum (anterior, lateral) ventral des lateralen Calyx	0 (2)	-	G0a (3) G0b (1)
Protocerebrum (anterior, median)	1 (2)	1 (45)	G1 (4)
Protocerebrum (anterior, median) mediodorsal der Antennalloben	2 (5)	2 (10)	G2a (6) G2b (5)
Deutocerebrum median der Antennalloben	3 (7)	3 (7)	G3a (9) G3b (2)
Protocerebrum (posterior, median) dorsal des Zentralkörpers	4 (3)	4 (1)	G4a (2) G4b (17) G4c (2) G4d (4)
zwischen lateralen protocerebralen Loben und deutocerebralem Dorsallobus	5 (5)	5 (5)	G5a (1) G5b (13)
laterale Somarinde zwischen Dorsallobus und Tritocerebrum	6 (1)	6 (1)	G6a (3) G6b (5)
ventrales suboesophageales Ganglion	7 (7 insgesamt)	7 (10 insgesamt pro Neuomer)	VUM (10 insgesamt) VPM (2)

Die TA-IR Somata konnten den Projektionen in den Neuropilen nicht zugeordnet werden, da die Neurite von den Somata aus nicht bis in die Neuropile verfolgt werden konnten. Generell lässt sich im Insektengehirn aus der topographischen Verteilung von Zellkörpern nicht ableiten, wohin ihre Neurite projizieren. Im Vergleich mit der OA-IR bei Kreissl et al. (1994) und Sinakevitch et al. (2005) fällt eine weitgehende Übereinstimmung mit der TA-IR sowohl in der Lokalisation der immunreaktiven Zellkörper als auch in den Projektionen in den Neuropilen auf. Inwieweit eine Zuordnung der TA-IR Somata zu den Projektionen in den Neuropilen analog zu der OA-IR angestellt werden kann, muss mit Hilfe von TA-IR Wholemount-Präparaten untersucht werden.

### 3.1.4 Tyramin-ähnliche Immunreaktion in den Neuropilen und Vergleich mit

#### Oktopamin

Alle Neuropile des Protocerebrums mit Ausnahme der Pilzkörper zeigten eine ausgeprägte TA-IR. Ebenso waren Dorsallobus und Tritocerebrum sowie das suboesophageale Ganglion mit dem Antikörper markiert (Abb. 6, Abb. 8 und Abb. 9). Die Projektionen Tyramin-immunreaktiver Neuronen erscheinen als verzweigtes Geflecht mit ovalen Verdickungen (Blebs). Die Blebs sind charakteristisch für das immunhistologische Bild eines Neuromodulators und kennzeichnen mit großer Wahrscheinlichkeit die Freisetzungsstellen für Transmitter aus den Neuronen. Im Folgenden wird die TA-IR in den einzelnen Neuropilen erläutert.

#### *optische Loben*

Alle drei optischen Neuropile durchzieht ein dichtes Netzwerk feiner Tyramin-immunreaktiver Neuriten (Abb. 14). Die Fasern weisen ovale Verdickungen auf. Der geordnete schichtartige Aufbau der optischen Neuropile ist in diesem Netzwerk erkennbar: viele Fasern sind tangential oder radial orientiert und bilden Schichten mit einem mehr oder weniger dichten Netzwerk immunreaktiver Fasern. Dieser Befund deckt sich mit den Ergebnissen für OA-IR von Kreissl et al. (1994) und Sinakevitch et al. (2005). Ein Zusammenhang der TA-IR mit dem säulenartigen Aufbau der optischen Neuropile ist nicht zu erkennen. Im Bereich der Somarinde, die die optischen Loben umgibt, sowie im Bereich der optischen Chiasmen wurden keine Somata markiert. Das deutet darauf hin, dass intrinsische Neurone nicht an der TA-IR in den optischen Loben beteiligt sind. Sinakevitch et al. (2005) beschreiben OA-IR extrinsische Zellen mit Somata in den Somaclustern 3 und 5, deren Neuriten neben anderen Neuropilen auch in den optischen Loben projizieren. Ob in diesen Gruppen auch Somata von Zellen mit TA-IR Projektionen in den optischen Neuropilen liegen, lässt sich anhand der Gehirnschnitte nicht eindeutig feststellen.

#### *Pilzkörper*

Eine Tyramin-ähnliche Immunreaktion in den Pilzkörpern konnte lediglich in den Calyces festgestellt werden (Abb. 16). Die ausgeprägte TA-IR im basalen Ring sowie eine deutlich schwächere TA-IR in Kragen und Lippe decken sich mit dem Befund für die Oktopamin-ähnliche Immunreaktion bei Kreissl et al. (1994) sowie Sinakevitch et al. (2005). Da Somata

intrinsischer Kenyon-Zellen keine Tyramin-Immunreaktion zeigen, muss es sich bei den gefärbten Strukturen um extrinsische afferente Fasern handeln, die in die Calyces projizieren. Bei der TA-IR im basalen Ring und im Kragen könnte es sich dabei möglicherweise um mechanosensorische und gustatorische Projektionen aus dem suboesophagealen Ganglion (Schröter & Menzel 2003) bzw. um visuelle Projektionen aus den optischen Loben (Ehmer & Gronenberg 2002) handeln. Eine Zuordnung der Projektionen zu TA-IR Somata war jedoch nicht möglich. Kreissl et al. (1994) führen die Färbung auf das VUMmx1-Neuron zurück, das vom suboesophagealen Ganglion aus über den antennoglomerulären Trakt bis in die Calyces der Pilzkörper projiziert (Hammer 1993). Im Bereich der VUM-Neurone zeigen eine ganze Reihe von Somata TA-IR. Ein ausgeprägtes Projektionsfeld des VUMmx1-Neurons stellen jedoch auch die Antennalloben dar (Hammer 1993). Da in den Antennalloben jedoch keinerlei TA-IR auftritt, schließt das eine TA-IR des VUMmx1-Neurons aus. Möglicherweise könnte es sich um ein anderes VUM-Neuron handeln, das für die TA-ähnliche Immunreaktion in den Calyces verantwortlich ist. Die Pedunculi sowie  $\alpha$ - und  $\beta$ -Loben sind frei von immunhistologischer Färbung und heben sich darin deutlich von dem sie umgebenden, stark gefärbten Neuropil des anterioren und medianen Protocerebrums ab (Abb. 9, Abb. 16 und Abb. 18). Der Befund in den  $\alpha$ -Loben unterscheidet sich von dem für OA-IR bei Kreissl et al. (1994) und Sinakevitch et al. (2005), die OA-IR extrinsische Fasern in der  $\gamma$ -Untereinheit der  $\alpha$ -Loben feststellten. In den Loben projizieren efferente Neurone, die Informationen zu anderen Neuropilen weiterleiten oder Feedback-Loops zu den Calyces ausbilden, sowie Afferenzen aus dem Protocerebrum. Im Bereich der  $\alpha$ -Loben sind jedoch offensichtlich keine Tyramin-immunreaktiven Fasern vorhanden.

#### *Zentralkomplex*

Der Zentralkomplex zeigt sowohl in der oberen als auch in der unteren Untereinheit des Zentralkörpers sowie in der protocerebralen Brücke ausgeprägte TA-IR (Abb. 9, Abb. 18 und Abb. 22). Dieser Befund stimmt mit der von Kreissl et al. (1994) und Sinakevitch et al. (2005) beschriebenen OA-IR überein. Ein Unterschied besteht allerdings darin, dass die OA-IR in der oberen Einheit („fan-shaped body“) als deutlich schwächer als in der unteren Einheit („ellipsoid body“) des Zentralkörpers beschrieben wird. Die TA-IR ist dagegen in beiden Teilen des Zentralkörpers ähnlich intensiv. Die charakteristische, fächerförmig angeordnete Säulenstruktur immunreaktiver Projektionen im Zentralkörper, die sich im frontal betrachteten Neuropil (Abb. 14) zusätzlich zu einem großflächigen Projektionsmuster

abzeichnet, deutet darauf hin, dass sowohl columnare als auch tangentielle Neurone an der Immunreaktion beteiligt sein könnten. Bei den TA-IR Zellen könnte es sich sowohl um extrinsische als auch um intrinsische Neurone handeln – für beide Typen wurden Somata beschrieben, die im Bereich von TA-IR-Somagruppen liegen (Homberg 1985; Müller et al. 1997; Vitzthum et al. 1996). Extrinsische Zentralkörper-Neurone haben z.T. auch ausgeprägte Projektionen im Protocerebrum, inclusive der lateralen akzessorischen Loben posterior der  $\beta$ -Loben sowie der protocerebralen Bereiche zwischen  $\alpha$ -Loben und Pilzkörper-Calyces (Homberg 1985) – auch diese Bereiche zeigen ausgeprägte TA-IR. Eine Zuordnung der TA-IR Somata zu den Projektionen im Neuropil war jedoch auch für den Zentralkomplex nicht möglich.

#### *medianes und laterales Protocerebrum*

Das gesamte mediane und laterale Protocerebrum zeigt eine ausgeprägte TA-IR (Abb. 9, Abb. 16, Abb. 18 und Abb. 22). Dieser Befund stimmt mit der OA-IR im Protocerebrum überein, wie sie von Kreissl et al. (1994) und Sinakevitch et al. (2005) beschrieben wird. In das laterale Horn des lateralen Protocerebrums projizieren extrinsische Afferenzen aus den optischen Loben. In die optischen Tuberkel projizieren polarisationssensitive Neurone aus der Medulla. In die lateralen akzessorischen Loben projizieren Afferenzen aus den optischen Loben bzw. dem Zentralkomplex. Extrinsische Neurone des Zentralkomplexes mit Somata in den Clustern 0, 1, 2, 3 und 4 projizieren neben den lateralen akzessorischen Loben in das gesamte ihn umgebende protocerebrale Neuropil, wie z.B. in die protocerebralen Loben zwischen den  $\alpha$ -Loben und den Calyces der Pilzkörper (Homberg 1985). Diese beschriebenen Projektionen könnten möglicherweise an der TA-IR im Protocerebrum beteiligt sein. Die TA-IR Projektionen können auch im medianen und lateralen Protocerebrum nicht den TA-IR Somata zugeordnet werden. Sinakevitch et al. (2005) fanden, dass Neurite von Zellen mit Somata in Cluster 3 und 5 unter anderem im lateralen bzw. medianen Protocerebrum projizieren.

#### *Deutocerebrum*

In den Antennalloben wurde weder in den Glomeruli noch in dem zentralen Fasergeflecht TA-IR nachgewiesen (Abb. 9, Abb. 24 und Abb. 26). Darin besteht ein wesentlicher Unterschied zur OA-IR, die sowohl im glomerulären als auch im amorphen zentralen Bereich der Antennalloben dokumentiert wurde (Kreissl et al. 1994; Sinakevitch et al. 2005). Der

Dorsallobus hingegen weist eine ausgeprägt TA-IR auf (Abb. 8, Abb. 26 und Abb. 28). Zu den im Dorsallobus projizieren Zellen gehören gustatorische und mechanosensorische Afferenzen aus den Antennen, sowie olfaktorische Afferenzen aus dem Antennallobus. Außerdem verlassen gustatorische Efferenzen den Dorsallobus in Richtung suboesophageals Ganglion. Um welche Zellen es sich bei den TA-IR Neuriten handelt, ist unklar. Sinakevitch et al. (2005) beschreiben OA-IR im Dorsallobus, die auf Zellen mit Somata im Cluster 5 und 6 zurückzuführen sind.

#### *Tritocerebrum und Suboesophageales Ganglion*

Alle drei Neuomere (mandibulares, maxillares und labiales Neuomer) des suboesophagealen Ganglions sind von zahlreichen TA-IR Fasern durchzogen (Abb. 9, Abb. 26 und Abb. 28). Dieser Befund stimmt mit dem Vorkommen von OA-IR in diesen Neuropilen überein (Kreissl et al 1994; Sinakevitch et al. 2005). Ebenso zeigt das Tritocerebrum ausgeprägte TA-IR (Abb. 26). Die immunreaktiven Fasern lassen sich auch hier keinen bestimmten Somata zuordnen. Möglicherweise handelt es sich bei den TA-IR Fasern um gustatorische Projektionen aus der Proboscis und möglicherweise auch aus dem Dorsallobus. Auch efferente Interneurone, die in die Pilzkörper-Calyces projizieren, könnten an der TA-IR beteiligt sein (Schröter & Menzel 2003).

## **3.2 Immunhistologie: Tyramin-Rezeptor-ähnliche**

### **Immunreaktion und Vergleich mit Tyramin-ähnlicher**

#### **Immunreaktion**

##### **3.2.1 Spezifität des primären Antikörpers**

Bei Verwendung des Kaninchen-Präimmuserums an Stelle des primären Antikörpers war eine AmTYR1-IR in den Präparaten nicht nachweisbar (Abb. 11 und Abb. 13). Die Immunfärbung der Gewebeschnitte kommt also durch einen Antikörper zustande, der im Kaninchenserum erst nach Immunisierung mit dem Rezeptor-Fusionsprotein gebildet wurde. Eine Präinkubation des primären Rezeptor-Antikörpers mit dem Rezeptor-Fusionsprotein zeigte in der höchsten Konzentration (6µg/ml) einen leichten inhibierenden Effekt auf die

Intensität der AmTYR1-IR. Die Präinkubation des Antikörpers mit dem Fusionsprotein der Konzentrationen 1 und 2 µg/ml zeigten keinen Effekt. Das könnte bedeuten, dass die Antikörper-Konzentration sehr hoch ist und nur durch Präinkubation mit großen Mengen des Fusionsproteins geblockt werden kann.

#### 3.2.2 Tyramin-Rezeptor-ähnliche Immunreaktion in den Neuropilen

Die Gehirne von 33 Sammlerinnen (21 Winterbienen und jeweils 6 Nichtpollen- und Pollensammlerinnen) wurden auf ihre AmTYR1-IR untersucht. Es wurde ein konsistentes Muster für die AmTYR1-IR in allen Neuropilen des Gehirns und im suboesophagealen Ganglion nachgewiesen (Abb. 10, Abb. 12 und Abb. 29). Die AmTYR1-IR von Winterbienen, Nektar- und Pollensammlerinnen unterschieden sich dabei nicht.

Das Vorkommen von AmTYR1-IR und TA-IR in den Neuropilen ist in Abb. 31 zusammengefasst.

#### *optische Loben*

Die optischen Neuropile zeigen eine deutliche AmTYR1-IR, die als gebänderte Struktur in den Neuropilen erscheint (Abb. 15). Besonders deutlich markiert sind eine zentrale Bande der Medulla, eine distale Bande der Lobula sowie der proximale, weniger strukturierte Bereich der Lobula (Abb. 15, Pfeile). Darüber hinaus ist die Immunreaktion besonders ausgeprägt im Bereich der optischen Chiasmen (Abb. 15, Pfeilspitzen, und Abb. 30). Im Vergleich zur AmTYR1-IR ist die TA-IR in den optischen Neuropilen gleichmäßig verteilt. Ein weiterer Unterschied besteht darin, dass sich keine TA-IR in den optischen Chiasmen findet. Bei den markierten Zellen könnte es sich in der Medulla möglicherweise um transmedulläre (Tm-) Zellen handeln, die Informationen aus der Lamina aufnehmen und z.T. an die Lobula weitergeben, sowie um amakrine Zellen, die für den Informationsaustausch innerhalb der Medulla sorgen. Das äußere optische Chiasma besteht aus Laminaneuronen, T-Zellen sowie aus den retinalen Neuronen, die direkt in die Medulla projizieren. Das innere optische Chiasma besteht neben den Tm-Zellen vorrangig aus Y- und T-Zellen, die die Medulla mit der Lobula verbinden. In der Lobula könnte es sich bei der distalen Bande um Projektionen aus dem inneren Chiasma handeln; die Markierung im proximalen Fasergeflecht könnte von Neuronen herrühren, die von der Lobula aus in das laterale Protocerebrum projizieren.

#### *Pilzkörper*

Auch in den Lippen-, Kragen- und basalen Ring-Regionen der Pilzkörper-Kelche ist eine AmTYR1-IR zu erkennen (Abb. 17 und Abb. 19, Pfeile). Die deutlichste Markierung weist der basale Ring auf; sie setzt sich als helle Bande in den Pedunculi und den Loben fort (Abb. 19, Pfeilspitzen und Abb. 21, Pfeile). In den Pedunculi erscheint diese Bande im horizontal geschnittenen Präparat als hufeisenförmige Struktur (Abb. 20), während sie im Frontalschnitt im  $\alpha$ -Lobus als horizontale Bande im oberen Drittel des Lobus erscheint. Außerdem ist eine breite Bande im untersten Teil („ $\gamma$ -Lobus“) des  $\alpha$ -Lobus markiert (Abb. 17, Pfeilspitze). Es könnte sich dabei möglicherweise um Axone intrinsischer Kenyonzellen handeln, die aus dem basalen Ring in parallel verlaufenden Bahnen bis in die Loben projizieren. Dafür spricht auch die Lage der Banden im frontal geschnittenen  $\alpha$ -Lobus, die der Lage von Projektionen aus dem basalen Ring entsprechen (Strausfeld 2002). Eine andere Möglichkeit wäre, dass es sich bei der Markierung in den Pedunculi und Loben um markierte Gliazellen handelt. Gliazellen umhüllen die Kenyon-Zellen der Pilzkörper und folgen somit der intrinsischen Struktur des Neuropils. Eine unspezifische Färbung der Gliazellen würde also einer Färbung der Neurone sehr ähnlich sehen, wie Hähnlein & Bicker (1996) anhand von Ethylgallat-gefärbten Präparaten zeigten. Im  $\gamma$ -Lobus enden auch Axone aus den Lippen- und Kragenregionen der Pilzkörperkelche. Die AmTYR1-IR entspricht in ihrer Verteilung in den Kelchen der Tyramin-ähnlichen Immunreaktion. Ein deutlicher Unterschied zwischen dem Vorkommen von Tyramin und dem AmTYR1-Rezeptor liegt in den Pedunculi und Loben der Pilzkörper: eine TA-IR ist dort nicht vorhanden.

#### *Zentralkomplex*

Der Zentralkomplex zeigt eine intensive AmTYR1-IR, die besonders deutlich in der oberen Einheit des Zentralkörpers ausgeprägt ist (Abb. 23, Pfeil). Eine besonders intensive AmTYR1-IR erscheint in Form von fingerartigen Fortsätzen, die sich fächerförmig in die obere Untereinheit ausdehnen (Abb. 23, Pfeilspitze). Die untere Einheit zeigt dagegen relativ schwache AmTYR1-IR. Auch in der protocerebralen Brücke wurde AmTYR1-IR detektiert. Die TA-IR im Zentralkomplex erscheint im Gegensatz zur AmTYR1-IR in der oberen und unteren Einheit des Zentralkörpers gleich intensiv. Die charakteristische Säulenstruktur des Zentralkörpers zeichnet sich in der oberen Zentralkörper-Einheit deutlich ab. Möglicherweise könnten also an der AmTYR1-IR columnare Zellen beteiligt sein. Die fingerförmigen Fortsätze in die obere Zentralkörper-Einheit könnten AmTYR1-Rezeptoren auf fächerförmig

projizierenden tangentialen Zellen markieren. Ob es sich dabei um extrinsisch oder intrinsisch projizierende Zellen handelt, lässt sich aus der Verteilung der Immunfärbung nicht schließen.

#### *Protocerebrum*

Im Neuropilbereich des medianen und lateralen Protocerebrums wurde ein unregelmäßiges, aber in den verschiedenen Präparaten konsistentes Muster von AmTYR1-IR nachgewiesen (Abb. 16, Pfeile). Besonders im Bereich um den  $\alpha$ -Lobus herum war die Markierung ausgeprägt. Es könnte sich bei den markierten Strukturen um intrinsische protocerebrale Neurone oder um extrinsische Zellen handeln, die in das Protocerebrum aus anderen Neuropilen projizieren. In den Bereich um die  $\alpha$ -Loben herum projizieren Fasern über die mediolateralen antennoglomerulären Trakte aus den Antennalloben. Möglicherweise sind diese Zellen an der AmTYR1-IR in diesem Bereich beteiligt.

#### *Deutocerebrum*

Auch die Antennalloben zeigen eine heterogene Markierung. Während das neuronale Geflecht im zentralen Bereich des Neuropils deutlich markiert ist, zeigen die peripheren Glomeruli keine AmTYR1-IR (Abb. 25 und Abb. 27, Pfeile). Das zentrale Fasergeflecht besteht aus intrinsischen und aus extrinsischen Fasern, die die Glomeruli untereinander verschalten bzw. Reizinformationen aus den Antennalloben in den Dorsallobus und das Protocerebrum weiterleiten. Um welche Zellen es sich bei den AmTYR1-IR Neuronen handelt, lässt sich nicht feststellen. Die in den Antennalloben detektierte AmTYR1-IR steht im Gegensatz zu der vollständigen Abwesenheit von TA-IR in diesem Neuropil. Im Neuropilbereich des Dorsallobus findet sich dagegen sowohl ausgeprägte TA-IR als auch AmTYR1-IR (Abb. 27, Pfeil). Dabei handelt es sich wahrscheinlich um Zellen, die an der Verarbeitung gustatorischer bzw. mechanosensorischer Reizinformationen aus den Antennen beteiligt sind.

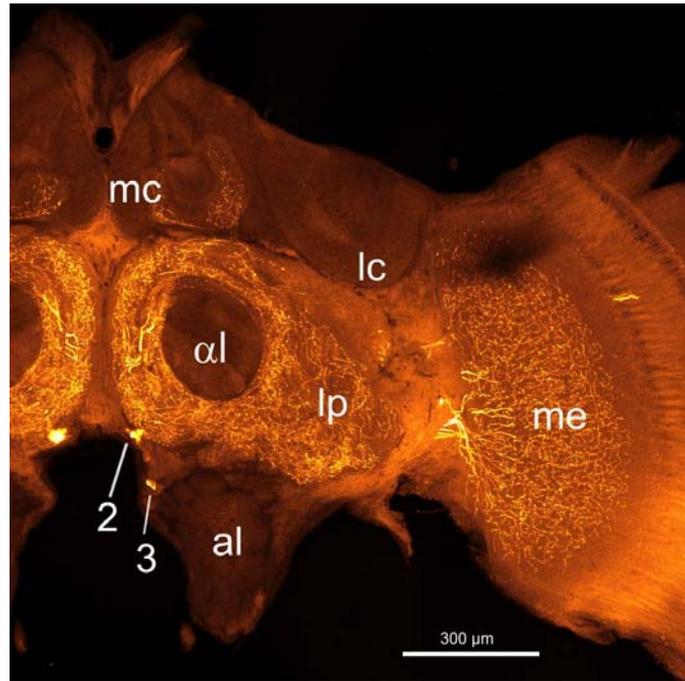
#### *Tritocerebrum und suboesophageales Ganglion*

Auch das Tritocerebrum und das suboesophageale Ganglion zeigen eine ausgeprägte AmTYR1-IR (Abb. 27, Pfeilspitze und Abb. 29, Pfeile). Die AmTYR1-IR wurde in allen drei Neuromeren des suboesophagealen Ganglions detektiert. Das Vorkommen von AmTYR1-IR deckt sich also mit dem von TA-IR in diesen Neuropilen. Bei den markierten Zellen handelt es sich mit großer Wahrscheinlichkeit um Zellen, die an der Verarbeitung gustatorischer

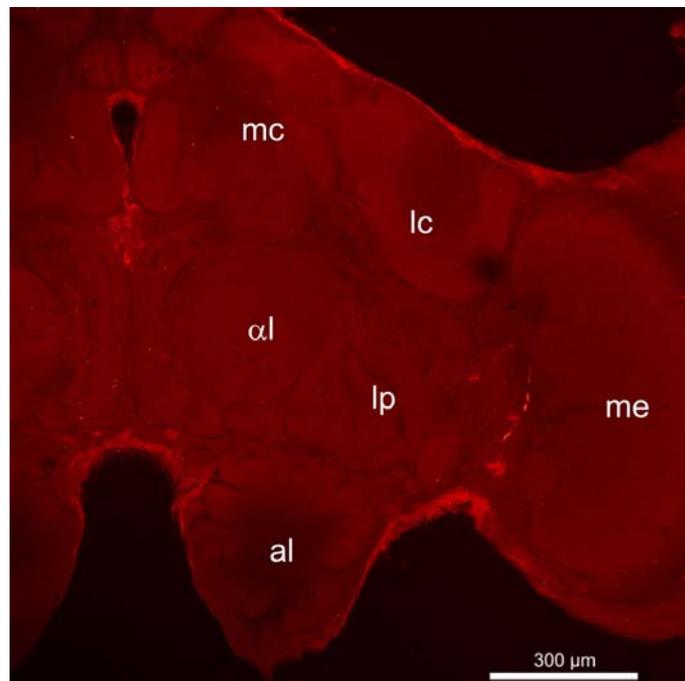
### 3.1 Ergebnisse Immunhistologie: AmTYR1-IR

---

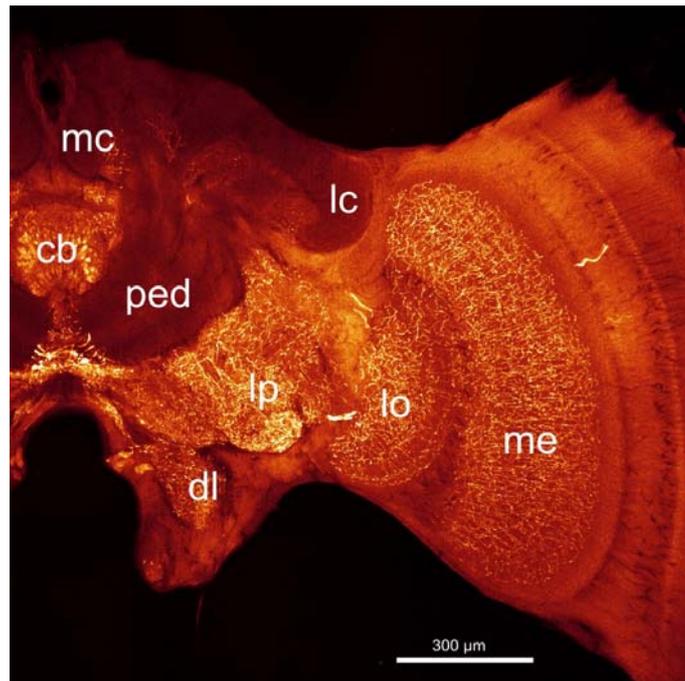
Reizinformationen beteiligt sind. Ob es sich dabei um intrinsische Zellen, um gustatorische Projektionen aus der Proboscis bzw. aus den Dorsalloben oder um gustatorische Efferenzen in die Pilzkörper handelt, ist aus der AmTYR1-IR in diesen Neuropilen nicht abzuleiten.



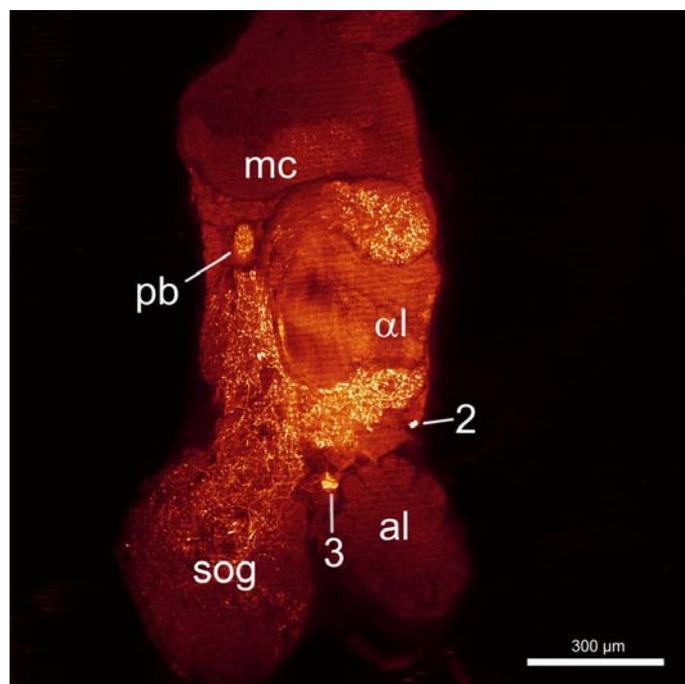
**Abbildung 6:** Tyramin-ähnliche Immunreaktion in einem anterioren Frontalschnitt des Bienenhirns (Konfokale Aufnahme, Schnitttiefe ca.250 μm). Zahlen bezeichnen Somata in den entsprechenden Gruppen in Abb. 5. al = Antennallobus; αl = Alpha-Lobus; lc = lateraler Calyx; lp = laterales Protocerebru; mc = medianer Calyx; me = Medulla.



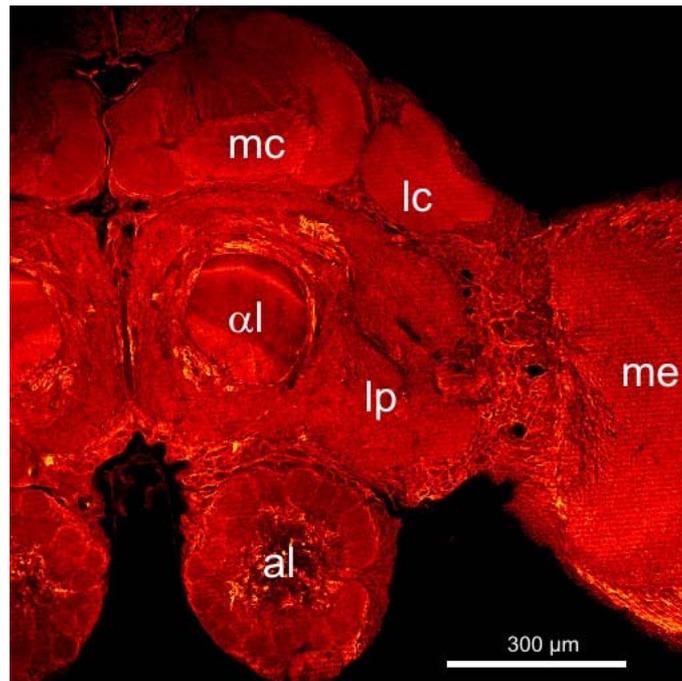
**Abbildung 7:** Kontrolle der Tyramin-ähnlichen Immunreaktion durch Präinkubation des primären Antikörpers mit  $10^{-7}$  M Tyramin. Anteriorer Frontalschnitt des Bienenhirns (Konfokale Aufnahme, Schnitttiefe ca.250 μm). Abkürzungen wie in Abb. 6.



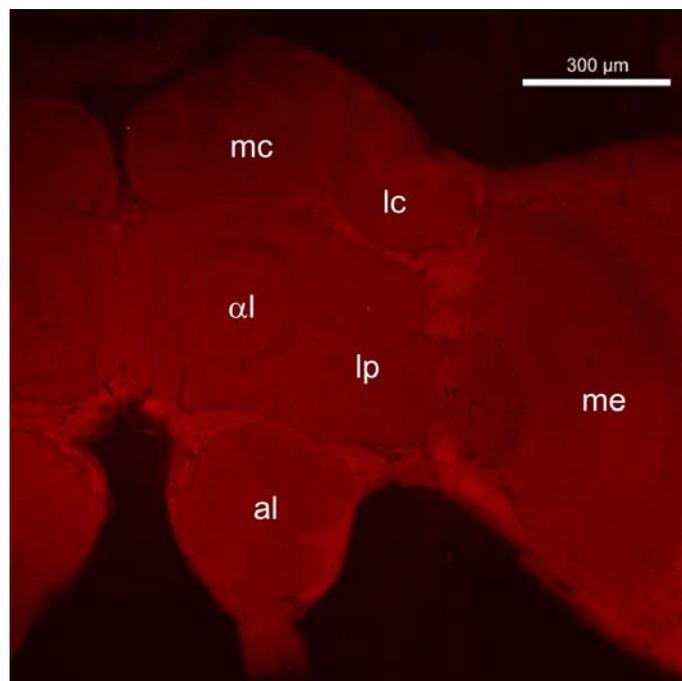
**Abbildung 8:** Tyramin-ähnliche Immunreaktion in einem posterioren Frontalschnitt des Bienengehirns (Konfokale Aufnahme, Schnitttiefe ca. 400 µm). cb = Zentralkörper; dl = Dorsallobus; lc = lateraler Calyx; lo = Lobula; lp = laterales Protocerebrum; mc = medianer Calyx; me = Medulla; ped = Pedunculus.



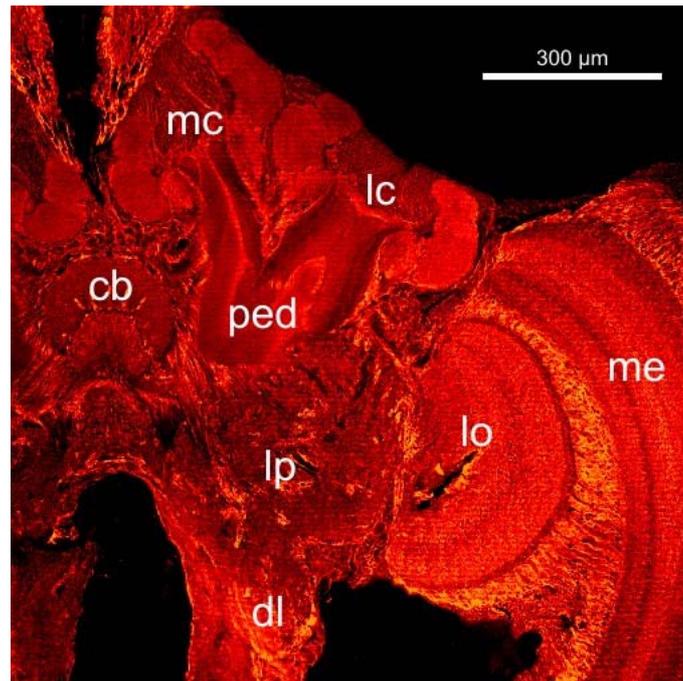
**Abbildung 9:** Tyramin-ähnliche Immunreaktion in einem Saggitalschnitt des Bienengehirns (Konfokale Aufnahme; Schnitttiefe ca 1100 µm). Zahlen bezeichnen Somagruppen in Abb. 5. al = Antennallobus; αl = Alpha-Lobus; mc = medianer Calyx; pb = Protocerebrale Brücke; sog = suboesophageales Ganglion.



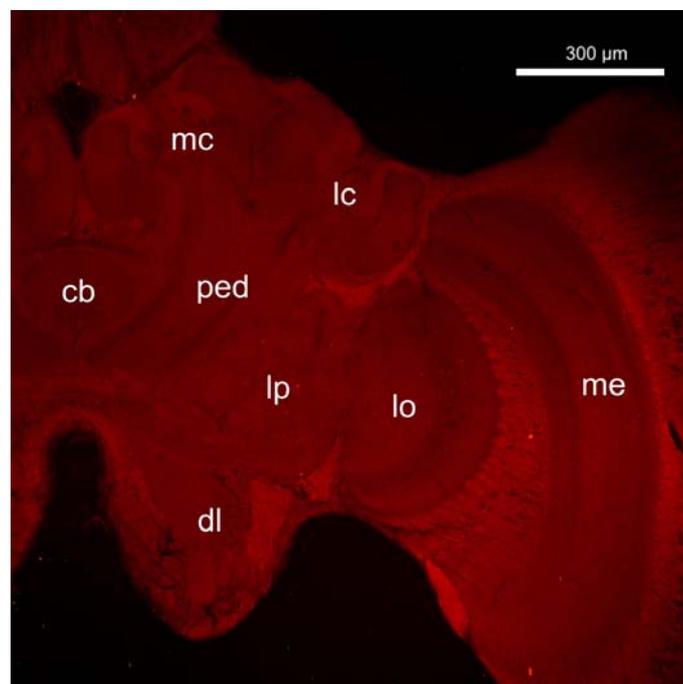
**Abbildung 10:** Konfokale Aufnahme (Schnitttiefe ca. 200 µm) einer frontalen Gehirnansicht mit Tyramin-Rezeptor-ähnlicher Immunreaktion im anterioren Bereich des Bienenhirns. al = Antennallobus;  $\alpha$ l = Alpha-Lobus; lc = lateraler Calyx; lp = laterales Protocerebrum; mc = medianer Calyx; me = Medulla.



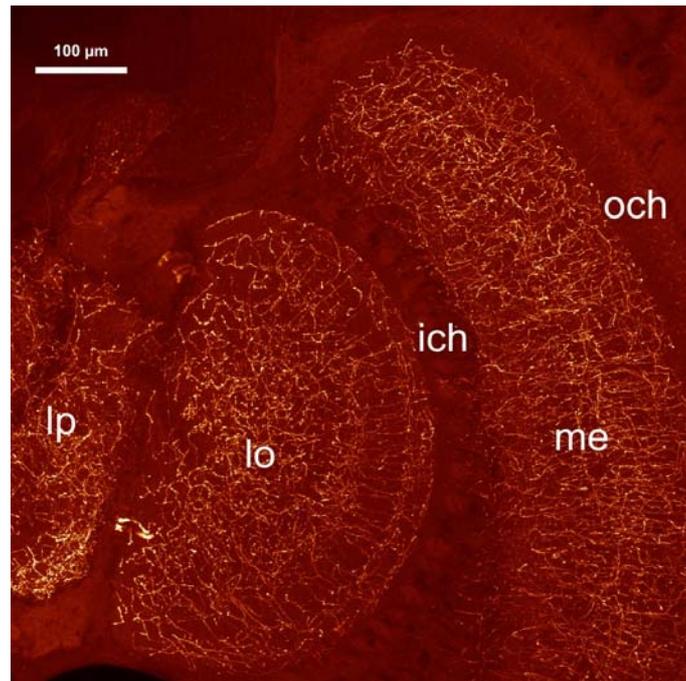
**Abbildung 11:** Kontrolle der Tyramin-Rezeptor-ähnlichen Immunreaktion durch Verwendung von Kaninchen-Präimmenserum anstelle des primären Rezeptor-Antikörpers in einem anterioren Frontalschnitt des Bienenhirns (Konfokale Aufnahme, Schnitttiefe ca. 200 µm). al = Antennallobus;  $\alpha$ l = Alpha-Lobus; lc = lateraler Calyx; lp = laterales Protocerebrum; mc = medianer Calyx; me = Medulla.



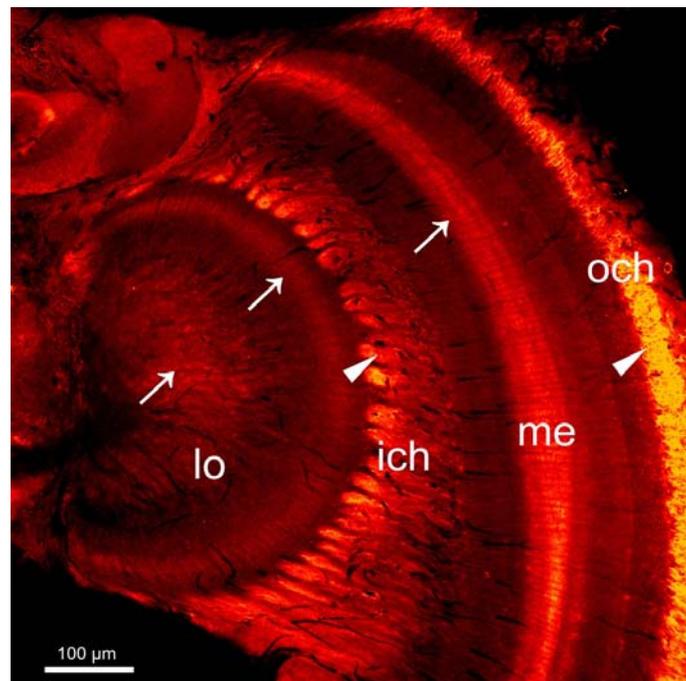
**Abbildung 12:** Konfokale Aufnahme einer frontalen Gehirnansicht mit Tyramin-Rezeptor-ähnlicher Immunreaktion im posterioren Bereich (Schnitttiefe ca. 400 µm) des Bienenhirns. cb = Zentralkörper; dl = Dorsallobus; lc = lateraler Calyx; lo = Lobula; lp = laterales Protocerebrum; mc = medianer Calyx; me = Medulla; ped = Pedunculus.



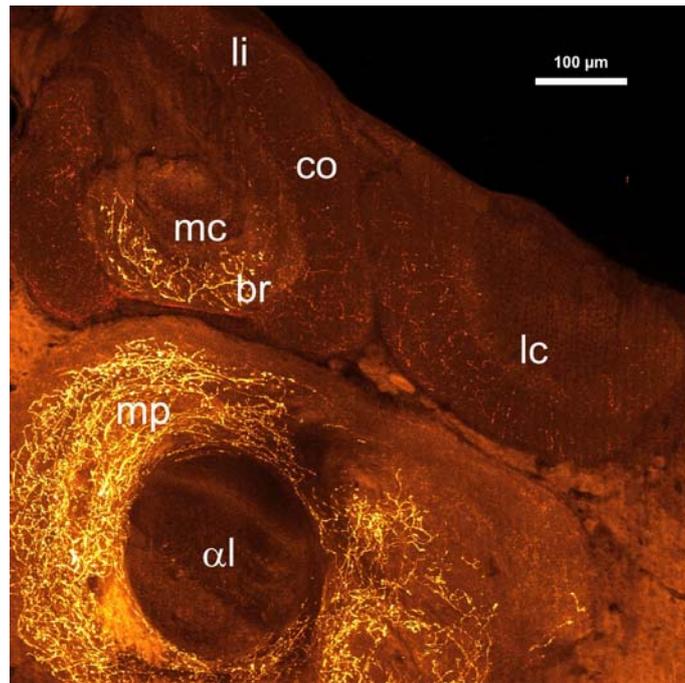
**Abbildung 13:** Kontrolle der Tyramin-Rezeptor-ähnlichen Immunreaktion durch Verwendung von Kaninchen-Präimmunserum anstelle des primären Rezeptor-Antikörpers. Posteriorer Frontalschnitt des Bienenhirns (Konfokale Aufnahme, Schnitttiefe ca. 400 µm). cb = Zentralkörper; dl = Dorsallobus; lc = lateraler Calyx; lo = Lobula; lp = laterales Protocerebrum; mc = medianer Calyx; me = Medulla; ped = Pedunculus.



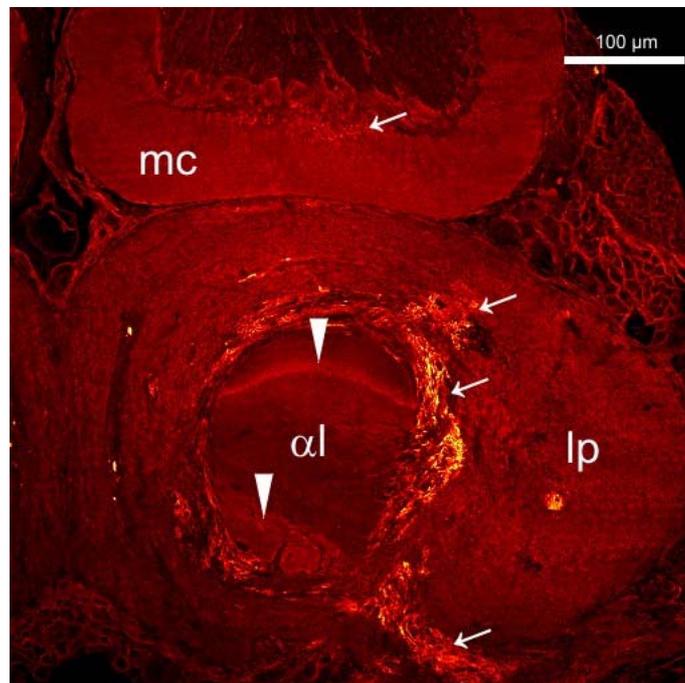
**Abbildung 14:** TA-IR: Konfokale Aufnahme eines immunhistologisch gefärbten Frontalschnitts durch die optischen Loben des Bienenhirns (Schnitttiefe ca. 400 μm). ich = inneres optisches Chiasma; lo = Lobula; lp = laterales Protocerebrum; me = Medulla; och = äußeres optisches Chiasma.



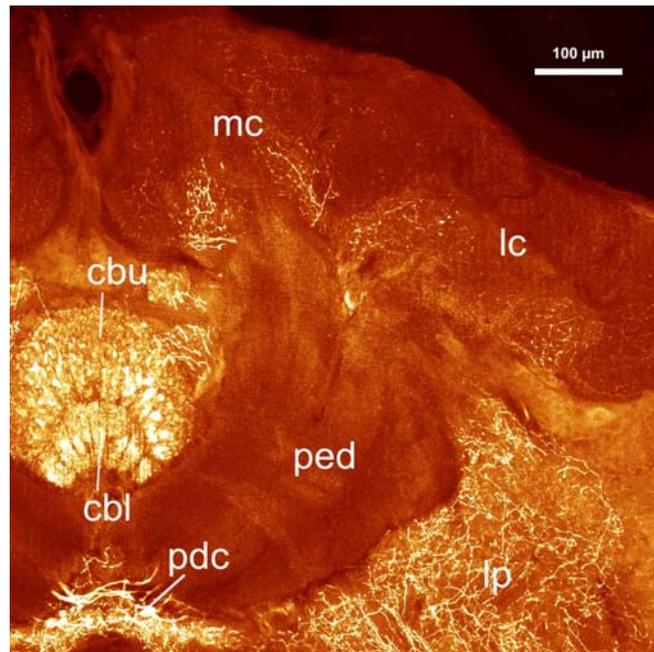
**Abbildung 15:** AmTYR1-IR: Konfokale Aufnahme eines immunhistologisch gefärbten Frontalschnitts durch die optischen Loben des Bienenhirns (Schnitttiefe ca. 400 μm). Pfeile bezeichnen AmTYR1-IR in den Neuropilen, Pfeilspitzen bezeichnen AmTYR1-IR in den optischen Chiasmen. ich = inneres optisches Chiasma; lo = Lobula; me = Medulla; och = äußeres optisches Chiasma



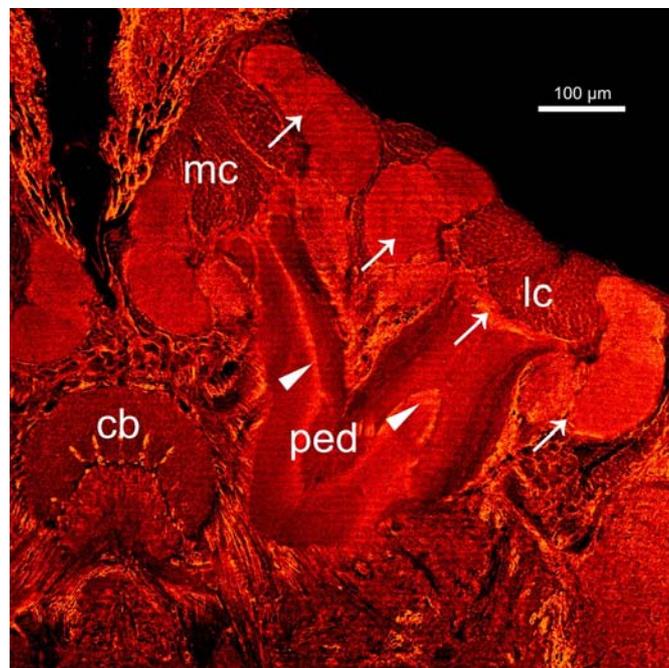
**Abbildung 16:** TA-IR: Ausschnitt aus einem frontalen Gehirnschnitt im anterioren Bereich des medianen Protocerebrums (Konfokale Aufnahme, Schnitttiefe ca. 250  $\mu\text{m}$ ).  $\alpha\text{l}$  = Alpha-Lobus; br = basaler Ring; co = Kragen; lc = lateraler Calyx; li = Lippe; mc = medianer Calyx; mp = medianes Protocerebrum.



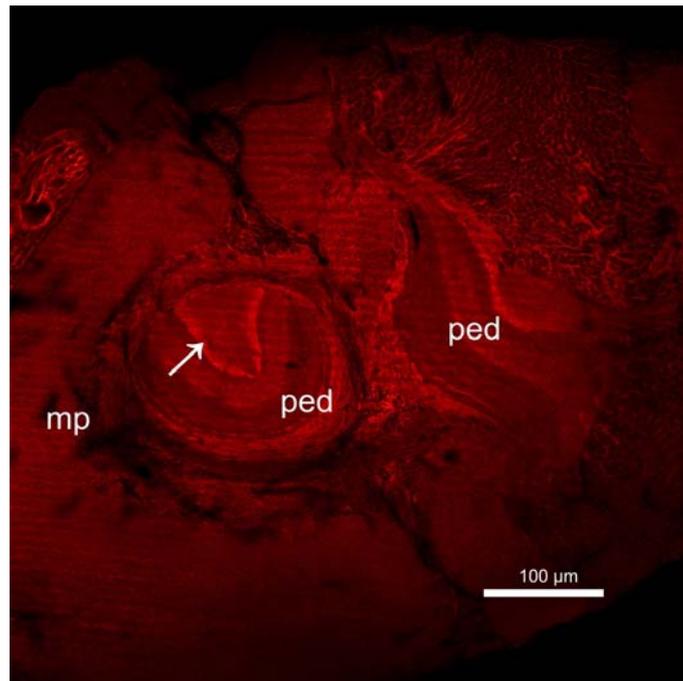
**Abbildung 17:** AmTYR1-IR: Ausschnitt aus einem frontalen Gehirnschnitt im anterioren Bereich des Protocerebrums (Konfokale Aufnahme, Schnitttiefe ca. 250  $\mu\text{m}$ ). Pfeile bezeichnen AmTYR1-IR im Protocerebrum und basalen Ring des medianen Calyx; Pfeilspitzen zeigen AmTYR1-IR im  $\alpha$ -Lobus.  $\alpha\text{l}$  = Alpha-Lobus; lp = laterales Protocerebrum; mc = medianer Calyx.



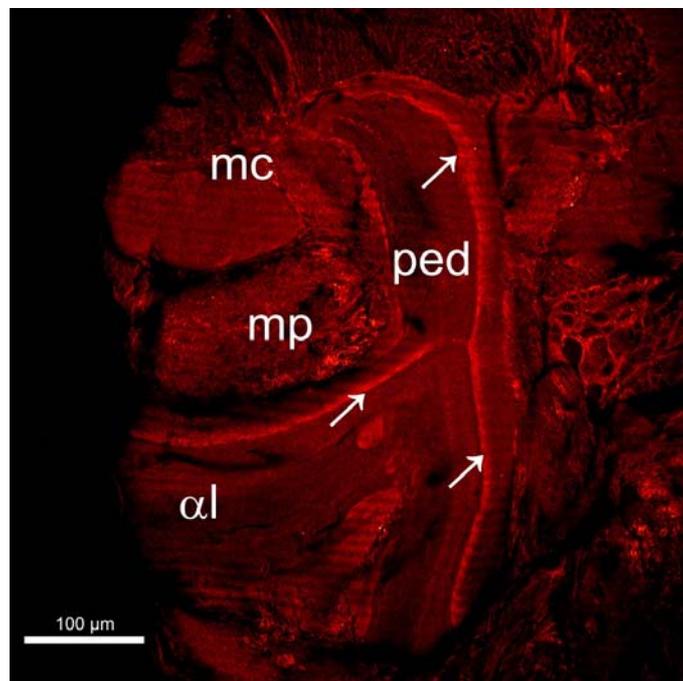
**Abbildung 18:** TA-IR: Ausschnitt aus einem immunhistologisch gefärbten frontalen Gehirnschnitt im posterioren Bereich des medianen Protocerebrums (Konfokale Aufnahme, Schnitttiefe ca. 400 µm). cbl = untere Einheit des Zentralkörpers; cbu = obere Einheit des Zentralkörpers; lc = laterales Calyx; lp = laterales Protocerebrum; mc = medianer Calyx; pdc = posteriore deutocerebrale Kommissur; ped = Pedunculus.



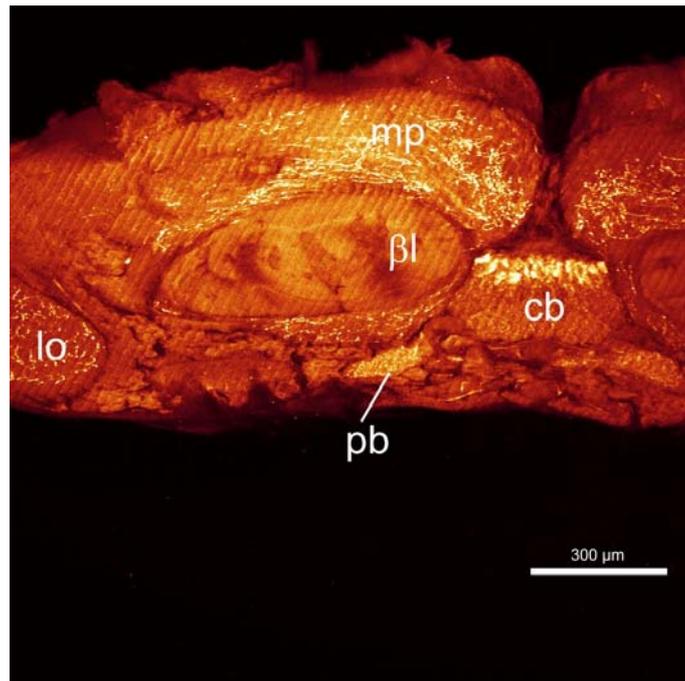
**Abbildung 19:** AmTYR1-IR: Ausschnitt aus einem immunhistologisch gefärbten frontalen Gehirnschnitt im posterioren Bereich des medianen Protocerebrums (Konfokale Aufnahme, Schnitttiefe ca. 400 µm). Pfeile bezeichnen AmTYR1-IR in den Pilzkörper-Kelchen; Pfeilspitzen zeigen AmTYR1-IR als Bänderung im Pedunculus. cb = Zentralkörper; lc = lateraler Calyx; mc = medianer Calyx; ped = Pedunculus.



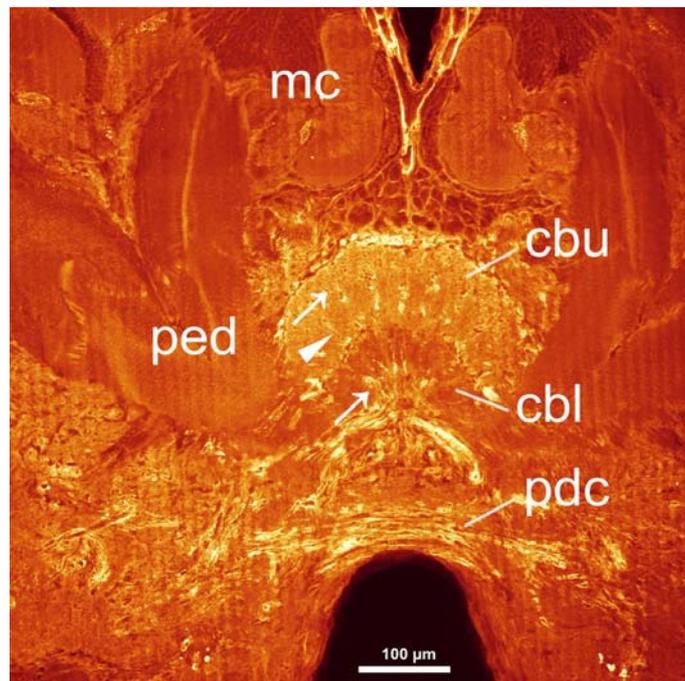
**Abbildung 20:** Konfokale Aufnahme der AmTYR1-IR in den Pedunculi der Pilzkörper in einem horizontalen Schnitt durch das Bienenhirn (Schnitttiefe ca. 300  $\mu\text{m}$ ). Der Pfeil bezeichnet die bogenförmige AmTYR1-IR im horizontal geschnittenen Pedunculus. mp = medianes Protocerebrum; ped = Pedunculus.



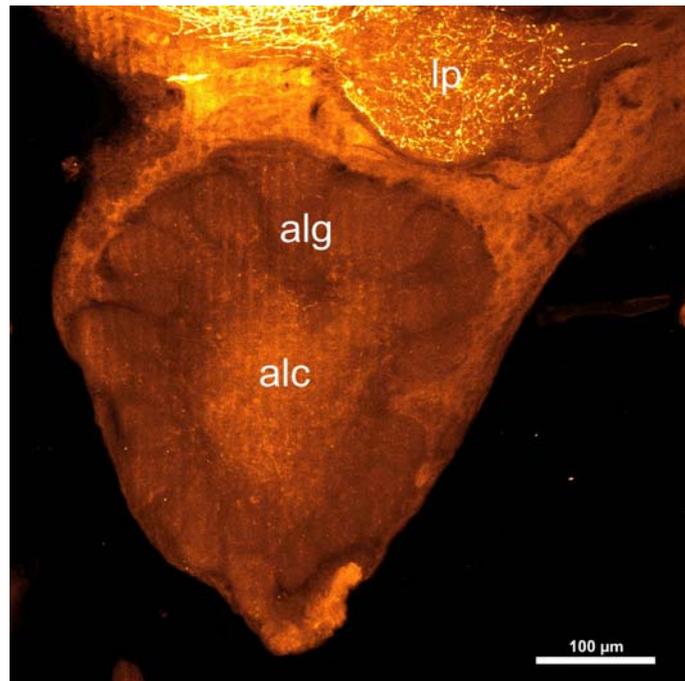
**Abbildung 21:** Konfokale Aufnahme der AmTYR1-IR in einem Pilzkörper-Pedunculus in einem sagittalen Schnitt durch das Bienenhirn (Schnitttiefe ca. 1100  $\mu\text{m}$ ). Pfeile bezeichnen die AmTYR1-IR im Pedunculus.  $\alpha\text{l}$  = Alpha-Lobus; mc = medianer Calyx; mp = medianes Protocerebrum; ped = Pedunculus.



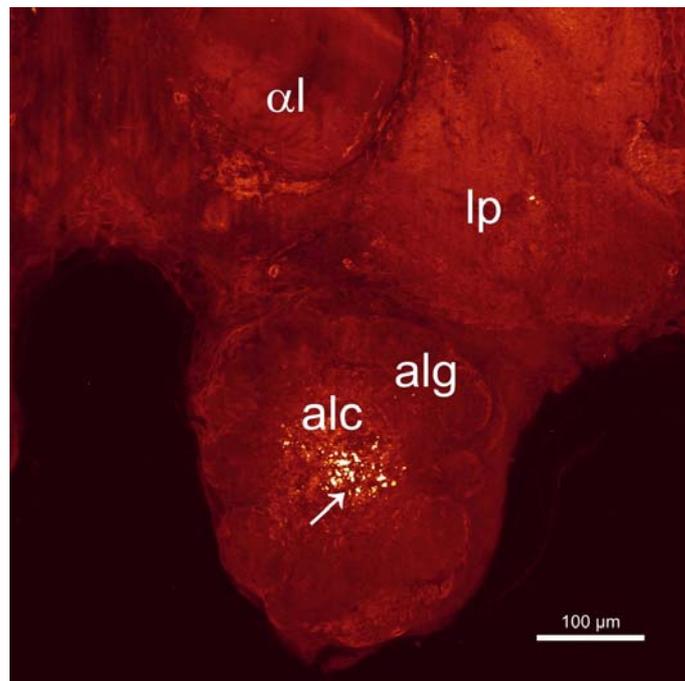
**Abbildung 22:** Tyramin-ähnliche Immunreaktion in einem Horizontalschnitt des Bienenhirns (Konfokale Aufnahme, Schnitttiefe ca. 400 µm).  $\beta$ l = Beta-Lobus; cb = Zentralkörper; lo = Lobula; mp = medianes Protocerebrum; pb = Protocerebrale Brücke.



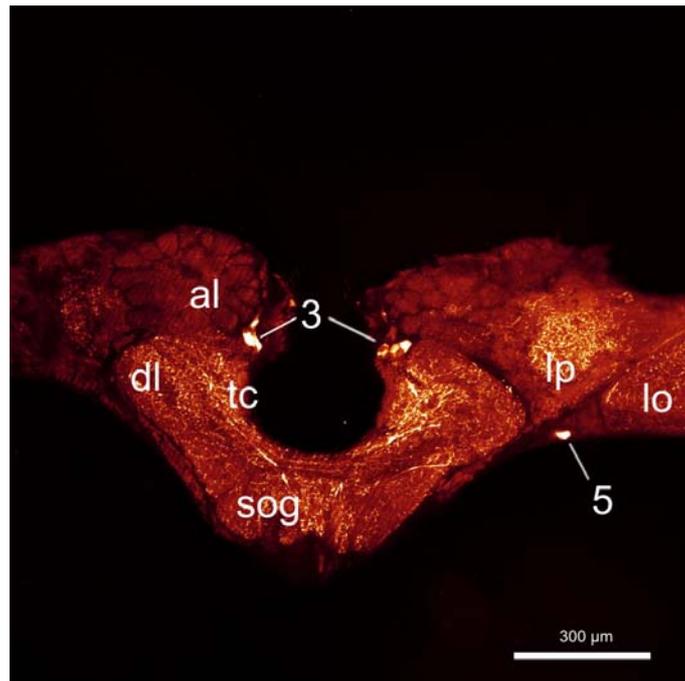
**Abbildung 23:** Tyramin-Rezeptor-ähnliche Immunreaktion im Zentralkörper. Ausschnitt aus einem frontalen Schnitt durch das Bienenhirn (Konfokale Aufnahme, Schnitttiefe ca. 400 µm). Pfeile bezeichnen die AmTYR1-IR in Zentralkörper, die Pfeilspitze zeigt die fächerförmige Aufteilung der oberen Zentralkörper-Einheit, die durch die AmTYR1-IR sichtbar wird. cbl = untere Einheit des Zentralkörpers; cbu = obere Einheit des Zentralkörpers; mc = medianer Calyx; pdc = posteriore deutocerebrale Kommissur; ped = Pedunculus.



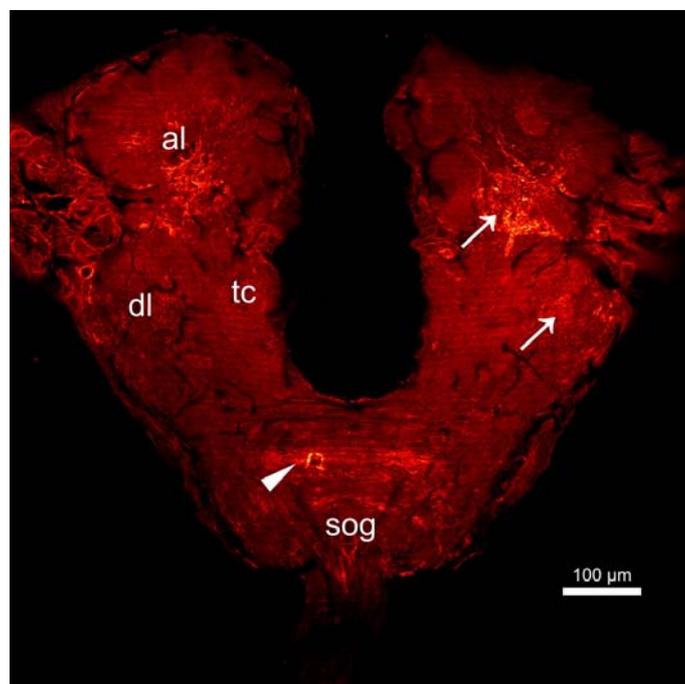
**Abbildung 24:** TA-IR: Konfokale Aufnahme eines frontalen Schnittes durch den Antennallobus im Bienenhirn (Schnitttiefe ca. 250 µm). alc = zentraler Bereich des Antennallobus; alg = glomerulärer Bereich des Antennallobus, lp = laterales Protocerebrum.



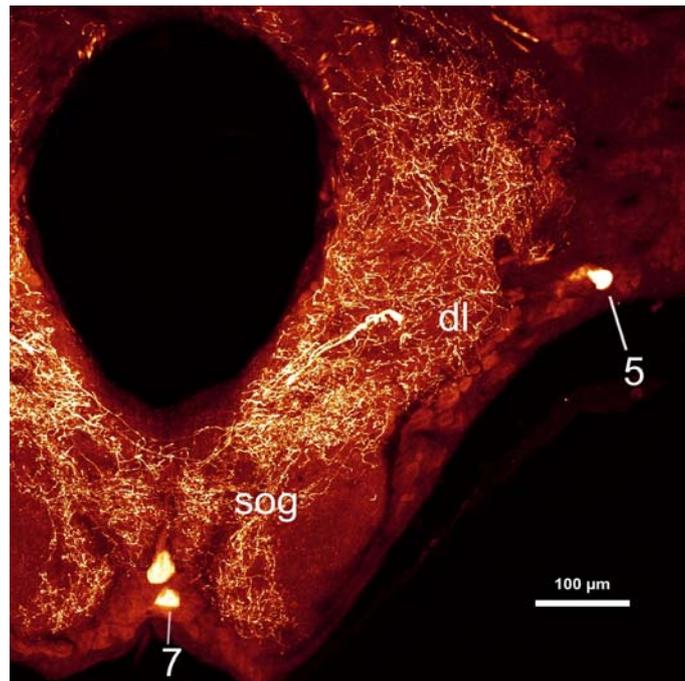
**Abbildung 25:** Tyramin-Rezeptor-ähnliche Immunreaktion im Antennallobus in einem frontalen Gehirnschnitt (Konfokale Aufnahme, Schnitttiefe ca. 250 µm). der Pfeil zeigt die AmTYR1-IR im zentralen Fasergeflecht des Antennallobus. alc = zentraler Bereich des Antennallobus; alg = glomerulärer Bereich des Antennallobus; lp = laterales Protocerebrum; αl = Alpha-Lobus.



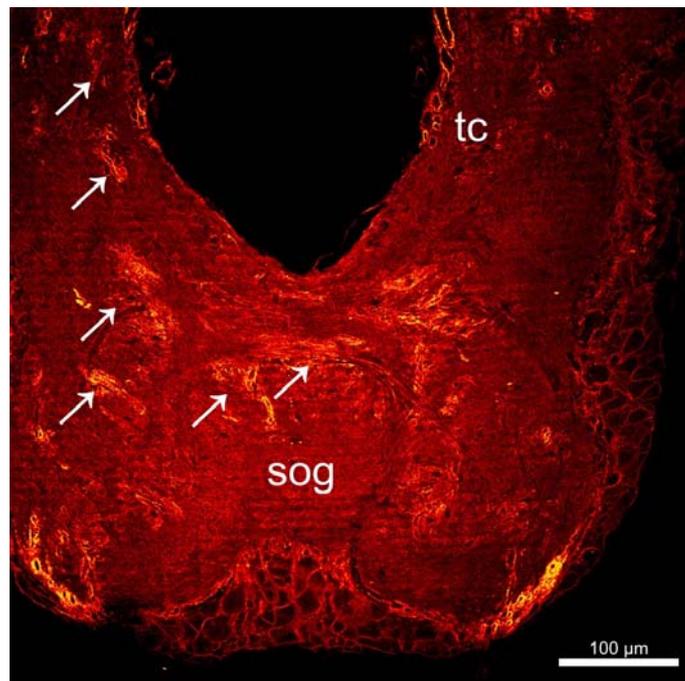
**Abbildung 26:** Tyramin-ähnliche Immunreaktion in einem Horizontalschnitt durch das Bienehirns (Konfokale Aufnahme; Schnitttiefe ca. 1000 µm). Zahlen bezeichnen Somata in den entsprechenden Gruppen in Abb. 5. al = Antennallobus; dl = Dorsallobus; lo = Lobula; lp = laterales Protocerebrum, sog = suboesophageales Ganglion; tc = Tritocerebrum.



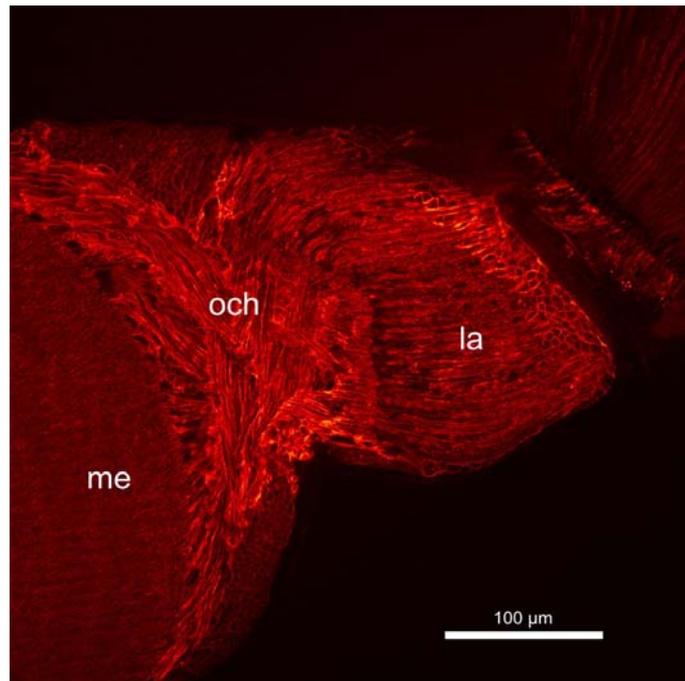
**Abbildung 27:** Tyramin-Rezeptor-ähnliche Immunreaktion in einem Horizontalschnitt durch das Bienehirn (Konfokale Aufnahme, Schnitttiefe ca. 1000µm). Pfeile bezeichnen die AmTYR1-IR im Antennallobus und Dorsallobus, die Pfeilspitze zeigt AmTYR1-IR im suboesophagealen Ganglion. al = Antennallobus; dl = Dorsallobus; sog = suboesophageales Ganglion, tc = Tritocerebrum.



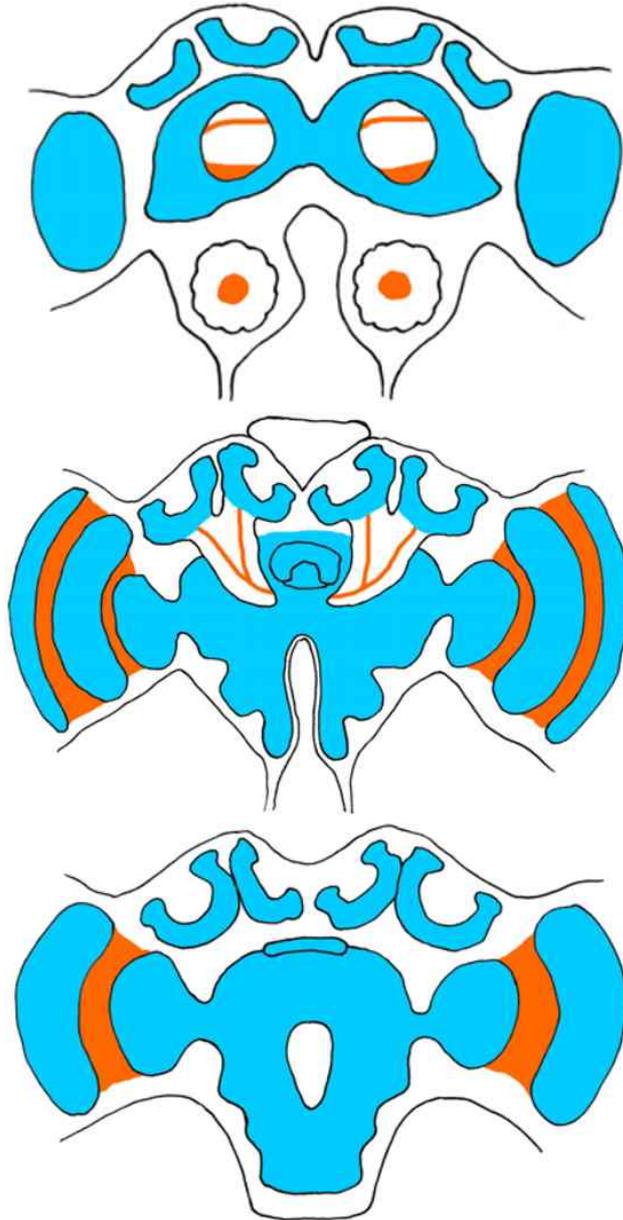
**Abbildung 28:** TA-IR: Konfokale Aufnahme des Dorsallobus und suboesophagealen Ganglions in einem frontalen Gehirnschnitt (Schnitttiefe ca. 500 µm). Zahlen bezeichnen Somata in den entsprechenden Clustern in Abb. 5. dl = Dorsallobus; sog = suboesophageales Ganglion.



**Abbildung 29:** AmTYR-IR in einer Frontalansicht des suboesophagealen Ganglions und Tritocerebrums des Bienenhirns (Konfokale Aufnahme, Schnitttiefe ca. 600 µm). Pfeile zeigen AmTYR1-IR im Tritocerebrum und suboesophagealen Ganglion; sog = suboesophageales Ganglion; tc = Tritocerebrum.



**Abbildung 30:** AmTYR1-IR im äußeren Chiasma der optischen Ganglien. Konfokale Aufnahme eines Horizontalschnittes durch das Bienenhirn (Schnitttiefe ca. 300 μm). la = Lamina; me = Medulla; och = äußeres optisches Chiasma.



**Abbildung 31:** Schematische Darstellung der TA-IR und AmTYR1-IR im Bienengehirn. blau: Neuropilbereiche, in denen sowohl TA-IR also auch AmTYR1-IR detektiert wurden. Orange: Neuropilbereiche, in denen ausschließlich AmTYR1-IR detektiert wurde.

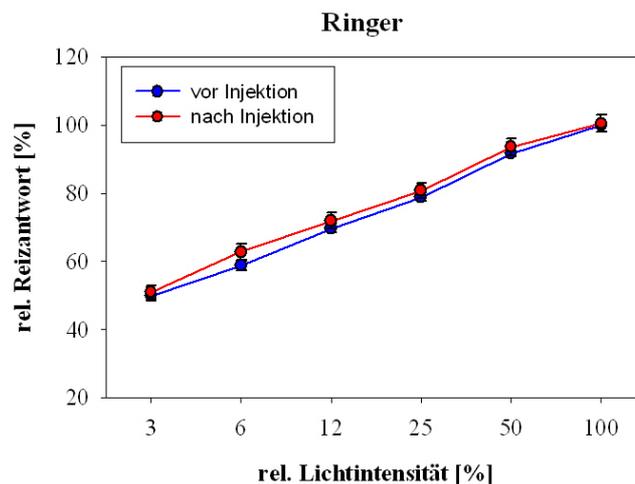
### 3.3 Elektroretinogramm (ERG)

Mit Hilfe von ERG-Intensitätskennlinien wurde die Wirkung der biogenen Amine Oktopamin und Tyramin sowie des Tyramin-Antagonisten Yohimbin auf das visuelle System von Pollen- und Nicht-Pollensammlerinnen bestimmt.

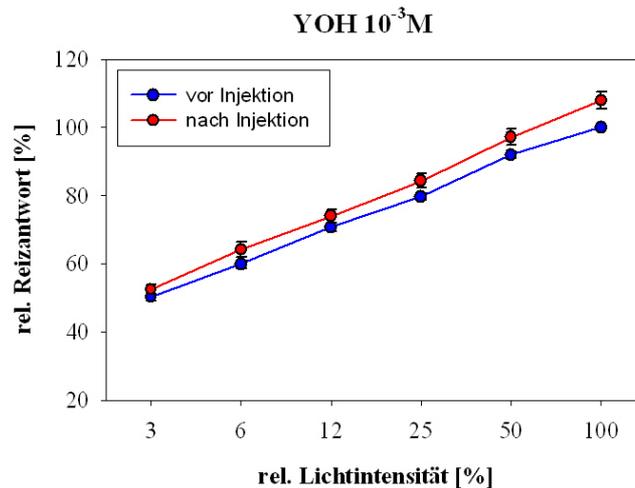
#### 3.3.1 Wirkung der Pharmakaapplikation auf das ERG von Nicht-Pollen-Sammlerinnen

##### *sustained-Komponente*

Eine Injektion von Ringer bzw. YOH führte zu einer leicht erhöhten Reizantwort für alle Lichtintensitäten (2% bzw. 4,6% im Vergleich zu der Reizantwort vor Pharmakaapplikation). Der Deltaprozent-Wert (also die Differenz der relativen Reizantworten vor und nach Injektion, gemittelt über die 6 Lichtintensitäten) für die Ringer-Behandlungsgruppe war nicht von 0 verschieden ( $p = 0,149$ ; One Sample t-Test), während sich der Wert für YOH signifikant von 0 unterschied ( $p = 0,018$ ; One Sample t-Test). Die Wirkung von YOH war von der von Ringer nicht signifikant verschieden (Vergleich der Deltaprozent-Werte:  $p = 0,21$ ; t-Test) (Abb. 32, Abb. 33 und Abb. 36).



**Abbildung 32:** Relative Reizantwort (sustained-Komponente) vor und nach Injektion von Ringer-Lösung ( $n = 11$ ).



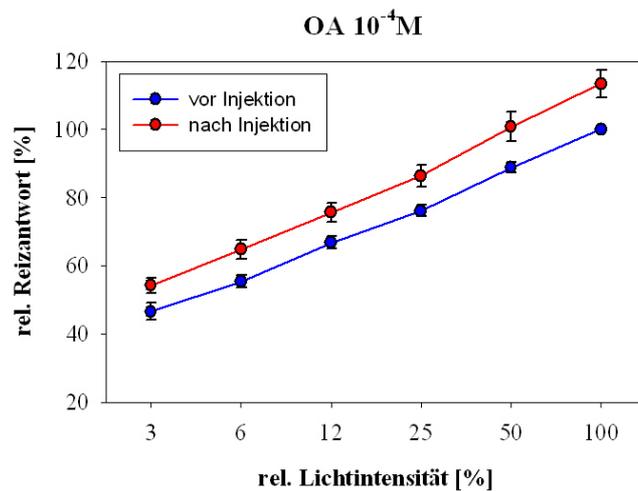
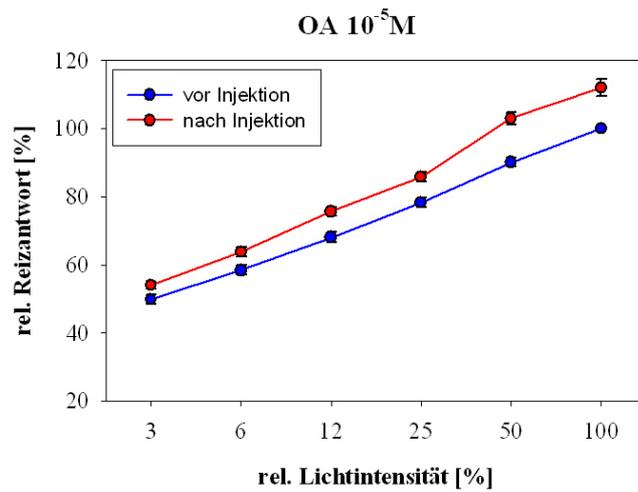
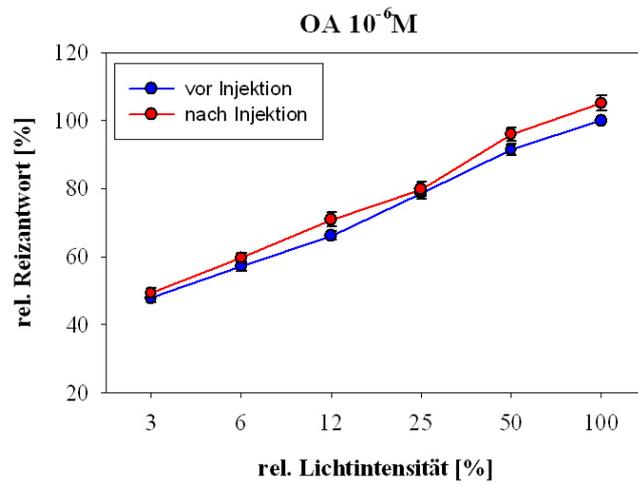
**Abbildung 33:** Relative Reizantwort (sustained-Komponente) vor und nach Injektion von  $10^{-3}$  M YOH (n = 10).

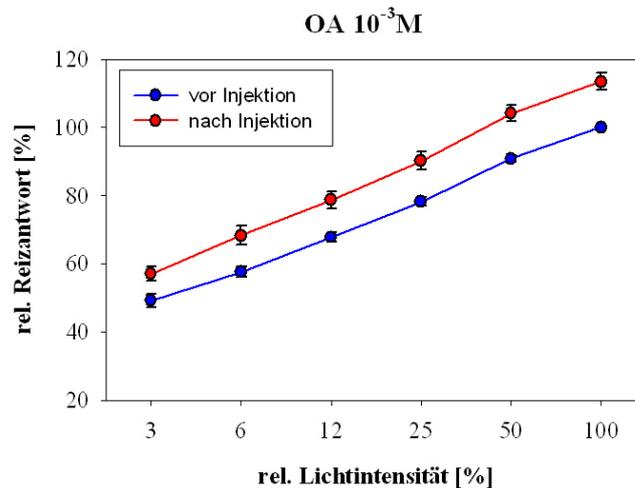
#### *sustained-Komponente: Wirkung von OA*

Eine Injektion von  $10^{-3}$  M,  $10^{-4}$  M oder  $10^{-5}$  M OA führte zu einer erhöhten Reizantwort für alle Lichtintensitäten in der sustained-Komponente. Die jeweiligen Deltaprozent-Werte waren signifikant von 0 verschieden ( $10^{-3}$  M:  $p = 0,001$ ;  $10^{-4}$  M:  $p = 0,008$  und  $10^{-5}$  M:  $p = 0,001$ ; One Sample t-Test). Eine Injektion von  $10^{-6}$  M OA hatte dagegen keinen signifikanten Effekt ( $p = 0,126$ ; One Sample t-Test).

Auch im Vergleich zur Ringer-Kontrolle bewirkte eine Injektion der verschiedenen OA-Konzentrationen eine Erhöhung der Reizantwort (Vergleich der Deltaprozent-Werte:  $p = 0,002$ ;  $F = 5,173$ ; One-way ANOVA). Die Einzelvergleiche der Deltaprozentwerte im Dunnett's Multiple Comparison Post-Test zeigen, dass gegenüber der Ringer-Kontrolle die wirksamen Konzentrationen dabei  $10^{-4}$  M und  $10^{-3}$  M waren ( $p < 0,01$ ), während eine Injektion von  $10^{-5}$  M oder  $10^{-6}$  M OA keinen signifikanten Effekt gegenüber Ringer auf das ERG hatte ( $p > 0,05$ ) (Abb. 34 und Abb. 36).

### 3.3 Ergebnisse: Elektroretinogramm (ERG)

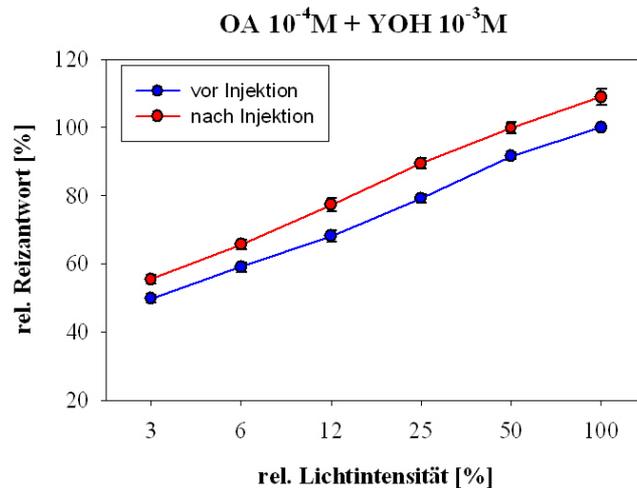




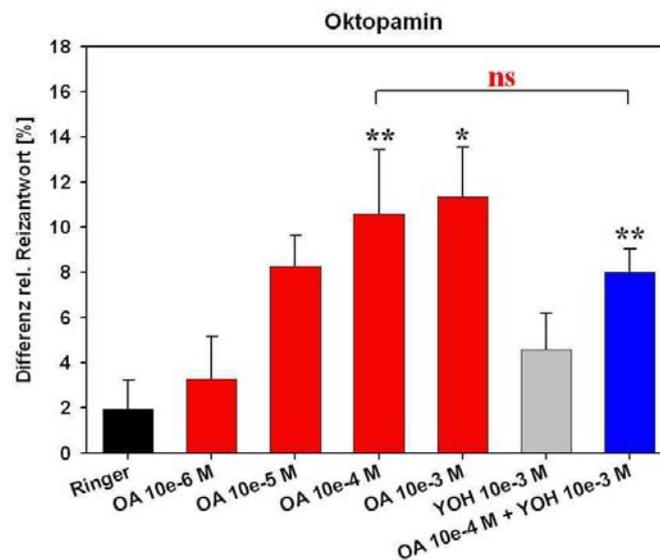
**Abbildung 34:** Relative Reizantwort (sustained-Komponente) vor und nach Injektion von OA verschiedener Konzentrationen (n = 8 für jede der OA-Konzentrationen).

Testet man die Deltaprozent-Werte der verschiedenen OA-Konzentrationen in einem ANOVA Post Test auf einen linearen Trend, so zeigt sich, dass für die verschiedenen Konzentrationen eine Dosis-Wirkungs-Abhängigkeit besteht ( $p = 0,01$ ;  $F = 2,876$ ; One-way ANOVA). Je höher die injizierte Konzentration, desto stärker ist der Effekt auf das ERG.

Der Deltaprozent-Wert der Koinjektion von  $10^{-4}$  M OA mit  $10^{-3}$  M YOH war signifikant von 0 verschieden ( $p = 0,0001$ ; One Sample t-Test). Vergleicht man die Deltaprozent-Werte der Behandlungsgruppen von  $10^{-4}$  M OA, der Koinjektion von  $10^{-4}$  M OA mit  $10^{-3}$  M YOH sowie der Ringerkontrolle in einer One-way ANOVA, so zeigt sich, dass ein signifikanter Unterschied zwischen diesen Gruppen besteht ( $p = 0,005$ ;  $F = 6,577$ ; One-way ANOVA). Ein Einzelvergleich mit dem Bonferroni's Multiple Comparison Post Test zeigt, dass sich der Effekt eine Koinjektion von  $10^{-3}$  M YOH dabei nicht signifikant von dem einer  $10^{-4}$  M OA-Injektion unterschied ( $p > 0,05$ ) (Abb. 35 und Abb. 36).



**Abbildung 35:** Relative Reizantwort (sustained-Komponente) vor und nach Koinjektion von  $10^{-4}$  M OA und  $10^{-3}$  M YOH (n = 8).

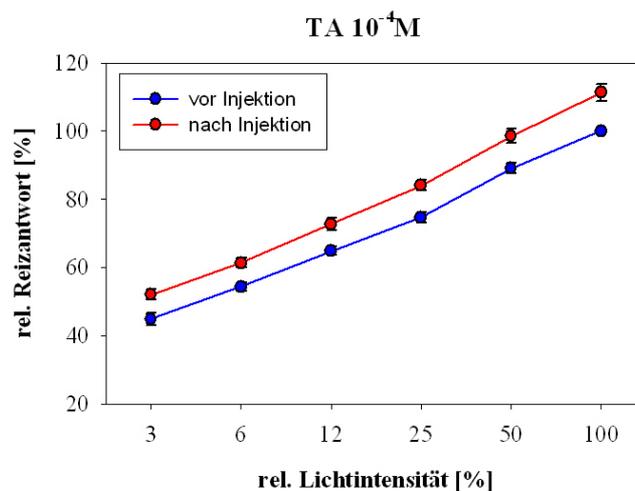
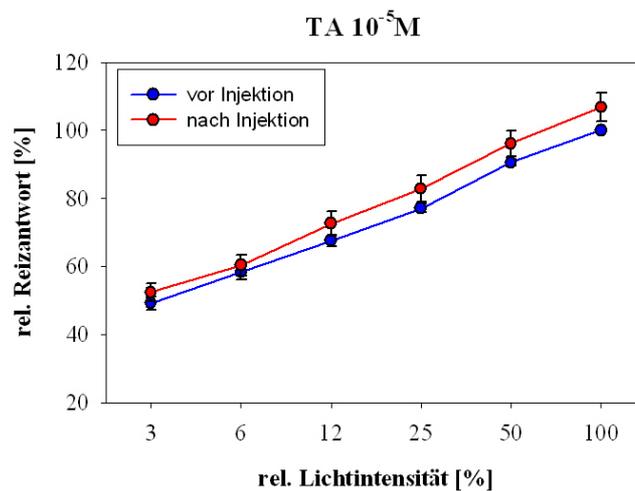


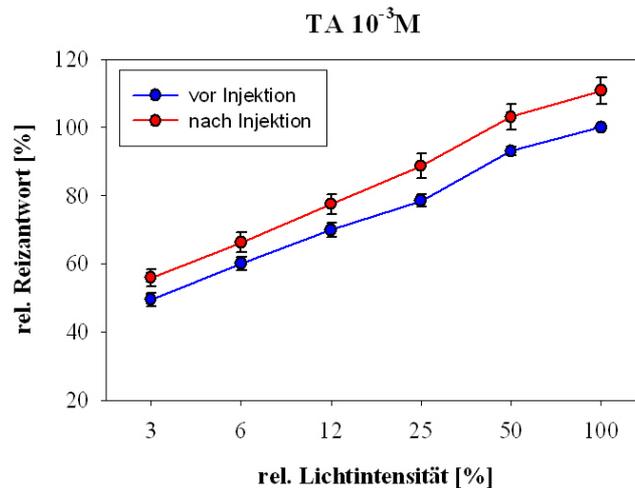
**Abbildung 36:** Sustained-Komponente: Mittelwerte der Differenzen der relativen Reizantworten („Deltaprozente“) für die Injektion von Ringer, verschiedene OA-Konzentrationen,  $10^{-3}$  M YOH sowie die Koinjektion von  $10^{-4}$  M OA und  $10^{-3}$  M YOH. Die Sternsymbole geben die Unterschiede zu Ringer an (Dunnnett’s Multiple Comparison Test; \*: p < 0,05; \*\*: p < 0,01). Das Ergebnis des Bonferroni’s Multiple Comparison Tests für die Koinjektion ist dargestellt. n = 8 für die OA-Injektionen und die Koinjektion; n = 11 für die Ringer-Injektion; n = 10 für die YOH-Injektion.

#### *sustained-Komponente: Wirkung von TA*

Eine Injektion von  $10^{-3}$  M oder  $10^{-4}$  M TA führte zu einer erhöhten Reizantwort für alle Lichtintensitäten in der sustained-Komponente. Die jeweiligen Deltaprozent-Werte waren signifikant von 0 verschieden ( $p = 0,006$  und  $p = 0,002$ ; One Sample t-Test). Eine Injektion von  $10^{-5}$  M TA hatte dagegen keinen signifikanten Effekt ( $p = 0,091$ ; One Sample t-Test).

Im Vergleich zur Ringer-Kontrolle bewirkte eine Injektion der verschiedenen TA-Konzentrationen ebenfalls eine Erhöhung der Reizantwort für alle Lichtintensitäten, wie ein Vergleich der Deltaprozent-Werte zeigt ( $p = 0,036$ ;  $F = 3,218$ ; One-way ANOVA). Die Einzelvergleiche der Deltaprozentwerte im Dunnett's Multiple Comparison Post-Test zeigen, dass gegenüber Ringer die wirksamen Konzentrationen dabei  $10^{-4}$  M und  $10^{-3}$  M waren ( $p < 0,01$ ), während eine Injektion von  $10^{-5}$  M TA keinen Effekt auf das ERG hatte ( $p > 0,05$ ) (Abb. 37 und Abb. 39).

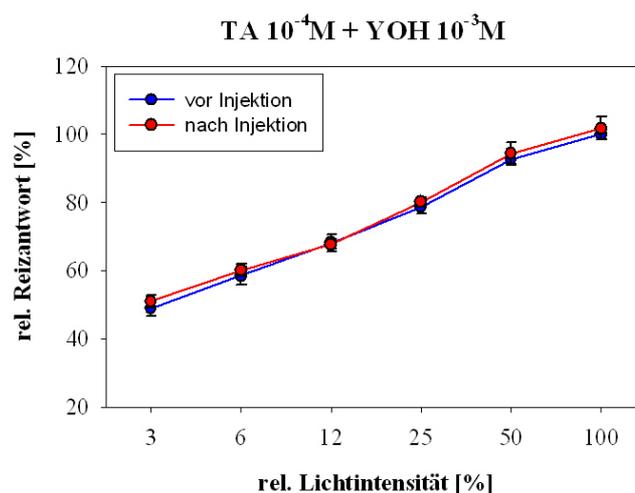




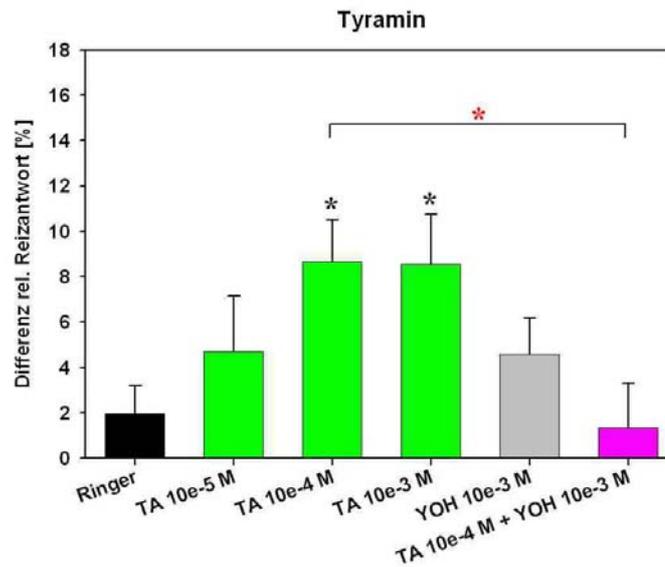
**Abbildung 37:** Relative Reizantwort (sustained-Komponente) vor und nach Injektion von TA verschiedener Konzentrationen (n = 8 für jede der getesteten Konzentrationen).

Die Analyse der verschiedenen TA-Konzentrationen in einem ANOVA Post Test für einen linearen Trend zeigt, dass für die verwendeten Konzentrationen von TA keine Dosis-Wirkungs-Abhängigkeit besteht ( $p = 0,223$ ;  $F = 1,083$ ). Dieser Befund ist vermutlich darauf zurückzuführen, dass nur 3 Konzentrationen getestet wurden.

Der Deltaprozent-Wert der Koinjektion von  $10^{-4}$  M TA mit  $10^{-3}$  M YOH unterscheidet sich nicht signifikant von 0 ( $p = 0,516$ ; One Sample t-Test). Der Vergleich der Deltaprozent-Werte der Behandlungsgruppen von  $10^{-4}$  M TA, der Koinjektion von  $10^{-4}$  M TA mit  $10^{-3}$  M YOH sowie der Ringerkontrolle zeigt weiterhin, dass die Koinjektion von  $10^{-3}$  M YOH den Effekt von  $10^{-4}$  M TA inhibiert ( $p < 0,05$ ; Bonferroni's Multiple Comparison Test) (Abb. 38 und Abb. 39).



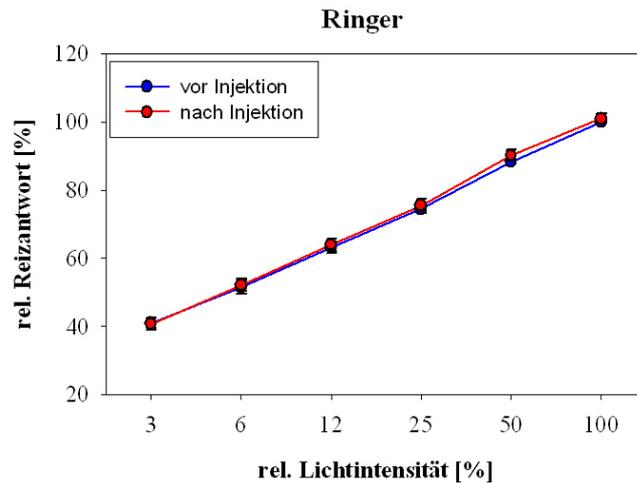
**Abbildung 38:** Relative Reizantwort (sustained-Komponente) vor und nach Koinjektion von  $10^{-4}$  M TA und  $10^{-3}$  M YOH (n = 8).



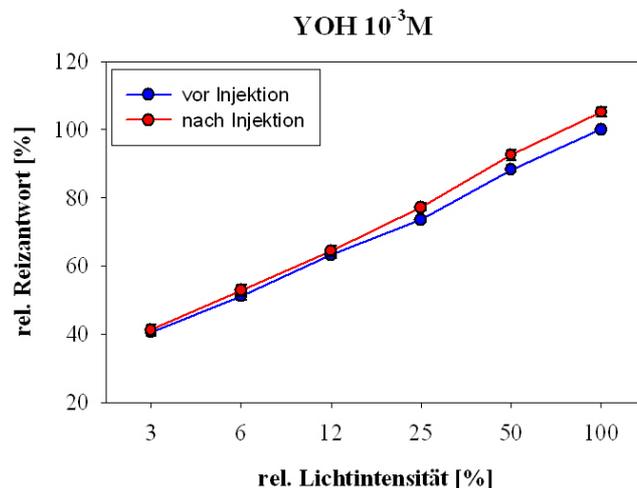
**Abbildung 39:** Sustained-Komponente: Mittelwerte der Differenzen der relativen Reizantworten („Deltaprozente“) für die Injektion von Ringer, verschiedene TA-Konzentrationen,  $10^{-3}$  M Yohimbin und die Koinjektion von  $10^{-4}$  M TA und  $10^{-3}$  M YOH. Die Sternsymbole geben die Unterschiede zu Ringer an (Dunnett’s Multiple Comparison Test; \*:  $p < 0,05$ ). Das Ergebnis des Bonferroni Multiple Comparison Tests für die Koinjektion ist ebenfalls dargestellt.  $n = 8$  für die TA-Injektionen und die Koinjektion;  $n = 11$  für die Ringer-Injektion;  $n = 10$  für die YOH-Injektion.

#### *on-Komponente*

Eine Injektion von Ringer bzw. YOH führte auch in der on-Komponente zu einer leicht erhöhten Reizantwort für einige Lichtintensitäten (1,2% bzw. 3,1% im Vergleich zu der Reizantwort vor Pharmakaapplikation). Der Deltaprozent-Wert für die Ringer-Behandlungsgruppe war nicht signifikant von 0 verschieden ( $p = 0,365$ ; Wilcoxon Signed Rank Test), während sich der Wert für YOH signifikant von 0 unterschied ( $p = 0,02$ ). Die Wirkung von YOH war von der von Ringer nicht signifikant verschieden (Vergleich der Deltaprozent-Werte:  $p = 0,193$ ; Mann-Whitney-Test) (Abb. 40, Abb. 41 und Abb. 44).



**Abbildung 40:** Relative Reizantwort (on-Komponente) vor und nach Injektion von Ringer-Lösung (n = 11).

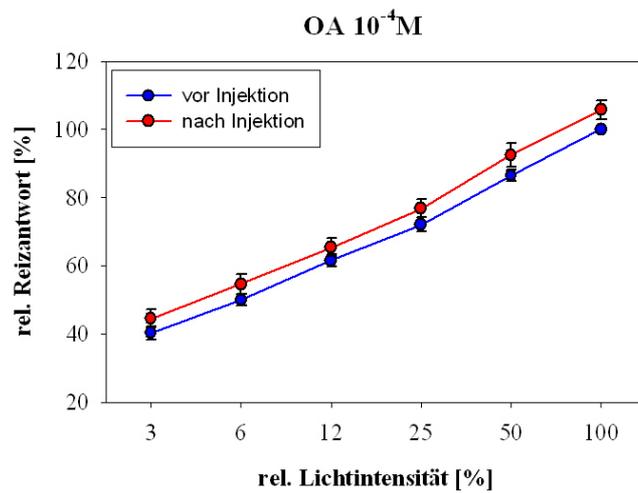
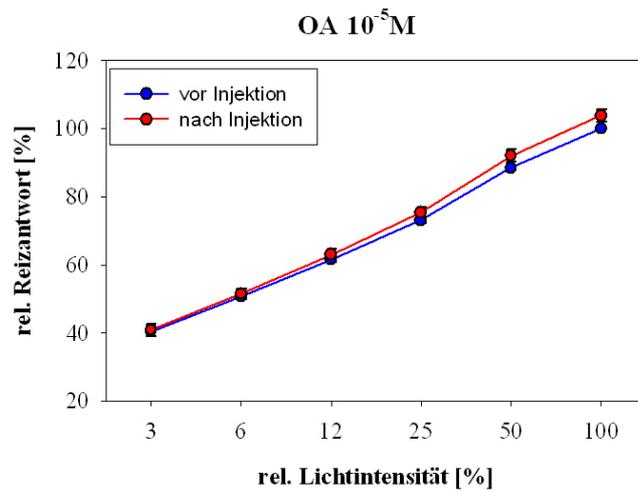
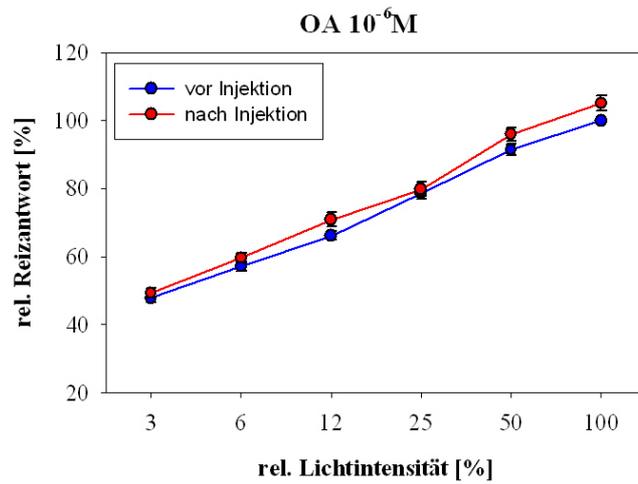


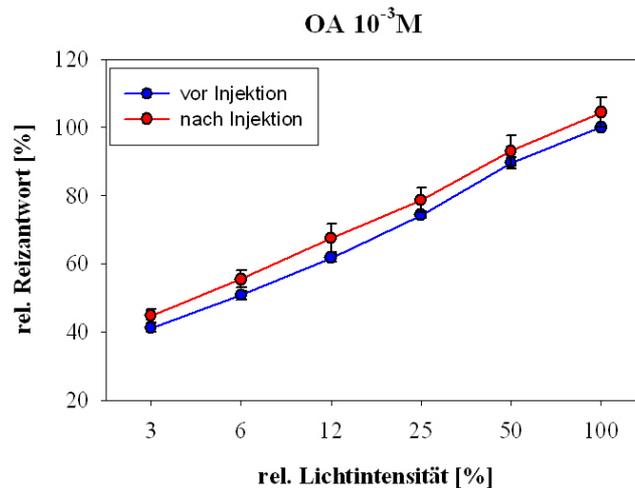
**Abbildung 41:** Relative Reizantwort (on-Komponente) vor und nach Injektion von  $10^{-3}$  M YOH (n = 10).

#### *on-Komponente: Wirkung von OA*

Der Deltaprozent-Wert für die Injektion von  $10^{-4}$  M OA ist für die on-Komponente signifikant von 0 verschieden ( $p = 0,027$ ; Wilcoxon Signed Rank Test). Eine Injektion von OA in den anderen Konzentrationen hatte dagegen keinen signifikanten Effekt auf die on-Komponente ( $p = 0,148$ ;  $p = 0,313$  und  $0,313$  für jeweils  $10^{-3}$  M OA,  $10^{-5}$  M OA und  $10^{-6}$  M OA; Wilcoxon Signed Rank Test). Im Vergleich zur Ringer-Kontrolle hatte eine Injektion der verschiedenen OA-Konzentrationen keinen signifikanten Effekt auf die Reizantwort der on-Komponenten (Vergleich der Deltaprozent-Werte:  $p = 0,249$ ; Kruskal-Wallis-Test) (Abb. 42 und Abb. 44).

### 3.3 Ergebnisse: Elektroretinogramm (ERG)

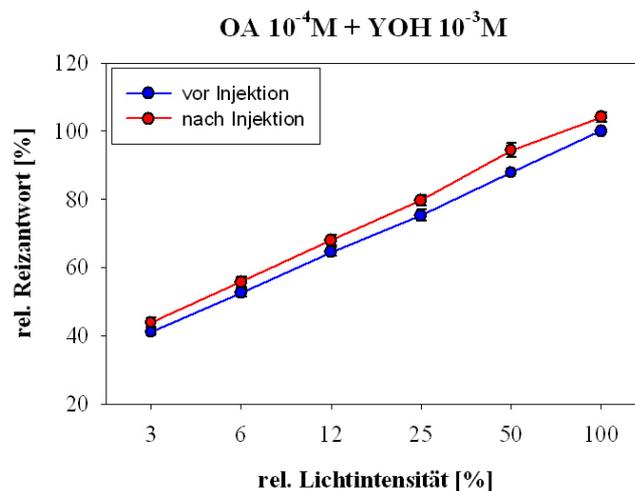




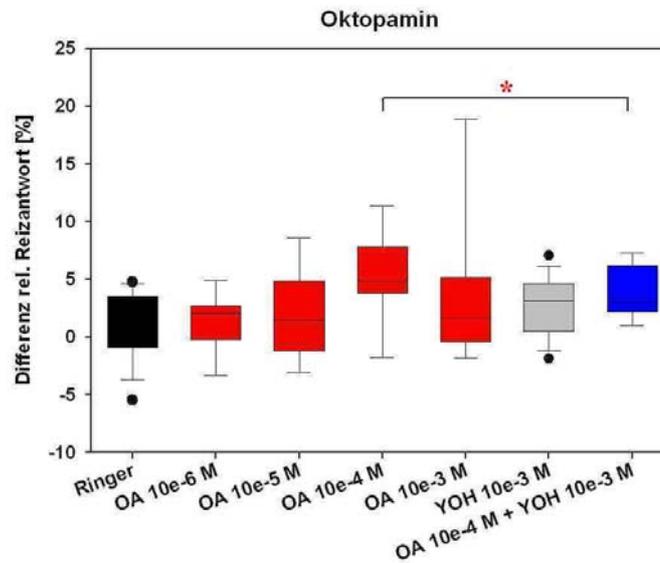
**Abbildung 42:** Relative Reizantwort (on-Komponente) vor und nach Injektion von OA verschiedener Konzentrationen ( $n = 8$  für jede der getesteten Konzentrationen).

Die Deltaprozent-Werte der verschiedenen OA-Konzentrationen für die on-Reaktion weisen keinen linearen Trend auf; es besteht also keine Dosis-Wirkungs-Abhängigkeit für die verschiedenen Konzentrationen ( $p = 0,182$ ;  $F = 0,830$ ; ANOVA Post Test).

Der Deltaprozent-Wert der Koinjektion von  $10^{-4}$  M OA mit  $10^{-3}$  M YOH ist signifikant von 0 verschieden ( $p = 0,008$ ; Wilcoxon Signed Rank Test). Vergleicht man die Deltaprozent-Werte der Behandlungsgruppen von  $10^{-4}$  M OA, der Koinjektion von  $10^{-4}$  M OA mit  $10^{-3}$  M YOH sowie der Ringerkontrolle in einem Dunn's Multiple Comparison Post Test miteinander, so zeigt sich, dass eine Koinjektion von  $10^{-3}$  M YOH den Effekt, den  $10^{-4}$  M OA im Einzelvergleich mit 0 zeigt, aufhebt ( $p < 0,05$ ) (Abb. 43 und Abb. 44).



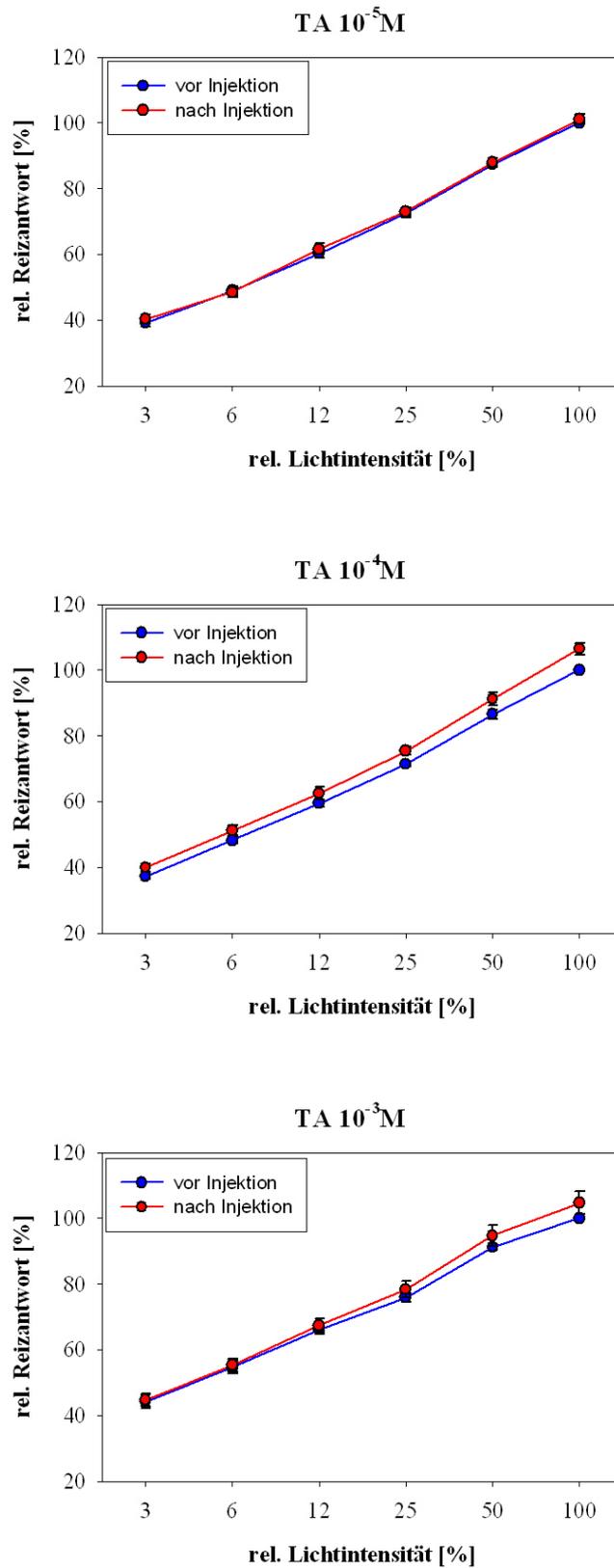
**Abbildung 43:** Relative Reizantwort (on-Komponente) vor und nach Koinjektion von  $10^{-4}$  M OA und  $10^{-3}$  M YOH ( $n = 8$ ).



**Abbildung 44:** on-Komponente: Mediane der Differenzen der relativen Reizantworten („Deltaprozente“) für die Injektion von Ringer, verschiedene OA-Konzentrationen,  $10^{-3}$  M YOH sowie die Koinjektion von  $10^{-4}$  M OA und  $10^{-3}$  M YOH. Das Ergebnis des Dunn’s Multiple Comparison Tests für die Koinjektion ist dargestellt ( $p < 0,05$ ).  $n = 8$  für die OA-Injektionen und die Koinjektion;  $n = 11$  für die Ringer-Injektion;  $n = 10$  für die YOH-Injektion.

#### *on-Komponente: Wirkung von TA*

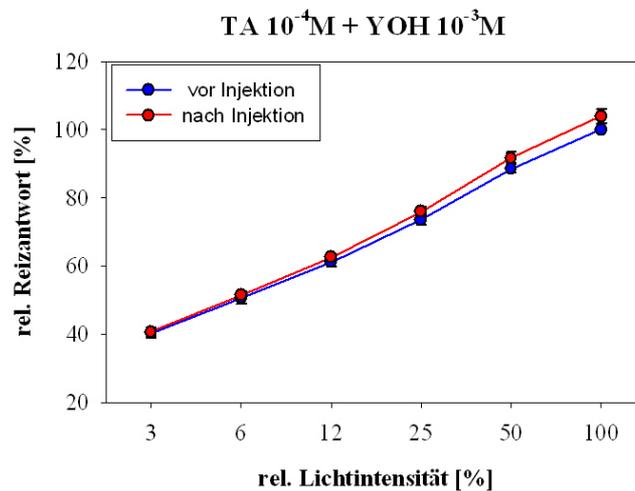
Der Deltaprozent-Wert ist auch für die Injektion von  $10^{-4}$  M TA signifikant von 0 verschieden ( $p = 0,023$ ; Wilcoxon Signed Rank Test). Eine Injektion von  $10^{-3}$  M und  $10^{-5}$  M TA hatte dagegen keinen signifikanten Effekt auf die Amplitude der on-Komponente ( $p = 0,313$  und  $p = 0,547$ ; Wilcoxon Signed Rank Test). Im Vergleich zur Ringer-Kontrolle hatte eine Injektion der verschiedenen TA-Konzentrationen jedoch keinen Effekt auf die Reizantwort der on-Komponenten (Vergleich der Deltaprozent-Werte:  $p = 0,293$ ; Kruskal-Wallis-Test) (Abb. 45 und Abb. 47).



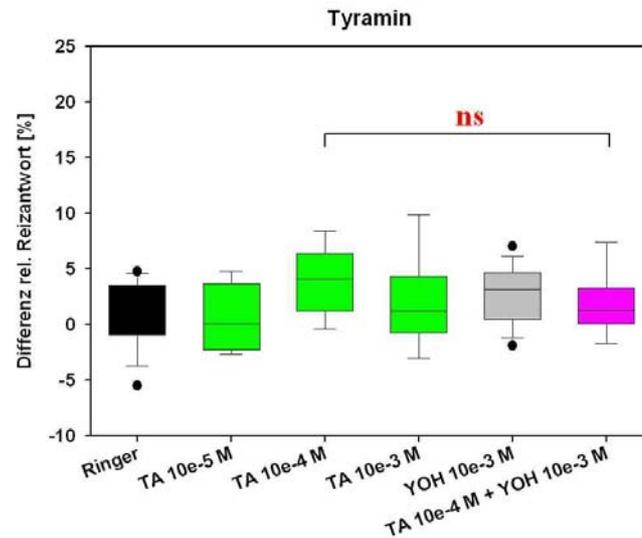
**Abbildung 45:** Relative Reizantwort (on-Komponente) vor und nach Injektion von TA verschiedener Konzentrationen (n = 8 für jede der getesteten Konzentrationen).

Die Deltaprozent-Werte der verschiedenen TA-Konzentrationen für die on-Reaktion weisen keinen linearen Trend auf; es besteht also keine Dosis-Wirkungs-Abhängigkeit für die verschiedenen Konzentrationen ( $p = 0,448$ ;  $F = 1,507$ ; ANOVA Post Test).

Der Deltaprozent-Wert der Koinjektion von  $10^{-4}$  M TA mit  $10^{-3}$  M YOH unterscheidet sich nicht signifikant von 0 ( $p = 0,156$ ; Wilcoxon Signed Rank Test). Vergleicht man die Deltaprozent-Werte der Behandlungsgruppen von  $10^{-4}$  M TA, der Koinjektion von  $10^{-4}$  M TA mit  $10^{-3}$  M YOH sowie der Ringerkontrolle in einem Dunn's Multiple Comparison Post Test miteinander, so zeigt sich, dass eine Koinjektion von  $10^{-3}$  M YOH keinen Effekt auf die Wirkung von  $10^{-4}$  M TA hat ( $p > 0,05$ ) (Abb. 46 und Abb. 47).



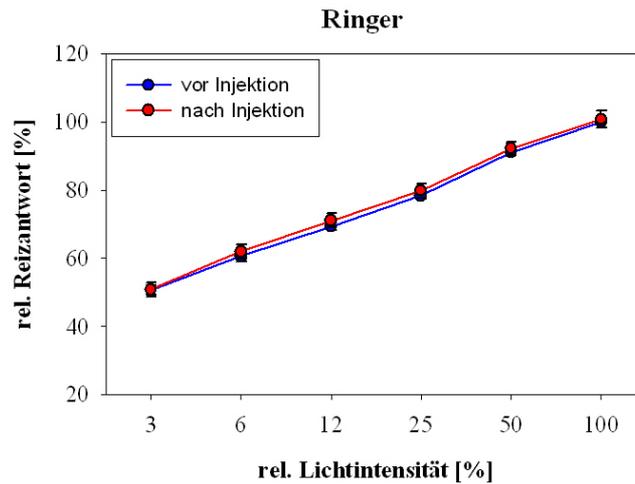
**Abbildung 46:** Relative Reizantwort (on-Komponente) vor und nach Koinjektion von  $10^{-4}$  M TA und  $10^{-3}$  M YOH ( $n = 8$ ).



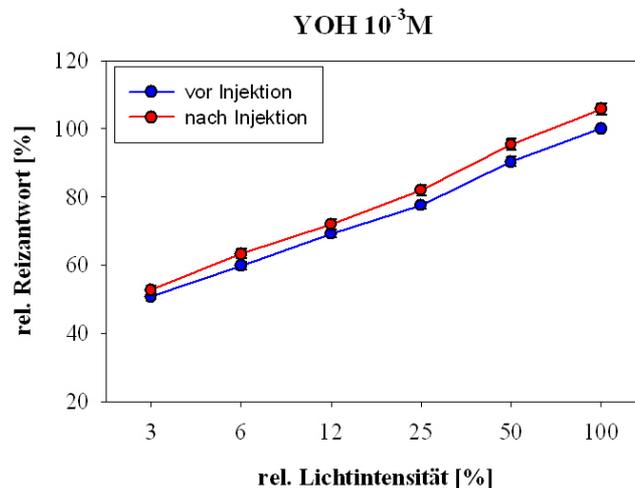
**Abbildung 47:** on-Komponente: Mediane der Differenzen der relativen Reizantworten („Deltaprozente“) für die Injektion von Ringer, verschiedene TA-Konzentrationen,  $10^{-3}$  M YOH und die Koinjektion von  $10^{-4}$  M TA und  $10^{-3}$  M YOH. Das Ergebnis des Dunn’s Multiple Comparison Test für die Koinjektion ist dargestellt (ns = nicht signifikant).  $n = 8$  für die TA-Injektionen und die Koinjektion;  $n = 11$  für die Ringer-Injektion;  $n = 10$  für die YOH-Injektion.

#### *off-Komponente*

Eine Injektion von Ringer bzw. YOH führte auch in der off-Komponente zu einer leicht erhöhten Reizantwort (2,5% bzw. 3,9% im Vergleich zu der Reizantwort vor Pharmakaapplikation). Der Deltaprozent-Wert für die Ringer-Behandlungsgruppe war nicht signifikant von 0 verschieden ( $p = 0,465$ ; Wilcoxon Signed Rank Test), während sich der Wert für YOH signifikant von 0 unterschied ( $p = 0,02$ ). Die Wirkung von YOH war von der von Ringer nicht signifikant verschieden (Vergleich der Deltaprozent-Werte:  $p = 0,275$ ; Mann-Whitney-Test) (Abb. 48, Abb. 49 und Abb. 52).



**Abbildung 48:** Relative Reizantwort (off-Komponente) vor und nach Injektion von Ringer-Lösung (n = 11).



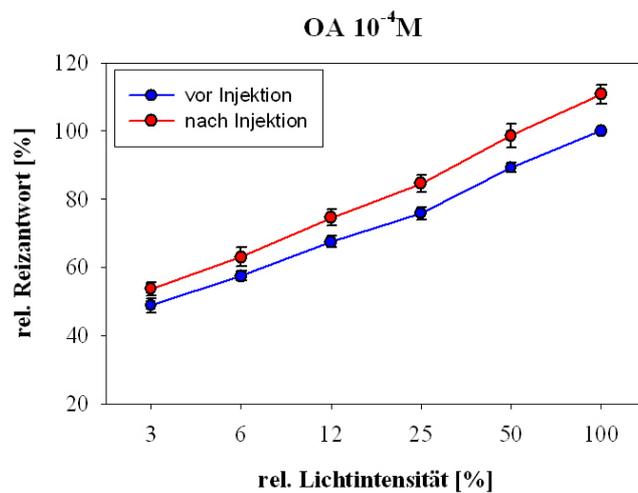
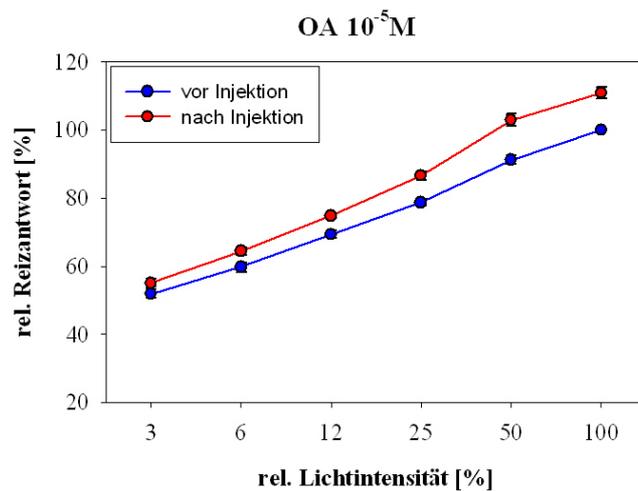
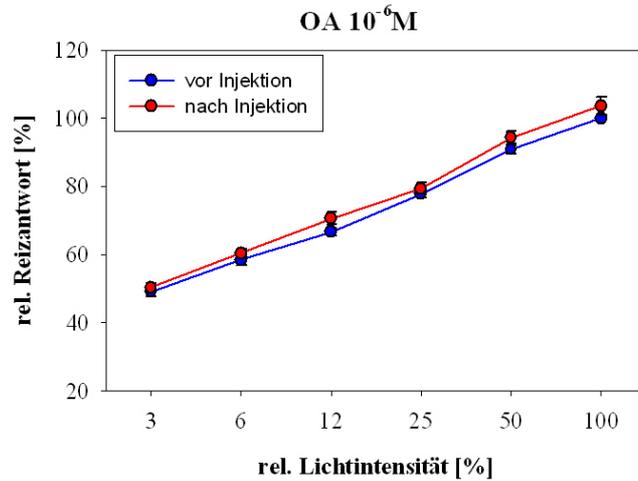
**Abbildung 49:** Relative Reizantwort (off-Komponente) vor und nach Injektion von 10<sup>-3</sup> M YOH (n = 10).

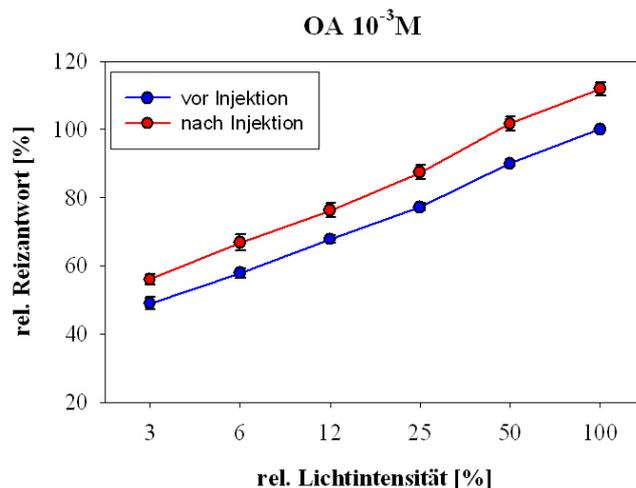
#### *off-Komponente: Wirkung von OA*

Der Deltaprozent-Wert für die Injektion von 10<sup>-3</sup> M, 10<sup>-4</sup> M und 10<sup>-5</sup> M OA ist ebenso wie die sustained-Komponente auch für die off-Komponente signifikant von 0 verschieden (p = 0,008 für alle 3 Konzentrationen; Wilcoxon Signed Rank Test). Eine Injektion von 10<sup>-6</sup> M OA hatte dagegen keinen signifikanten Effekt auf die off-Komponente (p = 0,148; Wilcoxon Signed Rank Test). Im Vergleich zur Ringer-Kontrolle hatte eine Injektion der verschiedenen OA-Konzentrationen ebenfalls einen Effekt auf die Reizantwort der off-Komponenten (Vergleich der Deltaprozent-Werte: p = 0,001; Kruskal-Wallis-Test). Die Einzelvergleiche der Deltaprozente im Dunn's Multiple Comparison Post Test zeigen, dass die wirksamen

### 3.3 Ergebnisse: Elektroretinogramm (ERG)

Konzentrationen dabei  $10^{-3}$  M und  $10^{-5}$  M OA waren ( $p < 0,01$  bzw.  $p < 0,05$ ), während eine Injektion von  $10^{-4}$  M oder  $10^{-6}$  M OA keinen Effekt auf das ERG hatte ( $p > 0,05$ ) (Abb. 50 und Abb. 52).

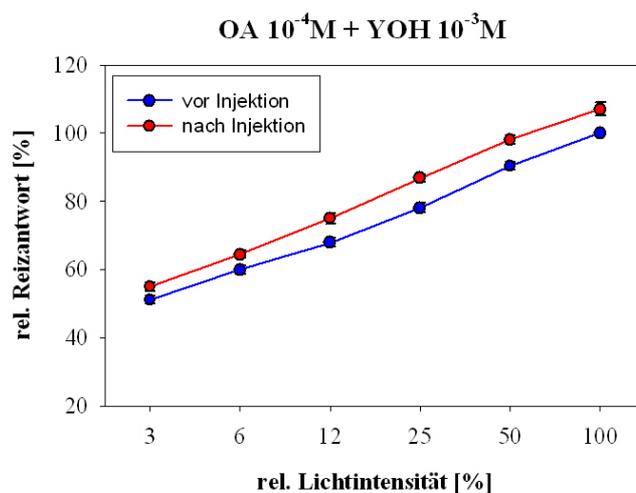




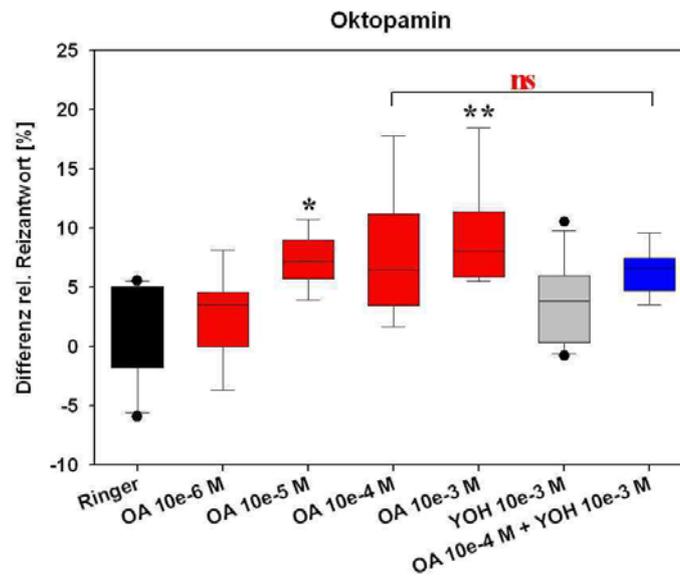
**Abbildung 50:** Relative Reizantwort (off-Komponente) vor und nach Injektion von OA verschiedener Konzentrationen ( $n = 8$  für jede der getesteten Konzentrationen).

Der lineare Trend für die Deltaprozent-Werte der verschiedenen OA-Konzentrationen für die off-Reaktion zeigt, dass eine Dosis-Wirkungs-Abhängigkeit für die verschiedenen Konzentrationen besteht ( $p = 0,007$ ;  $F = 3,176$ ; ANOVA Post Test). Je höher die eingesetzte Konzentration, desto stärker der Effekt auf die off-Komponente.

Der Deltaprozent-Wert der Koinjektion von  $10^{-4}$  M OA mit  $10^{-3}$  M YOH ist signifikant von 0 verschieden ( $p = 0,008$ ; Wilcoxon Signed Rank Test). Vergleicht man die Deltaprozent-Werte der Behandlungsgruppen von  $10^{-4}$  M OA, der Koinjektion von  $10^{-4}$  M OA mit  $10^{-3}$  M YOH sowie der Ringerkontrolle in einem Dunn's Multiple Comparison Post Test miteinander, so zeigt sich, dass eine Koinjektion von  $10^{-3}$  M YOH keinen Effekt auf die Wirkung von  $10^{-4}$  M OA hat ( $p > 0,05$ ) (Abb. 51 und Abb. 52).



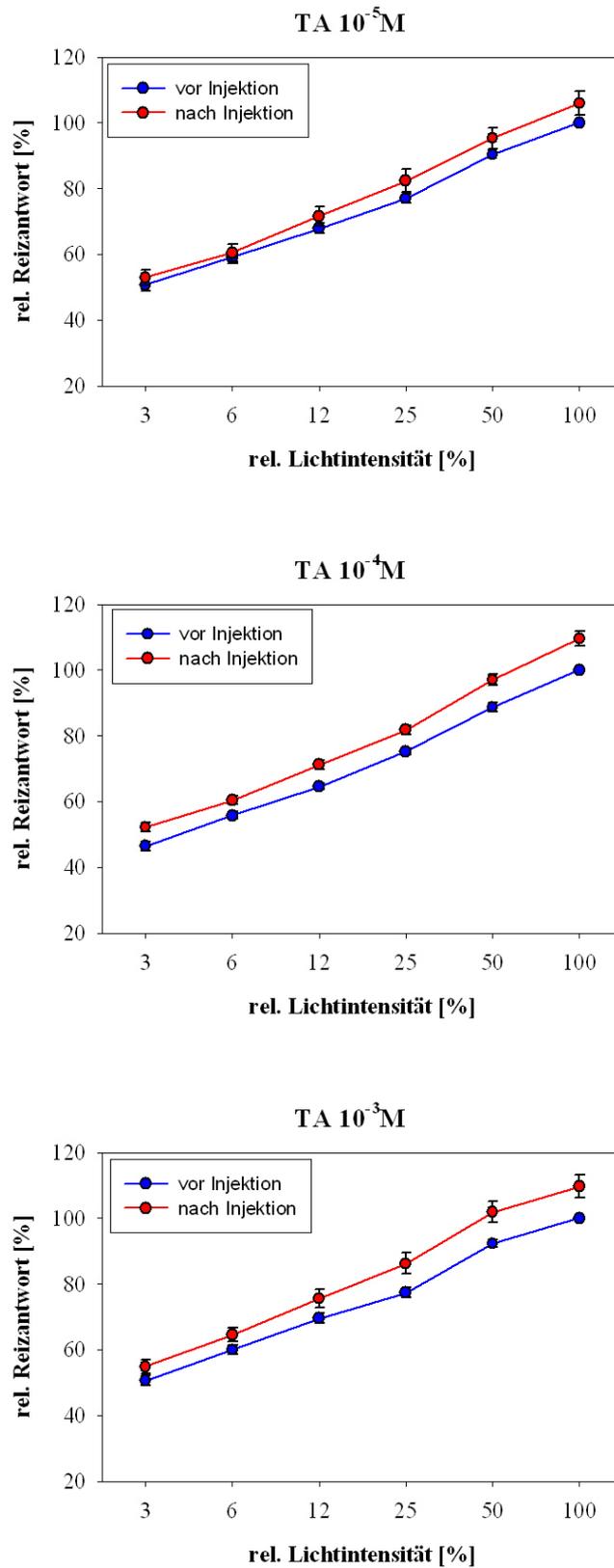
**Abbildung 51:** Relative Reizantwort (off-Komponente) vor und nach Koinjektion von  $10^{-4}$  M OA und  $10^{-3}$  M YOH ( $n = 8$ ).



**Abbildung 52:** off-Komponente: Mediane der Differenzen der relativen Reizantworten („Deltaprozente“) für die Injektion von Ringer, verschiedene OA-Konzentrationen,  $10^{-3}$  M Yohimbin und die Koinjektion von  $10^{-4}$  M OA und  $10^{-3}$  M YOH. Die Sternsymbole geben die Unterschiede zu Ringer an (Dunn’s Multiple Comparison Test; \*:  $p < 0,05$ ; \*\*:  $p < 0,01$ ). Das Ergebnis des Dunn’s Multiple Comparison Tests für die Koinjektion ist dargestellt (ns = nicht signifikant).  $n = 8$  für die OA-Injektionen und die Koinjektion;  $n = 11$  für die Ringer-Injektion;  $n = 10$  für die YOH-Injektion.

#### *off-Komponente: Wirkung von TA*

Der Deltaprozent-Wert für die Injektion von  $10^{-3}$  M und  $10^{-4}$  M TA ist auch für die off-Komponente signifikant von 0 verschieden ( $p = 0,023$  bzw.  $p = 0,016$ ; Wilcoxon Signed Rank Test). Eine Injektion von  $10^{-5}$  M TA hatte dagegen keinen signifikanten Effekt auf die off-Komponente ( $p = 0,109$ ; Wilcoxon Signed Rank Test). Im Vergleich zur Ringer-Kontrolle hatte eine Injektion der verschiedenen TA-Konzentrationen jedoch keinen Effekt auf die Reizantwort der off-Komponenten (Vergleich der Deltaprozent-Werte:  $p = 0,068$ ; Kruskal-Wallis-Test) (Abb. 53 und Abb. 55).

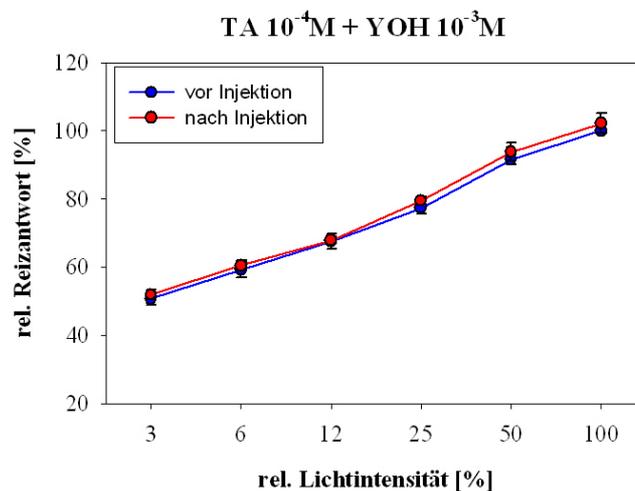


**Abbildung 53:** Relative Reizantwort (off-Komponente) vor und nach Injektion von TA verschiedener Konzentrationen (n = 8 für jede der getesteten Konzentrationen).

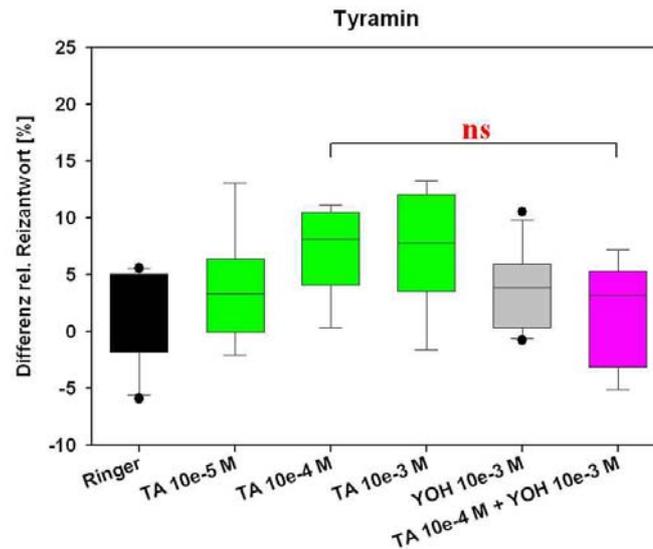
### 3.3 Ergebnisse: Elektroretinogramm (ERG)

Die Deltaprozent-Werte der verschiedenen TA-Konzentrationen für die off-Reaktion weisen keinen linearen Trend auf; es besteht also keine Dosis-Wirkungs-Abhängigkeit für die verschiedenen Konzentrationen ( $p = 0,241$ ;  $F = 0,911$ , ANOVA Post Test).

Der Deltaprozent-Wert der Koinjektion von  $10^{-4}$  M OA mit  $10^{-3}$  M YOH ist nicht signifikant von 0 verschieden ( $p = 0,383$ ; Wilcoxon Signed Rank Test). Vergleicht man die Deltaprozent-Werte der Behandlungsgruppen von  $10^{-4}$  M TA, der Koinjektion von  $10^{-4}$  M TA mit  $10^{-3}$  M YOH sowie der Ringerkontrolle in einem Dunn's Multiple Comparison Post Test miteinander, so zeigt sich, dass eine Koinjektion von  $10^{-3}$  M YOH keinen Effekt auf die Wirkung von  $10^{-4}$  M TA hatte ( $p > 0,05$ ) (Abb. 54 und Abb. 55).



**Abbildung 54:** Relative Reizantwort (off-Komponente) vor und nach Koinjektion von  $10^{-4}$  M TA und  $10^{-3}$  M YOH ( $n = 8$ ).

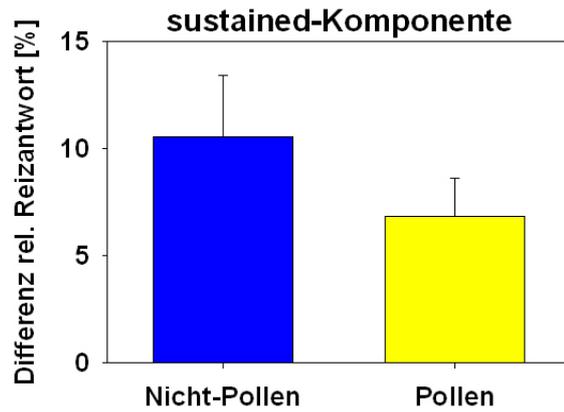


**Abbildung 55:** off-Komponente: Mediane der Differenzen der relativen Reizantworten („Deltaprozente“) für die Injektion von Ringer, verschiedene TA-Konzentrationen,  $10^{-3}$  M YOH und die Koinjektion von  $10^{-4}$  M TA und  $10^{-3}$  M Yohimbin. Das Ergebnis des Dunn’s Multiple Comparison Tests für die Koinjektion ist dargestellt (ns = nicht signifikant).  $n = 8$  für die OA-Injektionen und die Koinjektion;  $n = 11$  für die Ringer-Injektion;  $n = 10$  für die YOH-Injektion.

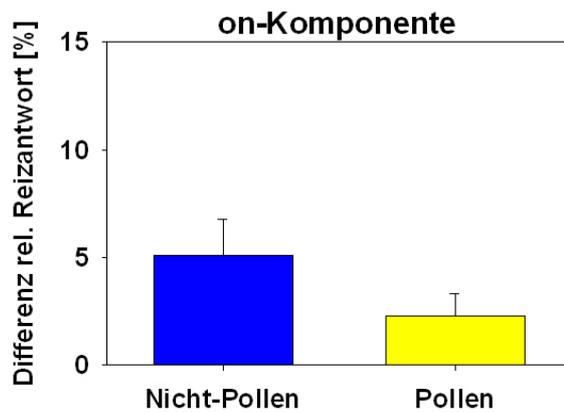
#### 3.3.2 Vergleich der Wirkung der Pharmakaapplikation von Pollen- und Nicht-Pollen-Sammlerinnen

Um eventuelle Unterschiede in der modulatorischen Wirkung biogener Amine bei Pollen- und Nichtpollen-Sammlerinnen zu untersuchen, wurde für die beiden Sammler-Typen der Effekt einer Applikation von  $10^{-4}$  M OA verglichen. Es wurden die ERG von jeweils 8 Pollen- und Nichtpollen-Sammlerinnen aufgenommen.

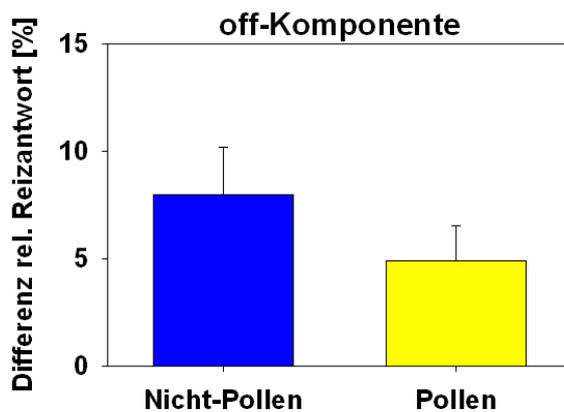
Der Deltaprozent-Wert für die  $10^{-4}$  M OA-Injektion war bei Pollen-Sammlerinnen, genau wie bei Nichtpollen-Sammlerinnen, signifikant verschieden von 0 für die sustained-Komponente ( $p = 0,007$ ; One Sample t-Test), für die on-Komponente ( $p = 0,039$ ; Wilcoxon Signed Rank Test) sowie für die off-Komponente ( $p = 0,031$ , Wilcoxon Signed Rank Test). Die Deltaprozent-Werte von Pollen- und Nichtpollensammlerinnen unterschieden sich weder in der sustained- ( $p = 0,284$ ; unpaired t-Test), noch in der on- ( $p = 0,161$ ; Mann-Whitney-Test) oder der off- ( $p = 0,442$ ; Mann-Whitney-Test) Komponenten bezüglich des modulatorischen Effektes einer Injektion von  $10^{-4}$  M OA voneinander (Abb. 56, Abb. 57 und Abb. 58).



**Abbildung 56:** Vergleich des Effektes einer Injektion mit  $10^{-4}$  M OA bei Nicht-Pollensammlerinnen und Pollensammlerinnen (sustained-Komponente).  $n = 8$  für jede Testgruppe.



**Abbildung 57:** Vergleich des Effektes einer Injektion mit  $10^{-4}$  M OA bei Nicht-Pollensammlerinnen und Pollensammlerinnen (on-Komponente).  $n = 8$  für jede Testgruppe.

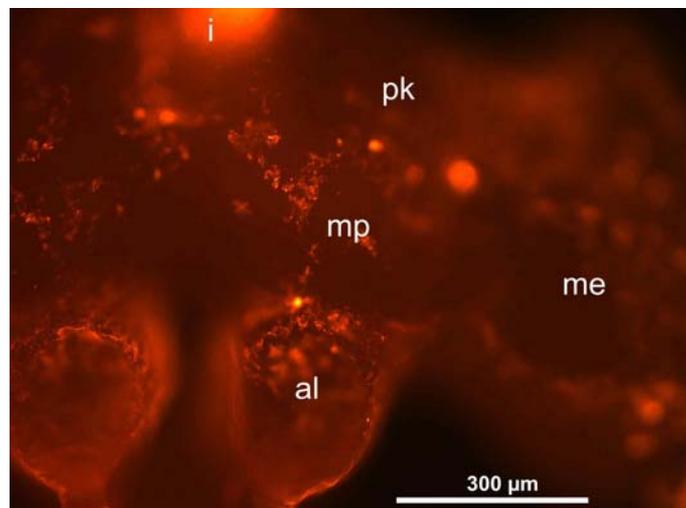


**Abbildung 58:** Vergleich des Effektes einer Injektion mit  $10^{-4}$  M OA bei Nicht-Pollensammlerinnen und Pollensammlerinnen (sustained-Komponente).  $n = 8$  für jede Testgruppe.

## 3.4 RNA-Interferenz

### 3.4.1 Test der Injektionsmethode mit fluoreszenzmarkierter doppelsträngiger RNA (dsRNA)

Eine Injektion fluoreszenzmarkierter dsRNA in den Ocellartrakt führte in den meisten Fällen zu einer Fluoreszenzmarkierung im Gehirn (Abb. 59). Von 34 untersuchten Präparaten zeigten 21 mindestens eine leichte Fluoreszenzfärbung. Die Markierung war dabei unregelmäßig verteilt und trat vor allem in den Somaregionen des Gehirns auf. Auch die Eindringtiefe in das Gewebe war bei verschiedenen Präparaten unterschiedlich. Die Markierung trat auch in Gehirnarealen auf, die nicht in unmittelbarer Nähe des Ocellartraktes liegen. Die markierte dsRNA scheint also nach Injektion in den Ocellartrakt in den meisten Fällen zumindest in vereinzelte Bereiche des cerebralen Gewebes aufgenommen zu werden. Obwohl eine Fluoreszenzmarkierung keine quantitative Methode darstellt, zeichnete sich eine Tendenz zu einer stärkeren Markierung nach einer längeren Inkubationszeit (bis zu 4 Tage) ab.

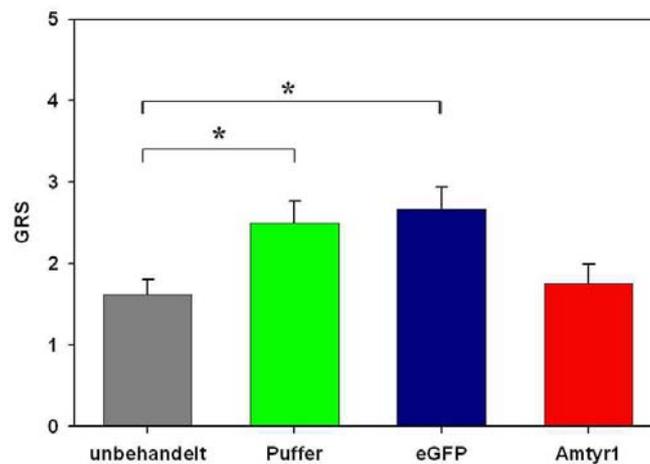


**Abbildung 59:** Aufnahme (Fluoreszenzmikroskop) der Frontalansicht eines Bienenhirns (wholemout) 4 Tage nach Injektion fluoreszenzmarkierter (Alexa Fluor 546-14-UTP, Molecular Probes) dsRNA des Green Fluorescent Protein-Gens (= GFP; 33,3 ng/ $\mu$ l in TE-Puffer). al = Antennallobus; i = Injektionsstelle im Bereich des Ocellartraktes; me = Medulla; mp = medianes Protocerebrum; pk = Pilzkörper.

### 3.4.2 Modulation der gustatorischen Schwellen durch dsRNA-Injektion

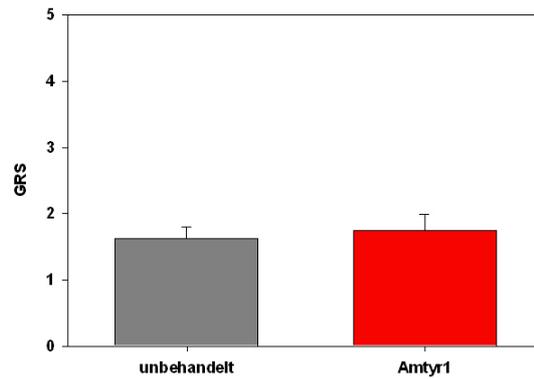
#### *dsRNA-Injektion in frisch geschlüpfte Bienen*

Die 4 verschiedenen Behandlungsgruppen frisch geschlüpfter Bienen unterschieden sich signifikant voneinander bezüglich ihrer gustatorischen Empfindlichkeiten 4 Tage nach Injektion ( $p = 0,004$ ; Kruskal-Wallis-Test). Der Dunn's Multiple Comparison Post-Test zeigt, dass die GRS der unbehandelten Gruppe dabei signifikant kleiner waren als die der eGFP-dsRNA-injizierten sowie der Puffer-injizierten Gruppe ( $p < 0,05$ ) (Abb. 60).

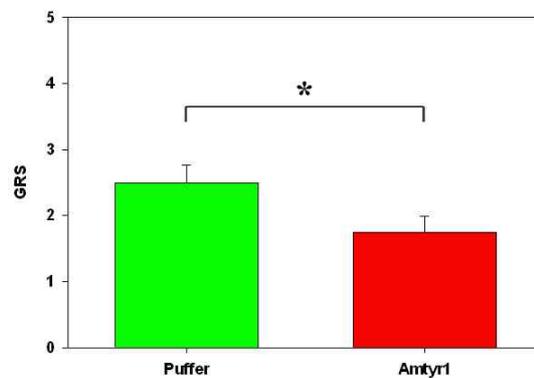


**Abbildung 60:** Gustatorische Empfindlichkeit frisch geschlüpfter Bienen 4 Tage nach dsRNA-Injektion. Die GRS von Puffer-injizierten Tieren ( $n = 71$ ) sowie von eGFP-dsRNA-injizierten Tieren ( $n = 85$ ) ist signifikant höher als die von unbehandelten Tieren ( $n = 119$ ) (Dunn's Multiple Comparison Post-Test).

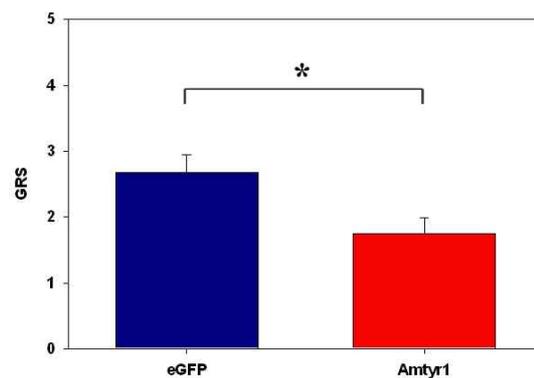
Vergleicht man die GRS der *Amtyr1*-dsRNA-injizierten Gruppe in Einzelvergleichen mit denen der verschiedenen Kontrollgruppen, so finden sich signifikante Unterschiede zu der Puffer-injizierten Gruppe ( $p = 0,038$ ; Mann-Whitney-Test; Abb. 62) sowie zu der eGFP-dsRNA-injizierten Gruppe ( $p = 0,031$ ; Mann-Whitney-Test; Abb. 63), nicht aber zu der unbehandelten Kontrollgruppe ( $p = 0,760$ ; Mann-Whitney-Test; Abb. 61). Die GRS *Amtyr1*-dsRNA-injizierter Bienen sind dabei signifikant kleiner als die der Tiere, denen eine Kontrollsubstanz injiziert wurde.



**Abbildung 61:** Gustatorische Empfindlichkeit frisch geschlüpfter Bienen 4 Tage nach dsRNA-Injektion. Die GRS von unbehandelten Tieren ( $n = 119$ ) unterschieden sich nicht signifikant von den *Amtyr1*-dsRNA-injizierten Tieren ( $n = 73$ ) ( $p = 0,760$ ; Mann-Whitney-Test).



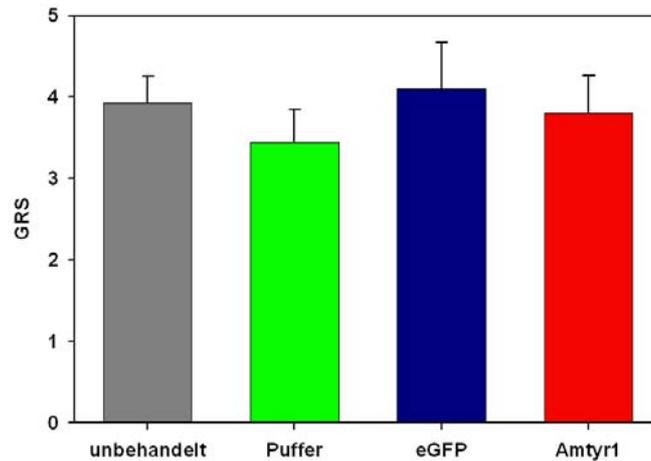
**Abbildung 62:** Gustatorische Empfindlichkeit frisch geschlüpfter Bienen 4 Tage nach dsRNA-Injektion. Die GRS von Puffer-injizierten Tieren ( $n = 71$ ) sind signifikant höher als die von *Amtyr1*-dsRNA-injizierten Tieren ( $n = 73$ ) ( $p = 0,038$ ; Mann-Whitney-Test).



**Abbildung 63:** Gustatorische Empfindlichkeit frisch geschlüpfter Bienen 4 Tage nach dsRNA-Injektion. Die GRS von eGRP-dsRNA-injizierten Tieren ( $n = 85$ ) sind signifikant höher als die von *Amtyr1*-dsRNA-injizierten Tieren ( $n = 73$ ) ( $p = 0,031$ ; Mann-Whitney-Test).

#### *dsRNA-Injektion in Winterbienen*

Eine Injektion von eGFP-dsRNA oder *Amtyr1*-dsRNA hat keinen Effekt auf die gustatorische Empfindlichkeit von Winterbienen im Vergleich zu unbehandelten Tieren. Die GRS in diesen Behandlungsgruppen unterscheiden sich nicht signifikant voneinander ( $p = 0,909$ ; Kruskal-Wallis-Test) (Abb. 64).



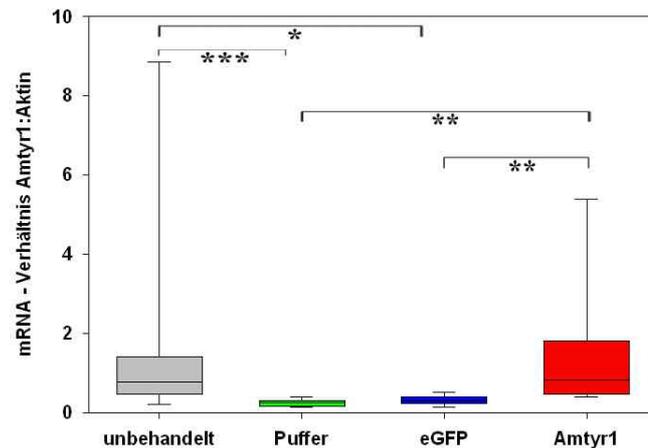
**Abbildung 64:** Gustatorische Empfindlichkeit von Winterbienen 4 Tage nach dsRNA-Injektion. Die GRS von eGFP-dsRNA-injizierten Tieren ( $n = 20$ ) unterscheidet sich nicht von der von unbehandelten ( $n = 39$ ) oder von *Amtyr1*-dsRNA-injizierten Tieren ( $n = 20$ ) (Kruskal-Wallis-Test).

Es bestehen auch in Einzelvergleichen keine signifikanten Unterschiede zwischen den GRS der *Amtyr1*-dsRNA-injizierten Tiere und den GRS der Tiere der Puffer-injizierten Gruppe ( $p = 0,566$ ; Mann-Whitney-Test), der eGFP-dsRNA-injizierten Gruppe ( $p = 0,694$ ; Mann-Whitney-Test), oder der unbehandelten Kontrollgruppe ( $p = 0,873$ ; Mann-Whitney-Test).

#### **3.4.3 Effekt der dsRNA-Injektion auf die *Amtyr1*-mRNA**

Bei frisch geschlüpften Bienen wurde der Erfolg der RNA-Interferenz mit Hilfe von quantitativer real-time PCR (qRT-PCR) überprüft. Der Vergleich der relativen *Amtyr1*-mRNA-Mengen in den Köpfen von Tieren aus den verschiedenen Behandlungsgruppen ergab signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen ( $p < 0,001$ ; Kruskal Wallis-Test). Dabei war die mRNA-Menge in unbehandelten Tieren signifikant größer als in Puffer-injizierten Tieren ( $p < 0,001$ ; Dunn's Multiple Comparison Post-Test) und als in eGFP-dsRNA-injizierten Tieren ( $p < 0,05$ ; Dunn's Multiple Comparison Post-Test). Dagegen bestand kein Unterschied

in der *Amtyr1*-dsRNA-Menge zwischen unbehandelten und *Amtyr1*-dsRNA-injizierten Tieren ( $p > 0,05$ ; Dunn's Multiple Comparison Post-Test). In *Amtyr1*-dsRNA-injizierten Tieren wurde eine signifikant größere *Amtyr1*-dsRNA-Menge detektiert als in Puffer-injizierten Tieren ( $p < 0,001$ ; Dunn's Multiple Comparison Post-Test) und als in eGFP-dsRNA-injizierten Tieren ( $p < 0,01$ ; Dunn's Multiple Comparison Post-Test) (Abb. 65).



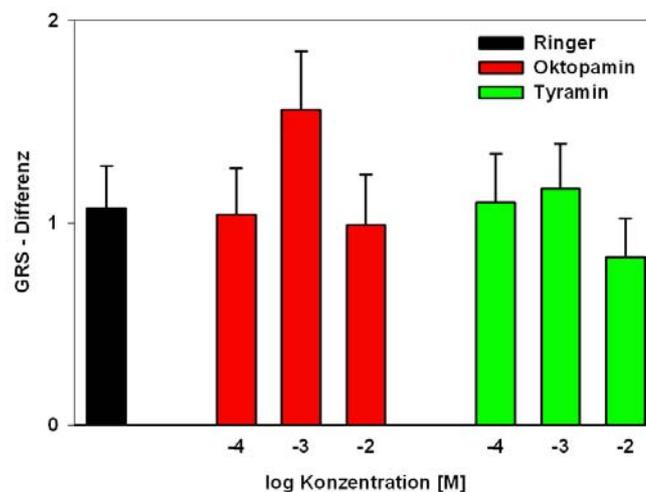
**Abbildung 65:** relative *Amtyr1*-mRNA-Mengen in den Köpfen frisch geschlüpfter Bienen 4 Tage nach dsRNA-Injektion. Tiere in der unbehandelten Gruppe ( $n = 12$ ) sowie der *Amtyr1*-dsRNA-injizierten Gruppe ( $n = 13$ ) weisen einen signifikant höheren *Amtyr1*-mRNA-Gehalt auf als Puffer- ( $n = 15$ ) und eGFP-dsRNA-injizierte Tiere ( $n = 12$ ) (Dunn's Multiple Comparison Test).

Die Injektion einer Kontrollsubstanz in das Gehirn frisch geschlüpfter Bienen senkt deren Schwelle für gustatorische Sucrose-Stimuli im Vergleich zu unbehandelten Tieren. Dabei handelt es sich vermutlich um einen Injektionseffekt. Eine Injektion von *Amtyr1*-dsRNA zeigt dagegen keinen Effekt im Vergleich zur unbehandelten Kontrollgruppe. Diese Behandlung hat also einen inhibierenden Effekt auf die PER der Versuchstiere, die den Injektionseffekt kompensiert. Eine Verringerung der *Amtyr1*-mRNA 4 Tage nach *Amtyr1*-dsRNA-Injektion war dagegen nicht nachweisbar. Die PER von Winterbienen ist weder durch Injektion der Kontrollsubstanzen noch durch Applikation von *Amtyr1*-dsRNA modulierbar; Winterbienen unterscheiden sich also offensichtlich von frisch geschlüpften Tieren in der Plastizität ihrer gustatorischen Empfindlichkeit nach *Amtyr1*-dsRNA-Injektion.

## 3.5 Effekt von OA und TA auf PER, lokomotorische Aktivität und phototaktisches Verhalten

### 3.5.1 Effekt von OA und TA auf die PER

In allen Versuchsgruppen waren die GRS nach Pharmakainjektion signifikant größer als vor der Injektion ( $p < 0,01$ ; Wilcoxon Signed Rank Test). Die Differenz der GRS (nach-vor Injektion) unterschied sich weder für die verschiedenen OA- ( $p = 0,600$ ; Kruskal-Wallis-Test) noch für die TA-Behandlungen ( $p = 0,705$ ; Kruskal-Wallis-Test) signifikant von der Ringer-Kontrollgruppe. Auch die Einzelvergleiche der verschiedenen Behandlungen mit der Kontrollgruppe ergeben keine signifikanten Unterschiede (OA  $10^{-4}$  M:  $p = 0,847$ ; OA  $10^{-3}$  M:  $p = 0,339$ ; OA  $10^{-2}$  M:  $p = 0,829$ ; TA  $10^{-4}$  M:  $p = 0,700$ ; TA  $10^{-3}$  M:  $p = 0,692$ ; TA  $10^{-2}$  M:  $p = 0,557$ ; Mann-Whitney-Test) (Abb. 66).

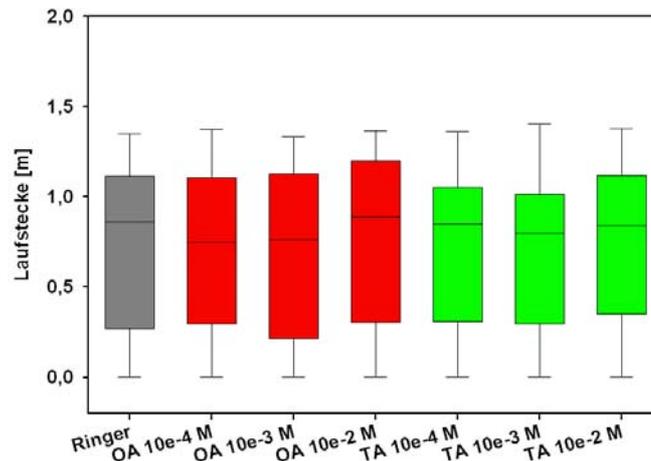


**Abbildung 66:** Differenzen der GRS nach – vor Pharmakaapplikation. Es bestehen keine signifikanten Unterschiede für OA- ( $p = 0,600$ ; Kruskal-Wallis-Test) oder TA-Behandlungen ( $p = 0,705$ ; Kruskal-Wallis-Test) im Vergleich zur Ringer-Kontrolle.  $n$  (Ringer-Kontrolle) = 70,  $n$  (OA  $10^{-4}$  M) = 69,  $n$  (OA  $10^{-3}$  M) = 57,  $n$  (OA  $10^{-2}$  M) = 70,  $n$  (TA  $10^{-4}$  M) = 63,  $n$  (TA  $10^{-3}$  M) = 66 und  $n$  (TA  $10^{-2}$  M) = 64.

### 3.5.2 Effekt von OA und TA auf die lokomotorische Aktivität

Eine Injektion von OA oder TA hatte ebenfalls keinen Effekt im Vergleich mit der Ringerkontrolle auf die Laufstrecke, die die Versuchstiere während der letzten 30 s der

Dunkelphase zurücklegten. (OA:  $p = 0,799$ ; TA:  $p = 0,742$ ; Kruskal-Wallis-Test). Auch in Einzelvergleichen der verschiedenen Behandlungsgruppen mit der Ringer-Kontrollgruppe zeigten sich keine signifikanten Unterschiede (OA  $10^{-4}$  M:  $p = 0,762$ ; OA  $10^{-3}$  M:  $p = 0,686$ ; OA  $10^{-2}$  M:  $p = 0,830$ ; TA  $10^{-4}$  M:  $p = 0,723$ ; TA  $10^{-3}$  M:  $p = 0,422$ ; TA  $10^{-2}$  M:  $p = 0,931$ ; Mann-Whitney-Test) (Abb. 67). Die Tiere in den verschiedenen Behandlungsgruppen unterschieden sich also nicht in ihrer lokomotorischen Aktivität voneinander.



**Abbildung 67:** Die spontan zurückgelegte Laufstrecke während der letzten 30 s der Dunkelphase für die verschiedenen Behandlungsgruppen. Es bestehen keine signifikanten Unterschiede für OA- ( $p = 0,799$ ; Kruskal-Wallis-Test) oder TA-Behandlungen ( $p = 0,742$ ; Kruskal-Wallis-Test) im Vergleich zur Ringer-Kontrolle.  $n$  (Ringer-Kontrolle) = 70,  $n$  (OA  $10^{-4}$  M) = 69,  $n$  (OA  $10^{-3}$  M) = 57,  $n$  (OA  $10^{-2}$  M) = 70,  $n$  (TA  $10^{-4}$  M) = 63,  $n$  (TA  $10^{-3}$  M) = 66 und  $n$  (TA  $10^{-2}$  M) = 64.

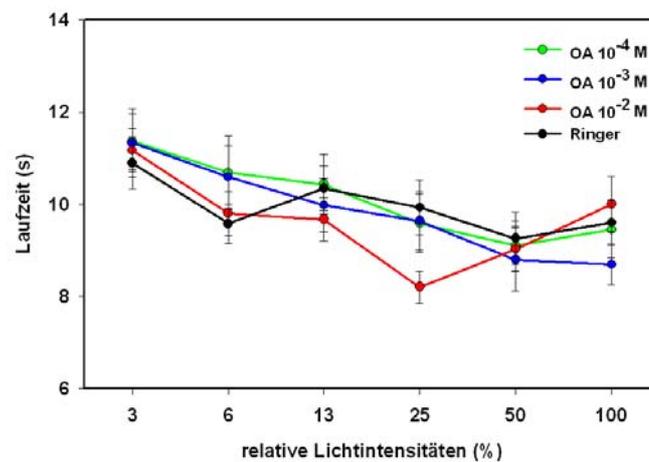
#### 3.5.3 Effekt von OA und TA auf das phototaktische Verhalten

Da sich die Versuchstiere in den Behandlungsgruppen nicht bezüglich der spontan zurückgelegten Wegstrecke während der Dunkelphase und somit auch nicht in ihrer Laufgeschwindigkeit voneinander unterschieden, war es ausreichend, als Maß für die phototaktische Aktivität die Zeit aufzunehmen, die die Tiere für die Läufe zu den Lichtquellen benötigten. Eine Auswertung der Wegstrecken war nicht nötig, da man davon ausgehen kann, dass sie mit den Laufzeiten korrelieren.

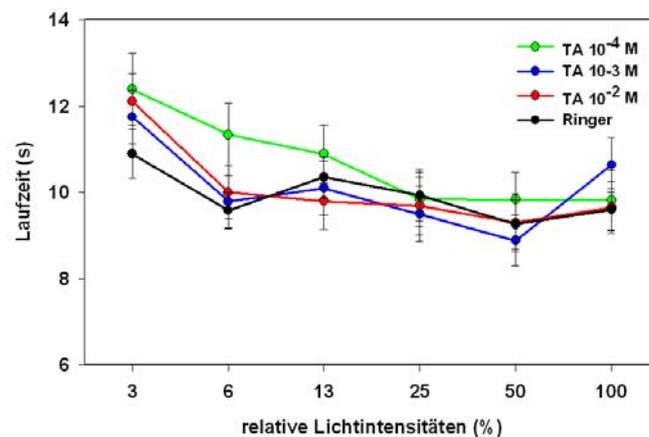
Die Laufzeiten der Tiere in den verschiedenen Behandlungsgruppen korrelierten mit den Lichtintensitäten ( $p < 0,01$ ; Spearman-Rho-Korrelation) mit Ausnahme der Behandlungsgruppe TA  $10^{-3}$  M. Die Korrelationskoeffizienten ( $\rho$ ) waren jeweils -0,154 (Ringer), -0,223 (OA  $10^{-4}$  M), -0,243 (OA  $10^{-3}$  M), -0,188 (OA  $10^{-2}$  M), -0,243 (TA  $10^{-4}$  M), -

### 3.5 Ergebnisse: Lokomotorisches und phototaktisches Verhalten

0,111 ( $TA\ 10^{-3}\ M$ ) und -0,220 ( $TA\ 10^{-2}\ M$ ) (Spearman-Rho-Korrelation). Für die einzelnen Lichtintensitäten wurden keine Unterschiede zwischen den Behandlungsgruppen detektiert. Die Signifikanzen mit Hilfe des Kruskal-Wallis-Tests sind für den Vergleich der OA-Behandlungen und Ringer  $p = 0,747$  (Intensität 1),  $p = 0,897$  (Intensität 2),  $p = 0,737$  (Intensität 3),  $p = 0,306$  (Intensität 4),  $p = 0,754$  (Intensität 5) und  $p = 0,565$  (Intensität 6); für die TA-Behandlungen und Ringer sind  $p = 0,421$  (Intensität 1),  $p = 0,218$  (Intensität 2),  $p = 0,298$  (Intensität 3),  $p = 0,837$  (Intensität 4),  $p = 0,698$  (Intensität 5) und  $p = 0,510$  (Intensität 6) (Abb. 68 und Abb. 69).

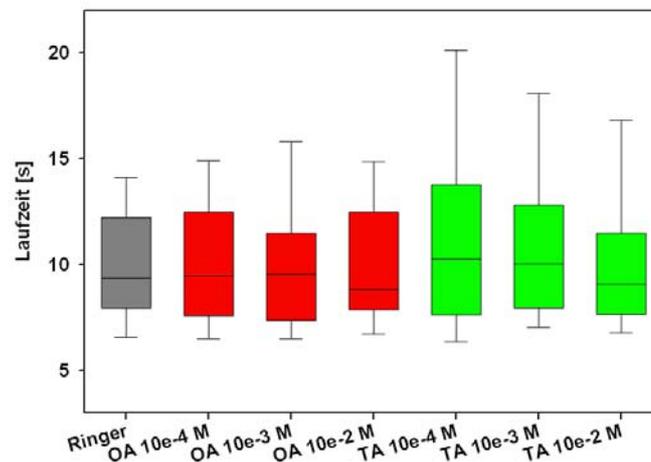


**Abbildung 68:** Mittlere Laufzeiten zu den Lichtquellen zunehmender Intensitäten nach Injektion verschiedener Konzentrationen von OA und von Ringer. Es bestehen für keine Lichtintensität Unterschiede zwischen den Behandlungsgruppen.  $n$  (Ringer-Kontrolle) = 55,  $n$  ( $OA\ 10^{-4}\ M$ ) = 52,  $n$  ( $OA\ 10^{-3}\ M$ ) = 44 und  $n$  ( $OA\ 10^{-2}\ M$ ) = 55.



**Abbildung 69:** Mittlere Laufzeiten zu den Lichtquellen zunehmender Intensitäten nach Injektion verschiedener Konzentrationen von TA und von Ringer. Es bestehen für keine der Lichtintensitäten Unterschiede zwischen den Behandlungsgruppen.  $n$  (Ringer-Kontrolle) = 55,  $n$  ( $TA\ 10^{-4}\ M$ ) = 47,  $n$  ( $TA\ 10^{-3}\ M$ ) = 51 und  $n$  ( $TA\ 10^{-2}\ M$ ) = 54.

Auch für die über alle Lichtintensitäten gemittelten Werte bestehen keine signifikanten Unterschiede zwischen den Behandlungsgruppen ( $p = 0,809$ ; Kruskal-Wallis-Test). Auch bei getrennter Betrachtung der OA-Behandlungen und der Ringer-Kontrolle ( $p = 0,995$ ) sowie der TA-Behandlungen und der Ringer-Kontrolle ( $p = 0,404$ ) mit dem Kruskal-Wallis-Test sind die Laufzeiten in den Gruppen nicht signifikant voneinander verschieden. Ebenso wird im Vergleich der einzelnen Behandlungsgruppen mit der Ringer-Kontrolle mit dem Mann-Whitney-Test kein Effekt einer OA- oder TA-Injektion festgestellt ( $p$  (OA  $10^{-4}$  M) =  $0,881$ ;  $p$  (OA  $10^{-3}$  M) =  $0,947$ ;  $p$  (OA  $10^{-2}$  M) =  $0,988$ ;  $p$  (TA  $10^{-4}$  M) =  $0,183$ ;  $p$  (TA  $10^{-3}$  M) =  $0,413$  und  $p$  (TA  $10^{-2}$  M) =  $0,823$ ) (Abb. 70).



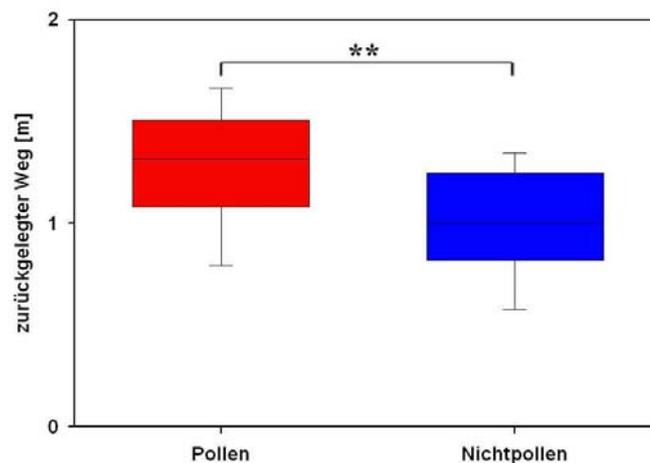
**Abbildung 70:** Über alle Lichtintensitäten gemittelte Laufzeiten nach Injektion verschiedener Konzentrationen von OA, TA bzw. von Ringer. Es bestehen keine Unterschiede zwischen den Behandlungsgruppen.  $n$  (Ringer-Kontrolle) = 55,  $n$  (OA  $10^{-4}$  M) = 52,  $n$  (OA  $10^{-3}$  M) = 44,  $n$  (OA  $10^{-2}$  M) = 55,  $n$  (TA  $10^{-4}$  M) = 47,  $n$  (TA  $10^{-3}$  M) = 51 und  $n$  (TA  $10^{-2}$  M) = 54.

## 3.6 Lokomotorische Aktivität und phototaktisches Verhalten von Pollen- und Nichtpollensammlerinnen

### 3.6.1 Lokomotorische Aktivität

Die spontan zurückgelegte Wegstrecke („Laufweg“) sowie die motorisch aktive Zeit („Laufzeit“) während der letzten 30 s der Dunkelphase wurden als Maß für die spontane lokomotorische Aktivität eines Tieres ausgewertet.

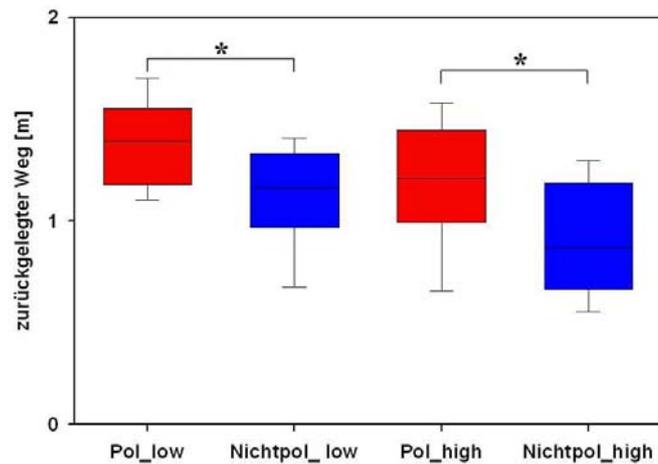
Pollen- und Nichtpollensammlerinnen unterschieden sich signifikant in ihrem Laufweg, also der Wegstrecke, die sie spontan während der letzten 30 s der Dunkelphase zurücklegten ( $p = 0,002$ ; Mann-Whitney-Test). Pollensammlerinnen legten dabei eine größere Strecke zurück als Nichtpollen-Sammlerinnen (Abb. 71).



**Abbildung 71:** Mediane der zurückgelegten Laufwege im Dunkeln von Pollen- und Nichtpollensammlerinnen. Pollensammlerinnen legen einen signifikant weiteren Weg zurück als Nichtpollensammlerinnen (\*\*:  $p = 0,002$ ; Mann-Whitney-Test). Pollensammlerinnen:  $n = 36$ ; Nichtpollensammlerinnen:  $n = 31$ ).

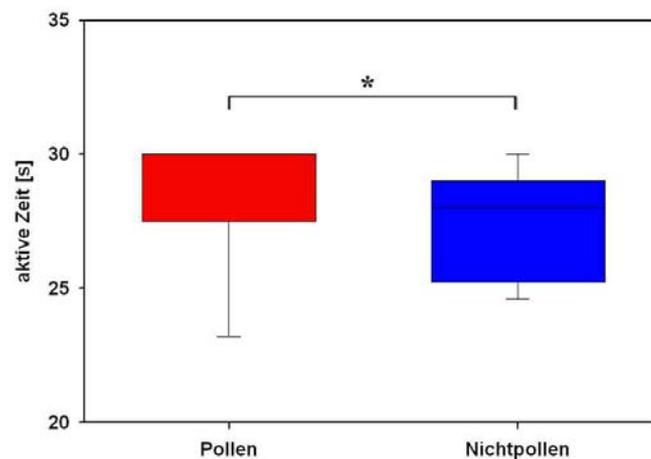
Betrachtet man die Laufwege für Tiere mit hohen („high“,  $GRS \geq 5$ ) und niedrigen („low“,  $GRS \leq 2$ ) gustatorischen Empfindlichkeiten getrennt voneinander, so zeigt sich, dass dieser Unterschied zwischen Pollen- und Nichtpollensammlerinnen auch innerhalb der Gruppen mit gustatorisch gleicher Empfindlichkeit bestehen bleibt (für niedrige GRS:  $p = 0,022$ ; Mann-Whitney-Test; für hohe GRS:  $p = 0,023$ ; Mann-Whitney-Test). Ein Unterschied in den Laufwegen zwischen Tieren mit hohen und niedrigen GRS besteht dagegen weder für

Pollensammlerinnen ( $p = 0,124$ ; Mann-Whitney-Test) noch für Nichtpollensammlerinnen ( $p = 0,092$ ; Mann-Whitney-Test) (Abb. 72).



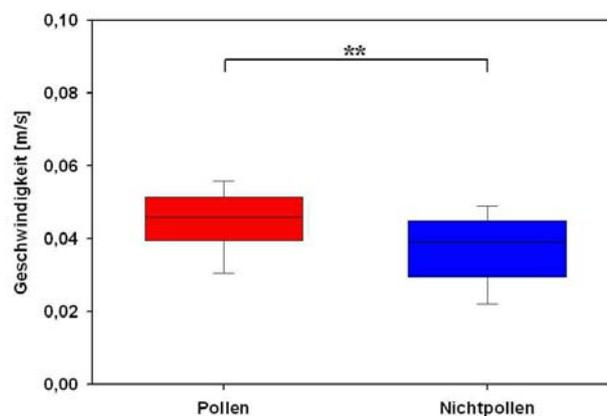
**Abbildung 72:** Mediane der Laufwege im Dunkeln von Pollen („Pol“-) und Nichtpollensammlerinnen („Nichtpol“) mit hohen („high“) bzw. niedrigen („low“) gustatorischen Empfindlichkeiten (\*:  $p < 0,05$ ; Mann-Whitney-Test). Pol\_low:  $n = 15$ ; Pol\_high:  $n = 21$ ; Nichtpol\_low:  $n = 14$ ; Nichtpol\_high:  $n = 17$ .

Pollen- und Nichtpollensammlerinnen unterschieden sich auch in den Zeiten voneinander, in denen sie lokomotorisch aktiv während der letzten 30 s der Dunkelphase waren ( $p = 0,041$ ; Mann-Whitney-Test). Pollensammlerinnen waren in diesen 30 s über einen signifikant längeren Zeitraum aktiv als Nichtpollensammlerinnen (Abb. 73).

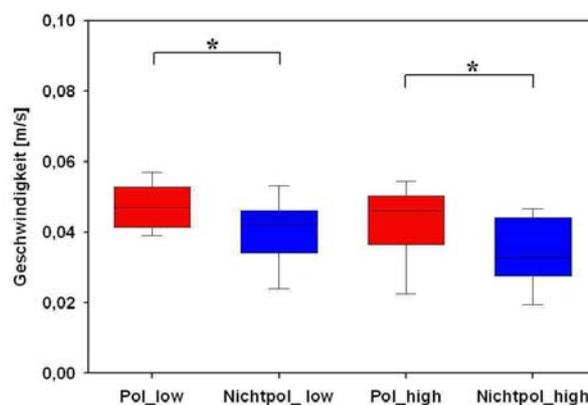


**Abbildung 73:** Mediane der aktiven Laufzeiten im Dunkeln von Pollen- und Nichtpollensammlerinnen ( $p = 0,041$ ; Mann-Whitney-Test). Pollensammlerinnen:  $n = 36$ ; Nichtpollensammlerinnen:  $n = 31$ .

Aus den gemessenen Laufwegen und Laufzeiten wurde die Laufgeschwindigkeit ermittelt. Die Laufgeschwindigkeit von Pollensammlerinnen war signifikant höher als die der Nichtpollensammlerinnen. Das gilt sowohl für den Vergleich der Gesamtheit aller getesteten Pollen- mit Nichtpollensammlerinnen ( $p = 0,003$ ; Mann-Whitney-Test), als auch für den getrennten Vergleich von Tieren mit niedrigen und hohen gustatorischen Empfindlichkeiten (hohe GRS:  $p = 0,039$ ; Mann-Whitney-Test; niedrige GRS:  $p = 0,036$ ; Mann-Whitney-Test). Unterschiede zwischen Tieren aus verschiedenen GRS-Gruppen innerhalb der beiden Sammeltypen bestehen dagegen nicht (Pollensammlerinnen:  $p = 0,163$ ; Mann-Whitney-Test; Nichtpollensammlerinnen:  $p = 0,197$ ; Mann-Whitney-Test) (Abb. 74 und Abb. 75).



**Abbildung 74:** Mediane der Laufgeschwindigkeiten im Dunkeln von Pollen- und Nichtpollensammlerinnen (\*\*:  $p = 0,003$ ; Mann-Whitney-Test). Pollensammlerinnen:  $n = 36$ ; Nichtpollensammlerinnen:  $n = 31$ .

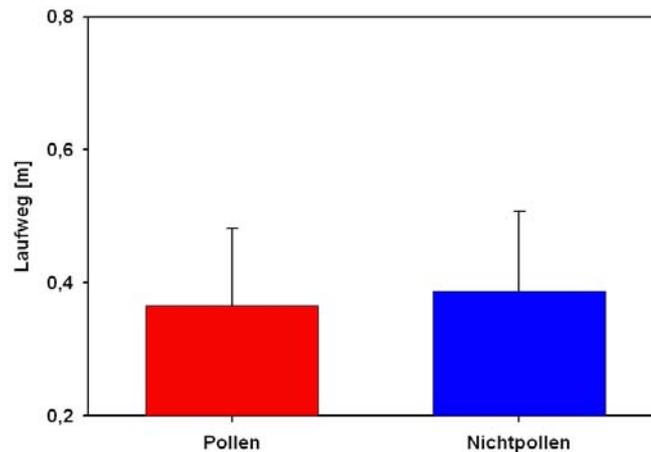


**Abbildung 75:** Mediane der Laufgeschwindigkeiten im Dunkeln von Pollen („Pol“)- und Nichtpollensammlerinnen („Nichtpol“) mit hohen („high“) bzw. niedrigen („low“) gustatorischen Empfindlichkeiten (\*:  $p < 0,05$ ; Mann-Whitney-Test). Pol\_low:  $n = 15$ ; Pol\_high:  $n = 21$ ; Nichtpol\_low:  $n = 14$ ; Nichtpol\_high:  $n = 17$ .

#### 3.6.2 Phototaktisches Verhalten: Laufwege zu den Lichtquellen

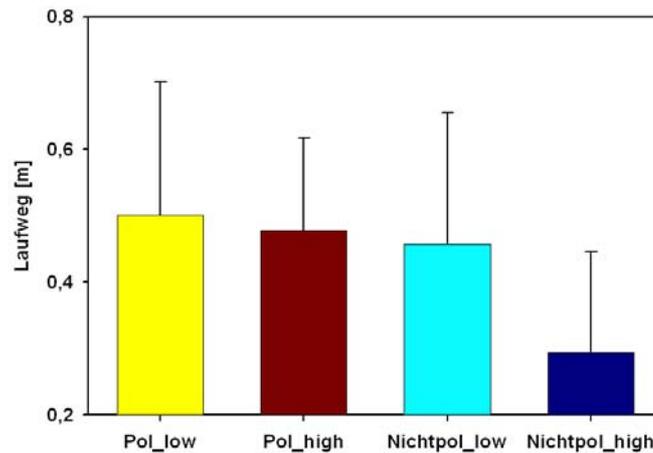
Der Weg, den Versuchstiere zu einer Lichtquelle zurücklegten, wurde als Maß für ihre phototaktische Aktivität ausgewertet.

Die Gesamtheit aller getesteten Pollensammlerinnen unterschied sich nicht von der aller Nichtpollensammlerinnen bezüglich ihrer Laufwege zu den Lichtquellen ( $p = 0,191$ ; unpaired t-Test) (Abb. 76).



**Abbildung 76:** Mittelwerte der Laufwege zu den Lichtquellen von Pollen- und Nichtpollensammlerinnen ( $p = 0,191$ ; unpaired t-Test). Pollensammlerinnen:  $n = 36$ ; Nichtpollensammlerinnen:  $n = 32$ .

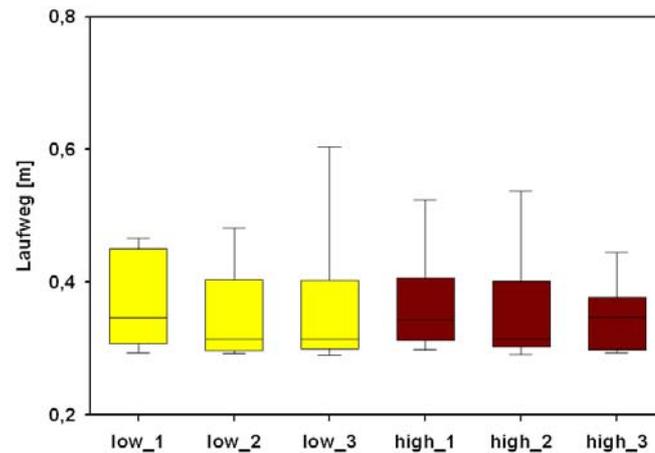
Auch bei getrennter Betrachtung von Tieren mit hohen und niedrigen GRS sind Unterschiede weder zwischen Pollen- und Nichtpollensammlerinnen (für niedrige GRS:  $p = 0,500$ ; unpaired t-Test; für hohe GRS:  $p = 0,256$ ; unpaired t-Test) noch innerhalb eines Sammeltyps zwischen Tieren mit hoher und niedriger gustatorischer Empfindlichkeit (für Pollensammlerinnen:  $p = 0,729$ ; unpaired t-Test; für Nektarsammlerinnen:  $p = 0,875$ ; unpaired t-Test) festzustellen (Abb.77).



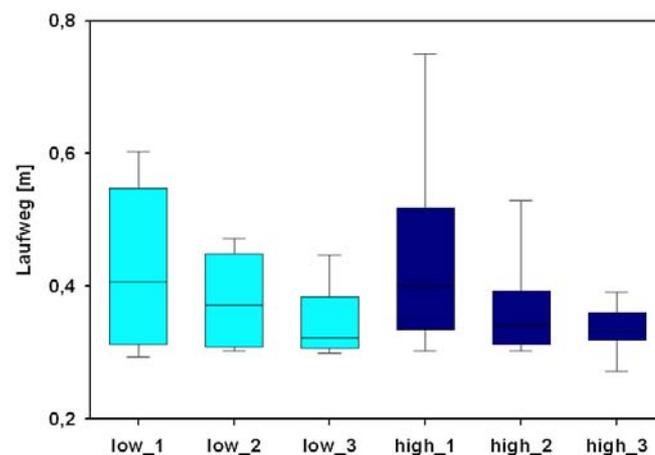
**Abbildung 77:** Mittelwerte der Laufwege zu den Lichtquellen von Pollen- („Pol“) und Nichtpollensammlerinnen („Nichtpol“) mit niedrigen („low“) bzw. hohen („high“) gustatorischen Empfindlichkeiten. Pol\_low: n = 15; Pol\_high: n = 21; Nichtpol\_low: n = 14; Nichtpol\_high: n = 18.

Signifikante Unterschiede zwischen den Laufwegen bei verschiedenen Intensitäten bestehen weder für Pollensammlerinnen mit hohen GRS ( $p = 0,334$ ; Friedman Test) bzw. niedrigen GRS ( $p = 0,374$ ; Friedman Test), noch für Nichtpollensammlerinnen mit hohen ( $p = 0,066$ ; Friedman Test) oder niedrigen GRS ( $p = 0,395$ ; Friedman Test). Für Pollensammlerinnen besteht ebenfalls kein Unterschied in den Laufwegen zwischen Tieren mit hohen und niedrigen GRS bei der niedrigsten ( $p = 0,987$ ; Mann-Whitney-Test), der mittleren ( $p = 0,898$ ; Mann-Whitney-Test) oder der höchsten Lichtintensität ( $p = 0,962$ ; Mann-Whitney-Test). Ebenso wenig finden sich Unterschiede zwischen Tieren mit hohen und niedrigen GRS in den Laufwegen von Nichtpollensammlerinnen bei der niedrigsten ( $p = 0,776$ ; Mann-Whitney-Test), der mittleren ( $p = 0,790$ ; Mann-Whitney-Test) sowie der höchsten Lichtintensität ( $p = 0,909$ ; Mann-Whitney-Test) (Abb. 78 und Abb. 79).

Es bestehen auch keine Unterschiede zwischen Pollen- und Nichtpollensammlerinnen mit niedrigen GRS in ihren Laufwegen zu den Lichtquellen niedriger ( $p = 0,257$ ; Mann-Whitney-Test), mittlerer ( $p = 0,206$ ; Mann-Whitney-Test) oder hoher ( $p = 0,647$ ; Mann-Whitney-Test) Intensität. Es bestehen ebenfalls keine Unterschiede zwischen Pollen- und Nichtpollensammlerinnen mit hohen GRS in ihren Laufwegen zu den Lichtquellen niedriger ( $p = 0,121$ ; Mann-Whitney-Test), mittlerer ( $p = 0,226$ ; Mann-Whitney-Test) oder hoher ( $p = 0,789$ ; Mann-Whitney-Test) Intensität.



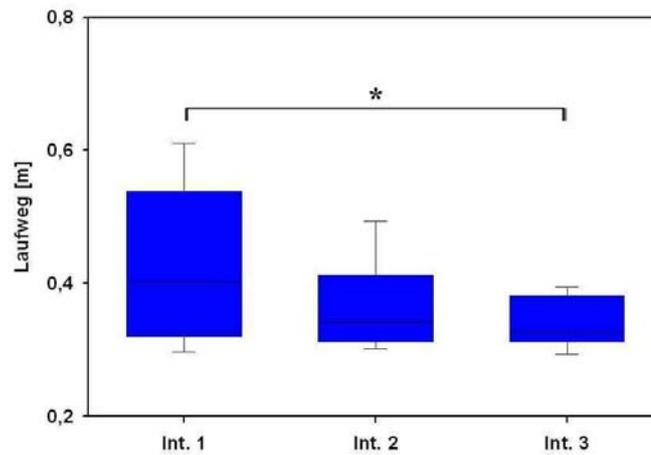
**Abbildung 78:** Pollensammlerinnen: Mediane der Laufwege zu den Lichtquellen niedriger (25%; „1“), mittlerer (50%; „2“) und hoher (100%; „3“) Intensität für Tiere mit niedrigen („low“; n = 15) und hohen („high“; n = 21) gustatorischen Empfindlichkeiten.



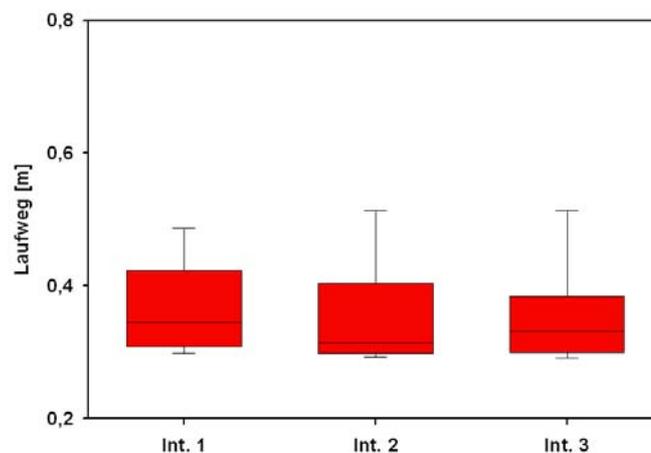
**Abbildung 79:** Nichtpollensammlerinnen: Mediane der Laufwege zu den Lichtquellen niedriger (25%; „1“), mittlerer (50%; „2“) und hoher (100%; „3“) Intensität für Tiere mit niedrigen („low“; n = 14) und hohen („high“; n = 18) gustatorischen Empfindlichkeiten.

Fasst man die Bienen mit niedrigen und hohen gustatorischen Empfindlichkeiten zu einer Gruppe zusammen, so findet man, dass sich die Wege, die Nichtpollensammlerinnen zu den Lichtquellen verschiedener Intensitäten zurücklegen, signifikant voneinander unterscheiden ( $p = 0,031$ ; Friedman Test). Dabei legen sie zu der Lichtquelle mit der höchsten Lichtintensität (100%) einen signifikant kürzeren Weg zurück als zu der Lichtquelle, deren Lichtintensität nur 25% beträgt ( $p < 0,05$ ; Dunn's Multiple Comparison Test) (Abb. 80). Die Wege der

Pollensammlerinnen zu den Lichtquellen verschiedener Intensitäten unterscheiden sich dagegen nicht voneinander ( $p = 0,150$ ; Friedman Test) (Abb. 81).

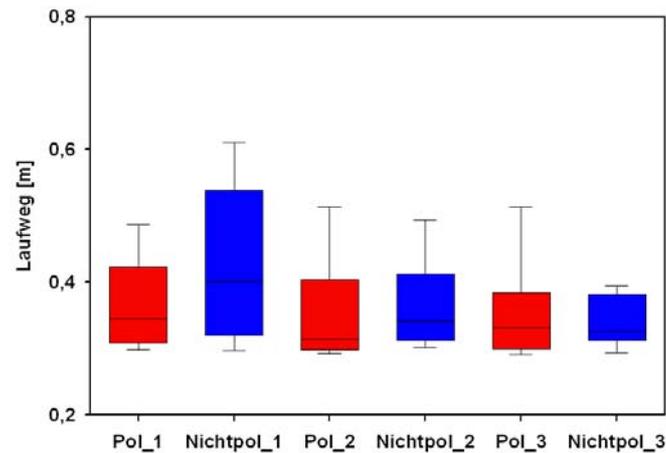


**Abbildung 80:** Nichtpollensammlerinnen: Mediane der Laufwege zu den Lichtquellen niedriger (25%; „1“), mittlerer (50%; „2“) und hoher (100%; „3“) Intensität für Tiere mit niedrigen und hohen gustatorischen Empfindlichkeiten zusammen (\*:  $p < 0,05$ ; Dunn's Multiple Comparison Test).  $n = 32$ .



**Abbildung 81:** Pollensammlerinnen: Mediane der Laufwege zu den Lichtquellen niedriger (25%; „1“), mittlerer (50%; „2“) und hoher (100%; „3“) Intensität für Tiere mit niedrigen und hohen gustatorischen Empfindlichkeiten zusammen.  $n = 36$ .

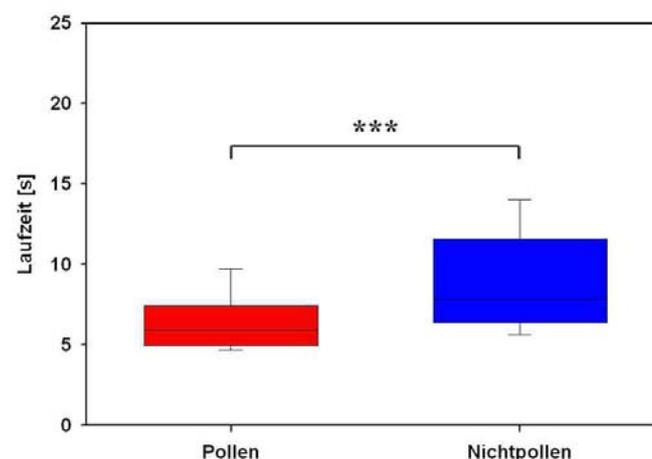
Für Tiere mit hohen und niedrigen GRS zusammen bestehen zwischen Pollen- und Nichtpollensammlerinnen keine Unterschiede in den Laufwegen zu den Lichtquellen mit niedriger ( $p = 0,087$ ; Mann-Whitney-Test), mittlerer ( $p = 0,101$ ; Mann-Whitney-Test) oder hoher ( $p = 0,654$ ; Mann-Whitney-Test) Lichtintensität (Abb. 82).



**Abbildung 82:** Mediane der Laufwege zu den Lichtquellen niedriger (25%; „1“), mittlerer (50%; „2“) und hoher (100%; „3“) Intensität für Pollensammlerinnen („Pol“;  $n = 36$ ) und Nichtpollensammlerinnen („Nichtpol“;  $n = 32$ ) mit niedrigen und hohen gustatorischen Empfindlichkeiten zusammen.

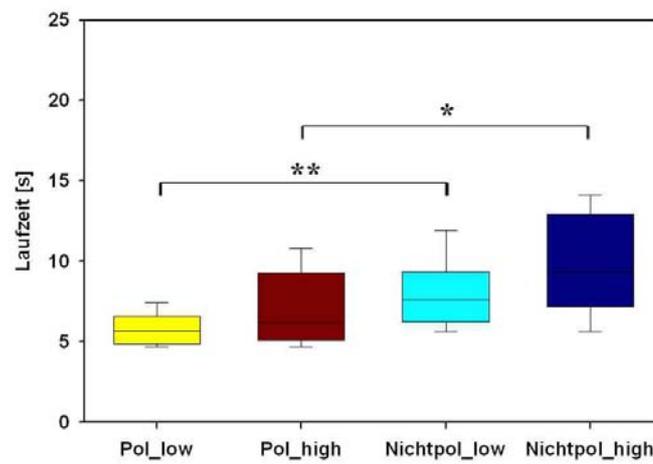
#### 3.6.3 Phototaktisches Verhalten: Laufzeiten zu den Lichtquellen

Die Zeit, die Versuchstiere bis zum Erreichen einer Lichtquelle benötigten, wurde ebenfalls analysiert. Die Gesamtheit aller getesteten Pollen- und Nichtpollensammlerinnen unterschieden sich signifikant in ihren Laufzeiten zu den Lichtquellen. Pollensammlerinnen legten die Strecke in einer signifikant kürzeren Zeit zurück als Nektarsammlerinnen ( $p < 0,001$ ; Mann-Whitney-Test) (Abb. 83).



**Abbildung 83:** Mediane der Laufzeiten zu den Lichtquellen von Pollen- und Nichtpollensammlerinnen (\*\*\*:  $p < 0,001$ ; Mann-Whitney Test). Pollensammlerinnen:  $n = 36$ ; Nichtpollensammlerinnen:  $n = 32$ .

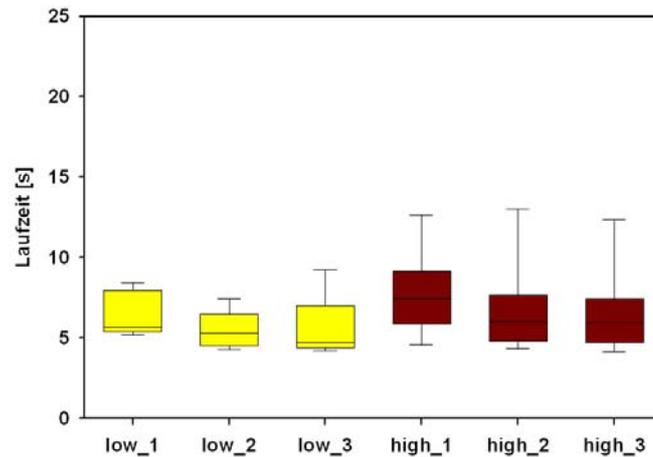
Auch bei getrennter Betrachtung von Tieren mit hohen und niedrigen GRS findet man Unterschiede zwischen Pollen- und Nichtpollensammlerinnen (für niedrige GRS:  $p < 0,01$ ; Mann-Whitney-Test nach Bonferroni-Korrektur; für hohe GRS:  $p < 0,05$ ; Mann-Whitney-Test nach Bonferroni-Korrektur). Dagegen sind innerhalb eines Sammeltyps zwischen Tieren mit hoher und niedriger gustatorischer Empfindlichkeit keine signifikanten Unterschiede festzustellen (für Pollensammlerinnen:  $p = 0,183$ ; Mann-Whitney-Test; für Nektarsammlerinnen:  $p = 0,263$ ; Mann-Whitney-Test) (Abb. 84).



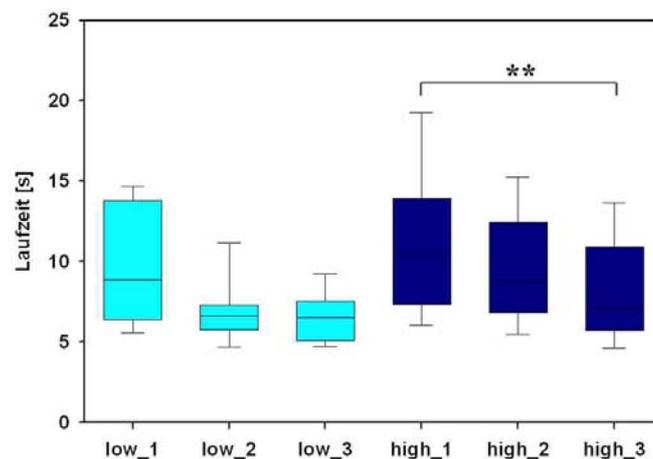
**Abbildung 84:** Mediane der Laufzeiten zu den Lichtquellen von Pollen („Pol“-) und Nichtpollensammlerinnen („Nichtpol“) mit niedrigen („low“) bzw. hohen („high“) gustatorischen Empfindlichkeiten (\*:  $p < 0,05$ ; \*\*:  $p < 0,01$ ; Mann-Whitney-Test nach Bonferroni-Korrektur). Pol\_low:  $n = 15$ ; Pol\_high:  $n = 21$ ; Nichtpol\_low:  $n = 14$ ; Nichtpol\_high:  $n = 18$ .

Betrachtet man die Laufzeiten zu den Lichtquellen getrennt für jede der 3 Lichtintensitäten, so wird deutlich, dass die Tendenz besteht, die Wegstrecke zu Lichtquellen höherer Intensität in einer kürzeren Zeit zu überwinden als die zu Lichtquellen geringerer Intensität. Signifikante Unterschiede bestehen dabei lediglich für Nichtpollensammlerinnen mit hohen GRS ( $p = 0,007$ ; Friedman Test). Dabei laufen die Tiere schneller zu den Lichtquellen höchster (100%) als zu denen niedrigster (25%) Intensität ( $p < 0,01$ ; Dunn's Multiple Comparison Test). Zu der Laufzeit zu der Lichtquelle mit mittlerer Intensität besteht dagegen kein Unterschied ( $p > 0,05$ ; Dunn's Multiple Comparison Test). Es finden sich keine Unterschiede in den Laufzeiten zu den verschiedenen Lichtquellen für Nichtpollensammlerinnen mit niedrigen GRS ( $p = 0,076$ ; Friedman Test) oder für Pollensammlerinnen mit niedrigen ( $p = 0,158$ ; Friedman Test) oder hohen ( $p = 0,051$ ; Friedman Test) GRS. Für Pollensammlerinnen besteht ebenfalls kein

Unterschied in den Laufzeiten zwischen Tiere mit hohen und niedrigen GRS bei der niedrigsten ( $p = 0,089$ ; Mann-Whitney-Test), der mittleren ( $p = 0,178$ ; Mann-Whitney-Test) oder der höchsten Lichtintensität ( $p = 0,217$ ; Mann-Whitney-Test). Ebenso wenig finden sich Unterschiede zwischen Tieren mit hohen und niedrigen GRS in den Laufzeiten von Nichtpollensammlerinnen bei der niedrigsten ( $p = 0,403$ ; Mann-Whitney-Test), der mittleren ( $p = 0,060$ ; Mann-Whitney-Test) oder der höchsten Lichtintensität ( $p = 0,372$ ; Mann-Whitney-Test)(Abb. 85 und Abb. 86).



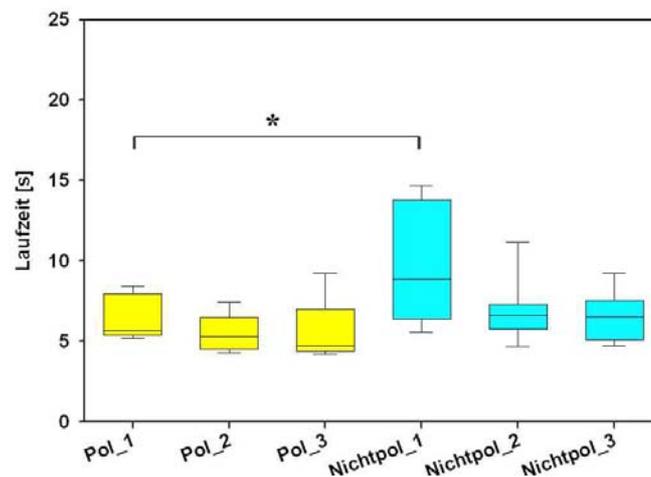
**Abbildung 85:** Pollensammlerinnen: Mediane der Laufzeiten zu den Lichtquellen niedriger (25%; „1“), mittlerer (50%; „2“) und hoher (100%; „3“) Intensität für Tiere mit niedrigen („low“;  $n = 15$ ) und hohen („high“;  $n = 21$ ) gustatorischen Empfindlichkeiten.



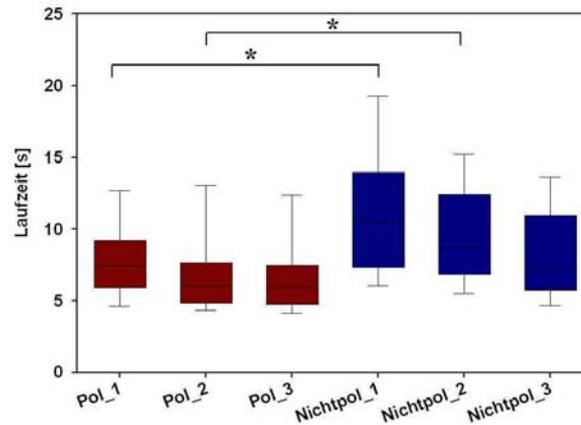
**Abbildung 86:** Nichtpollensammlerinnen: Mediane der Laufzeiten zu den Lichtquellen niedriger (25%; „1“), mittlerer (50%; „2“) und hoher (100%; „3“) Intensität für Tiere mit niedrigen („low“;  $n = 14$ ) und hohen („high“;  $n = 18$ ) gustatorischen Empfindlichkeiten (\*\*:  $p < 0,01$ ; Dunn's Multiple Comparison Test).

### 3.5 Ergebnisse: Lokomotorisches und phototaktisches Verhalten

Es bestehen darüber hinaus auch Unterschiede zwischen Pollen- und Nichtpollensammlerinnen mit niedrigen GRS in ihren Laufzeiten zu den Lichtquellen der niedrigsten Intensität ( $p < 0,05$ ; Mann-Whitney-Test nach Bonferroni-Korrektur), sowie zwischen Pollen- und Nichtpollensammlerinnen mit hohen GRS bei niedrigen ( $p < 0,05$ ; Mann-Whitney-Test nach Bonferroni-Korrektur) sowie mittleren ( $p < 0,05$ ; Mann-Whitney-Test nach Bonferroni-Korrektur) Lichtintensitäten. Dagegen bestehen keine Unterschiede zwischen Pollen- und Nichtpollensammlerinnen mit niedrigen GRS bei mittleren ( $p > 0,05$ ; Mann-Whitney-Test nach Bonferroni-Korrektur) und hohen ( $p = 0,085$ ; Mann-Whitney-Test) Lichtintensitäten sowie bei Tieren mit hohen GRS bei hohen Lichtintensitäten ( $p = 0,159$ ; Mann-Whitney-Test) (Abb. 87 und Abb. 88).

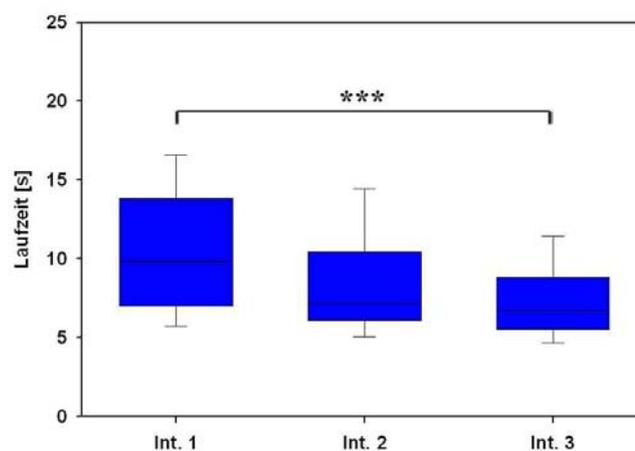


**Abbildung 87:** Sammlerinnen mit niedrigen GRS: Mediane der Laufzeiten zu den Lichtquellen niedriger (25%; „1“), mittlerer (50%; „2“) und hoher (100%; „3“) Intensität für Pollen- („Pol“;  $n = 15$ ) und Nichtpollensammlerinnen („Nichtpol“;  $n = 14$ ) (\*: $p < 0,05$ ; Bonferroni Post Test).

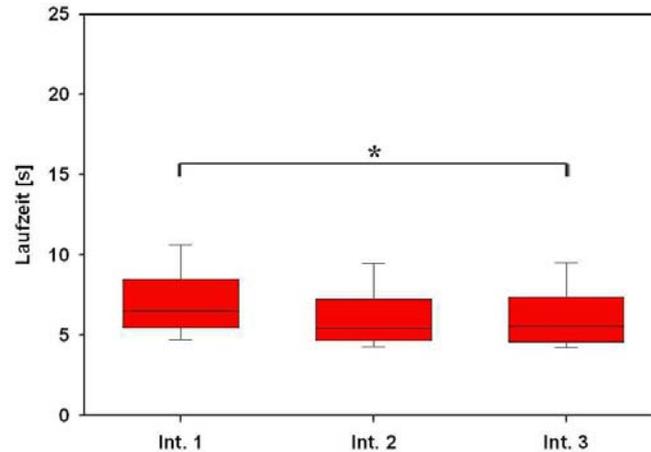


**Abbildung 88:** Sammlerinnen mit hohen GRS: Mediane der Laufzeiten zu den Lichtquellen niedriger (25%; „1“), mittlerer (50%; „2“) und hoher (100%; „3“) Intensität für Pollen- („Pol“; n = 21) und Nichtpollensammlerinnen („Nichtpol“; n = 18) (\*:p < 0,05; \*\*: p < 0,01; Bonferroni Post Test).

Fasst man die Bienen mit niedrigen und hohen gustatorischen Empfindlichkeiten zu einer Gruppe zusammen, so findet man, dass sich die Laufzeiten zu den Lichtquellen verschiedener Intensitäten signifikant voneinander unterscheiden für Pollen- (p = 0,010; Friedman Test) und für Nichtpollensammlerinnen (p < 0,001; Friedman Test). Dabei legen sie den Weg zu der Lichtquelle mit der höchsten Lichtintensität (100%) in einer signifikant kürzeren Zeit zurück als zu der Lichtquelle, deren Lichtintensität nur 25% beträgt (Pollensammlerinnen: p < 0,05; Dunn's Multiple Comparison Test, Nichtpollensammlerinnen: p < 0,001; Dunn's Multiple Comparison Test) (Abb. 89 und Abb. 90).

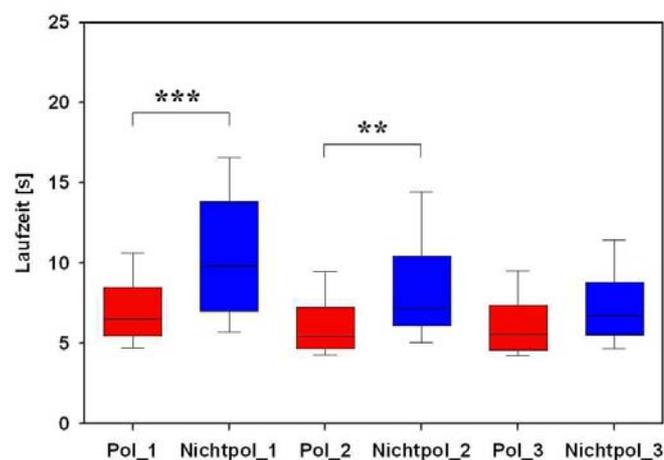


**Abbildung 89:** Nichtpollensammlerinnen: Mediane der Laufzeiten zu den Lichtquellen niedriger (25%; „1“), mittlerer (50%; „2“) und hoher (100%; „3“) Intensität für Tiere mit niedrigen und hohen gustatorischen Empfindlichkeiten zusammen (\*\*\*: p < 0,001; Dunn's Multiple Comparison Test). n = 32.



**Abbildung 90:** Pollensammlerinnen: Mediane der Laufzeiten zu den Lichtquellen niedriger (25%; „1“), mittlerer (50%; „2“) und hoher (100%; „3“) Intensität für Tiere mit niedrigen und hohen gustatorischen Empfindlichkeiten zusammen (\*:  $p < 0,05$ ; Dunn’s Multiple Comparison Test).  $n = 36$ .

Für Tiere mit hohen und niedrigen GRS zusammen laufen Pollensammlerinnen signifikant schneller als Nichtpollensammlerinnen zu den Lichtquellen mit niedriger ( $p < 0,001$ ; Mann-Whitney-Test nach Bonferroni-Korrektur) sowie mittlerer ( $p < 0,01$ ; Mann-Whitney-Test nach Bonferroni-Korrektur) Intensität. Kein Unterschied besteht dagegen in den Laufzeiten zu den Lichtquellen mit der höchsten Intensität ( $p > 0,05$ ; Mann-Whitney-Test nach Bonferroni-Korrektur) (Abb. 91).



**Abbildung 91:** Mediane der Laufzeiten zu den Lichtquellen niedriger (25%; „1“), mittlerer (50%; „2“) und hoher (100%; „3“) Intensität für Pollensammlerinnen („Pol“;  $n = 36$ ) und Nichtpollensammlerinnen („Nichtpol“;  $n = 32$ ) mit niedrigen und hohen gustatorischen Empfindlichkeiten zusammen (\*\*:  $p < 0,01$ ; \*\*\*:  $p < 0,001$ ; Bonferroni Post Test).

Pollen- und Nichtpollensammlerinnen unterscheiden sich also bezüglich ihrer lokomotorischen Aktivität voneinander, und zwar unabhängig von ihren gustatorischen Empfindlichkeiten. Die lokomotorische Aktivität scheint dabei auch unabhängig von der phototaktischen Aktivität reguliert zu werden, da sich diese zwischen Pollen- und Nichtpollensammlerinnen nicht unterscheidet. Unterschiede in der lokomotorischen Aktivität entstehen dabei vermutlich nicht über eine Modulation durch OA oder TA, da eine Injektion dieser Substanzen keinen Einfluss auf diesen Verhaltensparameter zeigte.

## 4 Diskussion

### 4.1 TA-IR und AmTYR1-IR im Bienengehirn und die Funktion von Tyramin

In fast allen Neuropilen des Bienengehirns sowie des suboesophagealen Ganglions wurde eine ausgeprägte TA-IR detektiert. Eine AmTYR1-IR wurde in allen Neuropilen detektiert. Dieses Ergebnis bestätigt den Befund von Blenau et al. (2000), die eine Transkription des *Amtyr1*-Gens in allen Somabereichen des Gehirns zeigten. Sie erscheint als verzweigtes Fasergeflecht mit ovalen Blebs, die als Freisetzungstellen des Tyramins aus den Zellen interpretiert werden können. Der Befund, dass sich die Tyraminmenge in den Gehirnen frisch geschlüpfter Bienen und Sammlerinnen nicht unterscheidet, deutet darauf hin, dass die Freisetzung des Amins unabhängig von Alter und somit von der altersabhängigen Rolle der Biene im Volk ist. Die Beobachtung, dass sich die Menge und die Verteilung von Tyramin sowie des AmTYR1-Rezeptors im Gehirn zwischen Pollen- und Nichtpollensammlerinnen sowie Winterbienen nicht unterscheidet, deutet darauf hin, dass diese Parameter in keinem direkten Zusammenhang mit der Sammelrolle einer Biene stehen. Für OA wurden dagegen vom Alter und von der Rolle im Volk abhängige individuelle Unterschiede zwischen Bienen beschrieben (Wagener-Hulme et al. 1999). Dieser Befund ergibt sich allerdings aus einer Analyse mit Hilfe von HPLC, einer Methode, die wesentlich sensitiver geringe Unterschiede von Amin-Mengen detektieren kann, als es durch immunhistologische Färbung möglich ist.

In allen drei optischen Loben war die TA-IR wie auch die AmTYR1-IR deutlich ausgeprägt. Wahrscheinlich ist Tyramin also, ebenso wie Oktopamin, an der Verarbeitung visueller Reizinformationen beteiligt. Das könnte die Farbcodierung in der Medulla und Lobula betreffen, die Verarbeitung visueller Bewegungsinformation oder auch die Richtungsinformation einer Bewegung, die in der Lobula verarbeitet wird. Tyramin könnte auch an der Verarbeitung von Informationen über die Polarisierung von Licht beteiligt sein und somit eine Rolle bei der Orientierung der Biene anhand des Himmelskompasses spielen.

In den Pilzkörpern erfolgt eine integrative Verarbeitung verschiedener Reizmodalitäten (Homborg 2005). Tyramin wird in allen drei Bereichen der Kelche aus extrinsischen Fasern freigesetzt. Genau wie Oktopamin (Kreissl et al. 1994) wird Tyramin im basalen Ring in einer größeren Menge freigesetzt als im Kragen oder in der Lippe. Tyramin könnte im Kragen der Calyces eine Rolle bei der Verarbeitung visueller Reize aus den optischen Loben spielen,

sowie in der Lippe an der Verarbeitung olfaktorischer und mechanosensorischer antennaler Informationen beteiligt sein. Besonders bei der Verarbeitung von Reizinformationen im basalen Ring, wohin vor allem mechanosensorische und gustatorische Afferenzen aus dem suboesophagealen Ganglion sowie antennale Afferenzen projizieren, scheint Tyramin eine Rolle zu spielen. Das Vorkommen von Tyramin und Tyramin-Rezeptoren in den Pilzkörpern zeigt auch, dass Tyramin an anderen integrativen Prozessen, die im Pilzkörper stattfinden, wie zum Beispiel dem Lernen und der zeitlichen Integration sensorischer Reizinformationen, beteiligt sein könnte. Die AmTYR1-IR deutet darauf hin, dass Tyramin-Rezeptoren bei intrinsischen Kenyon-Zellen sowohl im Bereich dendritischer Verzweigungen in den Kelchen als auch auf axonalen Projektionen in den Pedunculi und Loben vorkommen. Davon sind besonders die Zellen mit dendritischen Feldern im basalen Ring betroffen. Eine TA-IR wurde weder in den Pedunculi noch in den Loben der Pilzkörper detektiert. TA könnte möglicherweise z.B. aus dem umgebenden Protocerebrum zu den axonalen Rezeptoren der Kenyon-Zellen diffundieren („Volumentransmission“) und dort wie auch in den Loben Einfluss auf die Weiterleitung und Verarbeitung von Erregungen nehmen. Kreissl et al. (1994) und Sinakevitch et al. (2005) beschreiben OA-IR extrinsische Fasern im unteren („ $\gamma$ “-) Bereich der  $\alpha$ -Loben. Da die  $\gamma$ -Loben beim olfaktorischen Lernen bei *Drosophila* eine wichtige Rolle spielen (Zars et al. 2000), könnte die AmTYR1-IR in diesem Bereich einen Hinweis auf eine Rolle von TA beim olfaktorischen Lernen geben. Allerdings ist solch eine funktionelle Interpretation nur sehr bedingt von *Drosophila* auf die Biene zu übertragen.

Im Zentralkomplex werden visuelle, mechanische und chemische Reizinformationen verarbeitet. Columnare Neurone stellen Verbindungen zwischen der rechten und linken Gehirnhälfte her. Tyramin also könnte bei der Integration von Signalen aus den beiden Hemisphären eine Rolle spielen (Hanesch 1989; Vitzthum et al. 1996) und damit einen wesentlichen Beitrag zu komplexen motorischen Verhaltensmustern leisten, die eine visuelle räumliche Orientierung erfordern, wie das Laufen oder Fliegen (Homberg 1994; Huber 1967; Illius et al. 1994; Otto 1971; Strauss & Heisenberg 1993). Eine ausgeprägte TA-IR in der unteren Einheit des Zentralkörpers deutet darauf hin, dass Tyramin bei der Perzeption polarisierten Lichtes und somit bei der räumlichen Orientierung mit Hilfe des Himmelskompasses eine modulatorische Rolle spielen könnte (Homberg & Müller 1995; Müller & Homberg 1994; Vitzthum et al. 2002).

Das Protocerebrum spielt vor allem bei der Integration verschiedener Reizinformationen eine wichtige Rolle (Hertel 1980; Kanzaki et al. 1991; Maronde 1991; Mobbs 1985). Die

ausgeprägte TA-IR und AmTYR1-IR deutet darauf hin, dass TA an Prozessen in diesem Neuropil beteiligt sein könnte. Im lateralen Lobus könnte Tyramin beispielsweise modulatorischen Einfluss auf die olfaktorische Signalverarbeitung nehmen, während es in den optischen Foci an der integrativen Verarbeitung visueller Reize mit anderen Reizmodalitäten, z.B. mechanosensorischen Informationen, beteiligt sein könnte.

Das Fehlen sowohl von TA-IR als auch von AmTYR1-IR in den Glomeruli der Antennalloben deutet darauf hin, dass Tyramin an der Signalverarbeitung in diesem Bereich der Antennalloben nicht beteiligt ist. Darin unterscheidet sich seine Rolle von der von Oktopamin, welches in den Glomeruli ebenso wie in dem zentralen Neuronen-Geflecht der Antennalloben immunhistochemisch nachgewiesen wurde (Kreissl et al. 1994; Sinakevitch et al. 2005). Auch in dem Fasergeflecht im zentralen Bereich der Antennalloben fehlt eine TA-IR; im Gegensatz dazu findet man hier jedoch eine ausgeprägte AmTYR1-IR. Offensichtlich sind hier also Tyramin-spezifische Rezeptoren vorhanden, zu denen Tyramin z.B. aus den Dorsalloben über Volumentransmission diffundieren könnte. Auf diese Weise könnte also Tyramin durch Modulation inhibitorischer Interneurone oder extrinsischer Projektionsneurone an der Verarbeitung olfaktorischer Reizinformationen in den Antennalloben beteiligt sein. Die ausgeprägte TA-IR und AmTYR1-IR im Dorsallobus lässt auf eine Rolle von Tyramin bei der Verarbeitung antennaller Reizinformationen schließen. Neben olfaktorischen Projektionen aus den Antennalloben projizieren auch mechanosensorische und gustatorische Afferenzen aus den Antennen in den Dorsallobus (Haupt 2005). Möglicherweise könnte Tyramin also an der Verarbeitung von Reizinformationen aller drei Modalitäten im Dorsallobus beteiligt sein. Tyramin könnte im Dorsallobus die Empfindlichkeit für Sucrose modulieren, die sich dann in einer Veränderung der Proboscis Extension Response (PER) ausdrückt (Scheiner et al. 2002). Das Tritocerebrum und suboesophagealen Ganglion stellen das gustatorische Verarbeitungszentrum des Bienenhirns dar. Die Tyramin- und Tyramin-Rezeptor-ähnliche Immunreaktion in diesen Neuropilen deutet darauf hin, dass Tyramin bei der Verarbeitung gustatorischer Reizinformationen in der Proboscis eine Rolle spielt.

Tyramin ist als metabolischer Vorläufer von Oktopamin auch in oktopaminergen Neuronen enthalten. Es wäre also denkbar, dass die Tyramin-ähnlich markierten Neuronen oktopaminerg und nicht tyraminerg sind. Diese Hypothese ist allerdings nahezu auszuschließen, wie sich aus dem Befund in den Antennalloben ergibt: wie Kreissl et al. (1994) und Sinakevitch et al. (2005) zeigten, findet sich in den Glomeruli und im zentralen

Fasergeflecht der Antennalloben ausgeprägte OA-IR. Die Antennalloben sind hingegen frei von jeglicher TA-IR, woraus sich schließen lässt, dass das Vorkommen von Tyramin in oktopaminergen Neuronen mit der hier verwendeten Methode nicht detektiert wird. Das gleiche gilt für die OA-IR in den „ $\gamma$ -Loben“ der Pilzkörper, die ebenfalls nicht mit dem Tyramin-spezifischen Antikörper detektiert wird. Außerdem spricht das Auftreten von Blebs in dem immunreaktiven Fasergeflecht gegen diese Hypothese. Die Blebs stellen vermutlich Freisetzungstellen der markierten Substanz dar. Würde die TA-IR eigentlich oktopaminerge Neurite markieren, könnten keine Freisetzungstellen markiert sein, da ja in diesem Fall nicht Tyramin, sondern Oktopamin aus den Zellen freigesetzt würde.

Der Befund, dass TA-IR und AmTYR1-IR nicht überall im Bienenhirn kolokalisiert sind, könnte möglicherweise auch damit erklärt werden, dass auch OA in sehr hohen Konzentrationen an den AmTYR1-Rezeptor bindet. Die Aktivierung des Oktopamin-Rezeptors AmOA1 führt zu einer intrazellulären Erhöhung der cAMP-Konzentration (Grohmann et al. 86), während eine Bindung an AmTYR1 den entgegengesetzten Effekt hat (Blenau et al. 2000). Die Bindung von OA an den AmTYR1-Rezeptor könnte beispielsweise ein Mechanismus sein, um den Organismus in extremen Stresssituationen vor den möglicherweise letalen Folgen einer ungewöhnlich starken Oktopamin-Ausschüttung zu schützen.

### **4.2 Modulation visueller Reizinformation durch TA und OA**

Sowohl die Injektion von Ringer als auch von YOH bewirkten in allen 3 Komponenten eine leichte Verstärkung der Reizantwort. Dieser Effekt war für YOH signifikant verschieden von 0. Im Vergleich mit der Ringer-Applikation hatte eine Injektion von YOH jedoch keinen signifikanten Einfluss auf die Reizantwort. Da also die Injektion einer Kontrollsubstanz an sich schon eine gewisse Änderung der Reizantwort hervorruft, sind die Effekte der Pharmaka besonders in Hinblick auf einen Unterschied zur Ringer-Kontrolle zu beurteilen.

OA und TA verstärken die in einem ERG gemessene Reizantwort auf einen grünen monochromatischen Lichtreiz. Im Vergleich mit dem Effekt der Injektion einer Ringer-Kontrolle wirken beide Amine in den gleichen Konzentrationen auf die sustained-Komponente, welche auf die Aktivität der Photorezeptoren zurückgeht. OA vergrößert

außerdem die Amplitude der off-Komponenten, während die on-Komponente von keinem der beiden Amine beeinflusst wird.

Die Ergebnisse zur Wirkung von OA bestätigen die Befunde von Kloppenburg (1990), der ebenfalls eine Vergrößerung der Amplituden der sustained- und off-Komponenten, jedoch keinen Effekt auf die on-Komponente nach OA-Applikation beobachtete. In der vorliegenden Arbeit waren die wirksamen Konzentrationen dabei für die sustained-Komponente im Vergleich zur Ringer-Applikation  $10^{-3}$  und  $10^{-4}$  M. Die Injektion von  $10^{-5}$  M OA zeigte einen von 0 verschiedenen Effekt, der sich allerdings nicht von dem einer Ringer-Injektion signifikant unterschied. In der Konzentration  $10^{-6}$  M hatte OA dagegen keinen Effekt. Kloppenburg (1990) zeigte für  $10^{-6}$  M OA einen modulatorischen Effekt auf das ERG. Diese Abweichung ist vermutlich auf Unterschiede im Versuchsaufbau zurückzuführen.

Das Ergebnis steht auch in Einklang mit den verhaltensphysiologischen Beobachtungen von Erber & Kloppenburg (1995), die eine Modulation des richtungsspezifischen antennalen Reflexes auf einen Bewegungsreiz durch Injektion von OA in das visuelle System beschrieben.

Divergierende Ergebnisse für die verschiedenen Komponenten der ERG sind mit der unterschiedlichen Herkunft der Potentiale zu erklären: während die sustained-Komponente durch die Rezeptor-Potentiale der Retinula-Zellen zustande kommt, werden die off- und teilweise auch die on-Komponente übergeordneten visuellen Ganglien, insbesondere der Lamina, zugeschrieben (Goldsmith 1960; Heisenberg 1971; Menzel 1971). Sowohl OA als auch TA modulieren also die Verarbeitung visueller Stimuli in den Retinulazellen, was sich in einer veränderten sustained-Komponente ausdrückt. OA scheint darüber hinaus im Gegensatz zu TA auch eine modulatorische Wirkung auf Neurone der Lamina zu haben, die in der off-Komponente der ERG nachweisbar ist. Die ausgeprägte TA-IR und AmTYR1-IR in den optischen Ganglien legt den Schluss nahe, dass auch TA eine Rolle bei der Verarbeitung visueller Reizinformation in den optischen Neuropilen spielt. Dabei handelt es sich vermutlich um andere visuelle Reize, wie z.B. von Bewegungsreizen, die in diesem Versuch nicht getestet wurden.

Die inhibierende Wirkung von Yohimbin, die es bei Koinjektion mit TA entfaltet, zeigt, dass die Wirkung von TA auf eine spezifische Bindung an einen TA-Rezeptor zurückzuführen ist. Zusammen mit dem immunhistologischen Befund einer ausgeprägten TA-IR und AmTYR1-IR in den optischen Loben der Biene ist diese Beobachtung ein starker Hinweis darauf, dass TA ebenso wie OA an der Modulation visueller Empfindlichkeiten beteiligt ist.

Der Effekt der Pharmakainjektion wurde 20 min nach Applikation gemessen. Die Tatsache, dass eine systemische Applikation biogener Amine nach dieser Zeitspanne eine Wirkung zeigt, lässt auf einen lang anhaltenden Effekt schließen, wie er auf neuronaler Ebene durch die Wirkung von Neurohormonen zustande kommt. OA und TA könnten nach Injektion also mit der Hämolymphe zu den optischen Neuropilen und zu den visuellen Rezeptoren diffundieren, um dort als Neurohormone die visuelle Empfindlichkeit für längere Zeit zu modulieren. Unterschiede im visuellen Verhalten, wie sie beispielsweise für die Phototaxis von Erber et al. (2006) zwischen gustatorisch empfindlichen und unempfindlichen Tieren beobachtet wurden, könnten also auf Unterschiede in der visuellen Empfindlichkeit zurückzuführen sein, welche wiederum von OA oder TA moduliert wird.

Die Bedeutung der Wirkung von OA und TA im visuellen System für die Arbeitsteilung der Honigbiene lässt sich aus den vorgestellten Ergebnissen nicht ableiten. Die Reizantwort auf visuelle Stimuli wird bei Pollen- und Nicht-Pollen-Sammlerinnen in gleicher Weise durch OA  $10^{-4}$  M moduliert. Dieser Befund zeigt, dass Unterschiede im Sammelverhalten wahrscheinlich nicht dadurch zustande kommen, dass OA die visuelle Empfindlichkeit bei Pollen- und Nichtpollen-Sammlerinnen auf unterschiedliche Weise moduliert. Dieser Befund widerlegt jedoch nicht, dass OA in anderer Weise modulatorisch an der Arbeitsteilung beteiligt sein könnte. Die visuelle Empfindlichkeit einer Biene könnte beispielsweise einen Einfluss auf den Zeitpunkt haben, wann sie den dunklen Stock verlässt, um Aufgaben außerhalb des Stockes zu übernehmen (Ben-Shahar et al. 2003). Durch die Modulierbarkeit dieser Empfindlichkeit durch biogene Amine wäre dieser Zeitpunkt flexibel und kann den aktuellen Bedingungen angepasst werden.

### **4.3 Herunterregulierung des AmTYR1-Rezeptors**

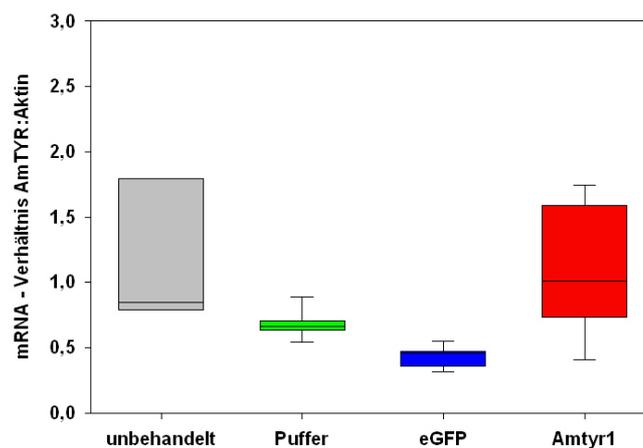
Der Vergleich der gustatorischen Empfindlichkeiten von frisch geschlüpften Versuchstieren der eGFP-dsRNA-injizierten sowie der Puffer-injizierten Kontrollgruppe mit unbehandelten Versuchstieren zeigt, dass durch die Injektion in den Ocellartrakt die gustatorische Empfindlichkeit erhöht wird. Tiere, denen *Amtyr1*-dsRNA injiziert wurde und die somit genauso behandelt worden waren wie die eGFP-dsRNA-injizierte und die Puffer-injizierte Gruppe, zeigen dagegen die gleiche geringe gustatorische Empfindlichkeit wie unbehandelte Tiere. Offensichtlich hatte die *Amtyr1*-dsRNA-Injektion also einen hemmenden Effekt auf die PER, der den stimulierenden Effekt der Injektion kompensiert. Dabei ist unklar, ob eine Aktivierung des AmTYR1-Rezeptors an dem Injektionseffekt beteiligt ist. In diesem Fall

würde eine *Amtyr1*-dsRNA-Injektion den Injektionseffekt direkt beeinflussen. Möglicherweise handelt es sich bei der Verringerung der gustatorischen Empfindlichkeit durch *Amtyr1*-dsRNA-Injektion und bei dem Injektionseffekt um zwei voneinander unabhängige Effekte auf die PER, die in entgegengesetzte Richtungen wirken.

Eine Injektion von dsRNA in den Ocellartrakt von Winterbienen hat dagegen keine Effekt auf die gustatorische Empfindlichkeit der Versuchstiere 4 Tage nach Injektion. Mustard et al. (2005) zeigten, dass der *Amtyr1*-mRNA-Gehalt bei Bienen-Sammlerinnen etwa 3 Mal höher als bei frisch geschlüpften Bienen ist. Das Ausbleiben eines Effektes einer *Amtyr1*-dsRNA-Injektion bei Winterbienen könnte also damit zu erklären sein, dass aufgrund der größeren mRNA-Menge in älteren Tieren eine Herunterregulierung durch RNAi möglicherweise keinen oder einen zeitlich verschobenen Effekt im Vergleich zu frisch geschlüpften Tieren haben könnte.

Die Daten aus dem Verhaltensexperiment legen die Vermutung nahe, dass eine *Amtyr1*-dsRNA-Injektion in frisch geschlüpften Bienen die Bildung des AmTYR1-Rezeptors inhibiert. Der über qRT-PCR ermittelte Gehalt an Rezeptor-mRNA in den verschiedenen Versuchsgruppen bestätigt diese Vermutung jedoch nicht. Tiere, denen *Amtyr1*-dsRNA injiziert wurde, wiesen ebenso wie unbehandelte Tiere einen signifikant höheren Gehalt an *Amtyr1*-mRNA auf als die Tiere aus den eGFP-dsRNA- bzw. Puffer-injizierten Kontrollgruppen. Aus einer Analyse des mRNA-Gehaltes lässt sich allerdings keine Aussage über die aktuelle Menge des entsprechenden Proteins treffen. Das Ergebnis könnte also dadurch erklärt werden, dass eine dsRNA-Injektion einen Knockdown des Proteins bewirkt, möglicherweise aber anschließend auch zu einer Überproduktion der entsprechenden mRNA führt, um die reduzierte Proteinmenge zu kompensieren. Es könnte also sein, dass eine mRNA-Quantifizierung zu einem früheren Zeitpunkt nach dsRNA-Injektion eine reduzierte *Amtyr1*-Menge detektieren würde. Amdam et al. (2003) zeigten in Northern Blots eine deutliche Reduktion von Vitellogenin-mRNA 7 Tage nach dsRNA-Injektion in adulte Honigbienen. Farooqui et al. (2003 und 2004) zeigten 24 und 48 h nach dsRNA-Behandlung eine Unterdrückung des *AmOAI*-Gens. Zhou et al. (2005) wiesen in einer qRT-PCR bei Termiten 24 h nach dsRNA-Injektion eine Unterdrückung zweier Hexamerin-Gene nach. Da keine Informationen über die Turnover-Rate des AmTYR1-Rezeptors vorliegen, lässt sich jedoch über einen geeigneten Zeitpunkt zu Detektion eines Effektes einer RNA-Interferenz

keine Vermutung anstellen. In einem weiterführenden Experiment könnte es dennoch lohnen, beispielsweise 12, 24 oder 48 h nach dsRNA-Injektion die *Amtyr1*-mRNA zu quantifizieren. Der mRNA-Gehalt jeder Probe wurde aufgrund der großen Probenzahl lediglich 1 Mal in einer qRT-PCR bestimmt. Die Ergebnisse einer qRT-PCR-Analyse unterliegen jedoch einer gewissen Variabilität, die beispielsweise durch Pipettierfehler zustande kommen können – Proben werden daher i.d.R. mehrmals analysiert, um den Fehler zu minimieren (z.B. Zhou et al. 2005). Um eine mögliche Verfälschung der Ergebnisse durch die lediglich 1-malige Probenanalyse abzuschätzen, wurde in jeder Behandlungsgruppe der *Amtyr1*-mRNA-Gehalt von 3 Proben je 4 Mal bestimmt. Obwohl das Ergebnis aufgrund des geringen Stichprobenumfangs statistisch nicht auswertbar ist, zeigt es ebenfalls tendenziell einen höheren *Amtyr1*-mRNA-Gehalt in den *Amtyr1*-dsRNA-injizierten sowie den unbehandelten Tieren im Vergleich zu den beiden übrigen Kontrollgruppen und bestätigt damit das Ergebnis der 1-fachen Analyse (Abb. 92).



**Abbildung 92:** relative *Amtyr1*-mRNA-Mengen in den Köpfen frisch geschlüpfter Bienen 4 Tage nach dsRNA-Injektion. 4-fache Analyse (n = 3).

#### 4.4 Modulation der motorischen und phototaktischen Aktivität durch OA und TA

Scheiner et al. (2002) zeigten, dass eine Applikation von OA oder TA die gustatorische Empfindlichkeit von Sammlerinnen erhöht. Dieser Effekt konnte hier nicht bestätigt werden. Dieser Widerspruch lässt sich möglicherweise durch Unterschiede im Versuchsablauf erklären: während Scheiner et al. (2002) die Versuchstiere bereits am Vorabend des Experiments abfingen und über Nacht in Metallröhrchen fixiert im Labor aufbewahrten, wurden die Tiere im vorliegenden Fall erst wenige Stunden vor dem Versuch gefangen und

eingespannt. Möglicherweise ist der Titer von OA in der Hämolymphe, das durch den Stress der Behandlung vermutlich ausgeschüttet wird (Harris & Woodring 1992; Adamo et al. 1995; Roeder et al. 2003), nach der Behandlung noch für einige Stunden erhöht, so dass eine zusätzliche Injektion von OA oder TA keinen merklichen Effekt erzielt. Pankiw & Page (2003) zeigten, dass eine Behandlung, wie das z.B. das Herunterkühlen der Versuchstiere zur Immobilisierung, einen Einfluss auf die gustatorische Schwelle von Bienen haben kann..

Die Ergebnisse der ERG-Ableitungen haben gezeigt, dass OA und TA einen modulatorischen Einfluss auf die Reizantwort der visuellen Rezeptoren auf einen Lichtstimulus haben. Immunhistologische Markierungen von Bienengehirnen zeigen außerdem eine ubiquitäre Verbreitung von TA, des AmTYR1-Rezeptors sowie von OA (Kreissl et al. 1994; Sinakevitch et al. 2005) im Bienenhirn und legen die Vermutung nahe, dass OA und TA bei der Verarbeitung visueller Reizinformation in den visuellen Neuropilen eine modulatorische Rolle spielen. Weder eine Injektion von OA noch von TA zeigte jedoch einen Effekt auf die phototaktische Aktivität der Versuchstiere. Möglicherweise äußert sich eine Modulation der visuellen Empfindlichkeit also nicht unbedingt im phototaktischen Verhalten. Die Beobachtung von Erber et al. (2006), die eine Korrelation zwischen der gustatorischen Empfindlichkeit und dem phototaktischen Verhalten von Sammlerinnen beschreiben, ist also möglicherweise nicht auf modulatorische Effekte durch OA oder TA zurückzuführen.

Ebensowenig wie die phototaktische Aktivität scheint die Korrelation der motorischen Aktivität mit der gustatorischen Empfindlichkeit (Humphries et al. 2005) auf einer übergeordneten Modulation durch OA oder TA zu beruhen. Diese Beobachtung steht auch in Einklang mit dem Befund von Erber et al. (2006), die keine Korrelation zwischen gustatorischer bzw. visueller Empfindlichkeit einerseits und motorischer Laufaktivität andererseits beobachteten. Der ausbleibende Effekt einer OA- oder TA-Injektion auf die lokomotorische bzw. phototaktische Aktivität könnte ebenso wie für die gustatorische Empfindlichkeit auch damit zu erklären sein, dass ein möglicher Effekt durch aufgrund der Stresssituation natürlicherweise ausgeschüttetes OA überdeckt wird und deshalb nicht detektiert werden kann. Dazu könnten neben der Injektion auch beispielsweise das Abschneiden der Flügel oder die isolierte Situation der sozialen Tiere in einer unbekanntem Umgebung beitragen. In diesem Fall könnte eine Injektion von Antagonisten möglicherweise Aufschluss über die Bedeutung von OA oder TA geben. Als OA-Antagonist käme dabei beispielsweise Epinastin, als TA-Antagonist Yohimbin in Frage.

### **4.5 Lokomotorische Aktivität und phototaktisches Verhalten von Pollen- und**

#### **Nichtpollensammlerinnen**

Pollensammlerinnen zeigten eine signifikant höhere lokomotorische Spontanaktivität als Nichtpollen-Sammlerinnen. Das äußerte sich sowohl in der Laufstrecke, die die Tiere während der Dunkelphase spontan zurücklegten sowie in der Geschwindigkeit, mit der sie sich dabei fortbewegten, als auch in dem Anteil der Zeit, während dessen die Tiere während der Dunkelphase lokomotorische Aktivität zeigten. Dieses Ergebnis bestätigt den Befund von Humphries et al. (2005), die eine höhere lokomotorische Aktivität bei frisch geschlüpften Bienen fanden, die aus einer auf das Sammeln von Pollen selektierten Kolonie stammten (also vermutlich als Sammlerinnen bevorzugt Pollen sammeln werden), als bei Tieren aus einer Kolonie, die gegen das Sammeln von Pollen selektiert worden war. Die spontane Laufaktivität war nicht korreliert mit der gustatorischen Empfindlichkeit für Sucrose. Dieser Befund deckt sich mit den Beobachtungen von Erber et al. (2006), die ebenfalls keine Korrelation zwischen der lokomotorischen Aktivität und der gustatorischen Empfindlichkeit von Nektarsammlerinnen feststellten. Das Ergebnis steht allerdings, ebenso wie das von Erber et al. (2006), in Widerspruch zu der Beobachtung von Humphries et al. (2005), die für Bienen aus einer unselektierten Kolonie eine Korrelation zwischen der gustatorischen Empfindlichkeit für Sucrose und der lokomotorischen Aktivität fanden. Erber et al. (2006) diskutierten diese Abweichung als Effekt unterschiedlicher Versuchsbedingungen, wie die unterschiedliche Größe der Versuchsarena, die Tatsache, dass Humphries et al. (2005) die Versuche bei Licht durchführten und die gustatorische Empfindlichkeit erst nach Messung der motorischen Aktivität ermittelten. Der Versuchsaufbau sowie die Durchführung des Versuches waren im vorliegenden Fall fast identisch mit denen von Erber et al. (2006); das abweichende Ergebnis zu dem von Humphries et al. (2005) könnte also ebenfalls in den abweichenden Versuchsbedingungen begründet sein. Das Ergebnis steht auch im Gegensatz zu Scheiner et al. (2005), die eine Korrelation des antennalen Abtastverhaltens mit der gustatorischen Sucrose-Empfindlichkeit beschrieben. Der Grund für diese Abweichung könnte darin liegen, dass die motorische Aktivität der Antennen anderen Regulationsmechanismen unterliegen könnte als die lokomotorische Aktivität.

Die lokomotorische Aktivität einer Biene scheint also, unabhängig von ihrer gustatorischen Empfindlichkeit, mit ihrer Rolle als Sammlerin in Zusammenhang zu stehen. Das heißt also, dass vermutlich Unterschiede zwischen Pollen und Nichtpollensammlerinnen bestehen, die auf die Aktivität unabhängiger Regulationsmechanismen zurückzuführen sind.

Die Wegstrecken, die Pollen- und Nichtpollensammlerinnen zu einer Lichtquelle zurücklegten, unterschieden sich nicht signifikant voneinander. Die Tatsache, dass Pollensammlerinnen die Wege zu den Lichtquellen in einer durchschnittlich signifikant kürzeren Zeit zurücklegen als Nichtpollensammlerinnen ist vermutlich der höheren Laufgeschwindigkeit von Pollensammlerinnen geschuldet, die während der Dunkelphase gemessen wurde, und wird nicht als Maß für die phototaktische Aktivität gewertet. Die phototaktische Aktivität von Pollen- und Nichtpollensammlerinnen ist demnach gleich. Es bestehen auch keine Unterschiede in der phototaktischen Aktivität zwischen Tieren mit hoher und geringer gustatorischer Empfindlichkeit. Auch dieses Ergebnis könnte ein Hinweis darauf sein, dass die sensorischen Empfindlichkeiten für verschiedene Reizmodalitäten über voneinander unabhängige Regulationsmechanismen moduliert werden könnten. Während die sensorischen Empfindlichkeiten für Pollen und Citral-Duft jeweils mit der individuellen gustatorischen Empfindlichkeit für Sucrose korrelierten (Scheiner et al. 2004), scheint das für visuelle Reize nicht uneingeschränkt zuzutreffen. Dieses Ergebnis steht im Gegensatz zu dem Befund von Erber et al. (2006), die eine Korrelation der Laufzeit zu einer Lichtquelle und der gustatorischen Empfindlichkeit eines Tieres fanden. Der Grund für dieses abweichende Ergebnis bei fast identischen Versuchsbedingungen ist derzeit noch unklar.

Die Messung von ERG nach Pharmakaapplikation hat ergeben, dass sowohl OA als auch TA die Reizantwort der visuellen Rezeptoren auf einen Lichtreiz verstärken. Zusammen mit dem Befund von Scheiner et al. (2002), dass OA und TA auch die gustatorische Reizantwort verstärken, bestätigt dieser Befund die Hypothese einer parallelen Modulation visueller und gustatorischer Empfindlichkeiten durch diese biogenen Amine als übergeordneten Regulationsmechanismus. Demnach sollte bei Tieren mit hoher gustatorischer Empfindlichkeit auch eine erhöhte phototaktische Aktivität zu erwarten sein, da diese ja an die visuelle Empfindlichkeit der Versuchstiere gekoppelt ist. Dass sich diese Erwartung nicht bestätigt, deutet darauf hin, dass die phototaktische Aktivität möglicherweise einer anderen Modulation unterliegt, deren Effekt eine mögliche Wirkung von OA oder TA überdeckt. Ben-Shahar et al. (2002 und 2003) zeigten, dass die phototaktische Aktivität der Biene an die Expression des foraging-Gens *Amfor* gekoppelt ist. Es codiert für eine cGMP-gekoppelte Proteinkinase (PKG), deren Aktivität das phototaktische Verhalten stimuliert, was wiederum den entwicklungsbedingten Zeitpunkt im Leben jeder Arbeiterin bestimmt, wann sie ihre Arbeit für die Kolonie vom dunkeln Stockinneren auf Arbeiten außerhalb des Stocks verlegt,

wo sie dem Tageslicht ausgesetzt ist. Interessanterweise zeigten Ben-Shahar et al. (2003), dass dieser Einfluss auf die phototaktische Aktivität unabhängig von einer Modulation der Empfindlichkeit der visuellen Rezeptoren vonstatten geht. Es könnte also sein, dass eine mögliche Wirkung von OA oder TA auf die phototaktische Aktivität, die z.B. über eine im ERG gezeigte Modulation der Empfindlichkeit der visuellen Rezeptoren wirken könnte, durch den von Ben-Shahar et al. (2003) beschriebenen Mechanismus überdeckt wird. Dieser Mechanismus scheint dabei weder mit der gustatorischen Empfindlichkeit einer Biene noch mit ihrer Rolle als Sammlerin korreliert zu sein. Ben-Shahar et al. (2003) zeigten außerdem, dass die cAMP-gekoppelte Proteinkinase (PKA) keinen Einfluss auf die phototaktische Aktivität hat. Auch dieser Befund ist ein Hinweis darauf, dass OA und TA möglicherweise keinen Effekt auf die phototaktische Aktivität haben, da beide Amine über den cAMP-Weg ihre Wirkung in der Zelle entfalten.

Die Schwellenhypothese geht davon aus, dass Unterschiede in bestimmten Verhaltensweisen auf unterschiedliche sensorische Empfindlichkeiten zurückzuführen sind. Die von Ben-Shahar et al. (2003) demonstrierte Bedeutung der *Amfor*-Gens für die phototaktische Aktivität, die sich unabhängig von einer Modulation der Empfindlichkeit der visuellen Rezeptoren ausdrückt, ist ein Hinweis darauf, dass vermutlich nicht alle Aspekte der Arbeitsteilung bei der Honigbiene mit der Schwellenhypothese erklärt werden können. Das schließt nicht aus, dass die Schwellenhypothese durchaus das Funktionsprinzip anderer Teilaspekte der Arbeitsteilung darstellen könnte. Der Effekt der Expression von *Amfor* scheint bei der entwicklungsbedingten Arbeitsteilung, nicht jedoch bei der zwischen den verschiedenen Sammlertypen eine Rolle zu spielen. Eine differenzierte Steuerung verschiedener, mit der Arbeitsteilung assoziierter Verhaltensweisen ist eine Voraussetzung für die Anwendbarkeit der Schwellenhypothese. Die Beobachtungen aus den beiden Verhaltensexperimenten deuten darauf hin, dass die motorische Aktivität, die gustatorische Empfindlichkeit und die phototaktische Aktivität unabhängig voneinander reguliert zu werden scheinen, wobei die Regulation der motorischen Aktivität in Zusammenhang mit der Rolle als Sammlerin zu stehen scheint. Dieser Befund stützt die Schwellenhypothese, liefert jedoch keinen eindeutigen Beweis. Die sensorischen Modalitäten, die, wenn überhaupt, in direktem Zusammenhang die motorische Aktivität und die phototaktische Aktivität beeinflussen, wurden bisher nicht identifiziert und untersucht. Die funktionelle Bedeutung einer erhöhten motorischen Aktivität von Pollen- gegenüber Nichtpollensammlerinnen ist nicht

offensichtlich. Möglicherweise handelt es sich dabei nicht um einen kausalen Zusammenhang, sondern lediglich um eine Begleiterscheinung eines anderen funktionellen Regulationsmechanismus. Um zu prüfen, ob die Arbeitsteilung tatsächlich über die sensorischen Empfindlichkeiten für mit bestimmten Aufgaben spezifisch verbundene Reize gesteuert wird, müssen diese Reizmodalitäten, die in spezifischem kausalem Zusammenhang mit einer Aufgabe stehen, identifiziert und untersucht werden. Beispielsweise wurde gezeigt, dass das von Bienenlarven abgesonderte Brutpheromon einen stimulierenden Effekt auf das Pollen-Sammelverhalten von Arbeiterinnen hat (Dreller et al. 1999; Pankiw et al. 1998). Darüber hinaus erhöht Brutpheromon auch die Empfindlichkeit für Sucroselösungen (Pankiw & Page 2001). Bienen, die auf ein Nestsäuberungsverhalten selektiert worden waren, zeigen eine höhere olfaktorische Empfindlichkeit für den Geruch von pilzinfizierter Brut als unselektierte Bienen (Masterman et al. 2001). Der Nachweis, dass die individuelle Schwelle für Brutpheromon mit der Wahrscheinlichkeit, Pollen zu sammeln, bei individuellen Bienen korreliert ist, wäre ein bestätigender Hinweis für die Schwellenhypothese.

### 4.6 Ausblick

Die Verteilung von TA im Gehirn der Honigbiene wurde in der vorliegenden Arbeit aufgeklärt. Um TA-IR Somata den Projektionen in den Neuropilen zuordnen zu können, sollten zukünftige Experimente die Anfertigung immunhistologischer Färbung ganzer Gehirne („Wholemout“-Präparate) beinhalten. Um das Vorkommen von TA im Bienenhirn zweifelsfrei von dem von OA abzugrenzen, wäre darüber hinaus eine Doppelmarkierung mit Antikörpern gegen beide biogenen Amine außerordentlich hilfreich. Das würde allerdings die Herstellung eines neuen Antikörpers voraussetzen, da die derzeit zur Verfügung stehenden Antikörper gegen TA und OA alle aus Kaninchen stammen. Schließlich sollte auch eine immunhistologische Färbung des Enzyms Tyramin- $\beta$ -Hydroxylase wichtige Informationen über die Syntheseorte von OA aus TA geben und weiter zum Verständnis der Lokalisierung dieser beiden Amine und ihre Rolle in den Neuropilen beitragen. Ein besonders interessantes Ergebnis dieser Arbeit ist das unterschiedliche Vorkommen von TA im Vergleich zu OA in den Antennalloben des Bienenhirns. Dieser Befund könnte ein Hinweis auf eine unterschiedliche Rolle der beiden Amine bei der Verarbeitung olfaktorischer Reizinformation sein. Deshalb könnte ein verhaltenspharmakologisches Experiment, in dem die modulatorische Bedeutung von OA und TA für die Empfindlichkeit von Bienen für olfaktorische Reize getestet wird, möglicherweise Aufschluss über eine unterschiedliche

Rolle der beiden Amine auf verhaltensphysiologischer Ebene geben. Die immunhistologischen Färbungen zeigten keine Unterschiede zwischen Winterbienen, Pollen- und Nektarsammlerinnen oder frisch geschlüpften Bienen bezüglich des Vorkommens von TA im Gehirn. Um Unterschiede in den TA-Mengen zwischen Bienen mit verschiedenen Aufgaben zweifelsfrei zu untersuchen, sollte eine quantitative Methode, wie beispielsweise HPLC, zur Bestimmung der TA-Mengen im Gehirn angewandt werden. Ein weiteres Ergebnis dieser Arbeit ist, dass die Modulationsmechanismen der phototaktischen Aktivität und der gustatorischen Empfindlichkeit einer Biene vermutlich unabhängig voneinander ablaufen. Ebenso scheint kein Zusammenhang dieser Parameter mit der Rolle einer Biene als Sammlerin zu bestehen. Das wirft die Frage auf, welche weiteren regulatorischen Mechanismen neben dem oktopaminergen bzw. tyraminergen System einen Einfluss auf diese Größen nehmen. Eine Untersuchung der Rolle des *Amfor*-Gens (Ben-Shahar et al. 2002 und 2003) für die Gustatorik bei Pollen- und Nichtpollensammlerinnen, beispielsweise über einen Knock-down des Gens mit Hilfe der RNAi-Methode, könnte dabei Aufschluss geben über die Rolle der *Amfor*-codierten PKG und möglicherweise zur Bedeutung der Schwellenhypothese für die Arbeitsteilung der Honigbiene beitragen.

# Abkürzungen

Abb.	Abbildung
abs.	absolut
al	Antennallobus
$\alpha$ l	Alpha-Lobus
alc	zentraler Bereich des Antennallobus
alg	glomerulärer Bereich des Antennallobus
AmTYR1	<i>Apis mellifera</i> -Tyraminrezeptor 1
<i>Amtyr1</i>	Gen des <i>Apis mellifera</i> -Tyraminrezeptor 1
AmTYR1-IR	Tyramin-Rezeptor-ähnliche Immunreaktion
AmOCT1-IR	Oktopamin-Rezeptor-ähnliche Immunreaktion
ASOT	anteriorer superiorer optischer Trakt
AWG	American Wire Gauge
$\beta$ l	Beta-Lobus
Bp	Basenpaare
br	basaler Ring
cb	Zentralkörper
cbl	untere Einheit des Zentralkörpers
cbu	obere Einheit des Zentralkörpers
cDNA	complementary DNA
co	Kragen
dl	Dorsallobus
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dsRNA	double-stranded RNA (doppelsträngige RNA)
EDTA	Ethylendiamin-Tetraacetat
eGFP	enhanced Green Fluorescent Protein
ERG	Elektroretinogramm
GFP	Green Fluorescent Protein
GPCR	G-Protein-gekoppelter Rezeptor
G-Protein	GTP-bindendes Protein
GRS	Gustatory Response Score

## Abkürzungen

---

ich	inneres optisches Chiasma
la	Lamina
lAGT	lateral antennoglomerulärer Trakt
lc	lateral Calyx
li	Lippe
lo	Lobula
lp	laterales Protocerebrum
M	molar
mAGT	medianer antennoglomerulärer Trakt
mc	medianer Calyx
me	Medulla
mlAGT	mediolateraler antennoglomerulärer Trakt
MOPS	Morpholinopropansulfonsäure
mp	medianes Protocerebrum
mRNA	messenger-RNA
NGS	Normal Goat Serum
OA	Oktopamin
OA-IR	Oktopamin-ähnliche Immunreaktion; Oktopamin-immunreaktiv
och	äußeres optisches Chiasma
pb	Protocerebrale Brücke
PCR	Polymerase Chain Reaction (Polymerase-Kettenreaktion)
pdc	posteriore deutocerebrale Kommissur
ped	Pedunculus
PER	Proboscis Extension Response
qRT-PCR	quantitative real-time-PCR
QTL	Quantitative Trait Loci
RNA	Ribonukleinsäure
RT	Raumtemperatur
SDS	Natriumdodecylsulfat
sog	suboesophageales Ganglion
SPB	Sörensen Phosphatpuffer
sscDNA	single stranded cDNA (einzelsträngige cDNA)
TA	Tyramin

## Abkürzungen

---

Tab.	Tabelle
TA-IR	Tyramin-ähnliche Immunreaktion; Tyramin-immunreaktiv
TBE	Tris-Borat-EDTA-Puffer
tc	Tritocerebrum
TCA	Trichloressigsäure
TE	Tris-EDTA-Puffer
Tris	2-Amino-2-(hydroxymethyl)1,3-propandiol
VPM	Ventral Paired Median
VUM	Ventral Unpaired Median
w/v	weight per volume
YOH	Yohimbin



# Literaturverzeichnis

Abel R, Rybak J & Menzel R (2001). Structure and response patterns of olfactory interneurons in the honeybee, *Apis mellifera*. J. Comp. Neurol. 437:363-383.

Adamo SA, Linn CE & Hoy RR (1995). The role of neurohormonal octopamine during fight or flight behavior in the field cricket *Gryllus bimaculatus*. J. Exp. Biol. 198: 1691-1700

Amdam GV, Simões LP, Guidugli KR, Norberg K & Omholt SW (2003). Disruption of vitellogenin gene function in adult honeybees by intra-abdominal injection of double-stranded RNA. BMC Biotechnol. 3:1-8.

Amdam GV, Norberg K, Page RE, Erber J & Scheiner R (2006). Downregulation of vitellogenin gene activity increases the gustatory responsiveness of honey bee workers (*Apis mellifera*). Behav. Brain Res. 169:201-205.

Arakawa S, Gocayne JD, McCombie WR, Urquhart DA, Hall LM, Fraser CM & Venter JC (1990). Cloning, localization, and permanent expression of a *Drosophila* octopamine receptor. Neuron 2:343-354.

Baumann A, Blenau W, Erber J (2002). Biogenic amines. In: Encyclopedia of Insects (Resh VH, Cardé RT, Herausgeber). S. 91-94. Academic Press.

Beggs KT, Hamilton IS, Kurshan PT, Mustard JA & Mercer AR (2005). Characterization of a D2-like dopamine receptor (AmDOP3) in honey bee, *Apis mellifera*. Insect Biochem. Mol. Biol. 35:873-882.

Ben-Shahar Y, Robichon A, Sokolowski MB & Robinson GE (2002). Influence of gene action across different time scales on behavior. Nature 296:741-744.

Ben-Shahar Y, Leung H-T, Pak WL, Sokolowski MB & Robinson GE (2003). cGMP-dependent changes in phototaxis: a possible role for the *foraging* gene in honey bee division of labor. J. Exp. Biol. 206:2507-2515.

Beshers SN & Fewell JH (2001). Models of division of labor in social insects. Annu. Rev. Entomol. 46:413-440.

Bicker G (1999). Biogenic amines in the brain of the honeybee: cellular distribution, development, and behavioral functions. Microsc. Res. Tech. 44:166-178.

Bicker G & Menzel R (1989). Chemical codes for the control of behaviour in arthropods. Nature 337:33-39.

- Birnboim HC & Doly J (1979). Rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res* 7:1513-1523.
- Blenau W & Baumann A (2001). Molecular and pharmacological properties of insect biogenic amine receptors: lessons from *Drosophila melanogaster* and *Apis mellifera*. *Arch. Ins. Biochem. Physiol.* 48:13-38.
- Blenau W & Baumann A (2003). Aminergic signal transduction in invertebrates: focus on tyramine and octopamine receptors. *Recent Res. Devel. Neurochem.* 6:225-240.
- Blenau W, Erber J & Baumann A (1998). Characterization of a dopamine D1 receptor from *Apis mellifera*: Cloning, functional expression, pharmacology, and mRNA localization in the brain. *J. Neurochem.* 70:15-23.
- Blenau W, Balfanz S & Baumann A (2000). *Amtyr1*: Characterization of a gene from honeybee (*Apis mellifera*) brain encoding a functional tyramine receptor. *J. Neurochem.* 74:900-908.
- Blumenthal EM (2003). Regulation of chloride permeability by endogenously produced tyramine in the *Drosophila* Malpighian tubule. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 284:C718-C728.
- Braun G & Bicker G (1992). Habituation of an appetitive reflex in the honeybee. *J. Neurophysiol.* 67:588-598.
- Cazzamali G, Klaerke DA & Grimmelikhuijzen CJP (2005). A new family of insect tyramine receptors. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 338:1189-1196.
- Chomczynski P & Sacchi N (1987). Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal. Biochem.* 162:156-159.
- David JC & Coulon JF (1985). Octopamine in invertebrates and vertebrates. A review. *Prog. Neurobiol.* 24:141-185.
- Dreller C, Page RE & Fondrk MK (1999). Regulation of pollen foraging in honeybee colonies: effects of young brood, stored pollen, and empty space. *Behav. Ecol. Sociobiol.* 45:227-233.
- Ehmer B & Gronenberg W (2002). Segregation of visual input to the mushroom bodies in the honeybee (*Apis mellifera*). *J. Comp. Neurol.* 451:362-373
- Erber J & Kloppenburg P (1995). The modulatory effects of serotonin and octopamine in the visual system of the honey bee (*Apis mellifera* L.) I. Behavioral analysis of the motion-sensitive antennal reflex. *J. Comp. Physiol. A* 176:111-118

- Erber J, Masuhr T & Menzel R (1980). Localization of short-term memory in the brain of the bee, *Apis mellifera*. *Physiol. Entomol.* 5:343-358.
- Erber J, Homberg U & Gronenberg W (1987). Functional roles of the mushroom bodies in insects. In: *Arthropod brain: its evolution, development, structure, and functions* (A.P. Gupta, Herausgeber). S. 485-511. Wiley, New York, NY.
- Erber J, Kloppenburg P & Scheidler A (1993). Neuromodulation by serotonin and octopamine in the honeybee: behaviour, neuroanatomy and electrophysiology. *Experientia* 49:1073-1083.
- Erber J, Pribbenow B, Grandy K & Kierzek S (1997). Tactile motor learning in the antennal system of the honeybee (*Apis mellifera* L.). *J. Comp. Physiol. A* 181:355-365.
- Erber J, Hoormann J & Scheiner R. (2006). Phototactic behaviour correlates with gustatory responsiveness in honey bees (*Apis mellifera* L.). *Behav. Brain Res.* 174:174-180.
- Evans PD (1985). Octopamine. In: *Comprehensive insect biochemistry, physiology and pharmacology* (G.A. Kerkut & L. Gilbert, Herausgeber). S. 499-530. Pergamon Press, Oxford.
- Evans PD (1993). Molecular studies on insect octopamine receptors. In: *Comparative Molecular Neurobiology* (Y. Pichon, Herausgeber). S. 286-296. Birkhäuser Verlag, Basel.
- Farooqui T, Robinson K, Vaessin H & Smith BH (2003). Modulation of early olfactory processing by an octopaminergic reinforcement pathway in the honeybee. *J. Neurosci.* 23:5370-5380.
- Farooqui T, Vaessin H & Smith BH (2004). Octopamine receptors in the honeybee (*Apis mellifera*) brain and their disruption by RNA-mediated interference. *J. Insect Physiol.* 50:701-713.
- Fewell JH & Page RE (2000). Colony-level selection effects on individuals and colony foraging task performance in honeybees, *Apis mellifera* L.. *Behav. Evol. Sociobiol.* 48:173-181.
- Fire A, Xu SQ, Montgomery MK, Kostas SA, Driver SE & Mello CC (1998). Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* 391:806-811.
- Gatehouse HS, Gatehouse LN, Malone LA, Hodges S, Tregidga E & Todd J (2003). Amylase activity in honey bee hypopharyngeal glands reduced by RNA interference. *J. Apicult. Res.* 43:9-13.
- Gerber B & Smith BH (1998). Visual modulation of olfactory learning in honeybees. *J. Exp. Biol.* 201:2213-2217.

- Goldsmith TH (1960). The nature of the retinal action potential, and the spectral sensitivities of ultraviolet and green receptor systems of the compound eye of the worker honeybee. *J. Gen. Physiol.* 43:775-799.
- Grohmann L (2001). Klonierung und funktionelle Charakterisierung eines Octopamin-Rezeptors aus der Honigbiene (*Apis mellifera*). Dissertation. Technische Universität Berlin, Berlin.
- Grohmann L, Blenau W, Erber J, Ebert PR, Strünker T & Baumann A (2003). Molecular and functional characterization of an octopamine receptor from honeybee (*Apis mellifera*) brain. *J. Neurochem.* 86:725-735.
- Gronenberg W (1986). Physiological and anatomical properties of optical input-fibres to the mushroom body in the bee brain. *J. Ins. Physiol.* 32:695-704.
- Gronenberg W (1987). Anatomical and physiological properties of feedback neurons of the mushroom bodies in the bee brain. *Exp. Biol.* 46:115-125.
- Gronenberg W (2001). Subdivisions of hymenopteran mushroom body calyces by their afferent supply. *J. Comp. Neurol.* 435: 474-489.
- Grünewald B (1999). Morphology of feedback neurons in the mushroom body of the honey bee, *Apis mellifera*. *J. Comp. Neurol.* 404:114-126.
- Hähnlein I & Bicker G (1996). Morphology of neuroglia in the antennal lobes and mushroom bodies of the brain of the honeybee. *J. Comp. Neurol.* 367:235-245.
- Hammer M (1993). An identified neuron mediates the unconditioned stimulus in associative olfactory learning in honeybees. *Nature* 366:59-63.
- Hammer M & Menzel R (1995). Learning and memory in the honeybee. *J. Neurosci.* 15:1617-1630.
- Hammer M & Menzel R (1998). Multiple sites of associative odor learning as revealed by local brain microinjections of octopamine in honeybees. *Learn. Mem.* 5:146-156.
- Han KA, Millar NS & Davis RL (1998). A novel octopamine receptor with preferential expression in *Drosophila* mushroom bodies. *J. Neurosci.* 18:3650-3658.
- Hanesch U, Fischbach KF & Heisenberg M (1989). Neuronal architecture of the central complex in *Drosophila melanogaster*. *Cell Tissue Res.* 257:343-366.

Harris JW & Woodring J (1992). 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.* 38:29-35.

Haupt SS (2005). Das gustatorische System und antennales Lernen in der Honigbiene (*Apis mellifera* L.). Dissertation. Technische Universität Berlin, Berlin.

Heisenberg M (1971). Separation of receptor and lamina potentials in the electroretinogram of normal and mutant *Drosophila*. *J. Exp. Biol.* 55:85-100.

Hertel H (1980). Chromatic properties of identified interneurons in the optic lobes of the bee. *J. Comp. Physiol.* 137:215-232.

Hiripi L, Juhos S & Downer RGH (1994). Characterization of tyramine and octopamine receptors in the insect (*Locusta migratoria migratorioides*) brain. *Brain Research* 633:119-126.

Homberg U (1984). Processing of antennal information in extrinsic mushroom body neurons of the bee brain. *J. Comp. Physiol. A* 154:825-836

Homberg U (1985). Interneurones of the central complex in the bee brain (*Apis mellifera* L.). *J. Insect Physiol.* 31: 251-264.

Homberg U (1994). Flight-correlated activity changes in neurons of the lateral accessory lobes in the brain of the locust *Schistocerca gregaria*. *J. Comp. Physiol. A* 175:597-610.

Homberg U (2004). In search of the sky compass in the insect brain. *Naturwissenschaften* 91:199-208

Homberg U (2005). Multisensory processing in the insect brain. In: *Advances in insect sensory neuroscience* (T. A. Christensen, Herausgeber). S. 3-25. CRC Press, Boca Raton.

Homberg U & Müller M (1995). Neurons of the central complex in the locust brain are sensitive to polarized light. In: *Nervous systems and behaviour* (M. Burrows, T. Metheson, P. L. Newland & H. Schuppe, Herausgeber). S. 279. Thieme, Stuttgart New York.

Homberg U, Hofer S, Pfeiffer K & Gebhardt S (2003). Organization and neural connections of the anterior optic tubercle in the brain of the locust, *Schistocerca gregaria*. *J. Comp. Neurol.* 462:415-430.

Huber F (1967). Central control of movements and behavior in invertebrates. In: *Invertebrate nervous system* (C. A. G. Wiersma, Herausgeber). S. 333-351. University of Chicago Press, Chicago.

- Humphries MA, Mustard JA, Hunter SJ, Mercer A, Ward V & Ebert PR (2003). Invertebrate D2 type dopamine receptor exhibits age-based plasticity of expression in the mushroom bodies of the honeybee brain. *J. Neurobiol.* 55:315-330.
- Humphries MA, Fondrk K & Packer RE (2005). Locomotion and the pollen hoarding behavioral syndrome of the honeybee (*Apis mellifera* L.). *J. Comp. Physiol. A* 191:669-674.
- Hunt GJ, Packer RE, Fondrk MK & Dullum CJ (1995). Major quantitative trait loci affecting honey bee foraging behavior. *Genetics* 141:1537-1545.
- Ilius M, Wolf R & Heisenberg M (1994). The central complex of *Drosophila melanogaster* is involved in flight control: studies on mutants and mosaics of the gene *ellipsoid body open*. *J. Neurogenet.* 9:189-206.
- Ito K, Suzuki K, Estes P, Ramaswami M, Yamamoto D & Strausfeld NJ (1998). The organization and significance of mushroom body extrinsic neurons and their projections in the brain of *Drosophila melanogaster* Meigen. *Learn. Mem.* 5:1-16.
- Ji TH, Grossmann M & Ji I (1998). G protein-coupled receptors. I. Diversity of receptor-ligand interactions. *J. Biol. Chem.* 273:17299-17302.
- Kanzaki R, Arbas EA & Hildebrand JG (1991). Physiology and morphology of descending neurons in pheromone-processing olfactory pathways in the male moth *Manduca sexta*. *J. Comp. Physiol. A* 169:1-14.
- Kloppenburg P (1990). Neuroanatomische Charakterisierung der antennalen Motoneuronen und elektrophysiologische Untersuchungen zur aminergen Modulation des visuellen Antennenreflexes der Honigbiene. Dissertation. Technische Universität Berlin, Berlin.
- Kloppenburg P (1995). Anatomy of the antennal motoneurons in the brain of the honeybee (*Apis mellifera*). *J. Comp. Neurol.* 363:333-343.
- Kloppenburg P & Erber J (1995). The modulatory effects of serotonin and octopamine in the visual system of the honey bee (*Apis mellifera* L.) II. Electrophysiological analysis of motion-sensitive neurons in the lobula. *J. Comp. Physiol. A* 176:119-129
- Kloppenburg P, Grandy K & Erber J (1987). Antennal motoneurons: projections in the bee brain (*Apis mellifera*). In: *New frontiers in brain research* (N. Elsner & O. Creutzfeld, Herausgeber). S. 248. Thieme, Stuttgart.
- Kreissl S, Eichmüller S, Bicker G, Rapus J & Eckert M (1994). Octopamine-like immunoreactivity in the brain and subesophageal ganglion of the honeybee. *J. Comp. Neurol.* 348: 583-595.

- Kutsukake M, Komatsu A, Yamamoto D & Ishiwa-Chigusa S (2000). A *tyramine receptor* gene mutation causes a defective olfactory behavior in *Drosophila melanogaster*. *Gene* 245:31-42.
- Livingstone MS & Tempel BL (1983). Genetic dissection of monoamine neurotransmitter synthesis in *Drosophila*. *Nature* 303:67-70.
- Maronde U (1991). Common projection areas of antennal and visual pathways in the honeybee brain, *Apis mellifera*. *J. Comp. Neurol.* 309:328-340.
- Masterman R, Ross R, Mesce K & Spivak (2001). Olfactory and behavioral response thresholds to odors of diseased brood differ between hygienic and non-hygienic honey bees (*Apis mellifera* L.). *J. Comp. Physiol. A* 187:441-452.
- Menzel R (1971). Über den Farbensinn von *Paravespula germanica* F. (Hymenoptera): ERG und selektive Adaptation. *Z. vergl. Physiologie* 75:86-104.
- Menzel R, Durst C, Erber J, Eichmüller S, Hammer M, Hildebrandt H, Maelshagen J, Müller U, Rosenboom H, Rybak J, Schäfer S & Scheidler A (1994). The mushroom bodies in the honeybee: From molecules to behaviour. *Fortschr. Zool.* 39:81-103.
- Mercer AR & Erber J (1983). The effects of amines on evoked potentials recorded in the mushroom bodies of the bee brain. *J. Comp. Physiol.* 151:469-476.
- Mercer AR & Menzel R (1982). The effects of biogenic amines on conditioned and unconditioned responses to olfactory stimuli in the honeybee *Apis mellifera*. *J. Comp. Physiol.* 145:363-368.
- Milde JJ (1988). Visual responses of interneurons in the posterior median protocerebrum and the central complex of the honeybee *Apis mellifera*. *J. Insect Physiol.* 34:427-436.
- Mobbs PG (1982). The brain of the honeybee *Apis mellifera*. 1. The connections and spatial organizations of the mushroom bodies. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B* 298:309-345.
- Mobbs PG (1985). Brain structure. In: *Comprehensive insect physiology, biochemistry, and pharmacology*. Vol. 5: Nervous system: structure and motor function. (G.A. Kerkut & L. Gilbert, Herausgeber). S. 299-370. Pergamon Press, Oxford
- Monastiriotti M, Linn CE & White K (1996). Characterization of *Drosophila tyramine  $\beta$ -hydroxylase* gene and isolation of mutant flies lacking octopamine. *J. Neurosci.* 16:3900-3911
- Mustard JA, Kurshan PT, Hamilton IS, Blenau W & Mercer AR (2005). Developmental expression of a tyramine receptor gene in the brain of the honey bee, *Apis mellifera*. *J. Comp. Neurol.* 483:66-75.

Müller M & Homberg U (1994). Influence of visual stimuli on the activity of neurons in the central complex of the locust *Schistocerca gregaria*. In: Göttingen Neurobiology Report 1994 (N. Elsner & H. Breer, Herausgeber). S. 462. Thieme, Stuttgart New York.

Müller M, Homberg U & Kühn A (1997). Neuroarchitecture of the lower division of the central body in the brain of the locust (*Schistocerca gregaria*). Cell Tissue Res. 288:159-176.

Müller D, Abel R, Brandt R, Zöckler M, Menzel R (2002). Differential parallel processing of olfactory information in the honeybee, *Apis mellifera* L.. J. Comp. Physiol. A 188:359-370.

Nagaya Y, Kutsukake M, Chigusa SI & Komatsu A (2002). A trace amine, tyramine, functions as a neuromodulator in *Drosophila melanogaster*. Neurosci. Lett. 329:324-328.

Ohta H, Utsumi T & Ozoe Y (2003). B96Bom encodes a *Bombyx mori* tyramine receptor negatively coupled to adenylate cyclase. Insect Mol. Biol. 12:217-223.

Osborne RH (1996). Insect neurotransmission: neurotransmitters and their receptors. Pharmacol. Ther. 69:117-142

Otto D (1971). Untersuchungen zur zentralnervösen Kontrolle der Lauterzeugung von Grillen. Z. Vergl. Physiol. 74:227-271.

Page RE & Erber J (2002). Levels of behavioral organization and the evolution of division of labor. Naturwissenschaften 89: 91-106.

Page RE, Erber J & Fondrk MK (1998). The effect of genotype on response thresholds to sucrose and foraging behavior of honey bees (*Apis mellifera* L.). J. Comp. Physiol. A 182:489-500

Page RE, Fondrk MK, Hunt GJ, Guzmán-Novoa E, Humphries MA, Nguyen K & Green AS (2000). Genetic dissection of honeybee (*Apis mellifera* L.) foraging behavior. J. Hered. 91:474-479.

Pankiw T & Page RE (2000). Response thresholds to sucrose predict foraging division of labor in honeybees. Behav. Ecol. Sociobiol. 47:265-267.

Pankiw T & Page RE (2001). Brood pheromone modulates honeybee (*Apis mellifera* L.) sucrose response thresholds. Behav. Ecol. Sociobiol. 49:206-213.

Pankiw T & Page RE (2003). Effect of pheromones, hormones and handling on sucrose response thresholds of honey bees (*Apis mellifera* L.). J. Comp. Physiol. A 189:675-684.

Pankiw T, Page RE & Fondrk MK (1998). Brood pheromone stimulates pollen foraging in honey bees (*Apis mellifera*). Behav. Ecol. Sociobiol. 44:193-198.

- Pascual A & Pr at T (2001). Localization of long-term memory withn the *Drosophila* mushroom body. *Science* 294:1115-1117.
- Pribbenow B & Erber J (1996). Modulation of antennal scanning in the honeybee by sucrose stimuli, serotonin, and octopamine:behavior and electrophysiology. *Neurobiol. Learn. Mem.* 66:109-120.
- Probst WC, Snyder LA, Schuster DI, Brosius J & Sealfon SC (1992). Sequence alignment of the G-protein coupled receptor superfamiliy. *DNA Cell Biol.* 11:1-20.
- Rehder V (1988). A neuroanatomical map of the suboesophageal and prothoracic ganglia of the honey bee (*Apis mellifera*). *Proc. R. Soc. Lond. B* 235:179-202.
- Ribi WA & Scheel M (1981). The second and third optic ganglia of the worker bee. Golgi studies of the neuronal elements in the medulla and lobula. *Cell Tissue Res.* 221:17-43.
- Roeder T (1994). Biogenic amines and their receptors in insects. *Comp. Biochem. Physiol. C* 107:1-12.
- Roeder T (2005). Tyramine and octopamine: ruling behaviour and metabolism. *Annu. Rev. Entomol.* 50:447-477.
- Roeder T, Seifert M, K hler C & Gewecke M (2003). Tyramine and octopamine: antagonistic modulators of behavior and metabolism. *Arch. Insect Biochem. Physiol.* 54:1-13.
- Robinson GE (2002). Regulation of division of labor in insect societies. *Annu. Rev. Entomol.* 37:647-665.
- Rossel S (1993). Navigation by bees using polarized skylight. *Comp. Biochem. Physiol. A* 104:695-708.
- Rybak J & Menzel R (1993). Anatomy of the mushroom bodies in the honey bee brain: the neuronal connections of the alpha-lobe. *J. Comp. Neurol.* 334:444-465.
- Saraswati S, Fox LE, Soll DR & Wu C-F (2004). Tyramine and octopamine have opposite effects on the locomotion of *Drosophila* larvae. *J. Neurobiol.* 58:425-441.
- Saudou F, Amlaiky N, Plassat J-L, Borrelli E & Hen R (1990). Cloning and characterization of a *Drosophila* tyramine receptor. *EMBO J.* 9:3611-3617.
- Scheiner R, Erber J & Page RE (1999). Tactile learning and the individual evaluation of the reward in honey bees (*Apis mellifera* L.). *J. Comp. Physiol. A* 185:1-10.
- Scheiner R, Pl ckhahn S,  ney B, Blenau W & Erber J (2002). Behavioural pharmacology of octopamine, tyramine and dopamine in honey bees. *Behav. Brain Res.* 136:545-553.

Scheiner R, Barnert M & Erber J (2003). Variation in water and sucrose responsiveness during the foraging season affects proboscis extension learning in honey bees. *Apidologie* 34:67-72.

Scheiner R, Page RE & Erber J (2004). Sucrose responsiveness and behavioral plasticity in honey bees (*Apis mellifera*). *Apidologie* 35:133-142.

Scheiner R, Kuritz-Kaiser A, Menzel R & Erber J (2005). Sensory responsiveness and the effects of equal subjective rewards on tactile learning and memory of honeybees. *Learn. Mem.* 12:626-635.

Scheiner R, Baumann A & Blenau W (2006). Aminergic control and modulation of honeybee behaviour. *Curr. Neuropharmacol.* (im Druck)

Scherer LJ & Rossi JJ (2003). Approaches for the sequence-specific knockdown of mRNA. *Nat. Biotechnol.* 21:1257-1465.

Schlenstedt J (2005). Molekulare und pharmakologische Charakterisierung von Serotonin-Rezeptoren der Honigbiene *Apis mellifera* L.. Dissertation. Universität Potsdam, Potsdam.

Schröter U & Menzel R (2003). A new ascending sensory tract to the calyces of the honeybee mushroom body, the subesophageal-calycal tract. *J. Comp. Neurol.* 465:168-178.

Schulz DJ & Robinson GE (1999). Biogenic amines and division of labor in honey bee colonies: behaviorally related changes in the antennal lobes and age-related changes in the mushroom bodies. *J. Comp. Physiol. A* 184:481-488.

Schulz DJ & Robinson GE (2001). Octopamine influences division of labor in honey bee colonies. *J. Comp. Physiol. A* 187:53-61.

Schürmann FW (1987). The architecture of the mushroom bodies and related neuropils in the insect brain. In: *Arthropod brain: its evolution, development, structure, and functions* (A.P. Gupta, Herausgeber). S. 231-264. Wiley, New York, NY.

Schürmann FW & Erber J (1990). FMRFamide-like immunoreactivity in the brain of the honeybee (*Apis mellifera*). A light- and electron microscopical study. *Neuroscience* 3:797-807.

Seeley TD (1995). *The wisdom of the hive: the social physiology of honey bee colonies*. Harvard University Press, Cambridge, Mass..

Sinakevitch I, Niwa M & Strausfeld NJ (2005). Octopamine-like immunoreactivity in the honey bee and cockroach: comparable organization on the brain and subesophageal ganglion. *J. Comp. Neurol.* 488:233-254.

Snodgrass RE (1984). Anatomy of the honey bee. Cornell University Press, London.

Spivak M, Mastermann R, Ross R & Mesce KA (2002). Hygienic behavior in the honey bee (*Apis mellifera* L.) and the modulatory role of octopamine. *J. Neurobiol.* 55:341-354.

Stevenson PA, Hofmann HA, Schoch K & Schildberger K (2000). The fight and flight responses of crickets depleted of biogenic amines. *J. Neurobiol.* 43:107-120.

Strausfeld NJ (1976). Atlas of an insect brain. Springer, Berlin.

Strausfeld NJ (2002). Organization of the honey bee mushroom body: representation of the calyx within the vertical and gamma lobes. *J. Comp. Neurol.* 450:4-33.

Strausfeld NJ, Hansen L, Li Y, Gomez RS & Ito K (1998). Evolution, discovery, and interpretations of arthropod mushroom bodies. *Learn. Mem.* 5:11-37.

Strausfeld NJ, Homberg U & Kloppenburg P (2000). Parallel organization in honey bee mushroom bodies by peptidergic Kenyon cells. *J. Comp. Neurol.* 424:179-195.

Strauss R & Heisenberg M (1993). A higher control center of locomotor behavior in the *Drosophila* brain. *J. Neurosci* 13:1852-1861.

Uzzan A & Dudai Y (1982). Aminergic receptors in *Drosophila melanogaster*: responsiveness of adenylate cyclase to putative neurotransmitters. *J. Neurochem.* 38:1542-1550.

Vanden Broeck J, Vulsteke V, Huybrechts R & De Loof A (1995). Characterization of a cloned locust tyramine receptor cDNA by functional expression in permanently transformed *Drosophila* S2 cells. *J. Neurochem.* 64:2387-2395.

Vitzthum H, Homberg U & Agricola H (1996). Distribution of Dip-allatostatin I-like immunoreactivity in the brain of the locust *Schistocerca gregaria* with detailed analysis of immunostaining in the central complex. *J. Comp. Neurol.* 369:419-437.

Vitzthum H, Müller M & Homberg U (2002). Neurons of the central complex of the locust *Schistocerca gregaria* are sensitive to polarized light. *J. Neurosci.* 22:1114-1125.

Wagener-Hulme C, Kuehn JC, Schulz DJ & Robinson GE (1999). Biogenic amines and division of labor in honey bee colonies. *J. Comp. Physiol. A* 184:471-479.

Waterhouse PM, Wang MB & Lough T (2001). Gene silencing as an adaptive defence against viruses. *Nature* 411:834-842.

Zars T, Fischer M, Schulz R & Heisenberg M (2000). Localization of a short-term memory in *Drosophila*. *Science* 288:672-675.

Zhou X, Oi FM & Scharf ME (2005). Social exploitation of hexamerin: RNAi reveals a major caste-regulatory factor in termites. PNAS 103:4499-4504.

# Anhang

## Herstellung der dsRNA: Amplifizierte DNA-Fragmente von *Amtyr1*

Nucleinsäuresequenz in 5' → 3'-Richtung. Zahlen geben die Position der Nucleotide an.

### Primer #1 und #2:

```
          ggcaacgc ttgtttattg catctatcgc gaaattgtgg gaaacaagat ttgccgccga
1381 aatcgtcatc gggacactac tcggccccgc ttgggattgg tcggcgagga aggaaagagg
1441 attggagttc ggctgagttt ttcgaggaag cggcaccgag cttggcacga ttcaaattct
1501 ttcgaaggag gaaacgagag ggaaaaaata tgaagagttt attttcgcgg aacgaagaag
1561 aagcgtctaa aatatggcgg tggattattc gtagaaacaa agagagagtt cgatggaaga
1621 ttaagcgatc aaaggctcga tacacgatag tctaatttag cgacgacgat gttcactccc
1681 ggaagagtcg ttccattaaa cttgttccat taatcctgct agggaaagcga gggagcgcgg
1741 ataaggaatt ttaaggaaat gaagtcgccg cccctgctcg attgtcctat acctcatttc
1801 atccgctcgtt acgcgcttgag ttcagctgaa cgataaattc accgctatct tcgatcggtc
1861 atgaataatg gaaatcgggtg gattcgatcg tcgctactcg gtcgtctcga ctcgaacaag
1921 accgtaaacc gaagaccatc gaatgaattg agcggagggg aggggagggg tgtagtgga
1981 gaggcgtcgt gtaaaaattc gatttcgacg ccgagtcgat ccgaagtcgt tccatt
```

### Primer #3 und #4:

```
          gtatacaag cacgtgtgta cgttgtatat ttcacctaaa tgcggtggc gcacaagggg
2581 tgattacaac ccgttcgaca tcacgtgacg gtcttttaat agagaaaaaa tcgagcgggt
2641 gttttattcg ctgaacaatg gggacagtta ccctcctctt ggatggccga tgatcattct
2701 gttaagtagt cctcgtgaaa aagaacgttt ttgtttgatg tcggctgctt gcttcctcga
2761 ttgcaatatt tccattcttc aaagaatcct tccgggcaga gtgtccgtca gatttacgaa
2821 ttcattggcca tagagaattg gaaatctcga cagattcgat cgatcgtaac cgagtcgaga
2881 ttgttttttt tctcttttgt tattttcgaa atttatggaa tcctatgaaa atatgacacg
2941 atgtttttca attattaatt acggtttttg catagtaatt cgcacagttt tctattttatc
3001 atgttttttt tcgtatcatt aatgatatac ataattttat ttataattaa gtattttcca
3061 aaatttttatt tatttaaaat taattagaat atatatatta tgatttataa ggcgatcaaa
3121 aataaaaaat atgataaaga acatccgtgc acacagagca tataatgaaa gcaaaagaaa
3181 gaagctc
```

### Primer #5 und #6:

```
          agg actacgacat gacaggctgc ggcccgccgg
181 aagaggaaac gggctcgaac ttgccggttt gggaaagccgc ggccgcctca ttgacgcttg
241 gcttcctggg tctcgcgacg gtgttggggg acgcgctcgt gatcctgagc gtgttcacgt
301 acaggcccct tcgtatcgtt cagaacttct ttatcgtgtc gctagctgtc gccgatctcg
361 cggctcgcgat cctcgtgatg ccgttcaacg tcgcctacct cctcctcggc aagtggatct
421 tcggcataca cctgtgcaaa ttgtggctaa cctgcgacgt gctctgctgc acggccagca
481 tactgaatct gtgcgccatc gccctcgacc gttactgggc gatcaccgat cccatcaatt
541 acgcccagaa acgtaccctg aagagagtac tggccacgat agccgggggtg tggatcctgt
601 cgggggcgat cagctcgcgc ccctggccg gttggaacga ctggcccagag gagttggaac
661 cgggcacacc ctgccaattg accaggagc agggatacgt catctactcg tcgctcggct
721 ccttcttcat cccgttgctg ttgatgagcc tcgctacct cgagatata ctgcccacga
781 ggagacgggt gagggagcgg gccaggcaga gcaggataaa cgctgtccag tcgacgagggc
841 atcgcgaggg ggacgacgcc gaggagtcgg tcagctcggg gacgaaatcat aacgagaggt
901 cgaccctcgt gtcgcacgcc aagccgtcgt tgatcgacga cgagcccacc gaggtcacga
```

```

961 tagggggtgg cgggtaccacg tcctcgaggc ggacgacggg gagcagggca gccgcgacca
1021 cgacaacggt ttaccaattc atcgaggaga ggcagaggat ctcgttgtcg aaggagagac
1081 gggccgcgag gacattgggc gtgataatgg gcgtgttcgt cgtatgctgg ttgccattct
1141 ttctgatgta cgtgatcgtc ccgttctgcc ccgattggtg cccctccgat cgtatggtct
1201 acttcatcac gtggctcggg tacgtgaaca gcgccctcaa cccgctcatc tacaccatct
1261 tcaacctcga ctacaggagg gcattcagac ggttggtgcg cattcggtg

```

## Hergestellte DNA-Fragmente zur Verwendung als Standards in der real-time-PCR

Nucleinsäuresequenz in 5' → 3'-Richtung. Zahlen geben die Position der Nucleotide an.

### *Amyr1*-Fragment

```

2401-2460 aactcttctc gtcgccaatc tcaaaaaagc cgagcagaga aattcacggt tacgaatagg      gaag
2461-2520 aattttctac gaaaccgacc aagactccag ttaagatggt ttagaatata gaatttgcgt
2521-2581 attctaggtg gtatacaagc acgtgtgt

```

### β-Aktin-Fragment

```

181-240 tcaaagagag gtattcttac cttgaaatac ccaattgagc atggttgggtga cgaagcccaa      cct
241-300 gatgatatgg agaaaatttg gcatcacact ttctacaatg aacttcgagt ggctcccgag
301-360 gaacatcc

```