

Einfluss epigenetischer Mechanismen auf das Verhalten der Honigbiene

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

von

Jakob Hättig

Saarbrücken

2009

Tag des Kolloquiums: 12.05.2009

Dekan: Prof. Dr. S. Diebels

Prüfungsvorsitzender: Prof. Dr. M. Schmitt

1. Gutachter: Prof. Dr. U. Müller

2. Gutachter: Prof. Dr. J. Walter

Akademischer Mitarbeiter: Dr. H. Kallenborn

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis.....	i
1 Einleitung	4
1.1 Lernen und Gedächtnisbildung	4
1.1.1 Einfache Lernparadigmen	5
a) Assoziative Lernform	5
b) Nicht-Assoziative Lernformen	6
1.1.2 Zelluläre und molekulare Grundlagen von Lernen und Gedächtnisbildung	6
1.2 Epigenetische Mechanismen als Regulatoren der Transkription	9
1.2.1 Chromatinstruktur verändernde Modifikationen	9
1.2.1.1 DNA-Methylierung	9
1.2.1.2 Histonmodifikationen	10
1.2.2 Wechselspiel von DNA-Methylierung und Histonacetylierung	13
1.3 Epigenetische Mechanismen in Lernen und Gedächtnisbildung	13
1.4 Die Honigbiene als Modellorganismus	15
2 Zielsetzung	17
3 Material und Methoden	18
3.1 Material	18
3.1.1 Chemikalien & Antikörper	18
3.1.2 Verbrauchsmaterial	20
3.1.3 Geräte	20
3.1.4 Puffer und Lösungen	21
3.2 Methoden	22
3.2.1 Haltung der Honigbienen	22
3.2.2 Injektion der Inhibitoren	22
3.2.3 Präparation des Bienenhirns	23
3.2.4 SDS-PAGE (Polyacrylamid Gelelektrophorese) und Westernblot	24
3.2.5 ELISA (Enzyme-linked Immunosorbent Assay)	25
3.2.6 Test des Einflusses des Ernährungszustands auf Histonmodifikationen	26
3.2.7 Test der Empfindlichkeit auf Zuckerwasser (Responsiveness)	26
3.2.8 Nicht-Assoziative Lernparadigmen (Sensibilisierung und Habituation)	26
3.2.9 Assoziative olfaktorische Konditionierung	27
3.2.10 Orale Applikation der Inhibitoren (TSA und 5-Azacytidin)	28
3.2.11 Kohortenbildung und Revertierung	29
3.2.12 Ausflugexperiment	30

3.2.13	Statistik.....	31
4	Ergebnisse	32
4.1	Etablierung einer Methode zur Quantifizierung der Histonmodifikationen	32
4.1.1	Test der Antikörper	32
4.1.2	Etablierung der ELISA.....	34
4.1.3	Wirkungsdauer des Inhibitormix (Trichostatin A und Valproat).....	37
4.1.4	Auftrennung des Inhibitormixes.....	38
4.2	Modifikation der Chromatinstruktur und Verhalten der Honigbiene.....	39
4.2.1	Einfluss der Histonacetylierung beim appetitiven Lernen	39
4.2.1.1	Wechselwirkung von Histonmodifikation und US	40
4.2.1.2	Einfluss von TSA auf nicht-assoziatives Lernen	41
4.2.1.3	Einfluss von TSA auf assoziatives Lernen und Gedächtnisbildung	44
4.2.1.4	Eingrenzung des Wirkmechanismus von TSA: transkriptionsabhängig, ja oder nein?	49
4.2.2	DNA-Methylierung in der Honigbiene	52
4.2.2.1	Einfluss von 5-Azacytidin auf die Histonmodifikationen in der Honigbiene	53
4.2.2.2	Einfluss von 5-Azacytidin auf die appetitive Konditionierung.....	53
4.3	Aufgabenverteilung in der Honigbiene	54
4.3.1	Einfluss der Aufgabenbereiche auf die Histonmodifikationen	56
4.3.2	Einfluss der Aufgabengebiete auf die Expression ausgewählter Kinasen ..	57
4.3.3	Einfluss von TSA auf die Aufspaltung der Arbeitsgebiete	60
4.3.3.1	Orale Applikation von TSA	60
5	Diskussion	65
5.1	Rolle der Histonacetylierung bei der Aufspaltung in die Aufgabengebiete der Arbeiterin	65
5.2	Histonacetylierung in Sättigung, Wahrnehmung und nicht-assoziativem Lernen ...	72
5.3	Der TSA-Effekt im assoziativen Gedächtnis	74
5.4	Eingrenzung des Wirkzeitpunkts von TSA auf die Konsolidierungsphase	75
5.5	Induktion eines transienten transkriptionsabhängigen Gedächtnisses	76
5.6	Einfluss von 5-Azacytidin auf Histonmodifikationen und Gedächtnisbildung	80
5.7	DNA-Methylierung: Säugetiere und Insekten unterschiedlich bei der Gedächtnisbildung.....	81
5.8	Allgemeine Proteinacetylierung und ihr Einfluss aufs Gedächtnis.....	83
5.8.1	CBP: Zielprotein der HDACs?.....	84
5.8.2	BDNF: Ziel aller epigenetischen Modulation bei der Gedächtnisbildung?.....	85
5.9	Fazit	86

6	Zusammenfassung.....	87
7	Summary	88
8	Danksagung.....	89
9	Verzeichnisse.....	91
9.1	Abkürzungsverzeichnis	91
9.2	Abbildungsverzeichnis	93
9.3	Tabellenverzeichnis.....	94
9.4	Literaturverzeichnis.....	95

1 Einleitung

Betrachte den Fühler dieses feingliedrigen Käfers!

Was ist der Mensch anderes als solch ein Fühler,
von unbekannter Urkraft ausgestreckt,
tastend sich über die Dinge zu unterrichten suchend,
zuletzt forschend zurückgekrümmt auf sich selbst?

Christian Morgenstern

Wie es in diesem Zitat von Christian Morgenstern zum Ausdruck kommt, ist alles Streben nach Erkenntnis des Menschen, sein Streben nach Wissen, eine Suche nach sich selbst.

Doch was macht den Menschen zu dem, wer er ist?

Eine Möglichkeit ist zu sagen, dass der Mensch die Summe seiner Erlebnisse, Gedanken und Erinnerungen ist, aus denen die Taten und Handlungen entspringen. Damit ist der wichtigste Schritt zur Selbsterkenntnis des Menschen der, die Funktion des Gehirns zu entschlüsseln, welches all dies integriert, verarbeitet und steuert.

Die Essenz all dessen, die Frage wie Erfahrung eine Verhaltensänderung nach sich zieht, ist die Erforschung von Lernen und Gedächtnisbildung.

1.1 Lernen und Gedächtnisbildung

Unter Lernen und Gedächtnisbildung wird die Fähigkeit verstanden, Information aus der Umwelt aufzunehmen, sie zu bewerten, zu speichern und sie bei gegebener Situation als Grundlage des Handelns zu verwenden. Dabei kann zwischen bewusstem (deklarativ) und unbewusstem (nicht-deklarativ) Gedächtnis unterschieden werden. Das Lernen, das zu deklarativem Gedächtnis führt, wird, da es das Bewusstsein erfordert, auch als Lernen höherer Ordnung bezeichnet (z.B. Spracherwerb), wohingegen die Lernformen, die zu nicht-deklarativem Gedächtnis führen, zu Lernformen niedriger Ordnung zählen (z.B. motorisches Lernen).

In Tiermodellen werden meistens Lernformen niedriger Ordnung untersucht, weil Tiere in der Regel kein Bewusstsein und daher auch keine Lernformen höherer Ordnung haben. Um eine Überinterpretation durch bewusstseinsgeprägte Vorstellung zu vermeiden, wird Lernen im Tiermodell funktionell definiert. Dabei wird Lernen als erfahrungsbedingte Verhaltensänderung und Gedächtnis als zeitliches Andauern dieser Verhaltensänderung festgelegt. Die zellulären und molekularen Grundlagen von Lernprozessen (s. Paragraph 1.1.2) sind unabhängig von der Lernform sehr ähnlich und über das Tierreich konserviert. Daher ist es von Vorteil, molekulare Prozesse an Lernformen niedriger Ordnung (nicht-deklaratives Gedächtnis) in „einfachen“ Tiermodellen zu studieren, da einfache Systeme deutlich besser kontrollierbare Experimente erlauben.

1.1.1 Einfache Lernparadigmen

Bei den nicht-deklarativen Lernformen wird zwischen assoziativem und nicht-assoziativem Lernen unterschieden.

Zur Erläuterung: Im folgenden werden die Begriffe „bedeutungsvoller Stimulus“ und „bedeutungsloser Stimulus“ verwendet. Diese Begriffe werden funktionell definiert und zwar so, dass der bedeutungsvolle Stimulus ein Stimulus ist, der eine spezifische Reaktion hervorruft, wohingegen ein bedeutungsloser Stimulus diese spezifische Reaktion nicht hervorruft.

a) Assoziative Lernform

Bei der assoziativen Lernform handelt es sich um eine Lernform, bei der die Eigenschaften eines Stimulus auf einen anderen übertragen werden, so dass die beiden Stimuli am Ende denselben Reflex auslösen.

Vor dem Lernprozess unterscheiden sich der konditionierte Stimulus (CS) und der unkonditionierte Stimulus (US) in der Art voneinander, dass der US eine bestimmte Reaktion hervorruft, also ein bedeutungsvoller Stimulus ist und der CS dagegen zwar wahrgenommen wird, aber die Reaktion des US nicht auslöst. Werden die beiden Stimuli nun so miteinander gepaart, dass der CS, also der bedeutungslose Stimulus, dem US kurz vorausgeht, so löst der CS nach einigen Trainingseinheiten dieselbe Reaktion wie der US aus. Es ist also zu einer Übertragung der Bedeutung von dem US auf den CS gekommen. Diese Lernform wird auch als klassische Konditionierung bezeichnet und wurde als erstes von Pavlow beschrieben [143].

b) Nicht-Assoziative Lernformen

Nicht-assoziative Lernformen hingegen verändern die Bewertung ein und desselben Stimulus, d.h. ein vorher bedeutungsloser Stimulus gewinnt an Bedeutung, wird also zu einem Reaktion auslösenden Stimulus (Sensitisierung), oder ein bedeutungsvoller Stimulus verliert an Bedeutung, büsst die Fähigkeit die Reaktion auszulösen ein (Habituation).

1.1.2 Zelluläre und molekulare Grundlagen von Lernen und Gedächtnisbildung

Das Gehirn stellt das Organ dar, in dem Lernen und Gedächtnisbildung stattfindet. Es ist ein komplexes Netzwerk aus Neuronen, das ständiger Veränderung unterliegt. Dabei hängt die Veränderungen im Netzwerk von der Veränderung der Signalübertragungsstärke zwischen zwei Neuronen ab [8, 95]. Dies wird auch als neuronale Plastizität bezeichnet, was als die zelluläre Basis von Lernen und Gedächtnisbildung angesehen wird. In der Hebb'schen Regel [79]: „Neurons that fire together wire together.“ kommt zum Ausdruck, dass wenn zwei miteinander verknüpfte Neurone gleichzeitig aktiv sind (Koinzidenz), sich die Verknüpfung zwischen ihnen und damit auch die Signalweiterleitung verstärkt. Da die Veränderung ausschließlich an der Synapse erfolgt, wird neuronale Plastizität auch mit synaptischer Plastizität gleichgesetzt.

Die molekularen Mechanismen, die dieser Veränderung der Signalweiterleitung zu Grunde liegen, sind stark konserviert, weswegen sie in verschiedenen Organismen untersucht wurden (z.B. Meeresschnecke *Aplysia californica* [7, 19, 36, 49, 94], Fruchtfliege *Drosophila melanogaster* [56, 119, 122, 193], Maus *Mus musculus* [26, 145], Honigbiene *Apis mellifera* [64, 135]).

Mit einer der ersten entdeckten Lernmutanten in *Drosophila* waren *Dunce* und *Rutabaga* [174], bei denen sich später gezeigt hat, dass es sich um Mutationen der Adenylcyclase (Ac) (*Rutabaga*), ein cAMP (cyclisches Adenosinmonophosphat) produzierendes [118], und der Phosphodiesterase (PDE) (*Dunce*), ein cAMP abbauendes Enzym, handelt [34]. Dies spiegelt die zentrale Rolle von cAMP als second messenger bei Lernprozessen wieder. In Abb. 1-1 auf Seite 8 ist ein reduziertes Schema des cAMP-Signalwegs dargestellt.

Wie es bereits in der Hebb'schen Regel zum Ausdruck kommt, besitzt die Koinzidenz eine zentrale Rolle bei der Gedächtnisbildung. Daher wurde nach der molekularen Maschinerie gesucht, die die notwendige Koinzidenzdetektion durchführt, um dann eine

Verstärkung an der Synapse einzuleiten. Wie im folgenden beschrieben wird, handelt es sich bei der Ca^{2+} -abhängigen Adenylylcyclase um solch einen Koinzidenzdetektor.

Die Adenylylcyclase integriert die beiden konvergierenden Signale, 1) die Aktivität der eigenen Zelle (Depolarisierung), die zu einer Erhöhung der zellinternen Ca^{2+} -Konzentration führt und 2) die Stimulation durch die Nachbarzelle, die über Neurotransmitter vermittelt wird. Diese beiden Signale führen zu einer starken Aktivierung der Adenylylcyclase, die unter Verwendung von ATP den second messenger cAMP erzeugt, welcher unter anderem die Proteinkinase A (PKA) aktiviert [147]. Die Aktivierung der PKA führt zur Phosphorylierung von Enzymen und Proteinen, die durch diese post-translationale Modifikation ihre Eigenschaften verändern können. Ein Beispiel hierfür ist der K^+ -Kanal, der durch Phosphorylierung durch die PKA inaktiviert wird, was eine Erhöhung des Ruhepotenzials und somit einen erleichterten Erregbarkeit der Zelle zur Folge hat [98, 166]. Dabei handelt es sich jedoch nur um kurzzeitige Veränderungen, die sehr schnell durch die entgegengewirkenden Enzyme wieder abgebaut werden können (z.B. PDE [24] und Proteinphosphatase (PP) [127]). Post-translationale Modifikationen von Proteinen, in Form der Phosphorylierung, bilden deshalb nur die molekulare Grundlage des Kurzzeitgedächtnisses (STM) (Abb. 1-1 unterer Bereich).

Bei ausreichend starker und andauernden Aktivierung der PKA aktiviert die Kinase den Transkriptionsfaktor CREB (CRE-element binding protein) im Nukleus [52, 71]. Zusammen mit dem Cofaktor CBP (CREB binding protein), eine beim Lernen beteiligte HAT (Histonacetyltransferase), induziert CREB die Expression neuer Proteine, die zu einer langzeitigen Veränderung der Signalweiterleitung und somit zur Ausbildung eines Langzeitgedächtnisses (LTM) führen (obere Bereich der Abb. 1-1) [123, 167].

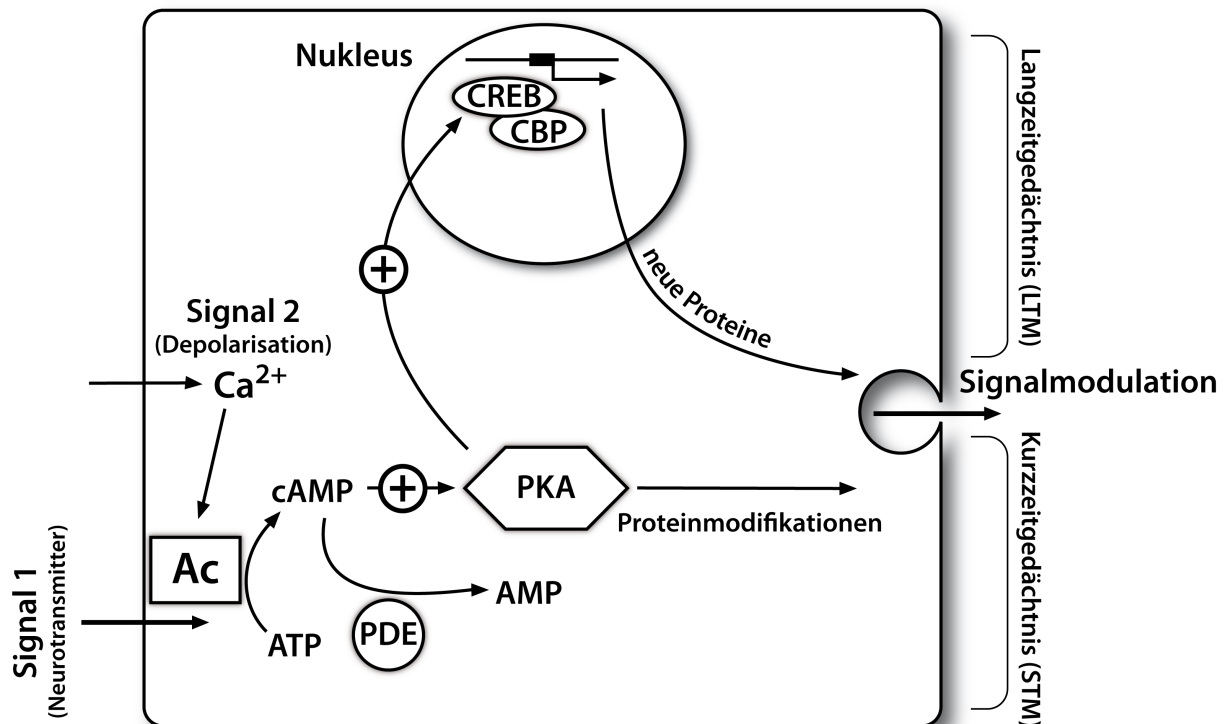


Abb. 1-1: Reduziertes Schema, der im Lernen beteiligten Signalkaskaden

Die Ca^{2+} -abhängige Adenylcyclase (Ac) [Koinzidenzdetektor] integriert die Depolarisierung der Zelle mit einer externen Stimulation durch die Nachbarzelle (Neurotransmitter). Dies führt zu einer starken Aktivierung der Ac, welche unter Verwendung von Adenosintriphosphat (ATP) den second messenger cyclisches Adenosinmonophosphat (cAMP) produziert. cAMP aktiviert die Proteinkinase A (PKA), welche direkt zu einer Modulation der Signalweiterleitung des Neurons beitragen kann, indem sie Proteine phosphoryliert. Diese post-translationalen Modifikationen führen nur zu kurzzeitigen Veränderungen der Signalweiterleitung (unterer Bereich der Abb.).

Bei ausreichend starker Aktivierung der PKA, aktiviert die PKA den Transkriptionsfaktor CREB (CRE-element binding protein) im Nukleus. CREB rekrutiert den Cofaktor CBP (CREB binding protein). Zusammen steuern sie die Expression neuer Proteine, die zu einer langzeitigen Veränderung der Signalweiterleitung führen (oberer Bereich der Abb.). Die Phosphodiesterase (PDE) baut den second messenger cAMP wieder ab.

Die Induktion der Transkription und damit des Langzeitgedächtnisses beruht auf einer verlängerten oder erneuten PKA Aktivierung, die entweder durch künstliche Freisetzung von cAMP [135] oder durch wiederholte Trainingseinheiten erreicht werden kann [77]. Eine einzelne CS-US-Paarung dagegen kann in der Regel kein Langzeitgedächtnis induzieren [77, 172]. Die für Langzeitgedächtnis notwendige Transkription ist, wie alle Prozesse in Lernen und Gedächtnisbildung, transient.

Obwohl die molekularen Grundlagen der Gedächtnisbildung gut untersucht sind, ist offen, wie sich lebenslange Gedächtnisse auf molekularer Ebene manifestieren. Da die langanhaltenden Gedächtnisse die Transkription benötigen, wäre eine langanhaltende Beeinflussung der Transkription eine mögliche Erklärung. Die Chromatinstruktur zusammen mit den epigenetischen Mechanismen bilden solch ein langanhaltendes Regulationssystem der Transkription.

1.2 Epigenetische Mechanismen als Regulatoren der Transkription

Bei der Entwicklung der Zelle von der Stammzelle zur spezifizierten, gereiften Zelle, kommt es zu langfristigen „unumkehrbaren“ Veränderungen im Expressionsmuster des Genoms [81]. Diese Veränderungen sind permanent und nicht umkehrbar, genauso die Veränderung von einer gesunden zu einer Krebszelle [27]. Bei diesen Prozessen fungiert die Chromatinstruktur, also die auf Histone aufgewickelte Form der DNA [100], als Regulator der Genexpression. Dabei sind die Gene ablesbar, wenn die Chromatinstruktur offen ist (Euchromatin) und sie können nicht abgelesen werden, wenn die Chromatinstruktur geschlossen ist (Heterochromatin) [99, 124]. Diese Regulation ist so stabil, dass sie auch wie beim Imprinting vererbt werden kann [148]. Beim Imprinting kommen Gene, abhängig von der maternalen oder paternalen Herkunft der Gene zur unterschiedlichen Ausprägung, was sich im Phänotyp wie eine geschlechtsspezifischen Vererbung auswirkt. Da es sich hier aber um eine Vererbung handelt, die nichts mit der Sequenz der DNA zu tun hat, sondern quasi auf ihr aufsitzt (z.B. Histone), wird sie als Epigenetik bezeichnet (epi: griech. darauf).

Die Frage ist nun: Handelt es sich bei der Chromatinstruktur um ein modulierbares System, wie es für Lernen und Gedächtnisbildung zu fordern ist?

Daher werden im folgenden die verschiedenen chromatinverändernden Modifikationen und ihr Wechselspiel untereinander näher betrachtet.

1.2.1 Chromatinstruktur verändernde Modifikationen

Die Chromatinstruktur wird durch ein Wechselspiel zwischen DNA-Modifikation und Histonmodifikation erzeugt.

1.2.1.1 DNA-Methylierung

Die DNA wird an der Base Cytosin durch die *de novo* DNA-Methyltransferasen (DNMT) methyliert. Die Gegenspieler, die DNA-Demethylasen, sind bisher noch nicht bekannt, auch wenn gezeigt werden konnte, dass es sich bei der Demethylierung um einen aktiven Prozess handelt [141]. Die DNA-Methylierung erfüllt mehrere Funktionen, zum einen dient sie bei der Synthese des Tochterstrangs zur Unterscheidung gegenüber dem Elternstrang und steuert so das Korrekturlesen bei Reparaturmechanismen und der semi-konservativen Synthese [180]. Zum anderen wird nach der Synthese aufgrund der Methylierungsdichte die Chromatinstruktur etabliert, d.h. die Verpackungstärke der DNA durch Histone gesteuert [158].

Eine Hypermethylierung hat eine dichte Packung der DNA durch Histone zur Folge, und damit das Schließen der DNA.

Die DNA-Methylierungsstärke lässt sich durch den Inhibitor 5-Azacytidin beeinflussen [92], der die DNMTs irreversibel inhibiert (Selbstmord-Inhibition) [153]. Dabei hat sich gezeigt, dass die Inkorporation von 5-Azacytidin in die DNA für die Inhibition wichtig ist.

1.2.1.2 Histonmodifikationen

Die Histone unterliegen sehr komplizierten Modifikationen und Modifikationskombinationen, die aufgrund ihrer Komplexität auch als Histoncode [87] bezeichnet werden. Abb. 1-2 zeigt eine Auswahl an Modifikationen am N-terminalen Schwanz von Histon 3.

Die Histonmodifikationen unterscheiden sich darin, ob sie einen direkten Einfluss auf die DNA-Bindeaffinität besitzen oder nicht. Modifikationen, die zu einer Ladungsveränderung am Histon führen, wirken direkt auf die Wechselwirkung mit der DNA und verändern damit die Chromatinstruktur. Wohingegen Histonmodifikationen, die keine Ladungsveränderung verursachen, zusätzliche Cofaktoren für die Veränderung der Chromatinstruktur benötigen [50]. Dabei lässt sich sagen, dass die Modifikationen, die zu einer Ladungsveränderung führen, wie zum Beispiel die Acetylierung und die Phosphorylierung, die Histonmodifikation ohne Ladungsveränderung als Signale überschreiben können [176]. Im Gegenzug sind die Modifikationen ohne Ladungsveränderung besser zu modulieren.

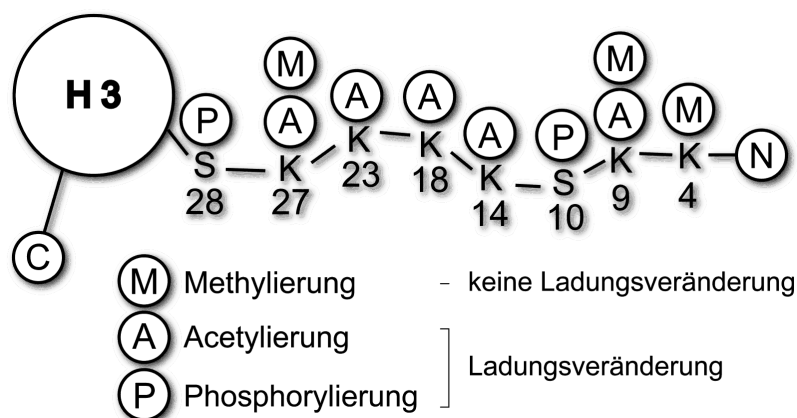


Abb. 1-2: Auswahl von Modifikationen am N-terminalen Schwanz von Histon 3 (H3)

Schematische Darstellung von Histon 3 (H3) mit einer Auswahl an post-translationalen Modifikationen: Methylierung (M), Acetylierung (A), Phosphorylierung (P). Die Zahlen geben die Position der Aminosäure (AS) an und der Buchstabe ist die Art der AS (Einbuchstaben-Code: S = Serin, K = Lysin). Stehen zwei Modifikationen an einer AS, so kann diese AS beide Modifikationen tragen, wobei sie sich gegenseitig ausschließen. N = N-terminus, C = C-terminus.

Ein weiterer Grund, warum man vom Histoncode spricht, ist die Tatsache, dass sich die verschiedenen Modifikationen auf den Histonschwänzen innerhalb eines Nukleosoms

beeinflussen [109], eventuell auch zwischen verschiedenen Nukleosomen. Die Untersuchungen des Histoncodes stehen noch am Anfang und sind weit davon entfernt, verstanden zu sein.

a) *Histonacetylierung*

Die Histonacetylierung am Lysin ist die am besten untersuchte Histonmodifikation, weil diese Modifikation in der Regel eine eindeutige Reaktion, die Öffnung der Chromatinstruktur und damit eine erleichterte Transkription, zur Folge hat.

Durch die Acetylierung verliert das Lysin seine positive Ladung und damit seine ionische Anziehungskraft zum negativ geladenen Rückrad der DNA. Daher nimmt die Bindeaffinität der Histone zur DNA ab, wenn sie acetyliert werden. Wie in Abb. 1-3 auf Seite 11 zu sehen ist, wird durch eine Acetylierung die Öffnung der Chromatinstruktur gefördert, was eine erleichterte Transkription zur Folge hat. Dies wird durch Coaktivatoren der Transkription, sogenannte Histonacetyltransferasen (HATs), vermittelt.

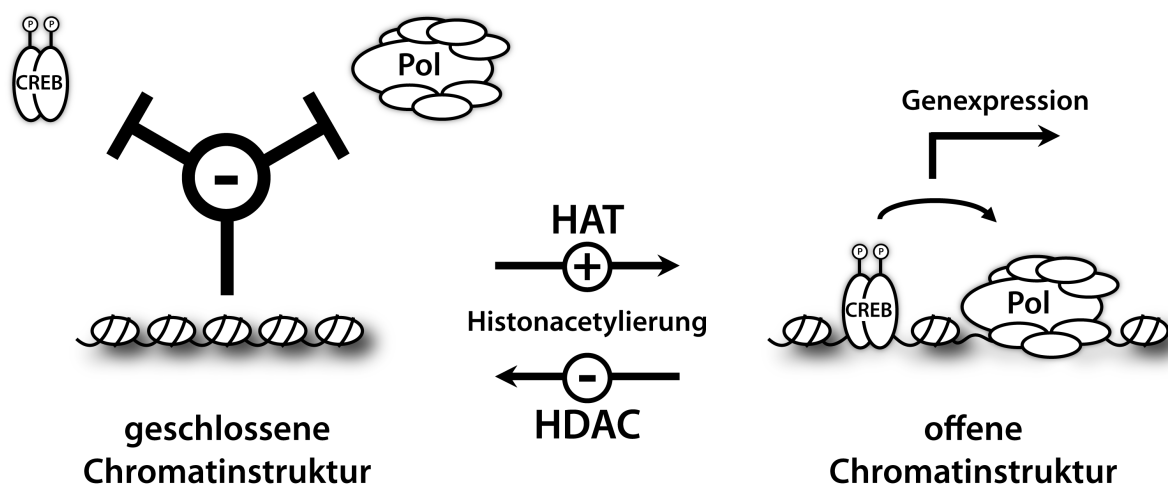


Abb. 1-3: Einfluss der Histonacetylierung auf die Genexpression

Über den Zustand der Chromatinstruktur kann die Zugänglichkeit der Transkriptionsfaktoren (z.B. CREB) und der RNA-Polymerase (Pol) reguliert werden. Eine Histonmodifikation, die dabei eine zentrale Rolle spielt, ist die Histonacetylierung. Histonacetyltransferasen (HAT) erhöhen die Histonacetylierung (+) und fördern die Öffnung der Chromatinstruktur. Die Histondeacetylasen (HDAC) reduzieren die Histonacetylierung (-) und schließen die Chromatinstruktur.

Bisher sind nur sehr wenige HAT-Inhibitoren bekannt: Curcumin, Garcinol und Arachidonsäure, die alle nicht nur auf die HATs, sondern auf noch weitere Enzyme wirken, die unter anderem ebenso eine Rolle bei Lernen und Gedächtnisbildung spielen (z.B. CaM-Kinase [126], NO-Synthase [120] und NF- κ B [83]).

Die Gegenspieler der HATs sind die Histondeacetylase (HDACs), diese entfernen die Acetylierung wieder und verstärken somit die Bindung der Histone zur DNA [107]. Die

HDACs sind eine sehr alte heterogene Gruppe von Enzymen, die phylogenetisch älter sind als die Histone selbst [114]. Sie lassen sich, basierend auf der Homologie der Hefe, in vier verschiedene Klassen einteilen:

Klasse I: ist hauptsächlich im Kern anzutreffen und sehr ubiquitär exprimiert

Klasse II: befindet sich hauptsächlich im Cytosol oder wechselt zwischen Cytosol und Kern und wird gewebespezifisch exprimiert

Bei diesen beiden Klassen handelt es sich um Enzyme, die Zink im aktiven Zentrum tragen und durch die bekannten HDAC-Inhibitoren Trichostatin A (TSA), Natriumbutyrat und Valproat (VPA) inhibiert werden [25].

Klasse III: sind NAD^+ (Nicotinamidadeninukleotid) abhängige HDACs, die sich auch funktionell deutlich von Klasse I und II unterscheiden. Sie können durch NAM (Nikotinamid) inhibiert werden (Produkthemmung).

Klasse IV: besteht nur aus der humanen HDAC 11. Diese bildet aufgrund der Sequenzunterschiede eine eigenständige Klasse [73, 191].

Wie bereits die Aussage nahelegt, dass die HDACs älter sind als die Histone, haben die HDACs neben den Histonen noch weitere Zielproteine [69]. Dabei gibt es Wechselwirkungen zu anderen aus dem Lernen bekannten Proteinen, z.B. die Proteinphosphatase [32, 39], NF- κ B [40], etc. Daraus ergeben sich eine Vielzahl von möglichen Wirkungsweisen der HDACs. Zudem können auch die Signalkaskaden aus Lernen und Gedächtnisbildung einen Einfluss auf die Aktivität von HDACs haben, wie die Regulation von HDAC 8 durch die PKA zeigt [112].

b) Histonmethylierung

Die Histonmethylierung ist sehr komplex, da sie sowohl am Lysin (mono-, di-, tri-) als auch am Arginin (mono-, di- symmetrisch, di- unsymmetrisch) in jeweils 3 verschiedenen Formen auftreten kann [11]. Die beiden Modifikationen (Acetylierung und Methylierung) können jeweils nur dann am Lysin etabliert werden, wenn das Lysin keine Modifikation trägt, d.h. bei einigen Lysinen konkurrieren die beiden Modifikationen um das Lysin [151]. Das Signal der Methylierung ist nicht eindeutig einer Wirkung zuzuordnen [105]. In der Regel ist eine Tri-Methylierung am Lysin ein Signal für Heterochromatin und damit für eine geschlossene Chromatinstruktur.

1.2.2 Wechselspiel von DNA-Methylierung und Histonacetylierung

In der Literatur ist man sich darüber uneinig, welche der Modifikationen die andere nach sich zieht, d.h. ob die DNA-Methylierung die Histonacetylierung oder ob die Histonacetylierung die DNA-Methylierung bestimmt [48, 65, 158].

In Kapitel 1.2.1.1 wurde bereits für den Fall der DNA-Synthese beschrieben, dass hier die DNA-Methylierung der Histonmodifikation vorausgeht. Die Methylierung der DNA resultiert in einer Deacetylierung der Histone, indem methylcytosinbindende Proteine (MBD-Protein) Histondeacetylasen an die DNA rekrutieren [93].

In Experimenten hat sich jedoch gezeigt, dass bei einer durch TSA induzierte Erhöhung der Histonacetylierung die DNA-Methylierung abnimmt [142, 163]. Dies gilt nicht nur für eine künstlich induzierte Histonhyperacetylierung, sondern auch für die durch Transkription induzierte Acetylierung. Dabei war die DNA-Methylierung umso geringer, je stärker das Gen abgelesen wurde [48]. Bei der Inhibition der DNA-Methyltransferasen mit 5-Azacytidin hat sich gezeigt, dass es nicht zu einer genomweiten Histonacetylierung kommt [111], sondern davon nur sehr enge Promotorbereiche betroffen sind [60]. Bei der Verwendung beider Inhibitoren, HDAC-Inhibitor und 5-Azacytidin, kommt es zu synergistischen Effekten, die zu einer stärkeren Öffnung der Chromatinstruktur führen, als durch den HDAC-Inhibitor alleine [196].

Es zeigt sich somit, dass die DNA-Methylierung nur zur Schließung der DNA führt, wohingegen die Histonacetylierung sowohl für die Schließung als auch für die Öffnung verantwortlich ist.

Die bisherigen Untersuchungen zeigen, dass es sich bei den epigenetischen Mechanismen keineswegs um ein starres, unumkehrbares System handelt. Damit besitzen sie die Möglichkeit als lang anhaltender aber veränderbarer Speicher von Expressionsmustern zu dienen, in den Information hineingeschrieben und, über die Regulation der Transkription, auch wieder ausgelesen werden kann [117, 177].

1.3 Epigenetische Mechanismen in Lernen und Gedächtnisbildung

Der Einfluss epigenetischer Mechanismen auf Lernen und Gedächtnisbildung wird erst seit wenigen Jahren erforscht. 1999 veröffentlichte R. Holliday ein theoretisches Paper, in dem er die Idee zum Ausdruck brachte, dass epigenetische Mechanismen einen Einfluss auf das Langzeitgedächtnis haben müssten, da dieses transkriptionsabhängig ist [82]. Die ersten Versuchsergebnisse wurden erst fünf Jahre später veröffentlicht, als erkannt wurde, dass der Cofaktor von CREB, das CBP, eine HAT ist und die HAT-Funktion essenziell für die Bildung

eines Langzeitgedächtnisses ist [2, 103]. Im selben Jahr zeigte sich auch der Einfluss von MeCP2 (methyl cytosin binding protein 2), ein MBD-Protein, auf Verhalten und Lernen von Mäusen [44, 134]. MeCP2 ist ein Transkriptionsinhibitor von BDNF (brain-derived neurotrophic factor), welches eine verstärkende Funktion bei Lernprozessen hat [41]. Ebenso konnte gezeigt werden, dass einige Antidepressiva, die auch Inhibitoren der Histondeacetylase sind, einen positiven Effekt auf die Expression von BDNF und damit auf das Verhalten von chronisch gestressten Mäusen haben [176]. Mittlerweile gibt es einige Veröffentlichungen, die zeigen, dass sich das assoziative Angstgedächtnis in Mäusen durch Inhibitoren der Histondeacetylase verbessern lässt [28, 29, 110]. Bei diesen Untersuchungen zeigte sich, dass die Lernverbesserung ebenfalls über die Aktivierung von BDNF vermittelt wird. Neu war dann der Befund, dass TSA zu keiner Verbesserung des Lernens bei Mäusen mit einer Mutation am CREB führt [179]. Die untersuchte Mutation verhindert die Interaktion von CREB mit CBP. Daher rückt die CREB-CBP-Interaktion in den Fokus des Interesses. CBP ist eine HAT, die sich selbst acetyliert [97]. Das Acetylierungssignal von CBP könnte durch HDACs abgebaut werden [169].

Neben der Histonacetylierung hat auch die DNA-Methylierung einen Effekt auf Lernen und Gedächtnisbildung [116]. Mit Inhibition der *de novo* DNA-Methyltransferase (DNMT) verschlechtert sich das Angstgedächtnis [132]. Obwohl beide Inhibitoren, die Inhibitoren der HDAC und der DNMT, zu einer Öffnung der Chromatinstruktur und damit zu einer Verbesserung des Lernens führen sollten, wirken sie unterschiedlich auf das Lernen. Werden beide Drogen gemeinsam verwendet, so hebt der HDAC-Inhibitor die Wirkung des DNMT-Inhibitors wieder auf [131]. Wie dieser Befund zustande kommt, ist noch nicht geklärt.

Alle bisherigen Untersuchungen wurden so durchgeführt, dass die verwendeten Inhibitoren zum Zeitpunkt des Trainings wirksam waren. Bisher ist weder untersucht worden, wie stabil das durch TSA verstärkte Gedächtnis ist, noch wurde der genaue Zeitpunkt der Inhibitorwirkung bestimmt. Zudem wurden alle Untersuchungen an Mäusen, also an Vertebraten durchgeführt. Deshalb bleibt unklar, ob es sich bei dem Einfluss von epigenetischen Mechanismen auf Lernen und Gedächtnisbildung um einen ebenso im gesamten Tierreich konservierten Mechanismus handelt, wie bei den Lernkaskaden.

1.4 Die Honigbiene als Modellorganismus

Die Honigbiene ist ein Invertebrat und ein sehr gut untersuchter Modellorganismus, da es sich bei der Biene um ein Nutztier des Menschen handelt, welches seit über 6000 Jahren domestiziert ist. Lernen und Gedächtnisbildung wird an der Biene bereits seit über 50 Jahren untersucht [21, 108]. Dagegen existieren nur drei Veröffentlichungen, die in den letzten zwei Jahren publiziert wurden, die die epigenetischen Mechanismen in der Biene beleuchten [106, 157, 182]. Das „Honey Bee Genome Project“ [45] hat gezeigt, dass viele der chromatin-modifizierenden Enzyme in der Biene exprimiert werden, z.B. Histonacetyltransferasen (HAT), Histondeacetylasen (HDAC) und *de novo* DNA-Methyltransferasen (DNMT) [182]. Im Fall der DNMT zeigt sich eine große Ähnlichkeit zu Vertebraten, da die Biene alle drei DNMT-Familien besitzt, wohingegen in *Drosophila* nur eine DNMT-Familie vertreten ist [157].

In einer ersten Veröffentlichung wurde der Einfluss der DNMTs für die kastenspezifische Entwicklung, die Entwicklung zwischen Arbeiterin und Königin, beschrieben. Dabei wurde mit Hilfe von RNAi die Expression der DNMT3 in den Bienenlarven unterdrückt. Als Ergebnis zeigte sich bei den Arbeiterinnen eine Entwicklung hin zur Königin [106]. Diese kastenspezifische Entwicklung wird in der Natur durch die unterschiedliche Fütterungsdauer mit Geleeroyal induziert, genetisch unterscheiden sich Königin und Arbeiterin nicht. Dies lässt auf eine Etablierung einer epigenetischen Programmierung schließen. Da die Königin ihr ganzes Leben mit Geleeroyal gefüttert wird, könnte es sein, dass Geleeroyal für die Aufrechterhaltung der Programmierung benötigt wird.

Ausser der kastenspezifischen Entwicklung, die im Larvenstadium vollzogen wird, durchläuft die adulte Arbeiterin eine weitere Entwicklung. Im Laufe ihres Lebens übernimmt sie verschiedene Aufgaben, zunächst innerhalb und später auch ausserhalb des Stocks [187]. Im Alter von etwa 3 Tagen beginnen die Arbeiterinnen mit der Brutpflege. Diese Bienen werden Ammen genannt. Später kommen weitere Aufgaben innerhalb des Stocks hinzu, wie Wabenbau, Pollen stopfen und Nektarreifung. Ab dem 16. Tag nach dem Schlüpfen beginnt die Arbeiterin Erkundungsflüge zu unternehmen, an die sich die Zeit anschließt, in der sie Nektar und Pollen sammelt. Diese Bienen werden Flieger genannt.

Dass der Verhaltensunterschied zwischen Ammen und Fliegern nicht ausschließlich durch das Alter determiniert ist, zeigt sich bei dem Phänomen des Schwärmens, der Teilung des Stocks zum Zweck der Völkervermehrung. Beim Schwärmen verlässt die Königin mit den flugfähigen Bienen den Stock, um eine neue Behausung zu suchen. Die jungen Bienen, deren Chitinpanzer noch nicht ausgehärtet ist, bleiben zurück. So verliert das ausgeschwärmte Volk

einen Teil seiner Ammen und das zurückgebliebene Volk besitzt keine Flieger mehr. Beide Stöcke reorganisieren sich aber innerhalb kürzester Zeit wieder zu vollwertigen Stöcken mit Fliegern und Ammen.

Wie dieses Sozialverhalten der Bienen realisiert wird und was der Auslöser ist, ist nicht genau bekannt. Untersuchungen zeigen, dass es sich dabei um den Ernährungszustand [6, 175] und die Konzentration des Pheromons der Königin handeln könnte [89, 171]. Zudem konnte gezeigt werden, dass es unterschiedliche Expressionsmuster im Gehirn von Ammen und Fliegern gibt [22, 185, 188]. Wie dieses veränderte Expressionsmuster etabliert wird und persistiert, ist nicht geklärt. Hier könnten epigenetische Mechanismen eine zentrale Rolle spielen.

Bei den bisher in der Honigbiene beschriebenen Prozessen handelt es sich um Veränderungen von Expressionsmuster, die über längere Zeiträume ablaufen. Im Falle von Lernen und Gedächtnisbildung dagegen passieren die initialen Veränderungen innerhalb weniger Sekunden und Minuten.

Für die Analyse von Lernen und Gedächtnisbildung ist die Biene ein gut etabliertes Tiermodell. Die Lernkaskaden und die verschiedenen Lernparadigmen, die vorgestellt wurden, sind auch in der Biene analysiert und etabliert worden [3, 21, 68, 77, 135]. Dennoch zeigen sich kleine Unterschiede zu anderen Tiermodellen. So hat sich gezeigt, dass in *Aplysia* [49, 172] und in der Ratte [9] das Gedächtnis bereits nach 24h transkriptionsabhängig ist, wohingegen in der Biene dies erst nach 72h der Fall ist [190]. Desweiteren erzeugt eine einzelne CS-US-Paarung in der Biene [64] so wie in *Aplysia* [172] kein transkriptionsabhängiges Gedächtnis.

Trotz dass die Biene auf dem Gebiet der Epigenetik noch wenig untersucht ist, bietet sie eine Reihe von Möglichkeiten, den Einfluss epigenetischer Mechanismen auf Verhalten zu untersuchen.

2 Zielsetzung

Ziel dieser Arbeit ist es den Einfluss epigenetischer Mechanismen auf das Verhalten der Honigbiene zu untersuchen. Dabei stehen zwei Fragestellungen im Mittelpunkt:

1. soll die Frage geklärt werden, ob die Chromatinstruktur einen Einfluss auf Lernen und Gedächtnisbildung besitzt. Dazu soll mit Hilfe von Inhibitoren in der Honigbiene Veränderungen in der Chromatinstruktur induziert und deren Effekte an Hand der gut in der Bienen etablierten Lernparadigmen analysiert werden.
2. soll die Frage geklärt werden, ob die Aufspaltung in Flieger und Ammen auf eine epigenetische Modulation zurückzuführen ist. Falls sich auf Histonebene Unterschiede zwischen den verschiedenen Aufgabengebieten der Arbeiterin zeigen, soll zusätzlich überprüft werden, ob sich das unterschiedliche Verhalten durch Veränderung der Histonmodifikation induzieren lässt.

Um diese Fragen anzugehen ist es notwendig, die Werkzeuge zu entwickeln, die es ermöglichen Histonmodifikationen in der Honigbiene zu quantifizieren und zu manipulieren.

3 Material und Methoden

3.1 Material

3.1.1 Chemikalien & Antikörper

1-Butanol (wassergesättigt)	Z-Chem
2-Mercaptoethanol	Merck
5-Azacytidin (5-Aza-2'-deoxycytidin)	Fluka
Actinomycin D	Appli-Chem
APS (Ammoniumperoxodisulfat)	Z-Chem
Bis-Acrylamid (Acrylamid (30 % w/v) & Bisacrylamid (0,8 % w/v))	Roth
Bromphenolblau	Appli-Chem
BSA (Rinderserumalbumin)	Roth
DMSO (Dimethylsulfoxid)	Z-Chem
EDTA (Ethylendiamintetraessigsäure)	Z-Chem
Glycerin	Z-Chem
Glycin	Roth
Harnstoff	Z-Chem
HCl (Salzsäure)	Merck
KCl (Kaliumchlorid)	Merck
KH ₂ PO ₄ (Kaliumdihydrogenphosphat)	Merck
Methanol	Z-Chem
MgCl ₂ • 6H ₂ O (Magnesiumchlorid)	Merck
Na ₂ HPO ₄ (Dinatriumhydrogenphosphat)	Z-Chem
NaCl (Natriumchlorid)	Z-Chem
NaN ₃ (Natriumacid)	Z-Chem
Natriumbutyrat	Sigma-Aldrich
Nelkenöl	Apotheke
p-NPP (4-Nitrophenylphosphat-Dienatriumsalz-Hexahydrat)	Appli-Chem
Proteinmarker Seeblue Plus2 Pre-Stained Standard	Invitrogen
SDS (Natriumdodecylsulfat)	Roth
TEMED (N,N,N',N'-Tetramethylethylenediamine)	Appli-Chem
Tris (Tris(hydroxymethyl)-aminomethan)	Sigma-Aldrich
TSA (Trichostatin A)	Sigma-Aldrich
Tween20 (Polyoxyethylen(20)-sorbitan-monolaurat)	Appli-Chem
VPA (Valproat)	Sigma-Aldrich

Tab. 3-1: Verwendete Antikörper

Antikörper	Herkunft	Firma	Konzentration	
			Westernblot	ELISA
Primäre Antikörper				
H3	Kaninchen	Sigma-Aldrich	1:5.000	1:5.000
H3	Kaninchen	Cellsignaling	1:1.000	-
H3 Ac-9	Kaninchen	Epitomics	1:1.000	1:500
H3 Ac-18	Kaninchen	Cellsignaling	1:1.000	1:1.000 / 1:2.000
H3 Ac-23	Kaninchen	Cellsignaling	1:1.000	-
H3 Met-4,1	Kaninchen	Abcam	1:1.000	1:1.000
H3 Met-4,3	Kaninchen	Abcam	1:1.000	-
H3 Met-27,3	Kaninchen	Upstate	1:1.000	1:1.000
H4	Kaninchen	Imgenex	1:1.000	-
H4 Ac-8	Kaninchen	Upstate	1:1.000	-
H4 Ac-12	Kaninchen	Upstate	1:1.000	-
H4 Ac-16	Kaninchen	Upstate	1:1.000	-
PKA (R1H7)	Maus	Eigene Produktion	1:500	1:500
PKC (2B3)	Maus	Eigene Produktion	1:500	1:500
MAPK p44/42	Kaninchen	Cellsignaling	1:1.000	1:1.000
Sekundäre Antikörper				
Westernblot				
Anti-Rabbit IgG - Peroxidase gekoppelt	Ziege		1:10.000	-
Anti-Mouse IgG - Peroxidase gekoppelt	Ziege		1:20.000	-
ELISA				
Anti-Rabbit IgG - Alkaline Phosphatase gekoppelt	Ziege	Sigma-Aldrich	-	1:4.000
Anti-Mouse IgG - Alkaline Phosphatase gekoppelt	Ziege	Sigma-Aldrich	-	1:4.000

Alle Antikörper wurden in Blocklösung (s. Tab. 3-2 auf Seite 21) der jeweiligen Anwendung (Westernblot bzw. ELISA) angesetzt. Um die Lösung haltbarer zu machen, wurde zusätzlich NaN_3 zugegeben. Spezifikation der Histonantikörpers besteht aus: Bezeichnung des Histons (H3 o. H4); Art der Modifikation (Ac – Acetylierung, Met – Methylierung; Position der Modifikation (Zahl nach dem Bindestrich); Anzahl der Modifizierungen (Zahl nach dem Komma)

3.1.2 Verbrauchsmaterial

96-well-ELISA-Platten Maxisorb	Nunc
Dentalwachs (medium)	Ubert
ECL-Entwicklungskit Western Lightning	Perkin Elmer
Fangröhrchen PS-Röhrchen 68ML	Greiner
Glaskapillaren Capilettor Tips (1 - 5 µl)	Selzer
Kanülen	Braun
Metallstößel für die Glaskapillaren Capilettor Stick (1 - 5 µl)	Selzer
Nitrocellulose-Membran (Optitran BA-S 85)	Schleicher und Schuell
Pasteurpipetten	Roth
Pinsel (klein)	Geschäft
Reaktionsgefäße (1,5 ml)	Eppendorf
Röntgenfilm BioMax Xar Film	Kodak
Röntgenfilm-Entwickler REF 103482	Tetenal
Röntgenfilm-Fixierer REF 103655	Tetenal
Silikon (Baysilone-Paste mittelviskos)	Bayer
Spritzen (2mL und 50mL)	Braun
Tafelzucker (Sucrose)	Geschäft
Textilklebeband	Geschäft
Whatman-Papier	Schleicher und Schuell
Zahnstocher	Drogerie

3.1.3 Geräte

1 mL-Glashomogenisator mit Glas-S-Stößel	Braun
Ablegerkasten DN/ZA	Holtermann
Bienenracks	eigene Herstellung
Bienenröhrchen (Kupfer)	eigene Herstellung
Binokular S6D	Leica
Block-Heizgerät (Accu Block)	Labnet
Blotkammer	Owl
Brutschrank	Horo
ELISA-Reader safire ²	Tecan
Folienschweißgerät	Severin
Gelelektrophoreseapparatur	C.B.S.
Kaltlichtquelle KL 1500 LCD	Schott
Lötkolben	eigene Herstellung
Mikroinjektor Pikospritzer II	General Valve
Mikropipetten Puller Model P-87	Sutter Instrument Co.
pH-Meter (inoLab pH 730)	WTW
Pinzetten	Dumont
Powerstation 300 PLUS	Labnet
Rührheizgerät IKA RCT basic	IKA-Labortechnik
Schüttler KS501 digital	IKA-Labortechnik
Switching Power DPS-4005 PFC	Voltkraft
Taunus-Begattungskasten	WSE
Ultraschallgerät HTU Soni 130	Heinemann
Vortex VX 100	Labnet
Waage CP3202S und CP225D	Sartorius
Zentrifuge (Spectrafuge 24D)	Labnet

3.1.4 Puffer und Lösungen

Tab. 3-2: Puffer und Lösungen

Name des Puffers	Inhalt
Probenvorbereitung	
10x PBS	27mM KCl; 18mM KH ₂ PO ₄ ; 1,37M NaCl; 101mM Na ₂ HPO ₄ (Vor Verwendung 1:10 verdünnt mit H ₂ O)
Histon-Homogenisierungspuffer	1x PBS; 1mM EDTA; 5mM Natriumbutyrat
Histon-Homogenisierungspuffer mit Harnstoff	1x PBS; 1mM EDTA; 5mM Natriumbutyrat; 8M Harnstoff
SDS-Page	
5x Probenpufferpuffer (SDS-PAGE)	0,2M Tris/HCl pH 6,8; 10mM 2-Mercaptoethanol; 10% (w/v) SDS; 20% (v/v) Glycerin; 0,05% (w/v) Bromphenolblau
Sammelgelpuffer	0,5M Tris/HCl pH 6,8
Trenngelpuffer	1,5M Tris/HCl pH 8,8
10x Laufpuffer	0,25M Tris; 2M Glycin; 1% (w/v) SDS (Vor Verwendung 1:10 verdünnt mit H ₂ O)
Westernblot	
Blotpuffer	0,25M Tris; 0,2M Glycin; 20% (v/v) Methanol
Blocklösung	1x PBS; 0,5% (w/v) BSA; 0,1% (v/v) Tween20
ELISA	
Blocklösung	1x PBS; 0,5% (w/v) BSA
RxN-Puffer	0,1M Tris/HCl pH 8,7; 1mM MgCl ₂ • 6H ₂ O
Färbelösung	1x RxN; 1mM p-NPP

Tab. 3-3: Gelzusammensetzung für die SDS-PAGE

Komponenten	Trenngel (4mL)		Sammelgel (2mL)
	10%	15%	4%
Aqua dest.	1,62	0,95	1,19
Trenngelpuffer	1	1	-
Sammelgelpuffer	-	-	0,5
20% (w/v) SDS	0,02	0,02	0,025
Bis-Acrylamid (0,8%,30%)	1,33	2	0,27
10% (w/v) APS	0,02	0,02	0,01
TEMED	0,01	0,01	0,005

Angaben in mL

3.2 Methoden

3.2.1 Haltung der Honigbienen

Sommer:

Die Bienen wurden in normalen Bienenstöcken im Freien mit natürlichen Futterquellen gehalten. Für die Einzeltier-Experimente wurden die Tiere mit einer Plexiglaspyramide gefangen und in Fangröhrchen überführt.

Winter:

Im Winter wurden die Bienen in ihrem Stock in einer mit Gase bespannten Voliere in einem Winterflughaus mit UV-durchlässigem Glasdach (Temperatur: 23-25°C mit Nachtabsenkung; Luftfeuchtigkeit: 50%) gehalten. Im Winterflughaus wurden die Bienen mit 30% (w/v) Zuckerwasser und Pollen gefüttert. Die Tiere für die Einzeltierexperimente wurden mit Hilfe von Fangröhrchen direkt aus der Voliere gefangen.

Die Bienen wurden auf Eis immobilisiert und anschließend mit Textilklebeband in kleine Röhrchen geklebt (s. Abb. 3-1 auf Seite 23) [21]. Der Kopf der Biene wurde zusätzlich mit Hilfe eines Lötkolbens und Dentalwachs fixiert (nicht gezeigt). Die Bienen wurden, wenn nicht weiter angegeben, 3x täglich mit einer 1M Zuckerlösung gefüttert, morgens 2, mittags 2 und abends 3-5 Tropfen.

3.2.2 Injektion der Inhibitoren

Die Bienen wurden mit einer aus einer Glaskapillare gefertigten Mikropipette in den Torax injiziert (Injektionsstellen s. Abb. 3-1 auf Seite 23). Das Injektionsvolumen betrug 1µl. Die jeweilige Zusammensetzung der injizierten Lösungen, sowie der Injektionszeitpunkt ist den einzelnen Bildunterschriften im Ergebnisteil zu entnehmen.

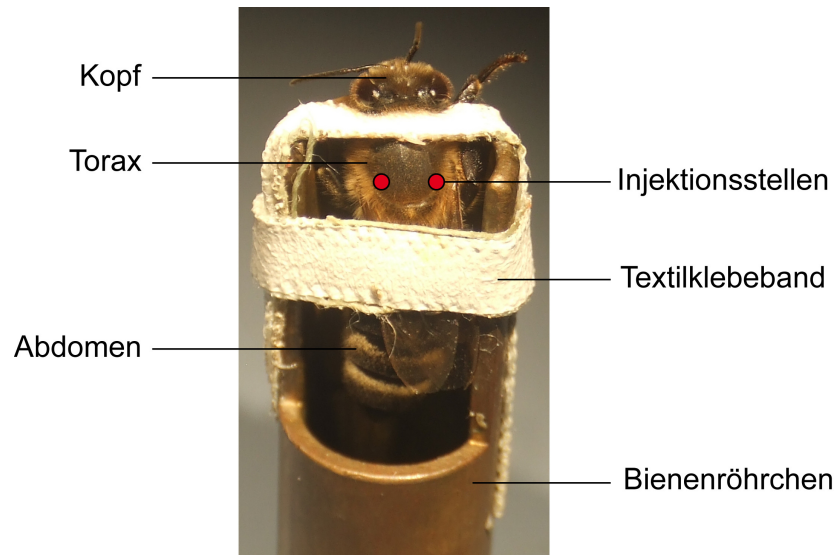


Abb. 3-1: Eingespannte Biene für Einzeltierexperimente

Gezeigt ist eine Biene in einem Bienenröhrchen, mit den Hauptkörperteilen Kopf, Torax und Abdomen. Es ist zu sehen, wie die Bienen für die Einzeltierexperimente in halbaufgeschnittenen Röhrchen mit Textilklebeband fixiert werden. Die roten Kreise mit schwarzer Umrandung markieren die Injektionsstellen. Im Experiment wurde nur eine der beiden möglichen Stellen verwendet, je nach Zugänglichkeit.

3.2.3 Präparation des Bienenhirns

Bei einer auf Eis immobilisierten Biene wird der Kopf abgetrennt und dieser in Wachs eingebettet. Die Kopfkapsel wird mit einem feinen Skalpell geöffnet. Dabei wird der Schnitt vor den Antennen angesetzt und führt dann durch die Komplexaugen bis kurz über die oberste Ozele (s. rotes Rechteck Abb. 3-2 A auf Seite 24). Anschließend wird das Gehirn von Tracheen und Futtersaftdrüsen befreit, sowie die Hirnhaut entfernt. In Abb. 3-2 B auf Seite 24 ist der heraus präparierte Gehirnbereich, im weiteren Zentralhirn genannt, zu sehen (s. schwarzes Rechteck). Dieser Bereich enthält alle Gehirnregionen, die für das olfaktorische Lernen wichtig sind, unter anderem die Antennalloben (Al) und die Pilzkörper (Pk).

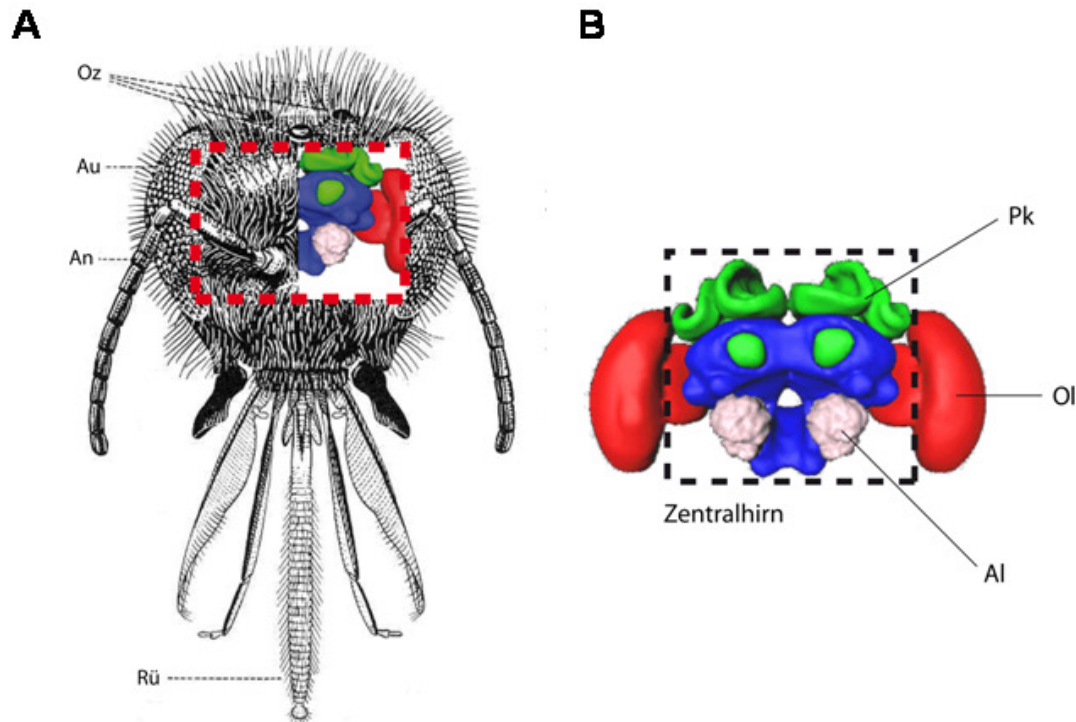


Abb. 3-2: Schematische Zeichnung eines Bienenkopfes (A) und eines Bienenhirns (B)

A) Bienenkopf: Das rote Rechteck markiert den Bereich, der beim Öffnen der Kopfkapsel entfernt wird, darunter wird die Lage des Gehirns in der Kopfkapsel sichtbar. Oz: Ozellen; Au: Komplexauge; An: Antenne; Rü: Rüssel B) Bienenhirn: Das schwarze Rechteck markiert das Zentralhirn, den für die Homogenate verwendeten Gehirnbereich. Pk: Pilzkörper; Ol: optische Loben; Al: Antennalloben

Adaptiert nach: http://www.suz-mitte.de/angebote/bilder_angebote/bienenkopf.jpg und <http://www.neurobiologie.fu-berlin.de/beebrain.gif>

3.2.4 SDS-PAGE (Polyacrylamid Gelelektrophorese) und Westernblot

Probenvorbereitung:

Ein Zentralhirn wurde in 200µl Histon-Homogenisierungspuffer [1x PBS; 1mM EDTA; 5mM Natriumbutyrat] auf Eis mit einem S-Pistill in einem Glashomogenisator homogenisiert. Anschließend wurden 50µl 5x Probenpuffer [0,2M Tris; 10mM 2-Mercaptoethanol; 10% (w/v) SDS; 20% (v/v) Glycerin; 0,05% (w/v) Bromphenolblau; pH 6,8 (HCl)] hinzugegeben und die Proben für 5 min bei 95°C gekocht. Die Proben wurden noch heiß auf das Gel aufgetragen.

Diskontinuierliche SDS-PAGE nach Laemmli:

Das Gel besteht hier aus Sammelgel (4%ig – oben) und einem höherprozentigen Trenngel (unten), für die Untersuchung von Histonen wurde ein 15%iges, bei der Untersuchung von anderen Proteinen ein 10%iges Trenngel verwendet (Zusammensetzung s. Tab. 3-3 auf Seite 21).

Das Gel wurde bei 20mA pro Gel für ca. 40-60min laufengelassen, so dass die Lauffront noch im Gel verblieb.

Westernblot:

Das Gel wurde im Semi-Dry-Verfahren auf eine Nitrozellulosemembran geblottet (20V und 400mA pro Gel für 40min). Anschließend wurde die Membran für 1h bei RT in WB-Blocklösung [1x PBS; 0,5% (w/v) BSA; 0,1% (v/v) Tween20] geblockt. Die primären Antikörper wurden über Nacht bei 4°C inkubiert. Anschließend wurde 3x je für 5min bei RT mit PBS gewaschen und der sekundäre Antikörper für 1h bei RT inkubiert. Die Konzentrationen der Antikörper sind aus Tab. 3-1 auf Seite 19 zu entnehmen. Es folgt eine weitere Waschung mit PBS (3x 5min). Anschließend wurde der Blot nach Anleitung in ECL-Entwicklerlösung geschwenkt und der Blot mit einem Röntgenfilm in der Dunkelkammer entwickelt.

3.2.5 ELISA (Enzyme-linked Immunosorbent Assay)

Ein Zentralhirn wurde in 500µl Histon-Homogenisierungspuffer [1x PBS; 1mM EDTA; 5mM Natriumbutyrate] auf Eis mit einem S-Pistill in einem Glashomogenisator homogenisiert. Anschließend wurden die Proben zusätzlich mit Ultraschall behandelt (10x für ca. 1s bei einer Amplitude von 30%). Danach wurde der Teil der Probe, der mit dem H3-Antikörper untersucht werden sollte, noch ein weiteres mal 1:2 mit dem Histon-Homogenisierungspuffer mit Harnstoff [1x PBS; 1mM EDTA; 5mM Natriumbutyrate; 8M Harnstoff] verdünnt und bei -40°C eingefroren. Je nach Arbeitsaufwand wurden die anderen Proben ebenfalls bei -40°C eingefroren und erst zu einem späteren Zeitpunkt verwendet, oder direkt auf die ELISA-Platte aufgetragen. Es hat sich gezeigt, dass die Proben etwa 3 Wochen bei -40°C stabil waren. Längere Lagerung führte zum Verlust der Acetylierungsunterschiede. Beim Auftragen auf die ELISA-Platte wurde eine fünfstufige Verdünnungsreihe (1:2) mit dem Puffer, in dem sich die Probe befand (H3: Histon-Homogenisierungspuffer mit 4M Harnstoff; Rest: Histon-Homogenisierungspuffer), erzeugt.

Die ELISA-Platte wurde 1h bei RT mit den Proben inkubiert, anschließend wird 1h bei RT mit ELISA-Blocklösung [1x PBS; 0,5% (w/v) BSA] geblockt. Die Primärantikörper wurden über Nacht bei 4°C auf einem Schüttler inkubiert. Es folgt ein Waschen mit PBS (3x 5min) und eine Inkubation mit sekundären Antikörpern für 1h bei RT. Nach erneutem Waschen mit PBS (3x 5min) wurde die Färbelösung [1x RxN-Puffer; 1mM p-NPP] in die Wells pipettiert und die ELISA-Platte bei 37°C im Brutschrank (in der Regel über Nacht) entwickelt. Für die

Zusammensetzung des RxN-Puffers s. Tab. 3-2 auf Seite 21. Die Konzentrationen der verwendeten Antikörper sind in Tab. 3-1 auf Seite 19 zu entnehmen.

3.2.6 Test des Einflusses des Ernährungszustands auf Histonmodifikationen

Die Tiere wurden wie in Kapitel 3.2.1 beschrieben in Röhrchen gespannt. Die eine Gruppe wurde wie üblich 3 Mal täglich gefüttert, morgens 2, mittags 2, abends 5 Tropfen (satt) und die hungrigen Tiere wurden nur abends mit 5 Tropfen gefüttert. Die Tiere wurden unter diesen Bedingungen für zwei Tage gehalten und dann ca. 30min nach der Mittagsfütterung der satten Tiere präpariert.

3.2.7 Test der Empfindlichkeit auf Zuckerwasser (Responsiveness)

Die in Röhrchen eingespannten Bienen wurden aufsteigend mit den Zuckerlösungen (Saccarose) 0mM, 30mM, 100mM, 300mM und 1000mM an der Antenne auf den Rüsselausstreckreflex (probostis extension reflex – PER) getestet. Die Tiere wurden vorher mit einer 1M Zuckerlösung gefüttert, und so eingestellt, dass weniger als 10% auf 0mM und alle auf 1000mM reagieren. Die Bienen wurden am selben Tag gefangen, an dem sie getestet wurden.

Um den Einfluss von TSA auf die Zuckerwasserempfindlichkeit zu testen, wurden die Tiere 2h vor dem Test, wie in Kapitel 3.2.2 beschrieben, mit TSA [0,5µg/µl Trichostatin A in Kontrolllösung] und Kontrolllösung [PBS:DMSO 4:1] injiziert.

3.2.8 Nicht-Assoziative Lernparadigmen (Sensitisierung und Habituation)

Die Untersuchungen zu den nicht-assoziativen Lernformen wurden nacheinander mit den selben Tieren durchgeführt. Die Tiere wurden am gleichen Tag getestet, an dem sie gefangen und, wie in Kapitel 3.2.1 beschrieben, in Röhrchen gespannt. Die Tiere wurden zunächst hungrig ca. 1h nach der Injektion auf die Sensitisierung getestet. Nach der Sensitisierung wurden die Tiere mit einer 1M Zuckerlösung gefüttert und in etwa so eingestellt, dass sie in etwa nach der Hälfte des Cut-Offs habituierten. Die Habituation wurde etwa 2h nach der Injektion durchgeführt. Injiziert wurde, wie in Kapitel 3.2.2 beschrieben, 1µl der entsprechenden Lösung: Kontrolllösung: [PBS:DMSO 4:1]; TSA: [0,5µg/µl Trichostatin A in Kontrolllösung].

Sensitisation:

Bei der Sensitisation wird die Biene vor einem Abzug mit Nelkenduft angeblasen. Dies geschieht, indem die Luft mit Hilfe einer Spritze durch einen mit Nelkenöl getränkten Zellstoff gedrückt wird. Dabei wurde der PER notiert. Nach einer Wartezeit von 2min wurde die Biene mit einer 1M Zuckerlösung an der Antenne stimuliert (Sensitisation) und 20s danach der Test mit dem Nelkenduft wiederholt. Hier wurde ebenfalls der PER notiert. Aus dem Experiment wurden die Bienen entfernt, die nicht mit dem PER auf eine Stimulierung mit einer 1M Zuckerlösung reagierten.

Habituation:

Die Tiere wurden mit einem in 1M Zuckerlösung getauchten Zahnstocher mit einer Frequenz von etwa 2Hz an einer Antenne stimuliert, solange bis entweder der Cut-Off (50 Stimuli) erreicht war, oder die Tiere auf 5 hintereinander dargereichte Stimuli nicht mit dem PER reagierten. Da es sich bei dem PER um eine Alles-oder-Nichts-Reaktion handelt (Rüssel rausgestreckt oder nicht rausgestreckt), gelangt man nach 5 Stimuli in den Bereich der Signifikanz (50%, 25%, 12,5%, 6,25%, **3,125%** Wahrscheinlichkeit des PER). Daher werden diese Tiere als habituiert betrachtet. Gezählt werden die Stimuli, bis zum Ausbleiben des PERs. Nun ist noch zu testen, ob es sich um eine Habituation oder eine Ermüdung handelt. Dazu werden die Tiere mit einer 1M Zuckerlösung an der anderen Antenne dishabituiert (Ermüdete Tiere würden hier nicht reagieren).

Von dem Experiment wurden die Tiere ausgeschlossen, die von Beginn an nicht auf die 1M Zuckerlösung reagierten, die Tiere, die nicht habituierten (mehr als 50 Stimuli) und auch die Tiere, die nicht dishabituierten.

3.2.9 Assoziative olfaktorische Konditionierung

Wenn nicht anders beschrieben, erfolgte das Training mit hungrig am Vortag eingespannten Tieren (keine Fütterung für ca. 17h – in der Regel über Nacht). Für die Konditionierung ist es wichtig, dass die Stimuli in zeitlicher Nähe und in der richtigen Reihenfolge präsentiert werden. In diesen Experimenten wird der Nelkenduft (konditionierter Stimulus – CS), mit einer 1M Zuckerlösung (unkonditionierter Stimulus – US) gepaart. Der Nelkenduft wurde, wie bei der Sensitisation (s. Kapitel 3.2.8) beschrieben, mit einer Spritze verabreicht. Nach etwa der Hälfte des Volumens aus der Spritze wurde eine 1M Zuckerlösung an einem Zahnstocher zunächst an den Antennen und dann, nach Herausstrecken des Rüssels, auch am Rüssel dargereicht. Die Präsentation dauerte etwa 6s. Wenn es sich bei dem Training um ein Training mit mehreren Trainingseinheiten (Drei-Trial-Training) handelt, so wurde zwischen

den einzelnen Trainingseinheiten ein Abstand von 2min eingehalten (Inter-Trial-Intervall). Die CS-US-Paarung wurde vor einem Abzug durchgeführt, der verhindert, dass die anderen Tiere mit dem CS in Kontakt kamen und auch der US nicht zu früh detektiert werden konnte. Durch Anblasen mit Nelkenduft, ebenfalls vor dem Abzug, wurde das Gedächtnis zu den Zeitpunkten 2h, 1d und 2d nach dem Training getestet. Die Tiere wurden, wie in Kapitel 3.2.1 beschrieben, gefüttert, frühestens jedoch 30min nach Abruf (2h, 1d und 2d). Die Injektion erfolgte wie in Kapitel 3.2.2 beschrieben. Der Zeitpunkt so wie die Zusammensetzung der verwendeten Lösungen für die Injektion, ist der jeweiligen Bildunterschrift des Experiments zu entnehmen.

3.2.10 Orale Applikation der Inhibitoren (TSA und 5-Azacytidin)

Für die orale Applikation von TSA und 5-Azacytidin wurden Käfige (s. Abb. 3-3 auf Seite 29) verwendet. Die adulten Bienen wurden mit der Plexiglaspyramide gefangen und zur einfacheren Überführung in den Käfig auf Eis immobilisiert. Die frisch geschlüpften Bienen wurden ohne Immobilisierung direkt in die Käfige überführt.

In den Käfigen wurden Wasser (Leitungswasser) und Futterteig [3 Teile Puderzucker; 1 Teil Honig] dargereicht. Für die orale Applikation wurde 1mg TSA in 200µl absolut Ethanol gelöst und dann auf den Puderzucker getropft und mit dem Futterteig verknetet. Für den ersten Versuch (s. Abb. 4-22 auf Seite 60) wurden 1mg TSA auf 6,6g Futterteig verfüttert, für die späteren Experimente wurde die Konzentration halbiert (1mg TSA auf 13,3g Futterteig).

Bei der oralen Applikation von 5-Azacytidin wurde 1,5mg in 6,6g Futter verwendet.

Die maximale Belegung eines Käfigs lag bei etwa 150 Tieren.

Die Tiere in den Käfigen wurden in einem Brutschrank mit hoher Luftfeuchtigkeit (Wanne mit Wasser) und einer Temperatur von 28°C gehalten.

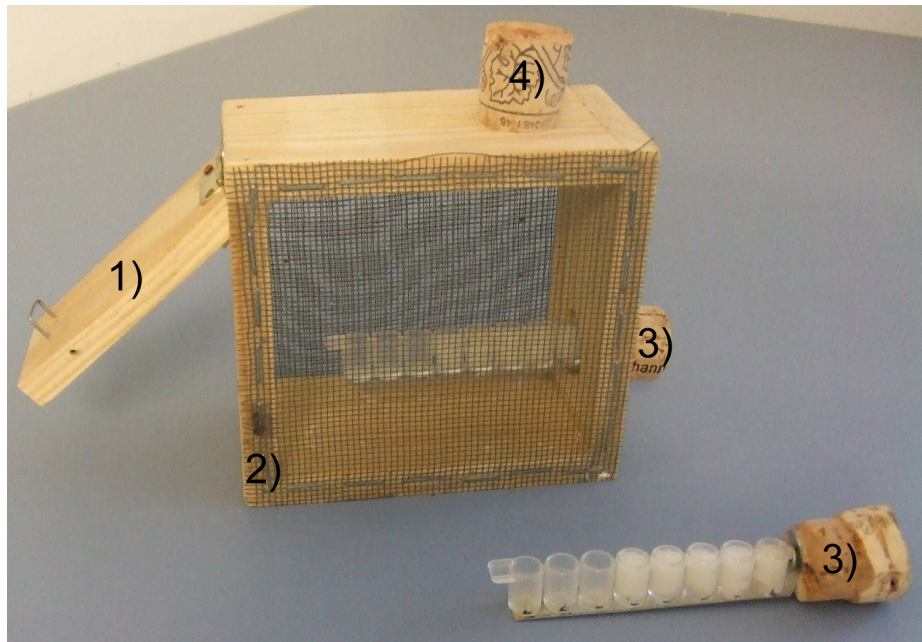


Abb. 3-3: Käfig für die orale Applikation der Inhibitoren mit zusätzlichem Futtertrog

Gezeigt ist ein Käfig, der für die orale Applikation von TSA verwendet wurde. 1) Tür; 2) Arretierungspin der Tür; 3) Futtertrog – die ersten 3 Wells wurden mit Wasser gefüllt, die restlichen 5 mit Futterteig; 4) Auslass zum Entnehmen kleiner Bienenmengen. Der Käfig ist auf beiden Seiten mit einem feinen Netz bespannt, durch das mit einer Kanüle Wasser nachgefüllt werden kann. Damit die Bienen besser das Klima in dem Käfig kontrollieren können, wurde zusätzlich zur Aufbewahrung in einem Brutschrank die mit Netz bespannten Seiten mit Pappe abgedeckt.

3.2.11 Kohortenbildung und Revertierung

Für die Kohorte wurden Waben mit schlüpfenden Bienen in einem Brutschrank bei 28°C gestellt. Die Bienen schlüpften dort bis maximal 3 Tage, dies definiert den Altersunterschied der Bienen im Experiment (Details s. Tab. 3-4 auf Seite 30). Die Bienen wurden anschließend in die Kohorten überführt. Für die kleinen Kohorten (600-800 Tiere) wurden Taunus-Begattungskästchen verwendet. In dem Honigraum wurde eine Honigwabe eingesetzt. In der Regel wurde nach etwa einem Tag die Königin dazugesetzt und die Kohorte 2 Tage ruhen gelassen. Anschließend wurde die Kohorte im Freien aufgestellt und geöffnet.

Für die große Revertierungskohorte wurden ca. 3000 Tiere und ein Ablegerkasten verwendet. Die Honigwabe wurde, wie die anderen Waben für die Eiablage auch, einfach eingehängt. Da es sich bei dieser großen Kohorte um sehr viele Tiere handelt, die über ein Zeitraum von 3 Tagen geschlüpft sind, wurde auf die Ruhezeit verzichtet und die Kohorte direkt ins Freie gestellt. Zudem wurde die Königin zunächst in einem Käfig in den Stock gehängt, so dass sich die Arbeiterinnen an die Königin gewöhnen konnten. Nach 2 Tagen der Eingewöhnung wurde der Verschluss am Käfig entfernt.

Normalerweise begannen die Tiere nach etwa 10 Tagen regelmäßig zu fliegen. Sie wurden mit Plakafarben (5 Farben für 5 verschiedene Tage im Laufe von etwa 10 Tagen) beim

Zurückkehren zum Ausflugsloch am Abdomen markiert. Die Tiere wurden für die Analyse etwa im Alter von 21 Tagen aus dem Stock entnommen.

Für die Revertierung wurde ein Teil der Brut zusammen mit einer Honigwabe und der Königin in einen neuen Ablegerkasten gesetzt, der an derselben Stelle aufgestellt wurde, an der die alte Kohorte stand. Die alte Kohorte wurde etwa 5-10m weiter entfernt aufgestellt. Die Bienen, die sich anhand von Orientierungsflügen gemerkt hatten, wo der Stock zu finden war, flogen zum neuen Stock, die anderen verblieben im Alten. So kommt es zur Auftrennung von Fliegern und Ammen. Bei der Revertierungskohorte wurde, da nicht genügend verschiedene Farben vorhanden waren, um insgesamt 10 Tage anzumalen, auf Mischungen (in der Regel mit Weiß) zurück gegriffen. Die Tiere der Revertierung waren zum Zeitpunkt der Präparation etwa 6 Wochen alt.

Als Flieger galten Tiere, die mindestens an drei verschiedenen Tagen geflogen sind (entweder die mit drei verschiedenen Farben markiert waren, oder die zwei verschiedene Farben trugen und beim Ausflug gefangen wurden). Als Ammen wurden Bienen definiert, die aufgrund ihrer Tätigkeit kopfüber in einer Wabe steckten, in der sich eine Larve befand.

Tab. 3-4: Details der Kohorten

#	Anzahl	Geschlüpft	Königin	Ruhezeit	Präparation	Revertierung	Präparation
1	~800	4./5.05.07	7.05.07	2 Tage	21.-25.05.07	-	-
2	~600-700	18./19.07.07	21.07.07	-	4.-8.08.07	-	-
3	~800	7.06.08	9.06.08	2 Tage	24.-27.06.08	-	-
4	~3000	4.-6.07.08	7.07.08	-	22.-25.07.08	26.07.08	8.-10.08.08

Ein – bedeutet, dass keine Ruhezeit eingehalten bzw. keine Revertierung durch geführt wurde.

Aus der Kohorte 4 wurden am 11./14./15.08.08 zum Zweck der Analyse einer genomweiten DNA-Methylierung Tiere präpariert. Die Ergebnisse dieser Analyse lagen bei Abgabe der Doktorarbeit noch nicht vor.

3.2.12 Ausflugexperiment

Die Tiere sind über Nacht in einem Brutschrank bei ca. 28°C geschlüpft. Die Tiere wurden einzeln mit einer Pinzette von den Waben gesammelt und anschließend mit Plakafarbe entsprechend der Gruppe (TSA oder Kontrolle) farblich markiert. Die so markierten Tiere wurden in die Käfige (je zwei pro Gruppe) für die orale Applikation gesetzt und im Brutschrank bei 28°C und hoher Luftfeuchtigkeit 4 Tage mit Kontrollfutter ohne Alkohol [10g Puderzucker; 3,3g Honig] gefüttert. Die Bienen wurden anschließend auf Kontrollfutter mit Alkohol [10g Puderzucker; 3,3g Honig; 200µl EtOH] bzw. auf TSA [1mg TSA in 200µl EtOH; 10g Puderzucker; 3,3g Honig] gesetzt. Dieses Futter wurde 2½ Tage verabreicht.

Anschließend wurden die beiden Gruppen $\frac{1}{2}$ Tage wieder auf Kontrollfutter ohne Alkohol gesetzt. Die Tiere wurden in eine Taunus-Begattungskasten überführt, 235 pro Gruppe und am Nachmittag nach draußen gestellt. Am nächsten Morgen wurden die verbliebenden Bienen im Stock gezählt.

3.2.13 Statistik

Zur Verifizierung der Ergebnisse wurden der T-Test (Microsoft Excel) und der Fischer Exakt Test (Statsoft Statistica) verwendet.

4 Ergebnisse

In dieser Arbeit soll die Wechselwirkung von Histonmodifikationen und Verhalten untersucht werden. Dafür ist es notwendig, Werkzeuge zu besitzen, die es ermöglichen, die Histonmodifikationen zu quantifizieren und zu manipulieren.

4.1 Etablierung einer Methode zur Quantifizierung der Histonmodifikationen

Es ist möglich mittels Antikörper und der ELISA (Enzyme-linked Immunosorbent Assay) Proteine und Proteinmodifikationen zu quantifizieren. Jedoch sind die Anforderungen an die Antikörper in der ELISA hoch. Daher ist eine wichtige Voraussetzung für die Verwendung der Antikörper in der ELISA ihre Güte. Unter der Güte eines Antikörpers oder Antikörpermischs (polyklonaler Antikörper) ist zu verstehen, dass a) keine weiteren Proteine detektiert werden, b) die Sensitivität ausreichend hoch ist und c) die Antikörper in der ELISA ein gutes messbares Signal erzeugen (Signal-Rausch-Verhältnis).

4.1.1 Test der Antikörper

Aufgrund der hohen Konservierung der Histone durch das gesamte Tierreich (s. Abb. 4-1) ist es möglich käuflich erwerbbare Antikörper zu verwenden, die nicht explizit für die Honigbiene produziert wurden.

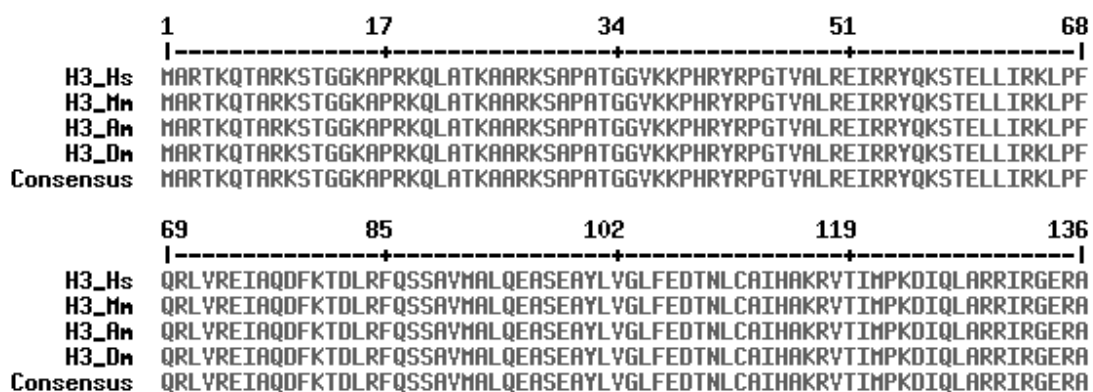


Abb. 4-1: Multialignment von Histon H3

Für dieses Alignment wurde das Histon H3.2 aus Mensch (*Homo sapiens* - H3_Hs), Maus (*Mus musculus* - H3_Mm), Honigbiene (*Apis mellifera* - H3_Am) und Fruchtfliege (*Drosophila melanogaster* - H3_Dm) verwendet. Die Sequenzen stammen von NCBI (www.ncbi.nlm.nih.gov). Von H3_Am sind noch keine Proteindaten veröffentlicht. Es handelt sich hier um das Ergebnis eines Proteinblast (tblastn) in der EST-Library des Honigbienenengensoms auf NCBI. Verwendetes Programm fürs Alignment: <http://bioinfo.genotoul.fr/multalin/multalin.html>

Diese Antikörper wurden mit Hilfe eines Westernblots auf ihre Tauglichkeit für die Verwendung in der ELISA überprüft. In diesem Rahmen wurden verschiedene Histonantikörper getestet (s. Tab. 4-1). Diese Arbeit beschränkt sich auf die Histone 3 und 4, da aus den bisherigen Veröffentlichungen eine Verbindung zwischen Modifikationen an diesen Histonen und Lernen und Gedächtnisbildung abzeichnet.

In den folgenden Experimenten wurden die Antikörper verwendet, die beide Voraussetzungen aus Tab. 4-1 erfüllen. Ausnahme ist lediglich der H3 Ac-9, da sich im ELISA gezeigt hat, dass das Signal-Rausch-Verhältnis von diesem Antikörper zu schlecht war. Dies kann zum einen daran liegen, dass der Antikörper sein Epitop nicht richtig erkennt, oder dass die Acetylierung am Lys-9 am Histon H3 in der Biene keine häufige Modifikation ist.

Die in Abb. 4-2 auf Seite 34 gezeigten Antikörper erfüllen die Kriterien für die Verwendung im ELISA. Bei dem Antikörper Met-4,1 zeigt sich eine sehr schwache weitere Bande, etwas unter 98kDa. Das Verhältnis der Bande, des Histons zu dem unbekannten Protein, ist 24:1, somit macht der Fehler in der ELISA etwa 4% aus. Vergleicht man diesen Fehler mit der Standardabweichung in der realen Messung (s. Abb. 4-19 auf Seite 57), so ist zu sehen, dass die Standardabweichung bei etwa 30% des Messwerts liegt und damit weit größer ist, als der Fehler durch die Detektion.

Tab. 4-1: Übersicht über die auf Bienenhirn getesteten Antikörper

Epitop	Erkennt Epitop	Erkennt keine weiteren Proteine	Firma
H3	X	X	Sigma-Aldrich
H3	X		Cellsignaling
H3 Ac-9	X	X	Epitomics
H3 Ac-18	X	X	Cellsignaling
H3 Ac-23			Cellsignaling
H3 Met-4,1	X	X*	Abcam
H3 Met-4,3	X		Abcam
H3 Met-27,3	X	X	Upstate
H4			Imgenex
H4 Ac-8	X		Upstate
H4 Ac-12	X		Upstate
H4 Ac-16			Upstate

Spezifikation des Antikörpers besteht aus: Bezeichnung des Histons (H3 o. H4); Art der Modifikation (Ac – Acetylierung, Met – Methylierung; Position der Modifikation (Zahl nach dem Bindestrich); Anzahl der Modifikationen (Zahl nach dem Komma)

*: Verhältnis von Epitop zu weiteren detektierten Proteinen ~ 24:1. Das entspricht einem Fehler von ca 4%.

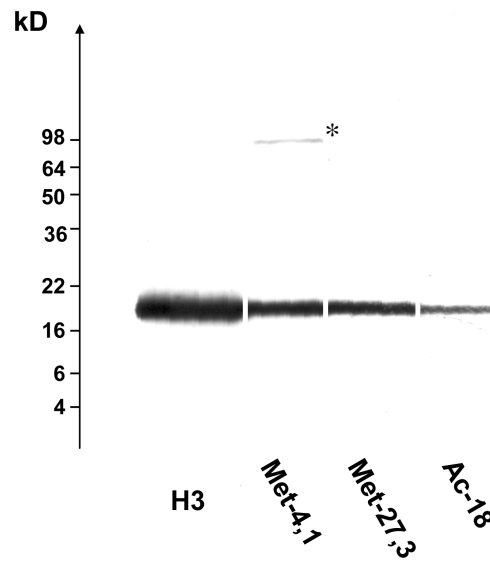


Abb. 4-2: Westernblot: Test der Antikörper H3, Met-4,1, Met-27,3, Ac-18 gegen Bienenhirn

H3: Histon 3; **Met-4,1:** Monomethylierung an Lysin 4 des Histons 3; **Met-27,3:** Trimethylierung an Lysin 27 des Histons 3; **Ac-18:** Acetylierung an Lysin 18 des Histons 3

*: s. Text unter Tab. 4-1 auf voriger Seite

4.1.2 Etablierung der ELISA

Um die Antikörper im ELISA verwenden zu können, ist es notwendig, dass sie ein lineares Detektionsverhalten zeigen, d.h. dass sie bei steigender Probenmenge zu einer linearen Zunahme der optischen Dichte (OD) bei der Nachweisreaktion führen (Lambert-Beersches Gesetz). Dies war bei dem H3 Antikörper für das einfache Homogenat (Bienenhirn in Histonhomogenisierungspuffer homogenisiert) nicht der Fall (s. Abb. 4-3 A auf Seite 36: H3 – PBS). Die Kurve stellt sich als stark gesättigt dar, mit einem Bereich, in dem es sogar zu einer Übersättigung und damit zu einem Signalabfall kommt. Weitere Verdünnung der Probe führte zu einer Verbesserung, sprich zu einer Linearisierung der Kurve (Daten nicht gezeigt). Die zu verwendende Verdünnung wäre ca. 1:64 von der Ausgangskonzentration (ein Zentralhirn in 250µl Homogenisierungspuffer).

Durch die starke Interaktion der Histone mit der DNA kann es sein, dass die Histone nicht von der DNA gelöst werden und es deswegen zu einer Beeinträchtigung der Histon-Detektion kommt. Es wurde daher getestet, ob denaturierende Bedingungen (Harnstoff) zu einer Verbesserung der Detektion führen. Bei der Verwendung von Harnstoff ist zu beachten, dass die räumliche Struktur der Epitope verlorengehen kann, weshalb die Antikörper das Epitop eventuell nicht mehr detektieren können. Daher ist von Fall zu Fall zu untersuchen, wie die Antikörper auf eine Behandlung der Probe mit Harnstoff reagieren.

Die Behandlung mit Harnstoff hebt die Sättigung nicht auf, eliminiert aber den Übersättigungseffekt (keine abnehmende OD bei den hohen Konzentration 4-16). Durch Zufall wurde der linearisierende Effekt des Einfrierens entdeckt. In Proben, in denen es durch Abkühlung zur Präzipitation des Harnstoff kam, wurde beobachtet, dass die resultierende Absorptionskurve linear war. Für die weiteren Versuche wurde wie in Abb. 4-3 die Proben bei -40°C eingefroren.

In Abb. 4-3 auf Seite 36 ist als Beispiel für die Histonmodifikationen der Antikörper Ac-18 gezeigt, die Daten für die anderen modifikationsspezifischen Antikörper werden aufgrund ihrer Ähnlichkeit zu den Ergebnissen des Ac-18 Antikörpers nicht gezeigt. Die Reduktion der Signale durch Harnstoff, bzw. durch Harnstoff und Frieren fielen bei den Antikörpern Met-4,1 und Met-27,3 leicht anders aus als bei Ac-18. Bei allen Dreien zeigte sich jedoch wie beim Ac-18, dass die in Harnstoff eingefrorenen Proben ein stärkeres Signal aufwiesen, als die Proben nur mit Harnstoff. Bei allen modifikationsspezifischen Antikörpern war die Probe ohne Harnstoff die Stärkste. Die Linearitätsverbesserung, die hier auch beim Ac-18 durch das im Harnstoff einfrieren zusehen ist, wurde bei den anderen Antikörper nicht beobachtet.

Die Steigung, die sich aus der Absorption der Verdünnungsreihe ergibt, ist ein Maß für die relative detektierte Probenmenge. In Abb. 4-3 B ist die Steigung der Ausgleichsgeraden für die jeweilige Behandlung wiedergegeben (relative detektierte Probenmenge). Hier zeigt sich, dass für den H3 Antikörper die Behandlung Harnstoff + Einfrieren zur stärksten Detektion führt, bei Ac-18 und den anderen Modifikationen (Daten nicht gezeigt) ist es die Probe, die nur im Homogenisierungspuffer (PBS) verbleibt, ohne weitere Behandlung.

Um eine Messung zu ermöglichen, die nicht von der eingesetzten Probenmenge abhängt, wird der H3 Antikörper zur Normalisierung verwendet, d.h. es wird für jede Probe die Modifikation und die Histonmenge gemessen. Anschließend wird der Wert der Histonmodifikation durch die Histonmenge geteilt und die so erhaltenen relativen Modifikationsstärken der einzelnen Proben miteinander zu einem Mittelwert verrechnet, der in einem Balkendiagramm wiedergegeben wird.

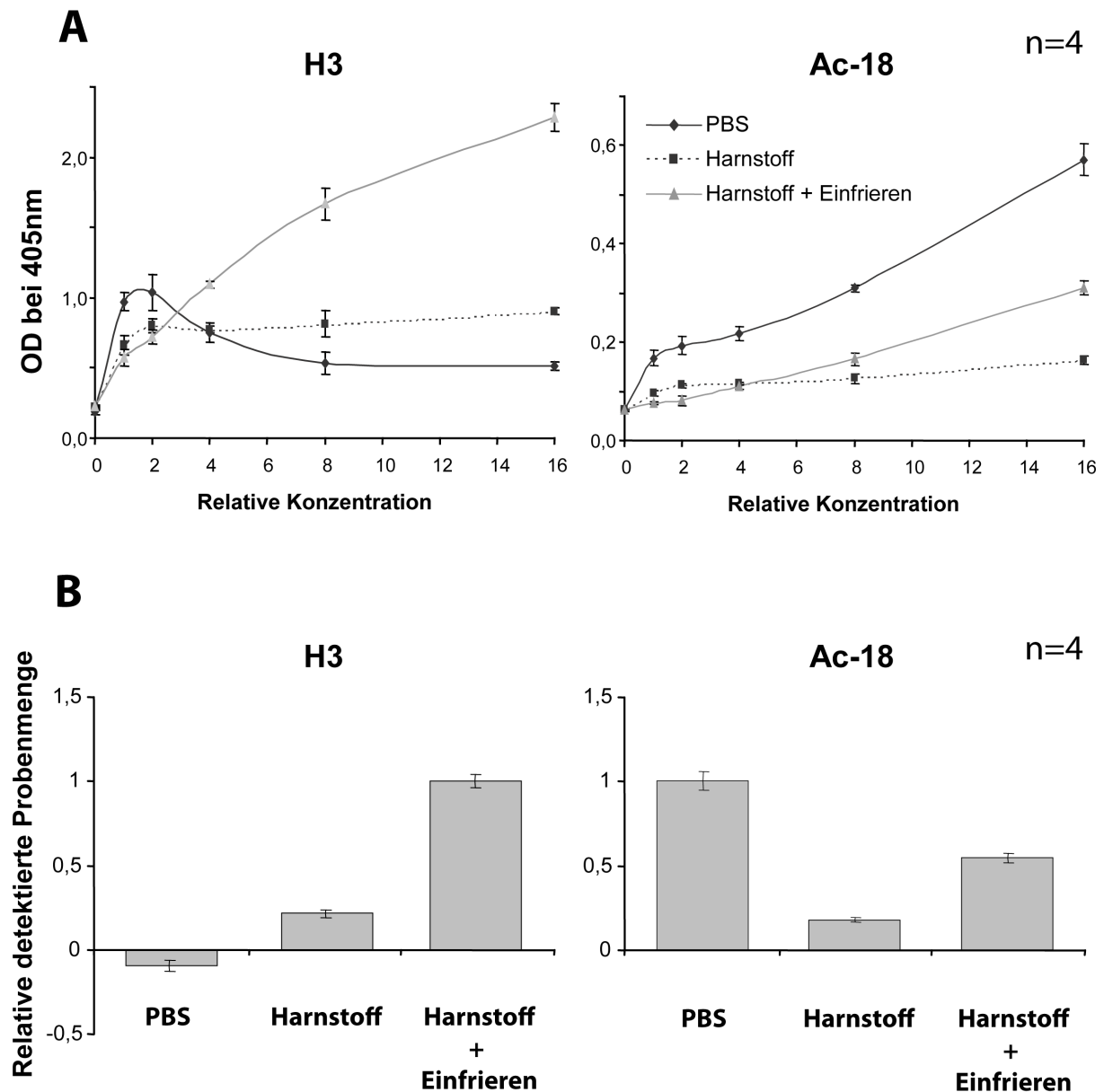


Abb. 4-3: Etablierung der ELISA

A) Zeigt die Mittelwerte der ELISA-Absorptionskurven der Antikörper H3 und Ac-18 gegen Verdünnungsreihen von Bienenhirnhomogenaten. Die Homogenate wurden unterschiedlich behandelt. Alle Proben wurden in Histonhomogenisierungspuffer homogenisiert und dann anschließend noch einmal 1:2 verdünnt mit:

PBS: Histonhomogenisierungspuffer

Harnstoff: Histonhomogenisierungspuffer mit Harnstoff

Harnstoff + Einfrieren: Histonhomogenisierungspuffer mit Harnstoff und zusätzliches Einfrieren bei -40°C

Fehlerbalken: Standardabweichung; n=4

B) Zeigt die Mittelwerte der Steigung der Ausgleichsgeraden der einzelnen Absorptionskurven aus A) für die Antikörper H3 und Ac-18. Dies entspricht der relativen detektierten Probenmenge.

Normiert auf das Maximum.

Fehlerbalken: Standardabweichung; n=4

Ob sich die jeweiligen Behandlungen der Proben für die Antikörper H3 und Ac-18 auch für die Detektion eines Acetylierungsunterschieds eignen, wurde mit Hilfe von Trichostatin A (TSA) getestet. Dazu wurden je 4 Tiere mit TSA-Lösung [0,2 µg/µl TSA in Kontrolllösung] und Kontrolllösung [PBS/DMSO 4:1] injiziert und 1h nach der Injektion präpariert. Die Proben wurden auf die beiden Behandlungen (PBS und Harnstoff + einfrieren) aufgeteilt.

Anschließend wurden alle Kombinationen zur Bildung des Verhältnisses aus Ac-18 und H3 gebildet. Die Zusammenfassung der Ergebnisse sind Tab. 4-2 zu entnehmen. Dabei war zu sehen, dass durch die Verwendung der Kombinationen aus Ac-18 und H3 in Harnstoff einfrieren (beide eingefroren) und Ac-18 im Homogenisierungspuffer und H3 in Harnstoff einfrieren (kombinierte Methode) eine erhöhte Acetylierung in TSA behandelten Tieren messbar war. Dabei war die Standardabweichung, wenn beide Antikörper auf Harnstoff eingefrorene Proben angewendet wurden, geringer als bei der kombinierten Methode. Für die Abb. 4-4 auf Seite 38 und Abb. 4-5 auf Seite 39 wurden die Proben für beide Antikörper in Harnstoff eingefroren. Da aber die anderen beiden Antikörper (Met-4,1 und Met-27,3) weniger gut auf die Harnstoffbehandlung reagierten und die Konzeption der Experimente nur einen sehr geringen Spielraum für die Probenaufteilung ließ, wurde in allen weiteren Experimenten die kombinierte Methode angewendet.

Tab. 4-2: Zusammenfassung der Ergebnisse der verschiedenen Probenbehandlungen

		Ac-18	
		PBS	Harnstoff + Einfrieren
H3	PBS	-	-
	Harnstoff + Einfrieren	+	+ *

Gemessen wurde das Verhältnis von Ac-18 / H3. Dargestellt ist, ob die jeweilige Probenbehandlung zu einer unterschiedlichen Acetylierungsdetektion entsprechend der TSA-Behandlung geführt hat (+) oder nicht (-). Kombinierte Methode: Probe für den Ac-18 in PBS, Probe für den H3 in Harnstoff eingefroren; Beide in Harnstoff eingefroren: Proben für Ac-18 und H3 in Harnstoff eingefroren. Die letztere Methode zeigte eine geringere Standardabweichung (*).

4.1.3 Wirkungsdauer des Inhibitor Mix (Trichostatin A und Valproat)

Wie bereits in vorherigen Paragraphen erwähnt, lässt sich mit der ELISA-Technik die relative Acetylierung bestimmen. Zu Beginn wurde ein Inhibitor Mix aus Trichostatin A (TSA) und Valproat (VPA) in den Thorax der Honigbiene injiziert. Das Gehirn dieser Honigbienen wurde dann zu bestimmten Zeitpunkten nach der Injektion (sofort - 0h; 1h; 2h; 4h), wie in Kapitel 3.2.3 beschrieben, präpariert, um so die Dauer der biologischen Wirksamkeit der Drogen zu untersuchen.

Wie zu erwarten, zeigt sich am Zeitpunkt 0h kein Unterschied zwischen den behandelten Tieren, da hier die Droge keine Möglichkeit besitzen sollte vom Torax ins Gehirn zu gelangen. Bei 1h und 2h zeigt sich eine starke Erhöhung der Acetylierung in TSA behandelten Tieren. Signifikant sind nur die 2h, weil bei 1h die Probenanzahl zu gering ist. Nach vier Stunden ist die Wirkung soweit abgeklungen, dass der Unterschied nicht mehr signifikant ist. Der Inhibitor mix zeigt bei der Lys-18 Acetylierung am H3 eine sehr lang andauernde Wirkung, die erst nach mehr als 4h Stunden abklingt.

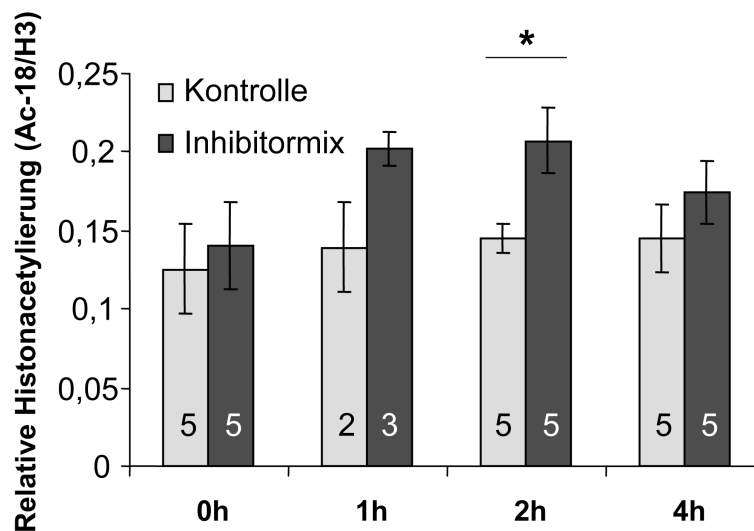


Abb. 4-4: Kinetik der biologischen Wirksamkeit des HDAC-Inhibitor mixes

Wirkungsdauer des Inhibitor mixes aus Trichostatin A (TSA) und Valproat (VPA) gemessen durch die relative Acetylierung an Position 18 am Histon 3. Wiedergegeben sind die Mittelwerte der Verhältnisse aus Ac-18 und H3 (n = Zahl im Balken). Die Bienen wurden mit 1µl der entsprechenden Lösung in den Thorax injiziert. Anschließend wurden die Gehirne wie in Kapitel 3.2.3 beschrieben zum entsprechenden Zeitpunkt (0h, 1h, 2h, 4h) präpariert. **Kontrolle:** PBS/DMSO 4:1 (Kontrolllösung); **Inhibitor mix:** TSA 0,2µg + VPA 0,6µg pro Biene in Kontrolllösung.

Fehlerbalken: Standardabweichung

*: $P \leq 0,05$ (T-Test)

4.1.4 Auftrennung des Inhibitor mixes

Der Inhibitor mix wurde zu Beginn verwendet, um eine möglichst starke und breite Wirkung zu erzielen. Da nur eine Acetylierungsstelle untersucht wurde, hätte es sein können, dass der eine Inhibitor einen stärkeren Einfluss auf die Acetylierung an dieser Position hat, als der andere.

Im folgenden Versuch soll die Wirkung der einzelnen Inhibitoren zum 2h-Zeitpunkt untersucht werden.

In Abb. 4-5 auf Seite 39 zeigt sich, dass Valproat alleine zu keiner signifikanten Erhöhung des Acetylierungslevels zu diesem Zeitpunkt führt, anders als TSA und die Kombination aus TSA und VPA. Es sieht sogar so aus, als ob es bei der Kombination zu synergistischen Effekten kommt, da die Erhöhung der Acetylierung durch VPA alleine kleiner ist, als die Differenz aus

TSA und TSA + VPA. Dies kann aber bei der geringen Probenanzahl nicht verifiziert werden (TSA zu TSA + VPA n.s.). In den weiteren Experimenten wurde nur noch TSA verwendet, weil die Inhibition durch TSA trotz geringerer Dosis (Stoffkonzentration im Experiment: TSA zu VPA ~ 1:6) stärker ist, als die von VPA.

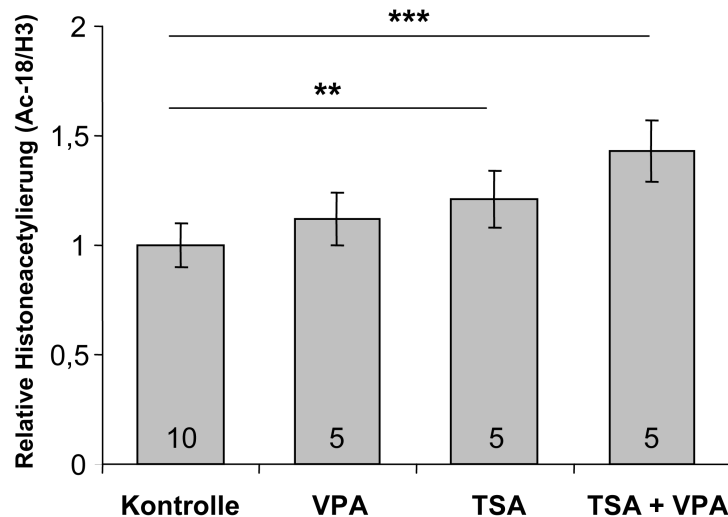


Abb. 4-5: HDAC-Inhibition durch VPA, TSA und TSA + VPA (anhand von Ac-18 an H3)

Dargestellt sind die Mittelwerte des Verhältnisses von Ac-18 zu H3, normalisiert auf die Kontrolle (n = Zahl im Balken). Die Bienen wurden mit 1µl der entsprechenden Lösung 2h vor der Präparation in den Thorax injiziert. Die Gehirne wurden wie in Kapitel 3.2.3 beschrieben präpariert. **Kontrolle:** PBS/DMSO 4:1 (Kontrolllösung); **VPA:** Valproat 0,6µg pro Biene in Kontrolllösung; **TSA:** Trichostatin A 0,2µg pro Biene in Kontrolllösung; **TSA + VPA:** Inhibitormix aus der Kombination von TSA und VPA (Konzentrationen s. VPA und TSA) in Kontrolllösung; ***: $P < 0,001$; **: $P < 0,01$ (T-Test)

4.2 Modifikation der Chromatinstruktur und Verhalten der Honigbiene

Da es durch die oben gezeigten Methoden möglich ist, Histonmodifikationen zu quantifizieren, und im Falle der Acetylierung es sogar möglich ist, die Modifikation zu beeinflussen, soll im Folgenden untersucht werden, welchen Einfluss die Beeinflussung der Chromatinstruktur auf das Verhalten der Honigbiene hat. Zum einen soll dabei der Einfluss der Histonacetylierung und DNA-Methylierung im appetitiven Lernen untersucht und zum anderen die Wechselwirkungen von Histonmodifikation und Aufspaltung in die Aufgabenbereiche der Arbeiterin als Beispiel natürlichen Verhaltens beleuchtet werden.

4.2.1 Einfluss der Histonacetylierung beim appetitiven Lernen

Im Folgenden soll der Einfluss der Histonacetylierung auf verschiedene Aspekte von Lernen und Gedächtnisbildung untersucht werden. Zunächst werden die Wechselwirkungen zwischen unkonditioniertem Stimulus (US) und Histonmodifikation untersucht, dann der Einfluss von

Histonacetylierung auf nicht-assoziative (Sensitisierung und Habituation) und assoziative Lernformen.

Diese Arbeit konzentriert sich dabei zum einen auf die Acetylierung, weil es die einzige Histonmodifikation ist, die sich gezielt verändern lässt, und zum anderen auf das appetitive Lernen, da es im Zusammenhang mit der Histonacetylierung noch in keinem System untersucht wurde.

4.2.1.1 Wechselwirkung von Histonmodifikation und US

Der unkonditionierte Stimulus (US) ist im appetitiven Lernen eine Futterbelohnung. Da die Belohnungsstärke, und damit auch die Stärke des US, stark vom Sättigungszustand des Tieres abhängt, soll in diesem Experiment der Einfluss des Sättigungszustands auf die Histonmodifikationen untersucht werden.

Histonmodifikationen sind mit verantwortlich für die Regulation der Transkription und sind damit Regulatoren eines energieverbrauchenden Prozesses. Der Sättigungszustand könnte also auch einen Einfluss auf die Histonmodifikationen besitzen.

In Abb. 4-6 ist zu sehen, dass die sattierten Tiere eine höhere Acetylierung an Position 18 am Histon H3 aufweisen, als die hungrigen Tiere; die anderen Histonmodifikationen sind unbeeinflusst.

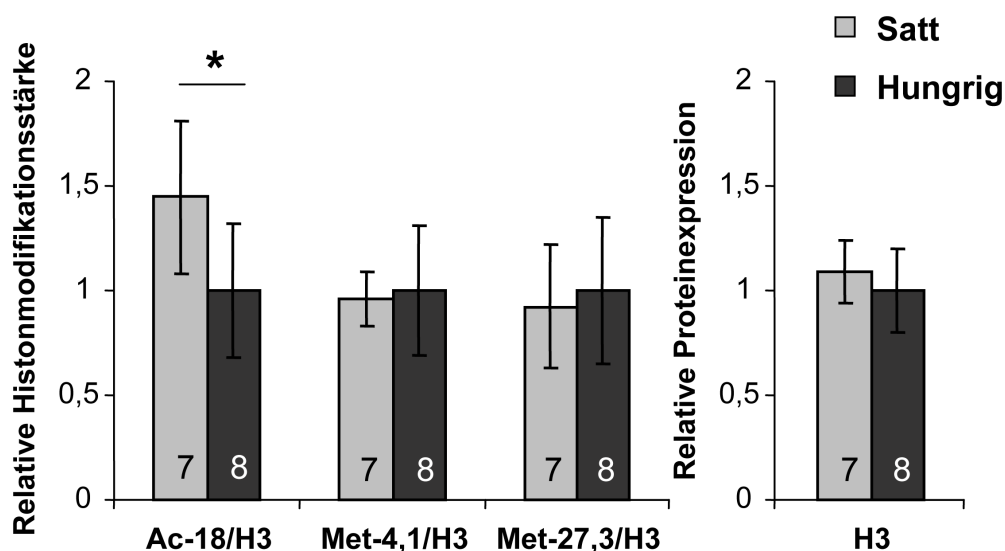


Abb. 4-6: Einfluss des Ernährungszustands auf Histonmodifikationen

Wiedergegeben sind die Mittelwerte der Verhältnisse aus der entsprechenden Histonmodifikation (Ac-18, Met-4,1 und Met-27,3) und H3, sowie die detektierte Menge von H3 (n = Zahl im Balken), normalisiert auf die hungrigen Tiere. Der Fehlerbalken gibt die Standardabweichung wieder. **Satt:** Bienen wurden über 2 Tage 3 mal täglich mit 2-5 Tropfen Zuckerlösung gefüttert; **Hungrig:** Bienen wurden nur am Abend des ersten Tages mit 5 Tropfen gefüttert

*: $P < 0,05$ (T-Test)

Satte Tiere können die Stimulierung mit Zuckerwasser, der in den Lernexperimenten als US verwendet wird, zwar wahrnehmen, sie reagieren aber, im Gegensatz zu hungrigen Tieren, nicht mit dem Rüsselreflex darauf. Nun stellt sich die Frage, wenn der Sättigungszustand einen Einfluss auf die Histonacetylierung besitzt, wie wirkt sich dann eine künstlich erhöhte Acetylierung auf die US-Wahrnehmung aus?

Im folgenden Experiment soll daher geklärt werden, welchen Einfluss TSA auf die Zuckerwasser-Empfindlichkeit und damit auf die Wahrnehmung des unconditionierten Stimulus (US) in der appetitiven Konditionierung in der Honigbiene haben könnte.

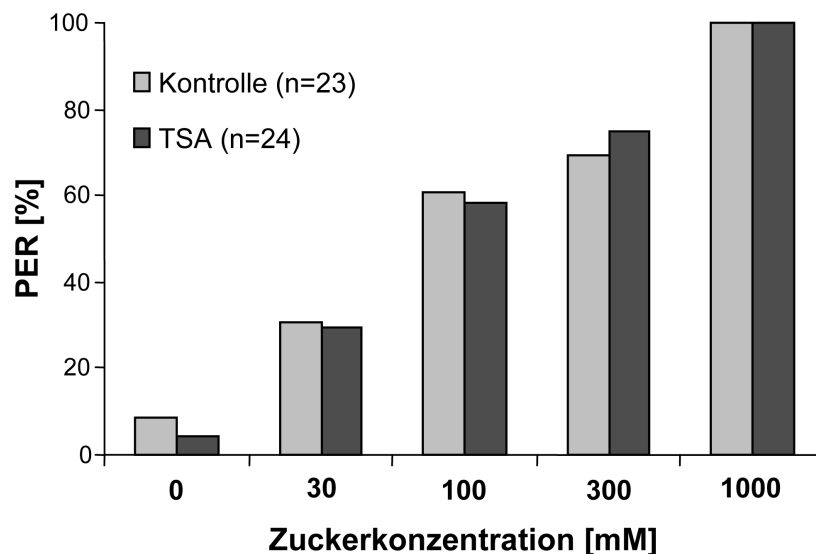


Abb. 4-7: Einfluss von TSA auf die Empfindlichkeit gegenüber verschiedenen Zuckerkonzentrationen

Gezeigt ist die Anzahl der Tiere in %, die auf den gegebenen Stimulus (Zuckerkonzentration in Lösung) an der Antenne mit dem PER reagierten. Die Tiere wurden 2h vor dem Test mit 1µl der entsprechenden Lösung injiziert.

Kontrolle: Kontrolllösung (PBS/DMSO 4:1); **TSA:** 0,5µg/µl Trichostatin A in Kontrolllösung. Die Anzahl der Tiere ist in Klammern hinter der Gruppenbezeichnung in der Legende vermerkt.

Wie Abb. 4-7 zu entnehmen ist, hat die Injektion mit TSA 2h nach der Injektion zu keiner Veränderung der Empfindlichkeit gegenüber Zuckerwasser geführt. Es gibt also keinen Einfluss von TSA auf die US-Empfindlichkeit im appetitiven Lernen der Honigbiene.

4.2.1.2 Einfluss von TSA auf nicht-assoziatives Lernen

In den nächsten Experimenten sollen die Auswirkungen von TSA auf nicht-assoziatives Lernen untersucht werden (Sensitisierung und Habituation). Bei den nicht-assoziativen Lernformen reagiert das Tier unterschiedlich auf ein und desselben Stimulus, abhängig von vorangegangenen Ereignissen.

Die Zeitpunkte der Messung wurden so gewählt, dass beide Untersuchungen hintereinander durchgeführt werden konnten. Dabei wurde zunächst die Sensitisierung etwa eine Stunde und anschließend die Habituation etwa zwei Stunden nach der Injektion von TSA durchgeführt.

a) *Einfluss von TSA auf die Sensitisierung*

Bei der Sensitisierung kommt es zu einer Verstärkung der Reaktion auf einen gegebenen Stimulus.

Die hier durchgeführte Sensitisierung verwendet eine Stimulation mit einer 1M Zuckerlösung an der Antenne, um das Tier in einen Zustand erhöhter Erregung zu versetzen. In dem Zustand erhöhter Erregung reagieren die Tiere vermehrt mit dem Herausstrecken des Rüssels (PER). In Abb. 4-8 A auf Seite 42 ist der Ablauf des Sensitierungs-Experiments dargestellt. Die Tiere wurden zweimal mit Nelkenduft (neutraler Stimulus) getestet, einmal 2min vor und einmal 20sec nach der Sensitisierung. Die Ergebnisse der Tests sind in Abb. 4-8 B zu sehen. Dabei zeigt sich, dass es zu keinem Unterschied zwischen TSA- und Kontrolltieren kommt. Ebenso ist die Spontanreaktionen in beiden Gruppen vor der Sensitisierung gleich.

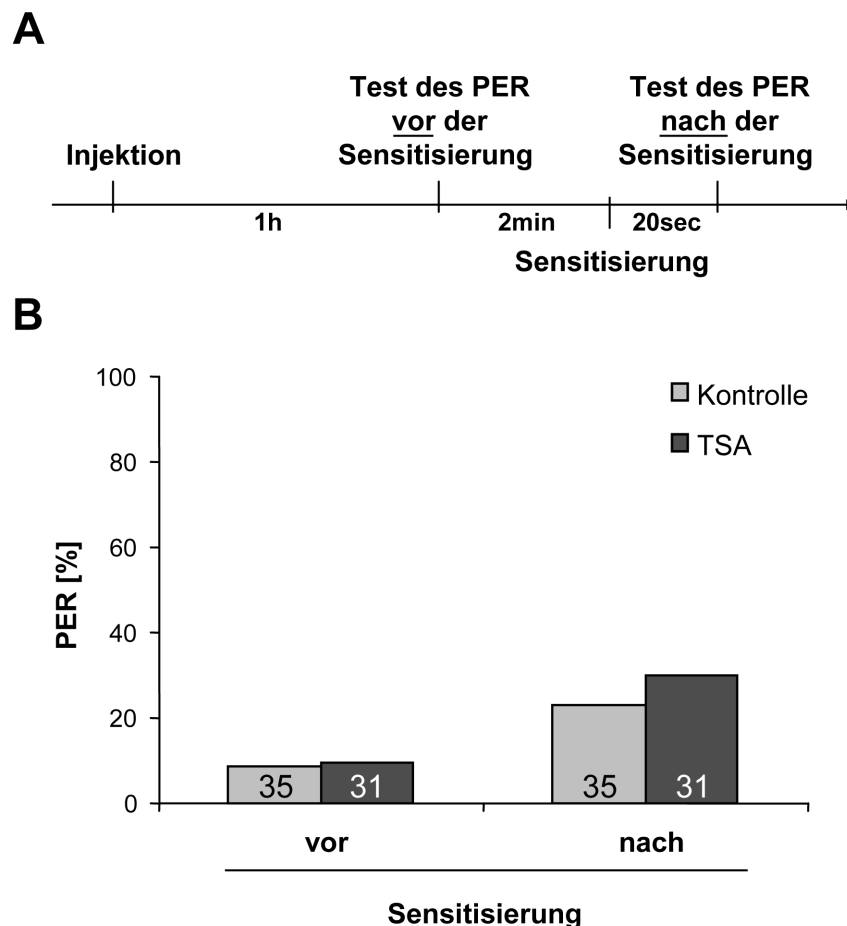


Abb. 4-8: Einfluss von TSA auf die Sensitisierung

A) Ablauf des Sensitierungs-Versuchs; B) Wiedergegeben ist die Anzahl der Tiere in %, vor und nach der Sensitisierung mit 1M Zuckerlösung an der Antenne, die auf den Nelkenduft mit dem PER reagiert haben (n = Zahl im Balken); Die Tiere wurden 1h vor dem Versuch mit 1µl der entsprechenden Lösung injiziert. **Kontrolle:** Kontrolllösung (PBS/DMSO 4:1); **TSA:** Trichostatin A 0,5µg/µl in Kontrolllösung. Von dem Experiment wurden alle Bienen ausgeschlossen, die nicht auf 1M Zuckerlösung reagiert haben (keine Sensitisierung). Die Anzahl der ausgeschlossenen Bienen war für beide Gruppen in etwa gleich.

b) *Einfluss von TSA auf die Habituation*

Bei der Habituation kommt es zu einer Abschwächung der Reaktion auf einen gegebenen Stimulus, bis hin zu dessen Ausbleiben.

Dies wird in diesem Fall durch eine ständig wiederholte Stimulierung (Frequenz etwa 2Hz) an einer Antenne mit einer 1M Zuckerlösung erreicht. Die Stimulation an der Antenne, die normalerweise zum PER führt, wird am Ende aufgrund der vorangegangenen Stimulationen vom Tier ignoriert. Um zu überprüfen, ob es sich beim Ausbleiben des PER nicht um eine Ermüdung des Tieres handelt, wurden die Tiere dishabituiert. Die Dishabituation wird dabei genauso wie die Habituation mit einer 1M Zuckerlösung durchgeführt, nur wird dabei die andere Antenne stimuliert.

Bei der Habituation wird getestet, wie häufig der Stimulus (Zuckerlösung) gegeben werden muss, bis das Tier auf den an der Antenne dargereichten Stimulus nicht mehr mit dem PER reagiert. Von dem Experiment wurden alle Tiere ausgeschlossen, die nach 50 Stimuli (Cut-Off) noch immer nicht habituierten, sowie alle Tiere, die nach der Habituation nicht dishabituierten. Die beiden untersuchten Gruppen (Kontrolle und TSA) unterschieden sich nicht in den ausgeschlossenen Tieren.

Es zeigt sich, dass auch die Habituation nicht durch TSA beeinflusst wird (s. Abb. 4-9). Somit zeigt sich, dass TSA keinen Einfluss auf nicht-assoziatives Lernen besitzt. Diese Experimente deuten darauf hin, dass es durch TSA zu keiner Veränderung der CS- und US-Prozessierung kommt.

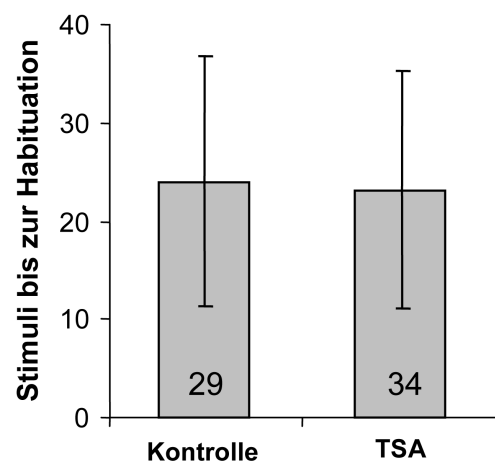


Abb. 4-9: Einfluss von TSA auf die Habituation

Dargestellt sind die Mittelwerte der Anzahl gegebenen Stimuli (1M Zuckerlösung) an einer der beiden Antennen, bis zum Ausbleiben des PER (Habituation). Die Frequenz der Stimuli lag bei etwa 2Hz. Die Anzahl der untersuchten Tiere ist durch die Zahl im Balken wiedergegeben. Der Fehlerbalken entspricht der Standardabweichung. Das Tier galt als habituiert, wenn es auf 5 aufeinander folgende Stimuli nicht reagierte (Erreichen des Signifikanzlevels bei einer Alles-oder-Nichts-Reaktion). Die Dishabituation erfolgte im Anschluss an die Habituation durch Stimulierung der anderen Antenne mit einer 1M Zuckerlösung.

Die Tiere für dieses Experiment wurden ca. 2h vor der Untersuchung mit 1µl der entsprechenden Lösung injiziert.

Kontrolle: Kontrolllösung (PBS/DMSO 4:1); **TSA:** Trichostatin A 0,5µg/µl in Kontrolllösung

4.2.1.3 Einfluss von TSA auf assoziatives Lernen und Gedächtnisbildung

In der Literatur existieren bisher nur Daten über den Einfluss von TSA auf das Gedächtnis von Vertebraten. Die meisten Untersuchungen wurden dabei mit aversiven Lernparadigmen vorgenommen. Daher soll im Folgenden die Wirkung von TSA in der appetitiven Konditionierung untersucht werden.

Dabei wird im appetitiven Lernen ein konditionierter Stimulus (CS), in diesem Experiment Nelkenduft, mit einer Futterbelohnung (Zuckerlösung) gepaart. Dabei bildet sich ein transkriptionsabhängiges Gedächtnis aus, wenn die CS-US-Paarung wie im Drei-Trial-Training mehrmals präsentiert wird. Dagegen bildet sich bei einer einmaligen Präsentation wie beim Ein-Trial-Training kein transkriptionsabhängiges Gedächtnis aus.

a) Einfluss der Trainingsstärke auf den TSA-Effekt

In den folgenden Versuchen soll der Einfluss von TSA auf das assoziative Lernen und Gedächtnis in Abhängigkeit der Trainingsstärke untersucht werden. Der Trainingszeitpunkt wurde, wie auch schon bei den nicht-assoziativen Lernformen, so gewählt, dass das Training unter dem Einfluss von TSA stattfand (2h nach der Injektion).

In Abb. 4-10 auf Seite 46 ist der Einfluss von TSA auf das assoziative Lernen und Gedächtnis zu sehen; dabei nimmt die Trainingsstärke von A nach C ab. Zunächst ist zu erkennen, dass TSA keinen Einfluss auf den Lernprozess hat. Wie Abb. 4-10 A zu entnehmen ist, unterscheiden sich die beiden Gruppen (TSA und Kontrolle) im Training nicht voneinander (1.-3. Trial). Das Gedächtnis unterscheidet sich erst ab einem Tag nach dem Training. Der Gedächtnisabruf bei 2h ist bei keinem der drei Trainingsintensitäten unterschiedlich. Bei dem starken Drei-Trial-Training ist beim Abruf am ersten Tag nur eine Tendenz zu sehen, der Unterschied ist nicht signifikant. Dies kann daran liegen, dass die Gruppengröße geringer war, als bei den anderen Versuchen (Abb. 4-10 B und C).

Aus appetitiven Konditionierungsversuchen mit Actinomycin D (ActD), einem Transkriptionsblocker, ist bekannt, dass sich ein transkriptionsabhängiges Gedächtnis in der Honigbiene erst nach dem zweiten Tag und auch nur beim Drei-Trial-Training zeigt [64, 190]. Dies ist im Vergleich mit der Maus, die bereits am ersten Tag ein transkriptionsabhängiges Gedächtnis aufweist, recht spät. Daher kann davon ausgegangen werden, dass der TSA-Effekt transkriptionsunabhängig ist. Transkriptionsunabhängige Effekte sollten sich aber auch im Ein-Trial-Training zeigen, bei dem kein transkriptionsabhängiges Gedächtnis induziert wird. Um dies zu überprüfen, wurde die Trainingsstärke reduziert. Dabei zeigt sich, dass mit abnehmender Trainingsstärke das Verhältnis des Gedächtnisses am ersten Tag zwischen TSA

und Kontrolle zunimmt (s. Abb. 4-11 auf Seite 47), d.h. je schwächer das Training, desto größer ist die relative Wirkung von TSA. Zu sehen ist, dass in beiden Ein-Trial-Trainingsexperimenten die TSA-Gruppe ein Gedächtnis am ersten Tag von ca. 40% erreicht. Dies deutet darauf hin, dass das durch TSA induzierte Gedächtnis nicht durch die Fütterung beeinflusst wird.

Alle bisher veröffentlichten Daten zeigen, dass der Einfluss der HDAC-Inhibitoren auf Lernen und Gedächtnisbildung transkriptionsabhängig ist. Daher ist die frühe Beeinflussung des Gedächtnisses, sowie die Beeinflussung des Gedächtnisses des Ein-Trial-Trainings höchst unerwartet.

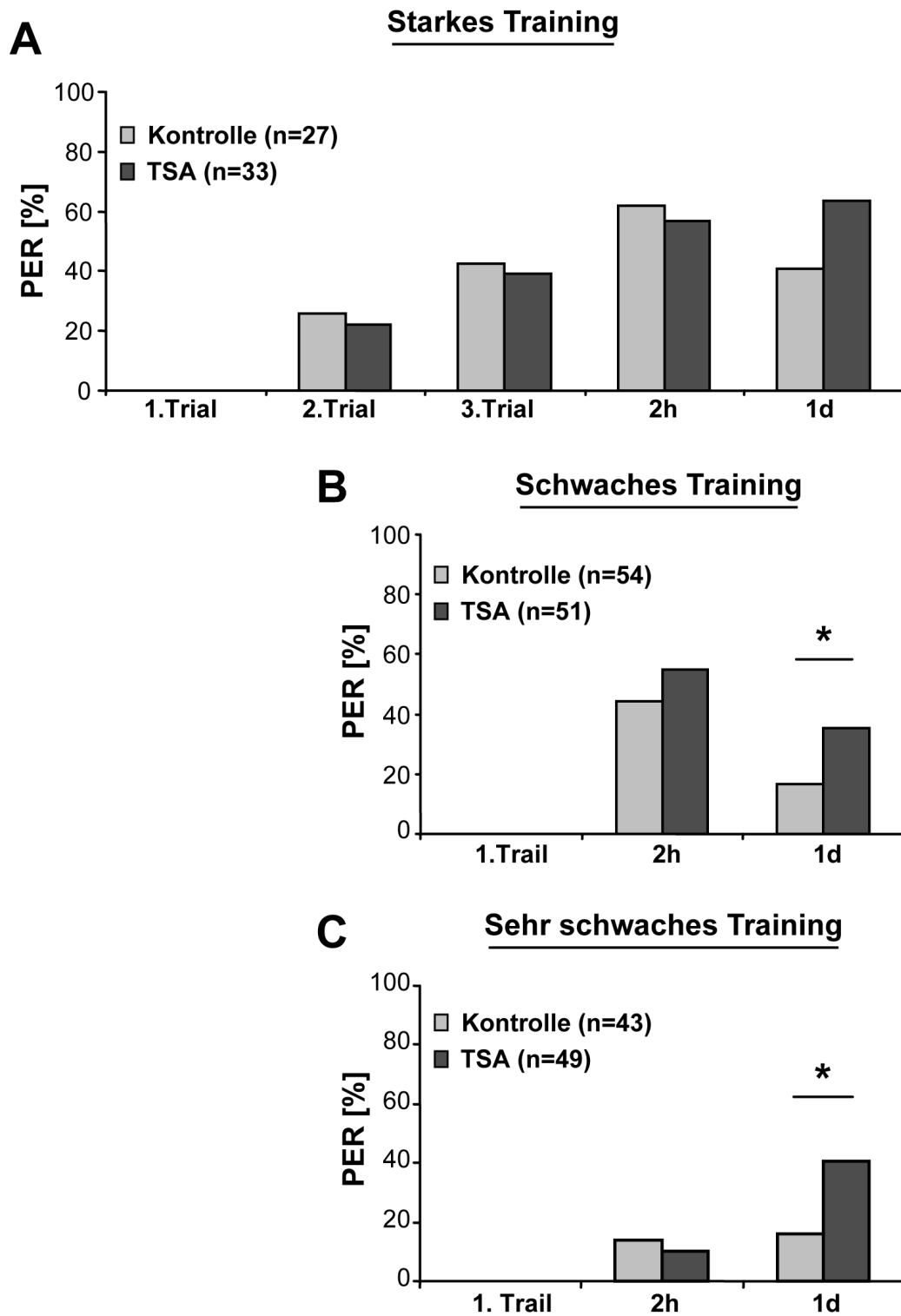


Abb. 4-10: Einfluss von TSA auf assoziatives Lernen und Gedächtnis bei verschiedenen Trainingsstärken

Dargestellt ist die Anzahl der Bienen in %, die auf den Nelkenduft (CS) mit dem PER reagierten. Training (Lernphase): CS-US-Paarung (1. – 3.Trial), Gedächtnisabruf: Nur CS Präsentation (2h, 1d). Die Bienen wurden 2h vor dem Training mit 1µl der entsprechenden Lösung injiziert. **Kontrolle:** Kontrolllösung (PBS/DMSO 4:1); **TSA:** Trichostatin A 0,5µg/µl in Kontrolllösung. Die Anzahl der Tiere ist in Klammern hinter der Gruppenbezeichnung in der Legende vermerkt. **A) Starkes Training:** Drei-Trial-Training mit einem Trainingsintervall von 2 min; **B) Schwaches Training:** Ein-Trial-Training; **C) Sehr schwaches Training:** Die Bienen wurden vor dem Ein-Trial-Training zusätzlich gefüttert.

*: $P < 0,05$ (Fischer Exakt Test)

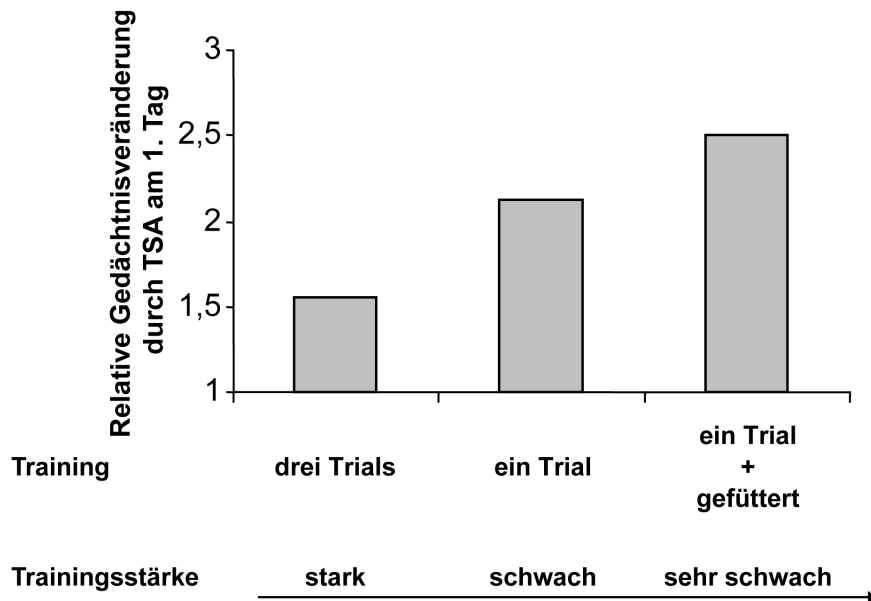


Abb. 4-11: Abhängigkeit des TSA-Effekts von der Trainingsstärke

Gezeigt ist die relative Gedächtnisveränderung in Abhängigkeit von der Trainingsstärke (Ratio TSA-Tiere / Kontroll-Tiere am 1. Tag) aus Abb. 4-10 auf Seite 46.

b) Einfluss des Injektionszeitpunkts auf den TSA-Effekt

Das assoziative Gedächtnis stellt sich als komplexes System aus ineinander greifenden Phasen dar, die durch verschiedene Kaskaden gesteuert werden. Die ersten Phasen der Gedächtnisbildung bestehen aus der Lern- (Etablierung des Gedächtnisses) und der Konsolidierungsphase (Festigung des Gedächtnisses).

Die bisherigen Experimente wurden alle so durchgeführt, dass TSA 2h vor dem Training injiziert wurde. Da, wie aus Abb. 4-4 auf Seite 38 bekannt, die HDAC-Inhibitoren sehr lange wirksam sind (über 4h), reicht die Wirkung von TSA von der Lernphase bis weit in die Konsolidierungsphase hinein. Um eine Idee zu bekommen, in welcher dieser Phasen TSA seine Wirkung entfaltet, wurde der Zeitpunkt relativ zum Training variiert.

Dazu wurden Experimente durchgeführt, in denen die Tiere zuerst trainiert und anschließend zu verschiedenen Zeitpunkten mit TSA injiziert wurden. Dabei zeigt sich der bereits bekannte TSA-Effekt (s. Abb. 4-12 auf Seite 48) für den Zeitpunkt 30min nach dem Training. Der 4h-Zeitpunkt zeigt nur noch eine Tendenz, der Unterschied ist nicht mehr signifikant, was an dem allgemein sehr geringen Gedächtnis am ersten Tag liegen könnte (s. Abb. 4-12 B). Dagegen scheint sich der Effekt bei der Injektion 6h nach dem Training umzukehren, hier sind die Kontrolltiere besser als die TSA-Tiere. Es handelt sich hier aber ebenfalls nur um eine Tendenz, die Werte sind nicht signifikant unterschiedlich.

Die Ergebnisse zeigen, dass TSA nicht bei der Etablierung des Gedächtnisses wirkt, sondern erst während der Konsolidierung, da sich der TSA-Effekt auch einstellt, wenn TSA nach dem Training injiziert wird.

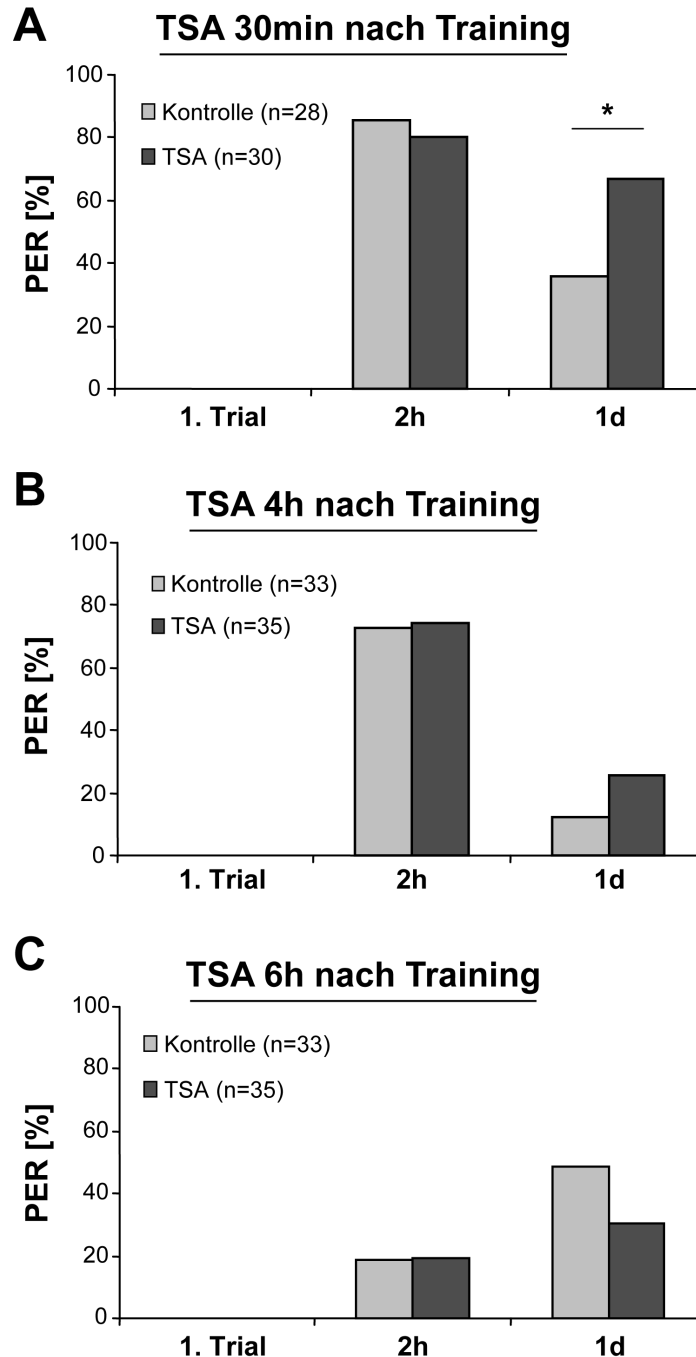


Abb. 4-12: Einfluss des Injektionszeitpunkts auf den TSA-Effekt – Injektion erfolgte nach dem Training

Dargestellt ist die Anzahl der Bienen in %, die auf den Nelkenduft (CS) mit dem PER reagierten. Training (Lernphase): CS-US-Paarung (1. Trial), Gedächtnisabruf: Nur CS Präsentation (2h, 1d). Die Tiere wurden zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach dem Training mit 1µl der entsprechenden Lösung injiziert: **A)** 30min; **B)** 4h; **C)** 6h. **Kontrolle:** Kontrolllösung (PBS/DMSO 4:1); **TSA:** Trichostatin A 0,5µg/µl in Kontrolllösung. Die Tiere wurden vor dem Training gefüttert (s. Abb. 4-10 C auf Seite 46). Das Gedächtnis bei 2h liefert einen Hinweis darauf, dass die Tiere bei A) und B) nicht ausreichend vor dem Training gefüttert wurden. Die Anzahl der Tiere ist in Klammern hinter der Gruppenbezeichnung in der Legende vermerkt. Bei B) und C) wurde die Injektion erst nach dem 2h Gedächtnisabruf durchgeführt, was es erlaubt, die Tiere nach ihrem Gedächtnis bei 2h gleichmäßig auf die Gruppen zu verteilen.

*: $P < 0,05$ (Fischer Exakt Test)

Die Abhängigkeit des TSA-Effekts ist in Abb. 4-13 noch einmal zusammengefasst, inklusive des Zeitpunktes 2h vor dem Training. Wiedergegeben ist das Verhältnis aus dem Gedächtnis von TSA-Tieren zu Kontrolltieren, in Abhängigkeit des Injektionszeitpunkts relativ zum Trainingszeitpunkt. Dabei ist zu erkennen, dass die Verstärkung von TSA auf einem ähnlich hohen Niveau bleibt, um dann bei dem 6h-Zeitpunkt rapide abzufallen. Es sieht so aus, als ob TSA nicht nur seine Wirkung verlieren würde, sondern dass sich die Wirkung von TSA umkehrt.

Da die Daten an dieser Stelle nicht signifikant sind, stellt das jedoch nur eine Tendenz dar, die durch weitere Experimente verifiziert werden muss.

Aus den Daten lässt sich ableiten, dass TSA in einem recht engen und spezifischen Zeitfenster (~1h nach dem Training [30min + 10-20min bis TSA zum Hirn transportiert wurde] bis ~5h nach dem Training) wirkt, was auch auf einen spezifischen Wirkmechanismus von TSA auf die Gedächtnisbildung schließen lässt.

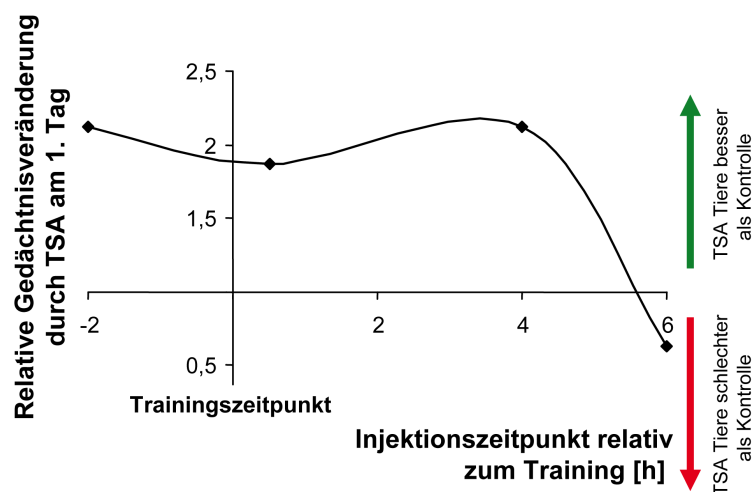


Abb. 4-13: Abhängigkeit des TSA-Effekts vom Injektionszeitpunkt

Gezeigt ist die relative Gedächtnisveränderung in Abhängigkeit vom Injektionszeitpunkt (Ratio TSA-Tiere / Kontroll-Tiere am 1. Tag) aus Abb. 4-10 B und Abb. 4-12. Zu beachten ist, dass es sich hier nicht um eine logarithmische Auftragung handelt, was den eigentlichen Nulldurchtritt verzerrt. Nulldurchtritt etwa bei 5h.

4.2.1.4 Eingrenzung des Wirkmechanismus von TSA: transkriptionsabhängig, ja oder nein?

Alle bisher veröffentlichten Daten an Vertebraten zeigen, dass es sich bei dem durch TSA induzierten Gedächtniseffekt um einen transkriptionsabhängigen Effekt handelt. Da die bisherigen Daten in der Honigbiene, das frühe Auftreten (bereits am 1. Tag) und das Auftreten beim Ein-Trial-Training, jedoch gegen die Transkriptionsabhängigkeit sprechen, soll in den folgenden Versuchen die Transkription mit Hilfe von Actinomycin D während der TSA-Behandlung geblockt werden.

Dafür wurden die beiden Inhibitoren Actinomycin D und TSA zusammen 2h vor dem Training injiziert.

Abb. 4-14 auf Seite 51 zeigt die Transkriptionsabhängigkeit des TSA-Effekts, sowohl für Drei-Trial- als auch für Ein-Trial-Training. Dabei zeigt sich die Tendenz (Daten nicht signifikant), dass im Drei-Trial-Training ab dem zweiten Tag und im Ein-Trial-Training schon am ersten Tag der TSA-Effekt transkriptionsabhängig ist. Weiterhin ist zu sehen, dass es abhängig von den Trainingstrials zu Unterschieden in der Wirkungsdauer des TSA-Effekts kommt. Im Drei-Trial-Training dauert die Gedächtnisverbesserung durch TSA bis zum zweiten Tag an, wohingegen beim Ein-Trial-Training der TSA-Effekt am zweiten Tag verschwunden ist. Dieser Befund wird zusätzlich durch Abb. 4-15 auf Seite 52 unterstützt. Hier sind die Daten aus dem Versuch aus Abb. 4-12 A auf Seite 48 zum Gedächtnisabruf vom ersten und zweiten Tag dargestellt. Es handelt sich bei dem Versuch um ein Ein-Trial-Training, bei dem die TSA-Injektion 30min nach dem Training erfolgte. Auch hier zeigt sich, dass bei einem Ein-Trial-Training der TSA-Effekt nur am ersten Tag auftritt und dann am zweiten Tag kein Unterschied mehr zwischen TSA und Kontrolle feststellbar ist. Dies deutet auf einen generellen Unterschied des TSA-Effekts zwischen den beiden Trainingsmethoden hin.

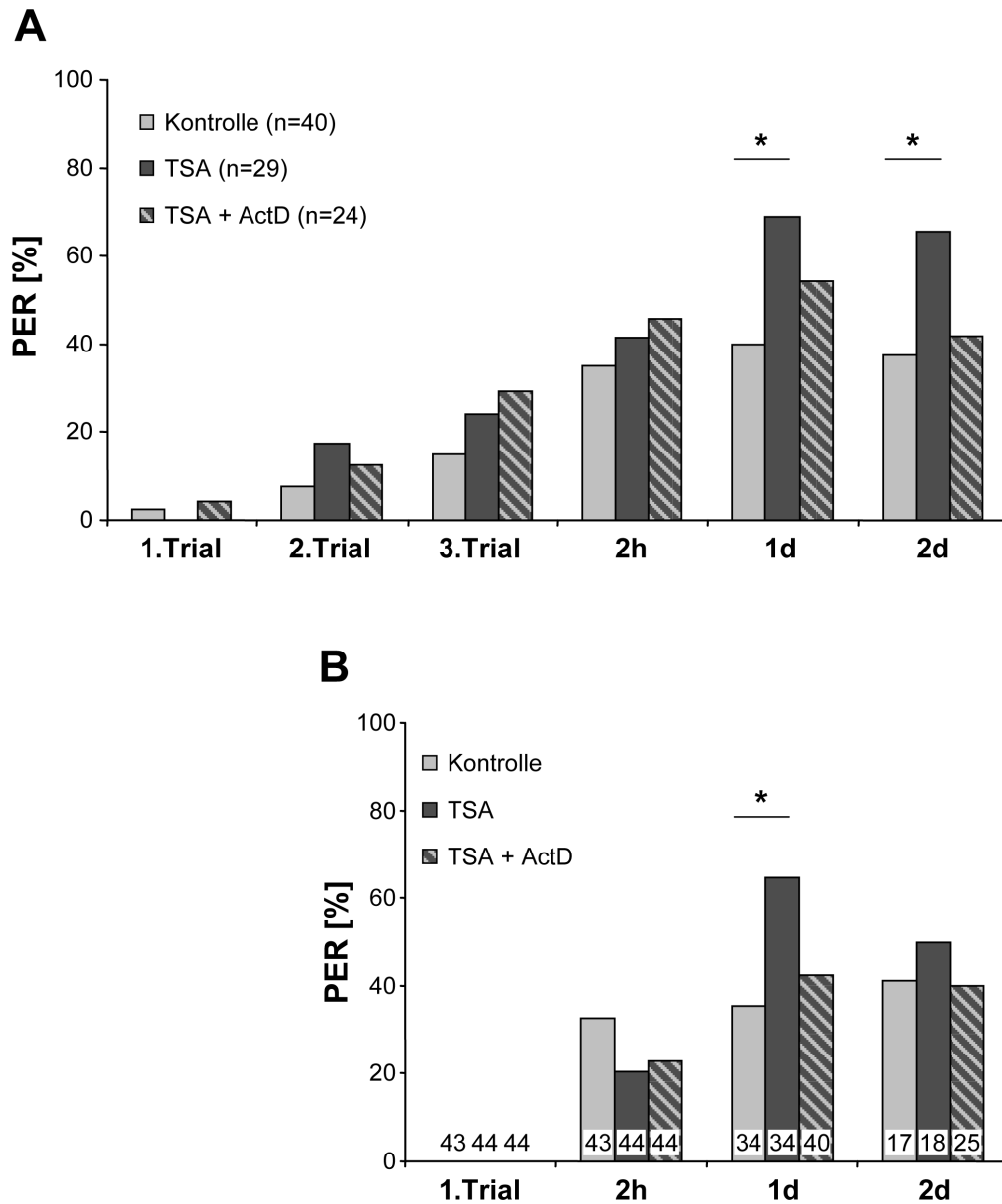


Abb. 4-14: Abhängigkeit des TSA-Effekts von der Transkription je nach Trainingsmethode

Wiedergegeben ist die Anzahl der Tiere in %, die auf den Nelkenduft (CS) mit dem PER reagierten. Training (Lernphase): CS-US-Paarung (1. – 3. Trial), Gedächtnisabruf: Nur CS Präsentation (2h, 1d, 2d). Die Tiere wurden zwischen 1-2h vor dem Training mit 1µl der entsprechenden Lösung injiziert. Die Tiere wurden anschließend mit 2 Tropfen 1M Zuckerlösung gefüttert (30-45min vor dem Training). **Kontrolle:** Kontrolllösung (PBS/DMSO 1:1); **TSA:** Trichostatin A 0,5µg/µl in Kontrolllösung; **TSA + ActD:** Trichostatin A 0,5µg/µl und Actinomycin D 2µg/µl in Kontrolllösung; **A)** Drei-Trial-Training mit einem Intertrialintervall von 2min; (n = s. Legende); **B)** Ein-Trial-Training; (n = Zahl im Balken)

*: P < 0,05 (Fischer Exakt Test)

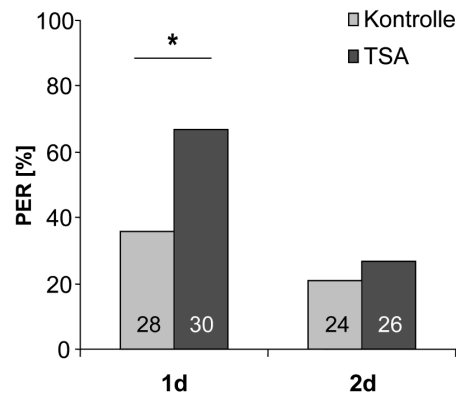


Abb. 4-15: Gedächtnisabruf des ersten und zweiten Tages des Versuchs aus Abb. 4-12 A auf Seite 48

Dargestellt ist die Anzahl der Bienen in %, die auf den Nelkenduft (CS) mit dem PER reagierten (n = Zahl im Balken). Es ist nur der Gedächtnisabruf für 1d und 2d dargestellt (nur CS Präsentation (1d, 2d)), für die Daten des Trainings und des 2h-Abrufs s. Abb. 4-12 A. Die Tiere wurden 30min nach dem Training mit 1µl der entsprechenden Lösung injiziert. **Kontrolle:** Kontrolllösung (PBS/DMSO 4:1); **TSA:** Trichostatin A 0,5µg/µl in Kontrolllösung. Es handelt sich bei diesem Experiment um ein Ein-Trial-Training, wie auch das Experiment aus Abb. 4-14 B. *: $P < 0,05$ (Fischer Exakt Test)

4.2.2 DNA-Methylierung in der Honigbiene

Wie in der Einleitung beschrieben, gibt es ein kompliziertes Wechselspiel zwischen DNA-Methylierung und Histonmodifikationen. In der Honigbiene ist bekannt, dass sie alle drei aus dem Menschen bekannten *de novo* Methyltransferase (DNMT)-Familien besitzt und dass die DNMTs eine Rolle bei der kastenspezifischen Entwicklung (unterschiedliche Entwicklung von Königin und Arbeiterin) spielen.

In den folgenden Experimenten soll der Einfluss der DNA-Methylierung auf die Histonmodifikationen und das Verhalten der Honigbiene am Beispiel der klassischen Konditionierung untersucht werden.

Für die Beeinflussung der DNA-Methylierung wurde 5-Azacytidin, ein Inhibitor der DNMT, verwendet. In der Maus hat sich gezeigt, dass 5-Azacytidin einen negativen Effekt auf das Gedächtnis in der aversiven Konditionierung hat. Zudem soll die Verwendung von 5-Azacytidin und TSA sich in der Wirkung aufs Lernen gegenseitig aufheben, was der verstärkenden Wirkung von 5-Azacytidin auf die Histondeacetylierung widerspricht.

4.2.2.1 Einfluss von 5-Azacytidin auf die Histonmodifikationen in der Honigbiene

Da die Daten widersprüchlich sind, was die Wirkung von 5-Azacytidin auf die Histonmodifikationen angeht, wurden frisch geschlüpfte Bienen für 4 Tage mit 5-Azacytidin gefüttert und anschließend die relative Histonmodifikationsstärke gemessen.

In Abb. 4-16 ist zu sehen, dass es zu keiner Beeinflussung der drei untersuchten Histonmodifikationen kommt. Dies deckt sich mit der Literatur, die zeigt, dass es durch die Gabe von 5-Azacytidin zu keiner genomweiten Histonacetylierung kommt.

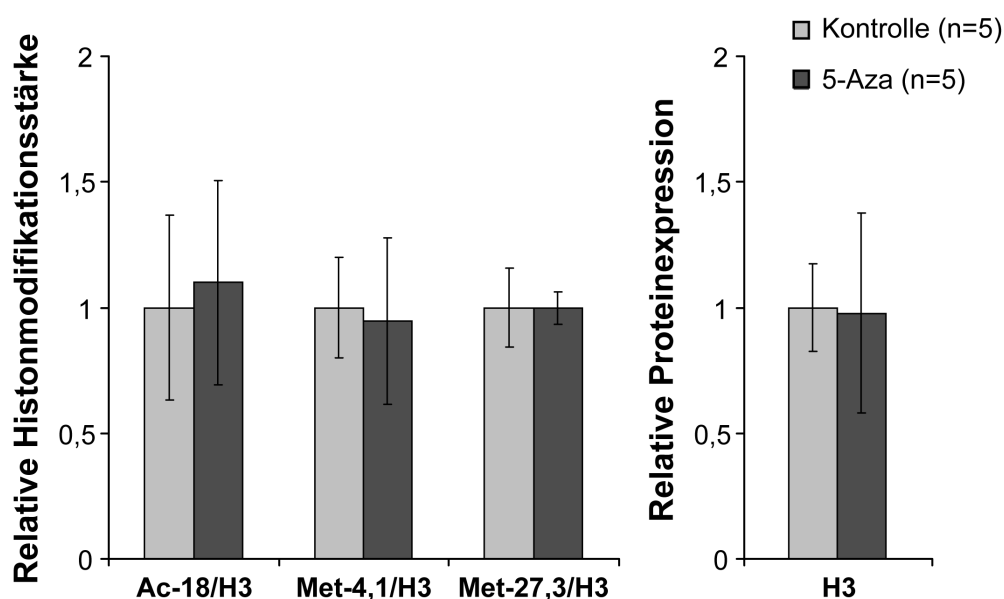


Abb. 4-16: Einfluss von 5-Azacytidin auf die Histonmodifikationen

Dargestellt sind die Mittelwerte der Verhältnisse aus der entsprechenden Histonmodifikation (Ac-18, Met-4,1 und Met-27,3) und H3, sowie die detektierte Menge von H3, normalisiert auf die Kontrolltiere (n = s. Legende). Der Fehlerbalken entspricht der Standardabweichung. Frisch geschlüpfte Bienen wurden vier Tage mit dem entsprechenden Futter gefüttert. **Kontrolle:** Kontrollfutter [5g Puderzucker, 1,6g Honig, 200µl EtOH]; **5-Aza:** 1,6 mg 5-Azacytidin in 6,6g Kontrollfutter

4.2.2.2 Einfluss von 5-Azacytidin auf die appetitive Konditionierung

Bisher ist der Einfluss von 5-Azacytidin auf Lernen und Gedächtnisbildung nur in der Maus und auch nur bei der aversiven Konditionierung untersucht worden. Hier zeigt sich eine Reduktion des Gedächtnisses. Im Folgenden soll der Einfluss von 5-Azacytidin auf die appetitive Konditionierung untersucht werden.

Daher wurden die Bienen 2h vor dem Training in den Thorax mit 5-Azacytidin injiziert.

Wie der Abb. 4-17 auf Seite 54 zu entnehmen ist, zeigt sich bei der Honigbiene kein Einfluss auf die appetitive Konditionierung.

Da nur eine Konzentration getestet wurde, kann es sein, dass die verwendete Dosis zu gering war.

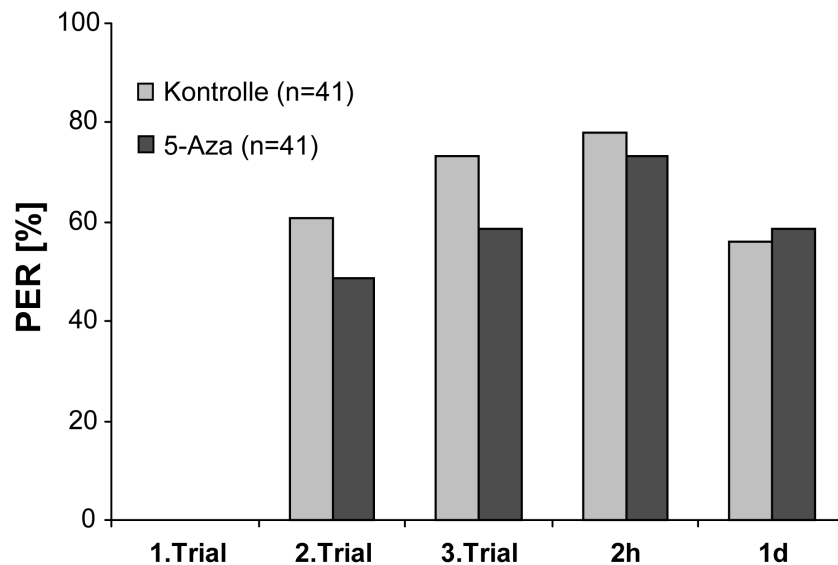


Abb. 4-17: Einfluss von 5-Azacytidin auf Lernen und Gedächtnisbildung

Dargestellt ist die Anzahl der Bienen in %, die auf den Nelkenduft (CS) mit dem PER reagierten. Training (Lernphase): CS-US-Paarung (1. – 3.Trial), Gedächtnisabruf: Nur CS Präsentation (2h, 1d). Die Bienen wurden 2h vor dem Training mit 1µl der entsprechenden Lösung injiziert. **Kontrolle:** Kontrolllösung (PBS); **5-Aza:** 5-Azacytidin 1µg/µl in Kontrolllösung. Die Anzahl der Tiere ist in Klammern hinter der Gruppenbezeichnung in der Legende vermerkt.

4.3 Aufgabenverteilung in der Honigbiene

In den bisherigen Versuchen wurde der Einfluss von TSA auf Lernen und Gedächtnisbildung der Honigbiene untersucht. Dabei handelt es sich um ein unter Laborbedingungen erzeugtes Verhalten, dass sehr schnell induzierbar ist. Wie sieht es aber mit dem Einfluss von Histonmodifikationen auf natürliche und längerfristige Verhaltensveränderungen der Honigbiene aus?

Wie in der Einleitung bereits erwähnt, durchläuft eine Arbeiterin abhängig von ihrem Alter verschiedene Aufgaben innerhalb und außerhalb des Stocks. Im Alter von etwa 3 Tagen beginnt die Biene mit der Brutpflege. Diese Bienen werden Ammen genannt. In einer Übergangsphase, in der die Arbeiterin zunächst weitere Aufgaben innerhalb des Stocks übernimmt, beginnt die Verlagerung der Aufgabenbereiche hin zu Tätigkeiten außerhalb des Stocks. Ab einem Alter von ca. 21 Tagen beginnt die Biene zu sammeln und regelmäßig auszufliegen. Diese Bienen werden Flieger genannt. Abb. 4-18 A auf Seite 56 zeigt stark vereinfacht die natürliche Abfolge der Aufgaben.

Diese zwei Verhaltensweisen (Flieger und Ammen) der Arbeiterbiene sollen als Untersuchungsmodell für eine natürliche und längerfristige Verhaltensveränderung der Honigbiene dienen.

Da eine Abhängigkeit zwischen Aufgabenbereich und dem Alter der Arbeiterin besteht, ist es nicht möglich, die Ergebnisse einem der beiden Faktoren eindeutig zuzuordnen. Es ist daher notwendig, die Aufgaben vom Alter zu entkoppeln. Dies wird dadurch erreicht, dass gleich alte Bienen in einem künstlichen Stock (Kohorte) zusammengesetzt werden (s. Abb. 4-18 B). Es bilden sich alle Aufgabenbereich der Arbeiterbiene heraus, die aber jetzt altersunabhängig sind, da die Bienen das gleiche Alter besitzen. Um wirklich sicher zugehen, dass die Ergebnisse mit den Aufgabengebieten korrelieren, wird die Kohorte, in der sich die Aufspaltung in die Aufgabengebiete vollzogen hat, in Flieger und Ammen getrennt. In den so gewonnenen Kohorten (Flieger-Kohorte und Ammen-Kohorte) kommt es zu einer erneuten Aufspaltung in die Aufgabengebiete. Die Flieger revertieren zu Ammen, daher wird dieser Vorgang auch Revertierung genannt (s. Abb. 4-18 B). Dies stellt sicher, dass die Veränderungen nicht nur auf den Alterungsprozess zurückzuführen sind, sondern wirklich mit den Aufgabengebieten assoziiert sind.

Bereits bekannt ist, dass die verschiedenen Verhaltensweisen mit unterschiedlichen Expressionsmustern im Gehirn adulter Tiere einhergehen. Dass es sich bei den Expressionsmustern um variable Systeme handelt, die sich ineinander überführen lassen, zeigt sich durch die Revertierung. Wie diese Expressionsmuster etabliert werden und persistieren, ist jedoch nicht geklärt. Es wäre möglich, dass hier epigenetische Mechanismen als Regulatoren der Expression fungieren.

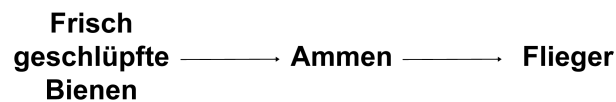
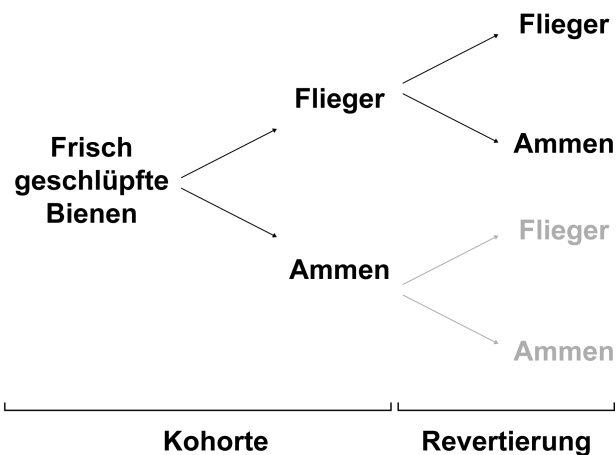
A**B**

Abb. 4-18: Schema der Reihenfolge der Aufgabenbereiche der Arbeiterin

A) Darstellung der Aufgabenreihenfolge im Stock (natürlich), die geschlüpften Bienen sind zunächst Ammen (Alter $\leq 21d$) und dann anschließend Flieger (Alter $> 21d$) B) Darstellung der Aufgabenreihenfolge im Experiment: Durch die Verwendung gleich alter Bienen zur Bildung eines künstlichen Stocks (Kohorte) kommt es zur Entkopplung der Abhängigkeit von Alter und Aufgabenverteilung. Bei der Revertierung handelt es sich um die erneute Aufspaltung der Aufgaben aus einer der beiden Gruppen (Flieger und Ammen). Im Experiment wurden die Flieger verwendet, um die Revertierung durchzuführen.

4.3.1 Einfluss der Aufgabenbereiche auf die Histonmodifikationen

Es wurden insgesamt vier Kohorten untersucht, in zwei aufeinanderfolgenden Sommern (2007-08). Dabei zeigt sich, dass Flieger eine Erhöhung der Acetylierung am Ac-18 des Histon H3 besitzen. Dies war für jede der vier Kohorten und auch für die Revertierung signifikant. Abb. 4-19 auf Seite 57 zeigt die zusammengefassten Daten aller Kohorten-Experimente inklusive der Revertierung (A) und die Ergebnisse der Kohorte 4 vor und nach der Revertierung (B). Die Werte für die beiden anderen Histonmodifikationen sind in den einzelnen Kohorten nicht signifikant. Werden jedoch alle Daten zusammengefasst, so zeigt sich auch hier ein signifikanter Unterschied in der Monomethylierung am Lysin 4 von Histon H3. Klar zu sehen ist, dass die Menge an detektiertem Histon H3 in beiden Gruppen gleich ist.

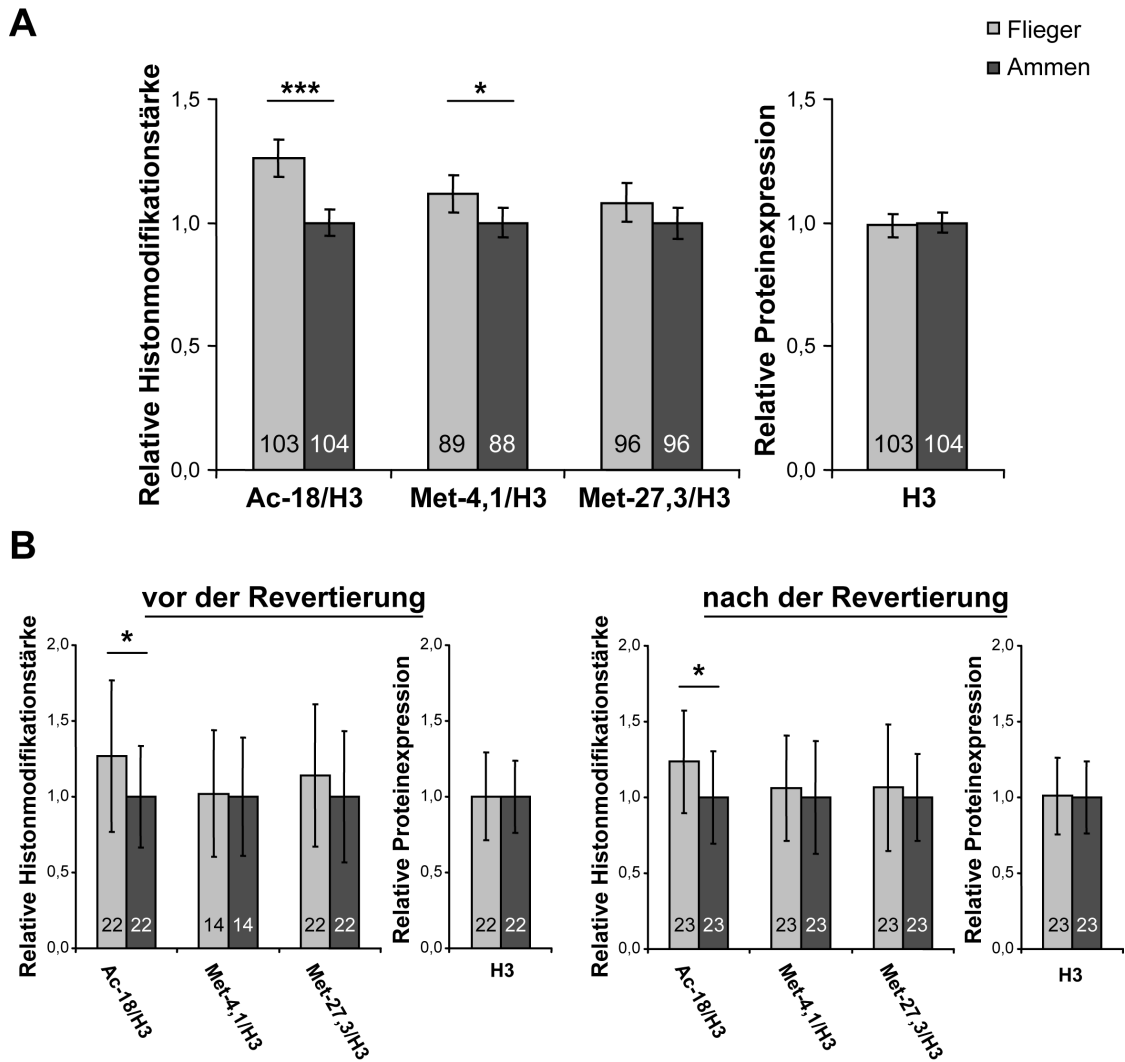


Abb. 4-19: Histonmodifikationsstärke in Abhängigkeit vom Aufgabenbereich der Arbeiterin

Wiedergegeben sind die Mittelwerte der Verhältnisse aus der entsprechenden Histonmodifikation (Ac-18, Met-4,1 und Met-27,3) und H3, sowie die detektierte Menge von H3, normalisiert auf die Ammen (n = Zahl im Balken) **Flieger**: Arbeiterbienen, die mindestens an 3 unterschiedlichen Tagen geflogen sind; **Ammen**: Arbeiterbienen, die kopfüber in einer Wabe mit einer Larve gesteckt hat (Fütterung der Larve); Flieger und Ammen sind gleich alt.

A) Daten von 4 Kohorten (je 2 in 2 unterschiedlichen Sommern, 2007-08) und einer Revertierung; Fehlerbalken: SEM;

B) Zeigt die Daten der Kohorte 4 vor und nach der Revertierung der Flieger; Fehlerbalken: Standardabweichung

***: $P < 0,001$; *: $P < 0,05$ (T-Test)

4.3.2 Einfluss der Aufgabengebiete auf die Expression ausgewählter Kinasen

Aus der Literatur ist bereits bekannt, dass verschiedene Kinasen, je nach Aufgabenbereich der Honigbiene, unterschiedlich exprimiert werden [185]. Die meisten Untersuchungen wurden dabei nur auf mRNA-Ebene durchgeführt. Die Menge der Kinasen soll mit denselben Proben ermittelt werden, mit denen auch die Analyse der Histonmodifikation durchgeführt wurde.

Um die Proteinexpression auf Proteinlevel zu bestimmen, werden ebenfalls Antikörper gegen Kinasen benötigt. Diese müssen zunächst gegen Bienenhirn getestet werden, um zu überprüfen, ob sich die Antikörper für die Verwendung im ELISA eignen.

In Abb. 4-20 ist der Westernblot von MAP-Kinase (Mitogen-aktivierte Proteinkinase - MAPK), Proteinkinase A (PKA) [3] und Proteinkinase C (PKC) [4] Antikörpern gegen Bienenhirn zu sehen. Bei der Doppelbande von PKA handelt es sich um Abbauprodukte, in der phosphorylierten und dephosphorylierten Form der regulatorischen Untereinheit der Typ II A cAMP-abhängigen Kinase [3]. Alle drei Antikörper erfüllen die Voraussetzung für die Verwendung im ELISA.

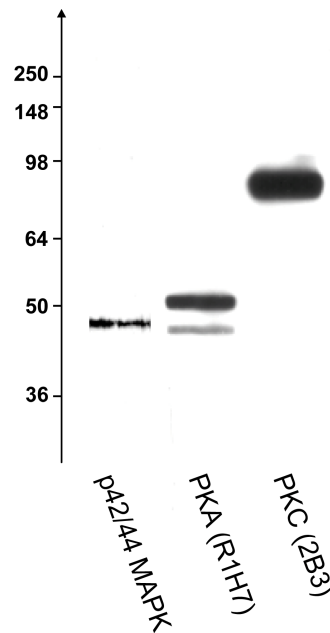


Abb. 4-20: Westernblot: Test der Antikörper p42/44 MAPK, PKA und PKC gegen Bienenhirn
p42/44 MAPK: Mitogen-aktivierte Proteinkinase (42 & 44kD); **PKA:** Proteinkinase A; **PKC:** Proteinkinase C

Die Untersuchung der Proteinexpression wurde nur an zwei Kohorten und der Revertierung durchgeführt. Wie der Abb. 4-21 auf Seite 59 zu entnehmen ist, zeigen alle drei untersuchten Kinasen eine erhöhte Expression in den Fliegern. Dies gilt für alle Kohorten und auch für die Revertierung. Die deutlichste Steigerung ist bei der MAPK zu sehen. Zu beachten ist auch hier der Wert für das Histon H3, der belegt, dass die gemessenen Gesamtprotein-konzentrationen in etwa gleich groß waren.

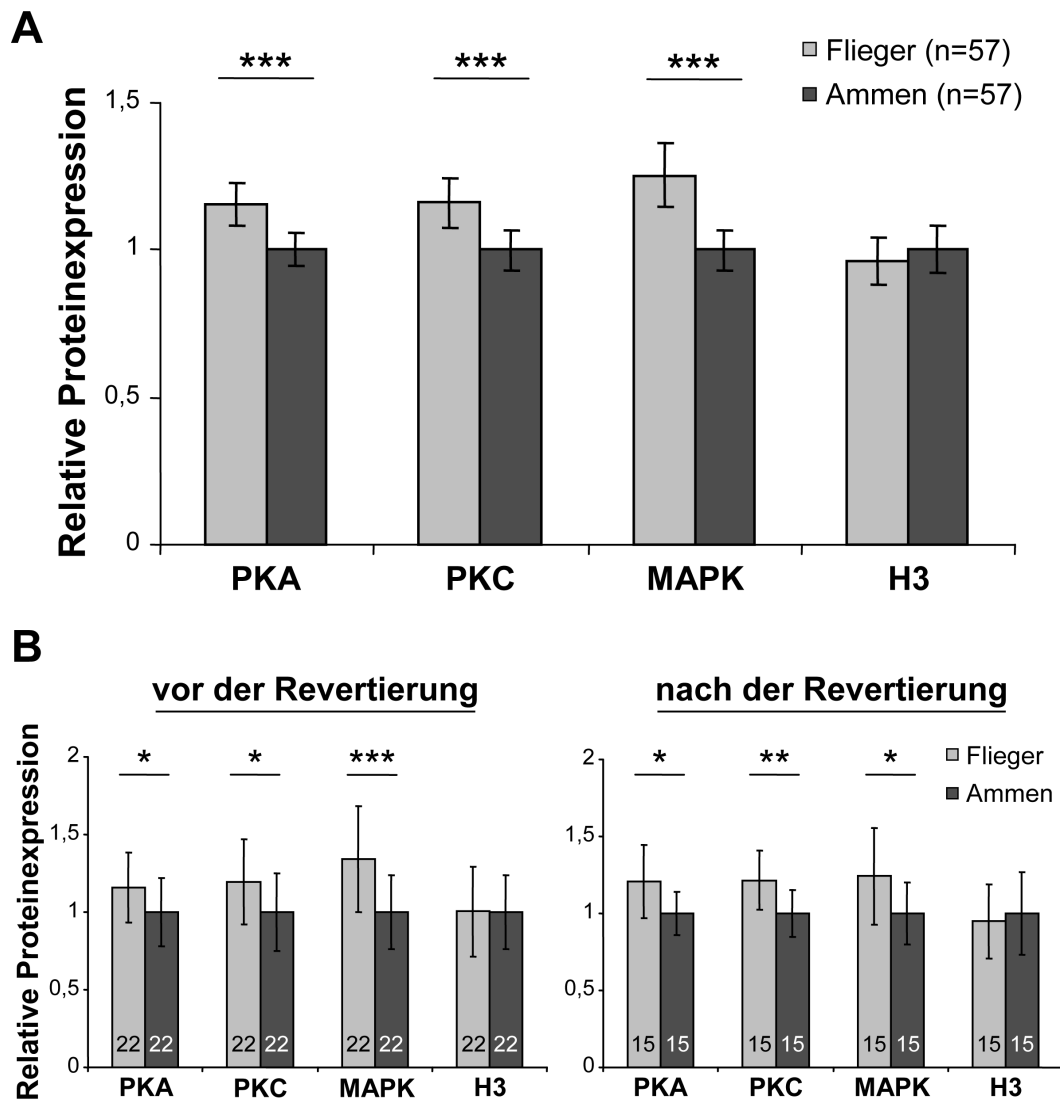


Abb. 4-21: Expression ausgewählter Proteine in Abhängigkeit vom Aufgabenbereich der Arbeiterin

Gezeigt sind die Mittelwerte der relativen detektierten Proteinmengen für PKA, PKC, MAPK und H3 jeweils normiert auf die Ammen. **Flieger:** Arbeiterbienen, die mindestens an 3 unterschiedlichen Tagen geflogen sind; **Ammen:** Arbeiterbienen, die kopfüber in einer Wabe mit einer Larve gesteckt hat (Fütterung der Larve); Flieger und Ammen sind gleich alt; **A)** Daten von 2 Kohorten und einer Revertierung (2008); Fehlerbalken: SEM; $n = s$. **Legende B)** Zeigt die Daten der Kohorte 4 vor und nach der Revertierung der Flieger; Fehlerbalken: Standardabweichung; n = Zahl im Balken

***: $P < 0,001$; **: $P < 0,01$; *: $P < 0,05$ (T-Test)

Die Korrelation zwischen der Histonacetylierung und den Aufgabengebieten weist auf eine mögliche Regulation der aufgabenspezifischen Expression durch die Histonacetylierung hin. Es stellt sich die Frage: Werden die Expressionsmuster des jeweiligen Aufgabenbereichs durch die Histonacetylierung gesteuert?

Dafür ist zu klären, ob eine künstliche Erhöhung der Acetylierung zu einer Erhöhung der Kinasenexpression führt und ob dadurch Verhalten in der Arbeiterin induziert wird, das typisch für Flieger ist. Es soll also getestet werden, ob es möglich ist, mit Hilfe von TSA aus Ammen Flieger zu machen.

4.3.3 Einfluss von TSA auf die Aufspaltung der Arbeitsgebiete

Für diese Versuche muss eine andere Darreichung von TSA gewählt werden, da die Versuche eine große Anzahl an Tieren, sowie eine länger andauernde Verabreichung erfordern.

4.3.3.1 Orale Applikation von TSA

In den folgenden Versuchen wird die orale Applikation von TSA in der Honigbiene getestet.

In Abb. 4-22 ist die Veränderung der Histonacetylierung abhängig von der Verabreichungsdauer für frisch geschlüpfte Bienen und adulte Flieger gezeigt. Dabei ist zu beobachten, dass die Wirkung von TSA in direkt geschlüpfte Bienen nicht zu sehen ist, wohingegen in adulten Bienen nach zwei Tagen fast eine doppelt so hohe Acetylierung vorliegt wie in der Kontrolle. Nach vier Tagen ist dieser Effekt wieder verschwunden.

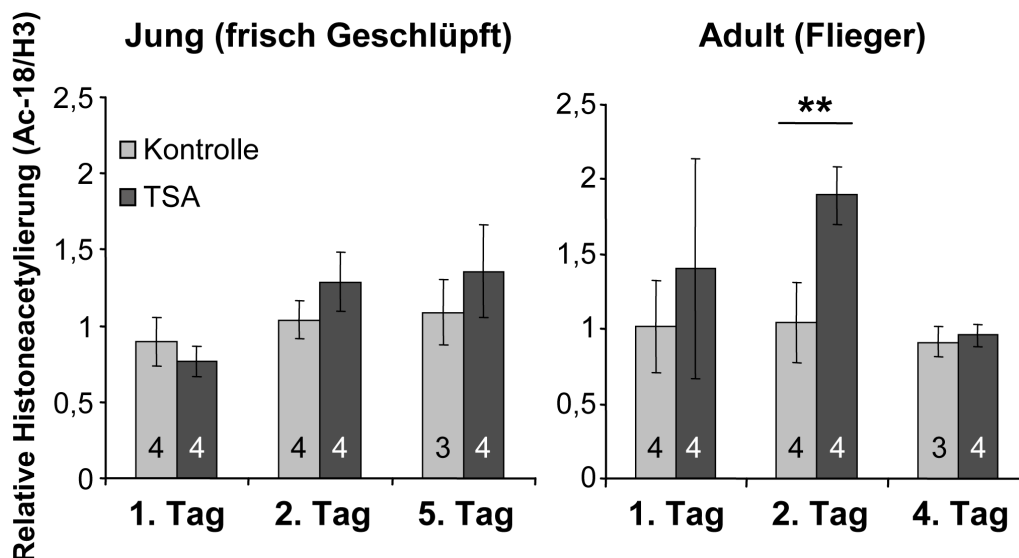


Abb. 4-22: Veränderung der Acetylierung abhängig vom Alter und Applikationsdauer von TSA

Dargestellt sind die Mittelwerte des Verhältnisses von Ac-18 zu H3, normiert auf den Mittelwert der Kontrollen über alle gemessenen Tage (n = Zahl im Balken). Die Bienen wurden mit dem entsprechenden Futter für 5 Tage (Jung) bzw. 4 Tage (Adult) gefüttert. **Kontrolle:** Kontrollfutter [5g Puderzucker, 1,6g Honig, 200µl EtOH]; **TSA:** 1mg TSA (gelöst in 200µl EtOH) in 6,6g Kontrollfutter. Die Tiere wurden zu unterschiedlichen Zeitpunkten präpariert (Jung: am Tag 1, 2 u. 5; Adult: am Tag 1, 2 u. 4). Fehlerbalken: Standardabweichung; **Jung:** frisch geschlüpfte Bienen; **Adult:** Flieger (Alter ≥ 16 Tage); **: P < 0,01 (T-Test)

Deutlich ist, dass die jungen Tiere zwar eine Tendenz zeigen, diese aber bei der geringen Probengröße nicht signifikant ist. Bei der sehr hohen Konzentration an TSA im Futter werden allerdings auch die anderen Histonmodifikationen (Met-4,1 und Met-27,3) mit beeinflusst (Daten nicht gezeigt). Vergleicht man dies mit den Daten aus den Kohorten-Experimenten, so hatten die Flieger nur etwa eine 20% erhöhte Acetylierung. Eine ~80 %ige Erhöhung ist daher nicht mehr als physiologisch anzusehen, was die Beeinflussung der anderen Histonmodifikationen (Daten nicht gezeigt) erklären könnte. Dass TSA nach vier Tagen in

den adulten Tieren nicht mehr wirkt, kann zum einen daran liegen, dass die Tiere merklich weniger fressen und zum anderen, dass sich die Tiere vielleicht an die Dosis gewöhnt haben. Aus dem vorangegangenen Experiment ergeben sich gleich zwei Probleme, zum einen wirkt TSA in frisch geschlüpften Bienen nur schwach und zum anderen ist die Dosis von TSA im Futter zu hoch, weshalb in den adulten Tieren eine nicht mehr physiologische Hyperacetylierung detektiert wurde.

Daher wurde im folgenden Experiment die Konzentration von TSA im Futter halbiert und die Experimente an vier Tage alten Bienen durchgeführt, was in etwa der Zeit entspricht, die die Tiere im Stock benötigen, bis sie beginnen als Ammen ihre Arbeit aufzunehmen.

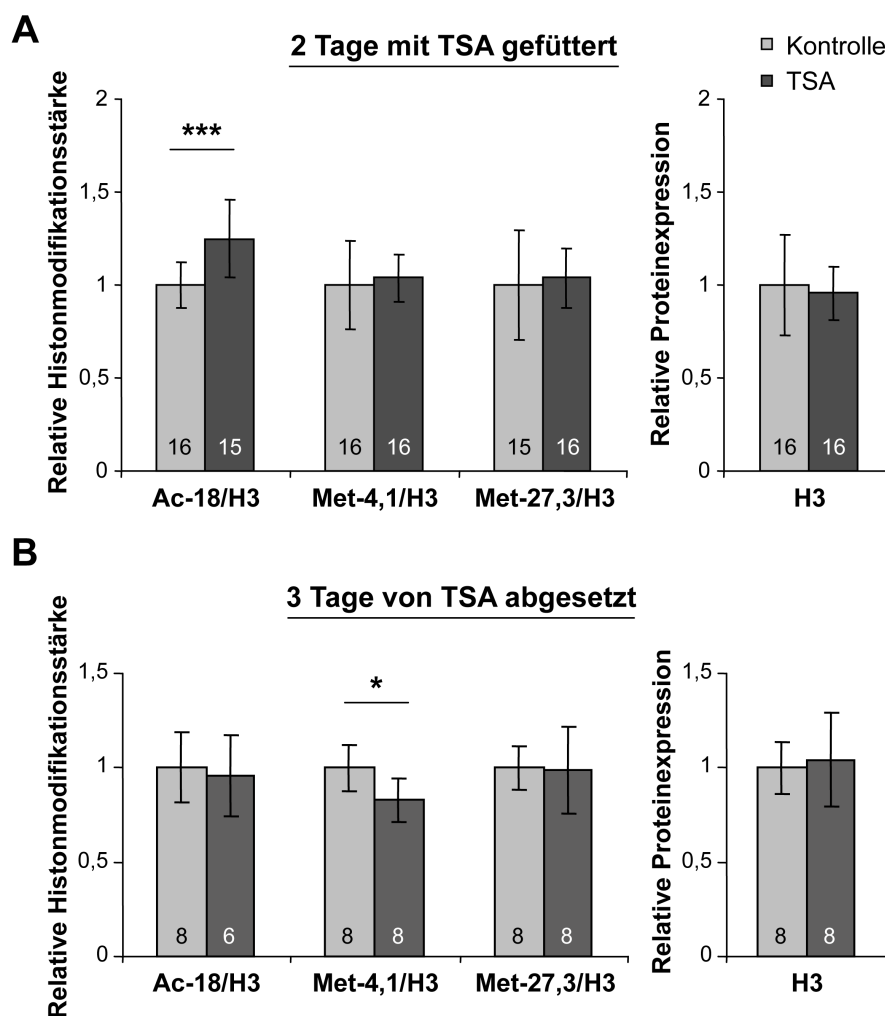


Abb. 4-23: Einfluss der oralen Verabreichung von TSA auf die Histonmodifikationen

Wiedergegeben sind die Mittelwerte der Verhältnisse aus der entsprechenden Histonmodifikation (Ac-18, Met-4,1 und Met-27,3) und H3, sowie die detektierte Menge von H3, normalisiert auf die Kontrolltiere (n = Zahl im Balken). Der Fehlerbalken entspricht der Standardabweichung. **A)** Vier Tage alte Bienen wurden zwei Tage mit dem entsprechenden Futter gefüttert. **Kontrolle:** Kontrollfutter [10g Puderzucker, 3,3g Honig, 200µl EtOH]; **TSA:** 1mg TSA (gelöst in 200µl EtOH) in 13,3g Kontrollfutter **B)** dieselben Gruppen wurden drei Tage nach Absetzen von TSA erneut gemessen (3 Tage Kontrollfutter). ***: $P < 0,001$; *: $P < 0,05$ (T-Test)

Dabei zeigt sich, dass in vier Tage alten Bienen die orale Applikation von TSA zu einer Erhöhung der Histonacetylierung führt. Die anderen Histonmodifikationen sind davon nicht beeinflusst (Abb. 4-23 A auf voriger Seite). Drei Tage nach der Verabreichung von TSA ist die Acetylierung zwischen den beiden Gruppen wieder gleich, dagegen ist die Monomethylierung am Lys-4 in der TSA-Gruppe geringer. Mit einer Differenz von etwa 20% zwischen TSA- und kontrollgefütterten Tieren entspricht der Unterschied in etwa dem Unterschied zwischen Flieger und Ammen.

a) Einfluss von TSA auf die Expression ausgewählter Kinasen

Da die verschiedenen Aufgabenbereiche der Arbeiterin mit einer unterschiedlichen Histonacetylierung und einer unterschiedlichen Kinasenexpression einhergehen, soll mit Hilfe von TSA überprüft werden, ob die Histonacetylierung eine Rolle bei der Regulation der Kinasenexpression spielt. Daher wurden vier Tage alte Bienen für zwei Tage entweder mit Kontrollfutter oder mit TSA gefüttert und anschließend die Histonacetylierung und die relative Proteinexpression für PKA, PKC, MAPK und H3 ermittelt (s. Abb. 4-24).

Es ist nur eine Tendenz zu erkennen, aber sie deutet darauf hin, dass eine Hyperacetylierung zu einer erhöhten Kinasenexpression führt.

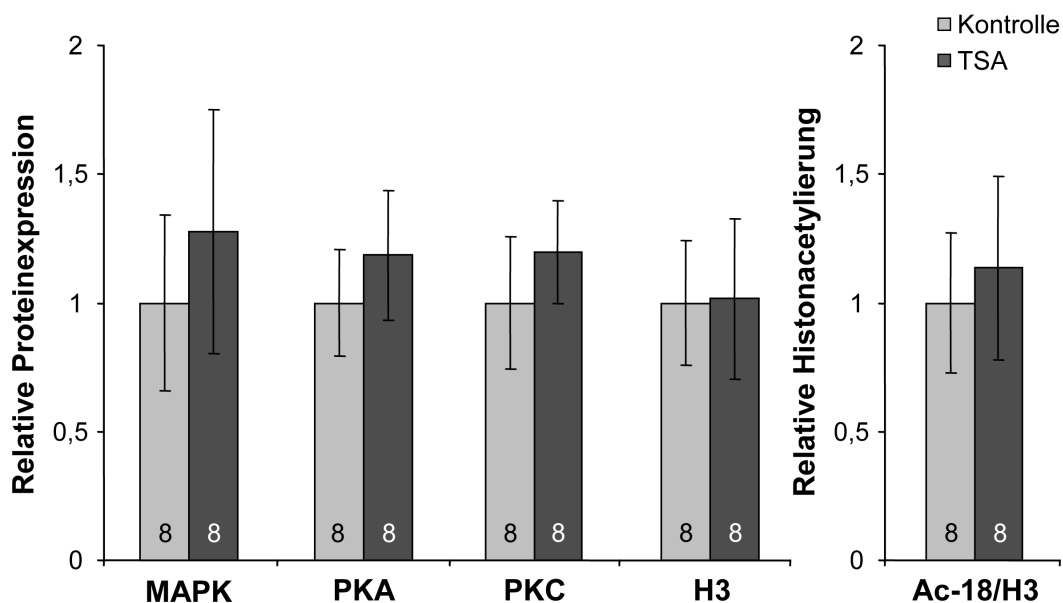


Abb. 4-24: Einfluss von TSA auf die Expression von PKA, PKC und MAPK

Gezeigt sind die Mittelwerte der relative detektierten Proteinmenge für PKA, PKC, MAPK und H3, sowie die relative Histonacetylierung an Position 18 (Ratio aus Ac-18 und H3), normiert auf die Kontrolltiere (n = Zahl im Balken). Der Fehlerbalken entspricht der Standardabweichung. 4 Tage alte Bienen wurden 2 Tage mit dem entsprechenden Futter gefüttert. **Kontrolle:** Kontrollfutter [10g Puderzucker, 3,3g Honig, 200µl EtOH]; **TSA:** 1mg TSA (gelöst in 200µl EtOH) in 13,3g Kontrollfutter

Leider war es nicht möglich, gegen Ende des Jahres noch ausreichend Brut zu erhalten. Die weiteren Tiere, die in dem Experiment verwendet wurden, reagierten auf die orale Applikation von TSA nicht mehr mit einer Erhöhung der Acetylierung. Dies kann an dem starken Befall von Varoamilben gelegen haben, oder an dem allgemein schlechten Zustand, in dem sich die Bienen befanden.

b) Einfluss von TSA auf das Ausflugsverhalten der Honigbiene

Wie bereits zu Beginn dieses Kapitels (Kapitel 4.3) beschrieben, verrichten die Ammen ihre Aufgaben im Stock, wohingegen die Flieger zum Sammeln den Stock verlassen. Ein wesentliches Unterscheidungsmerkmal zwischen den beiden Aufgabenbereichen ist also das Ausflugsverhalten der Arbeiterbiene. Im folgenden Versuch soll daher der Einfluss von TSA auf das Ausflugsverhalten der Honigbiene untersucht werden.

Um zu untersuchen, ob sich die Erhöhung der Histonacetylierung auch auf dieses Verhalten auswirkt, d.h. ob die jungen Bienen ein Verhalten zeigen, das dem eines Fliegers entspricht, wurden die vier Tage alten Bienen 2¹/₂ Tage mit TSA gefüttert. Da die Tiere sich gegenseitig füttern, wurde sie zusätzlich ein halben Tag von TSA abgesetzt, um einer Weitergabe von TSA zwischen den Gruppen vorzubeugen. Anschließend wurden die Tiere, die vorher in getrennten Käfigen gefüttert wurden (je Behandlung zwei Käfige), in eine Kohorte zusammengesetzt. Danach verblieb die Kohorte einen Tag draußen im Freien. Schließlich wurden die im Stock verbliebenen Bienen gezählt.

In Abb. 4-25 auf Seite 64 ist die Anzahl der fehlenden Bienen (ausgeflogene Bienen) beider Gruppen in Prozent wiedergegeben. Deutlich ist zu erkennen, dass die Kontrolltiere viel eher im Stock bleiben, als die TSA-Tiere. Dies könnte darauf hindeuten, dass das Ausflugsverhalten der Bienen beeinflusst ist.

Deutlich zu sehen war allerdings auch, dass die Bienen der TSA-Gruppe weniger fit waren und insgesamt einen leicht trägen Eindruck gemacht haben.

Würde das Ergebnis des Experiments als einzelne Entscheidungen für jede Biene gewertet werden, so wäre das Ergebnis hoch signifikant (Fischer Exakt Test: $P \sim 2,3 \cdot 10^{-33}$). Da gruppenspezifische Effekte nicht ausgeschlossen werden können, kann das Experiment nur als Ganzes bewertet werden. Daher ist eine statistische Auswertung nicht möglich.

Leider war es auch hier wegen dem Rückgang der Brut im Herbst nicht mehr möglich, das Experiment zu wiederholen. Die große Anzahl der Tiere, die für dieses Experiment benötigt wird, ist im Spätsommer nicht mehr zu erreichen.

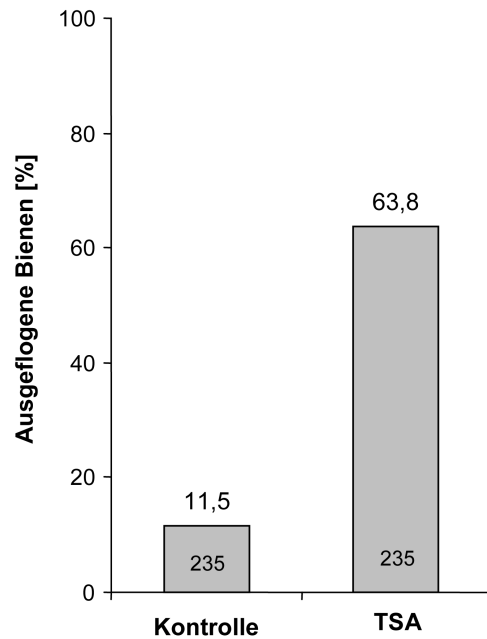


Abb. 4-25: Einfluss von TSA auf das Ausflugverhalten

4 Tage alte Bienen wurden entweder 3 Tage mit Kontrollfutter [10g Puderzucker, 3,3g Honig, 200µl EtOH] (**Kontrolle**) oder 2½ Tage mit 1mg TSA (gelöst in 200µl EtOH) in 13,3g Kontrollfutter (**TSA**) gefüttert, anschließend ½ Tag von TSA abgesetzt (Kontrollfutter) und die auf vier Käfige aufgeteilten Gruppen (je zwei Kontrolle und TSA) in eine Kohorte zusammengesetzt. Die Kohorte wurde einen Tag nach draußen gestellt und am folgenden Tag wurden die verbliebenen Bienen in der Kohorte gezählt. Wiedergegeben sind die fehlenden Bienen in %. Die Anzahl der Tiere entspricht der Zahl im Balken, die Zahl über dem Balken gibt den Wert an.

5 Diskussion

5.1 Rolle der Histonacetylierung bei der Aufspaltung in die Aufgabengebiete der Arbeiterin

Der Bienenstock besteht aus einem komplexen sozialen Gefüge, das vom Zusammenwirken aller Bienen und ihrer verschiedenen Aufgaben abhängt. Neben den auch morphologisch unterscheidbaren Kasten (Königin, Drohnen, Arbeiterin) existieren unterschiedliche Aufgabenbereiche der Arbeiterin [150], die das Überleben des Stocks sichern. Die Verteilung der Aufgaben im Stock bilden ein Gleichgewicht, das von der Größe, dem Futterstatus [6] und der Demographie [12, 85] des Stocks abhängt. Es gibt demnach Signale, die diese Verteilung der Aufgabengebiete im Stock steuern. Da die Regelung einer sozialen Struktur von beträchtlichem Interesse ist, gab es in den letzten Jahren viele Anstrengungen, um die zugrunde liegenden Prozesse zu erklären. Unter natürlichen Bedingungen durchläuft eine Biene die verschiedenen Tätigkeiten während ihres Lebens. Die Tätigkeit ist also abhängig vom Alter der Biene, daher muss im Experiment die Tätigkeit vom Alter getrennt werden. Dazu werden frisch geschlüpfte Bienen verwendet, die noch kein unterschiedliches Verhalten aufweisen und somit eine homogene Gruppe darstellen, deren Aufspaltung in die unterschiedlichen Tätigkeiten untersucht wurde (s. Abb. 5-1 A).

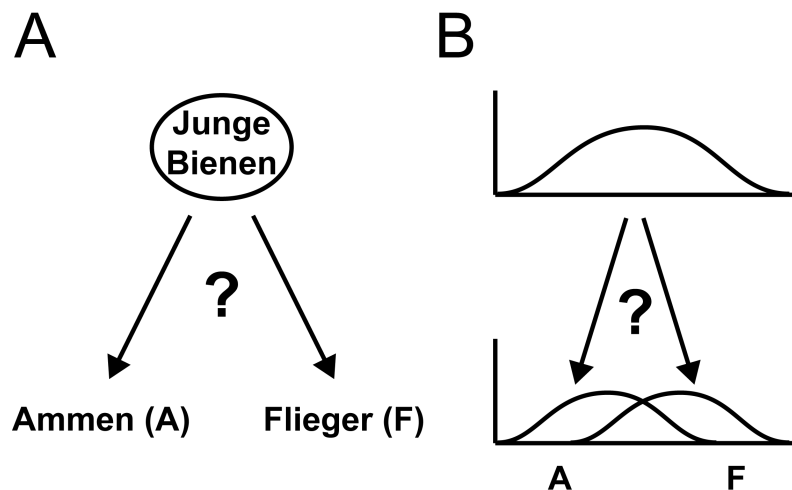


Abb. 5-1: Aufspaltung in die Arbeitsgebiete

Gezeigt ist schematisch die Aufspaltung der Aufgabengebiete der Arbeiterin A) auf der Ebene des Verhaltens B) auf der Ebene von biochemischen Unterschieden. Welche Signale und Mechanismen zu den Unterschieden führen ist noch nicht vollständig verstanden, daher das Fragezeichen.

Verschiedene Arbeiten zeigen, dass Ammen und Flieger (Sammler) sich sowohl in ihrem Verhalten, als auch in einer Reihe biochemischer und molekularer Eigenschaften voneinander unterscheiden. Dabei wurden Unterschiede auf verschiedenen Ebenen beschrieben (s. Tab.

5-1 auf Seite 69). Flieger und Ammen unterscheiden sich bei Hormonen und hormonähnlichen Stoffen: Juvenilhormon [152] und Oktopamin [181] sind in Fliegern und Vitellogenin [5] ist in Ammen erhöht. Es zeigen sich charakteristische Unterschiede in der Gen-Expression auf RNA-Level, so dass von aufgabenbezogenen Expressionsmustern gesprochen werden kann [75, 184, 185]. Diese Unterschiede differenzieren zwar zwischen Flieger und Ammen (s. Abb. 5-1 B), erklären aber nicht, wie es zu der Aufspaltung selbst kommt und wie die aufgabenbezogenen Unterschiede entstehen. Da die Verhaltensänderung zu Änderungen der Umwelteinflüsse [23, 57, 130, 165] und der Stoffwechselraten [61, 80, 186] führt, gibt es bei der Interpretation der Ergebnisse ein typisches Henne-Ei-Problem: all diese Einflüsse können die Expression verändern. Ungeachtet dieser Probleme zeigen diese Ergebnisse nur die Auswirkung, jedoch nicht die Ursache der Aufspaltung. Zur Entstehung der Aufspaltung gibt es jedoch erste Hinweise durch Arbeiten zum *foraging*-Gen.

Bei *Drosophila*-Larven hat sich gezeigt, dass unterschiedliche Allele des *foraging*-Gens zu unterschiedlichem Explorationsverhalten führen. Dabei blieben die Larven mit dem *sitter*-Allel in einem Futterhaufen, wohingegen die mit dem *rover*-Allel nach einiger Zeit des Fressens den Futterhaufen wechselten [140]. *Foraging* kodiert für eine cGMP-abhängige Proteinkinase (PKG). Untersuchungen an der Biene haben gezeigt, dass *amfor*, die korrespondierende PKG in der Honigbiene, in Fliegern stärker exprimiert wird als in Ammen [17]. Eine künstliche Aktivierung der PKG durch 8-bromo-cGMP führt in jungen Bienen zu einem verfrühten Ausfliegen [15], sowie zu einer positiven Phototaxis [16], was als Vorraussetzung fürs Fliegen angesehen wird. Damit zeigt sich, dass möglicherweise wie in *Drosophila* die unterschiedlichen Expressionsmuster im Gehirn auch zu unterschiedlichem Verhalten führen könnten. Untersuchungen zeigen zudem, dass die Aktivierung der PKG zu einer stärkeren Expression von Kr-h1, ein in Fliegern verstärkt exprimierter Transkriptionsfaktor, führt [66].

Die Gabe von Oktopamin führt, zusammen mit dem Juvenilhormon, ebenso zu einem fliegerähnlichem Verhalten [161], aber nicht zu einer verstärkten Expression von Kr-h1 [74].

Damit scheint der PKG eine zentrale Rolle bei der Aufspaltung der Aufgabengebiete zu zukommen, da sie sowohl fliegerähnliche Expression- als auch Verhaltenmuster induziert.

Die bisherigen Untersuchungen zur Aufspaltung der Aufgabengebiete der Arbeiterin stellen nur recht zusammenhangslose Einzelbefunde dar. Sie können nicht erklären, wie die verhaltensverändernden Expressionsmuster etabliert werden oder persistieren. Einziger Hinweis bis jetzt ist die Aktivierung der PKG. Dabei ist kritisch anzumerken, dass in der

Literatur die Aktivierung der PKG mit der in Fliegern gemessenen erhöhten PKG-Expression gleichgesetzt wird [15, 16].

Die meisten bekannten Unterschiede zwischen Fliegern und Ammen zeigen sich in den unterschiedlichen Expressionsmustern. Etwa 39% der Gene im Gehirn sind zwischen Flieger und Ammen unterschiedlich exprimiert (5500 getestete Gene) [185]. Hieraus ergibt sich die Hypothese, dass dies nicht das Produkt der Aktivierung einzelner Transkriptionsfaktoren ist, sondern es sich hier um eine übergeordnete, das gesamte Genom betreffende Expressionsregulation handelt.

Der mögliche Regulator könnte die Chromatinstruktur sein, von der aus der Entwicklung und der Krebsentstehung bekannt ist, dass sie grundlegende Expressionsmusterveränderungen erzeugen kann [27, 100]. Die Chromatinstruktur wiederum wird durch die Modifikationen an den Histonen gesteuert [99, 124]. Daher habe ich Flieger und Ammen in Hinblick auf die Verteilung ihrer Histonmodifikationen untersucht.

Dabei hat sich gezeigt, dass in jedem Einzelexperiment die Acetylierung am Lysin 18 des Histons H3 in Fliegern höher als in Ammen und dies unabhängig vom Alter der Bienen ist. Diese Acetylierung spielt eine entscheidende Rolle bei der Aktivierung der Transkription [46, 78, 144], was darauf schließen lässt, dass sich Flieger und Ammen in der Transkriptionrate im Gehirn unterscheiden.

Die signifikanten Unterschiede in der Mono-Methylierung am Lysin 4 des Histons H3 sind nicht so eindeutig, sie sind nur signifikant, wenn alle vier Einzelexperimente vereint werden. Daher kann hier keine Aussage zur Altersunabhängigkeit getroffen werden. Über die Funktion der Mono-Methylierung an dieser Position ist wenig bekannt. Sie ist funktionell verschieden von der Di- und Tri-Methylierung am Lysin 4 [51, 164], welche Signale für aktiv transkribierte Gene sind [155, 159]. Die Mono-Methylierung ist in Enhancer-Regionen zu finden [149] und wird sehr wahrscheinlich durch RTF1, einem Protein, welches bei der Termination der DNA-Synthese und der Initiierung und Termination der RNA-Synthese eine Rolle spielt [59], etabliert [51]. Durch diese Einschränkungen ist es schwierig, eine Aussage über die mögliche Bedeutung der Veränderung dieser Histonmodifikation zu treffen.

Keine Unterschiede zeigen sich bei der Tri-Methylierung am Lysin 23 des Histons H3. Diese Histonmodifikation ist ein Signal, welches zur Repression der Transkription führt [35, 47] und eine wichtige Rolle bei der Stilllegung von Genen während der Zelldifferenzierung spielt [162, 173]. Da die Untersuchungen an adulten Tieren durchgeführt wurden und somit keine Zelldifferenzierung zu erwarten ist, die größere Teile des Gehirns betreffen, war mit diesem Befund zu rechnen.

Da die von mir gemessene Histonacetylierung auf eine unterschiedliche Expression hinweist, habe ich Untersuchungen durchgeführt, die eine Expressionsveränderung weiter untermauern. Bisherige Untersuchungen zu den Unterschieden zwischen Fliegern und Ammen stützen sich hauptsächlich auf die Analyse der mRNA-Level [17, 75, 113, 184, 185]. Dies zeigt jedoch nicht, wieviel von der mRNA in die funktionelle Form, das Protein, umgesetzt wird. Es kann durchaus sein, dass die Translation als Regulationsebene fungiert [129] und so die Menge von mRNA und Protein unterschiedlich ausfallen. Es existiert bisher nur eine Studie, die auf der Quantifizierung der Proteinmengen (Kr-h1) durch Antikörper beruht [66]. Deshalb wurde von mir die Proteinmenge direkt mit Antikörpern gemessen. Dies hatte zudem den Vorteil, dass die Messungen an denselben Proben aus der Histonanalyse durchgeführt werden konnten.

Für die Untersuchung wurden Antikörper gegen Proteinkinasen (PKA, PKC und MAPK) verwendet, die zum einen in der Biene bereits etabliert sind [3, 4, 146] und deren Rolle bei Lernen und Gedächtnisbildung beschrieben ist [86, 135, 146].

In der Untersuchung hat sich gezeigt, dass alle drei Kinasen in Fliegern stärker exprimiert sind, dieser Unterschied ist unabhängig vom Alter der Tiere. Damit unterstützt dieses Ergebnis die Annahme, dass in denselben Tieren, in denen die Histonacetylierung erhöht ist, auch die Expression der Kinasen erhöht ist. Die Expression von H3 wird im Gegensatz dazu durch die Aufgabengebiete nicht beeinflusst.

Ein direkter Vergleich zwischen den bisher veröffentlichten, in Fliegern stärker exprimierten Genen aus mRNA-Analysen und meinen Ergebnissen ist nicht möglich, da entweder die mRNA der von mir quantifizierten Kinasen nicht untersucht wurde [185] oder die Ergebnisse so zusammengefasst wurden, dass keine differenzierte Aussage zu den einzelnen Genen mehr möglich ist [75, 184].

Die bisherigen Ergebnisse zeigen, dass unterschiedliche Histonmodifikationen zwischen Flieger und Ammen existieren und dass es in denselben Bienen zu entsprechenden Unterschieden in der Expressionen der Kinasen PKA, PKC und MAPK kommt.

Damit könnten die Histonacetylierungen die Chromatinstruktur beeinflussen und für die Etablierung der aufgabenabhängigen Expressionsmuster verantwortlich sein. Um dies zu überprüfen, ist es notwendig, die Histonacetylierung künstlich zu verändern und zu untersuchen, wie sich dies auf Expressionsmuster und Verhalten auswirkt.

Beeinflussungen der Histonacetylierung sind nur durch die Inhibition der Histondeacetylasen (TSA) möglich. Andere einfache Möglichkeiten zur Aktivierung der HDACs oder eine allgemeine Inhibition oder Aktivierung der Histonacetyltransferasen sind derzeit nicht bekannt. Mit Hilfe eines HDAC-Inhibitors kann künstlich eine Hyperacetylierung der Histone

5.1 Rolle der Histonacetylierung bei der Aufspaltung in die Aufgabengebiete der Arbeiterin

erzeugt werden, um den Unterschied zwischen Flieger und Ammen zu erzeugen, also aus jungen Bienen durch eine künstlich induzierte Hyperacetylierung vermehrt Flieger zu entwickeln. Bei der PKG, mit der ähnliche Experimente durchgeführt wurden, wurde keine künstliche Überexpression induziert, wie es in Fliegern gefunden wird [17], sondern die PKG wurde mittels 8-bromo-cGMP überaktiviert [16]. In der Literatur wurden diese beiden Sachverhalte zu der Aussage zusammengefügt, dass die PKG eine wichtige Rolle bei der Aufspaltung der Aufgabengebiete spielt, obwohl diese beiden Befunde möglicherweise nichts miteinander zu tun haben [15-17]. In meinem Experiment dagegen erzeuge ich künstlich eine Hyperacetylierung von Histonen, die der Stärke der Histonacetylierung von Fliegern entspricht.

Tab. 5-1: Übersicht über Unterschiede zwischen Flieger und Ammen

Unterschiede	Flieger vs Ammen	Verändert Verhalten	Verändert Expression	Literatur
Hormone				
Juvenilhormon	+	⁽¹⁾ +		[152, 161, 170, 171]
Vitellogenin	-			[5]
Neuromodulator/ -transmitter/ -hormon				
Oktopamin	+	⁽¹⁾ +		[160, 161, 181]
Genexpression				
mRNA-Level				
PKG (<i>Amfor</i>)	+	⁽²⁾ +	+	[15-17]
Tyramin-β-Hydroxylase	+			[113]
Unterschiedliche Expressionsmuster	+/-			[75, 184, 185]
Proteinlevel				
Kr-h1	+			[66]
Kinasen (PKA, PKC und MAPK)	+			Eigene Messung
Histonmodifikationen				
H3 Ac-18	+	⁽³⁾ +	(+)	Eigene Messung
H3 Met-4,1	+			Eigene Messung

+: erhöht in Fliegern / niedriger in Ammen; -: niedriger in Fliegern / erhöht in Ammen

1) Erhöht die Ausflugsrate nur in Kombination (Juvenilhormon und Oktopamin zusammen)

2) Erhöht die Ausflugsrate und die Phototaxis bei erhöhter Enzymaktivität (induziert durch 8-bromo-cGMP)

3) nur ein Experiment

(+) – nur eine Tendenz

Die Ergebnisse dieser sehr aufwändigen Experimente zeigen eine tendenzielle Erhöhung der Histonacetylierung, eine Erhöhung der Kinaseexpression und ein vermehrtes Ausflugsverhalten der TSA-gefütterten Bienen. Damit entsprechen die Ergebnisse den Erwartungen und deuten darauf hin, dass eine erhöhte Histonacetylierung zu einer verstärkten Ausbildung von Fliegern führt, jedoch müssen die Ergebnisse vorsichtig interpretiert werden. So handelt es sich bei der Kinaseexpression nur um eine Tendenz. Hierbei ist zu bedenken, dass TSA zwar die Transkription beeinflusst, was jedoch nicht zwangsläufig zu einer erhöhten Translation führen muss. Daher könnte es sein, dass neben der Histonacetylierung noch weitere Signale notwendig sind, die die Expressionsunterschiede etablieren. Da bei den Untersuchungen nur ein bestimmter Zeitpunkt untersucht wurde, könnte es sein, dass andere Zeitpunkte wesentlich deutlichere Unterschiede zwischen Flieger und Ammen liefern könnten.

Ebenso sind andere Gründe für das vermehrte Ausfliegen denkbar. Bei der oralen Applikation von TSA zeigte sich, dass die TSA-gefütterten Tiere nach etwa 2-3 Tagen die Nahrungsaufnahme im Vergleich zu den Kontrolltieren verringerten. Es könnte somit sein, dass die TSA-gefütterten Tiere geschwächt oder hungriger waren, was zu verschiedenen Reaktionen im Bienenvolk führt.

In der Natur kann ein aggressiveres, stärkeres Volk ein schwächeres aus seinem Stock verdrängen [31]. Es ist möglich, dass bei einer Konfrontation zweier Gruppen wie in diesem Experiment, die stärkere, in diesem Fall die Kontrollgruppe, die schwächere, die TSA-Gruppe, verdrängt und deswegen die TSA-Tiere weniger im Stock vertreten waren. Dazu ist es aber notwendig, dass die Gruppen sich voneinander unterscheiden können und dass sie sich als fremd erkennen.

Als Erkennungsmerkmal dienen die kurzkettigen Kohlenwasserstoffe im Wachs, die durch die genetische Herkunft bestimmt werden [30]. Da die Gruppen jedoch nie mit unterschiedlichem Wachs in Berührung gekommen sind, sollten keine Unterschiede zwischen den Gruppen induziert worden sein. Dennoch ist es nicht auszuschließen, dass durch die TSA-Fütterung in verschiedenen Käfigen eine unterschiedliche Zusammensetzung der Kohlenwasserstoffe auf dem Chitinpanzer induziert wurde, die zu Unterschieden zwischen den Tieren und somit zu Aggressionsverhalten führt.

Ein weiterer Grund, der zu einem vermehrten Ausfliegen der TSA-Gruppe führen könnte, ist die verringerte Nahrungsaufnahme. Da der Ernährungszustand auch einen Einfluss auf das Ausflugsverhalten besitzt [6], ist es möglich, dass die TSA gefütterten Bienen vermehrt ausfliegen, weil sie hungriger sind.

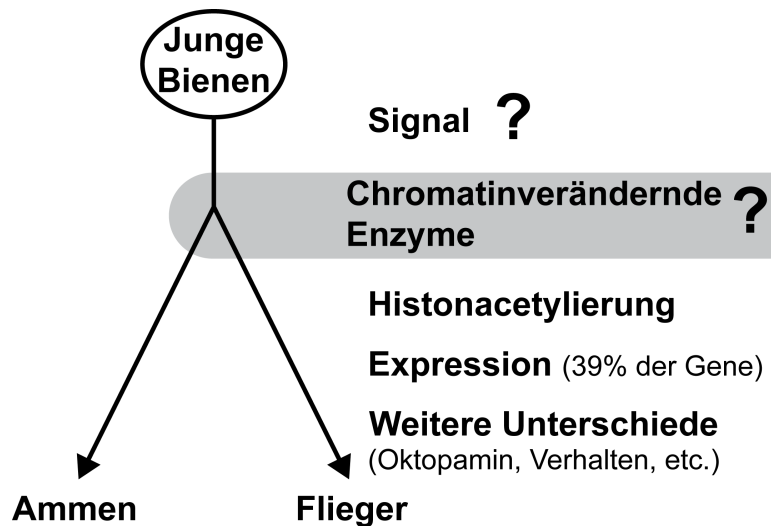


Abb. 5-2: Neues mögliches Modell der Aufspaltung der Aufgabengebiete

Zeigt das von mir postulierte Modell. Dabei werden durch ein Signal chromatinverändernde Enzyme aktiviert, die die Histonacetylierung etablieren und somit die Chromatinstruktur verändern. Dies führt wiederum zu einer veränderten Expression in den Bienen, was letztlich in allen weiteren Unterschieden zwischen Flieger und Ammen resultiert. Der Zeitpunkt der Aufspaltung ist nach meinem Modell die unterschiedliche Aktivierung der chromatinverändernden Enzyme.

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass es zwischen Flieger und Ammen Unterschiede in der Histonacetylierung gibt, die daraufhin deuten, dass es über die Chromatinstruktur zu einer Regulation der Gen-Expression kommt. Ist dies der Fall, dann wäre die veränderte Histonacetylierung und die aus ihr resultierende Chromatinstruktur die Erklärung für die unterschiedlichen Expressionsmuster von Flieger und Ammen und somit die Ursache aller bisher bekannten Unterschiede.

Um dies zu bestätigen, muss die Frage geklärt werden, in welcher Reihenfolge die Unterschiede zwischen Flieger und Ammen auftreten, d.h. ob die Aktivität der PKG zu einer Erhöhung der Histonacetylierung, oder ob die Histonacetylierung zu einer Erhöhung der PKG-Expression führt.

Dies ließe sich entweder dadurch zeigen, dass durch 8-bromo-cGMP eine erhöhte Histonacetylierung induziert wird, oder dass durch TSA die mRNA von *amfor* zunimmt. Ähnliche Experimente müssten für Oktopamin durchgeführt werden. Damit wäre es möglich, eine einheitliche Kausalkette der zur Aufspaltung führenden Mechanismen zu bilden.

Das von mir in Abb. 5-2 vorgeschlagene Modell geht davon aus, dass sich die individuellen Unterschiede aufgrund eines noch zu bestimmenden Signals verstärken und die letztlich zu einer unterschiedlichen Aktivierung der chromatinverändernden Enzyme führt. Hier passiert meiner Meinung nach die eigentliche Trennung der beiden Gruppen. Diese unterschiedliche Enzymaktivierung führt zu einer unterschiedlichen Acetylierung der Histone, was wiederum

eine veränderte Gen-Expression nach sich zieht und damit alle anderen bisher bekannten Unterschiede zwischen Flieger und Ammen.

Selbst wenn das von mir postulierte Modell nicht zutreffend sein sollte, so weisen meine Befunde in eine neue Richtung, die es ermöglichen, außerhalb der bisherigen Unterschiede zwischen Fliegern und Ammen nach den Ursachen der Aufspaltung zu suchen. Das bedeutet, dass sich die Herangehensweise an das Problem der Aufspaltung der Aufgabengebiete erweitert, über das bloße Untersuchen der Unterschiede hinaus. Mit den chromatinverändernden Enzymen rücken zum ersten Mal Proteine in den Fokus dieser Fragestellung, die nicht aus dem Unterschied von Flieger und Ammen entsprungen sind.

5.2 Histonacetylierung in Sättigung, Wahrnehmung und nicht-assoziativem Lernen

Die Aufspaltung in die Arbeitsgebiete ist ein langwieriger Prozess, der eher entwicklungsähnliche Züge trägt, da die Aufspaltung auch mit morphologischen Veränderungen einhergeht. Die Etablierung eines Gedächtnisses dagegen geschieht innerhalb weniger Sekunden und Minuten und führt ebenso wie die Aufspaltung in die Aufgabengebiete zu einer Verhaltensveränderung.

Die bisherigen Veröffentlichungen, die sich mit dem Einfluss der Histondeacetylasen in Lernen und Gedächtnisbildung beschäftigen, haben sich zum einen nur auf assoziative Lernformen beschränkt und zum anderen wurden mögliche Beeinflussungen der Sensorik durch die verwendeten HDAC-Inhibitoren ignoriert.

Die appetitive Konditionierung verwendet ein Futterstimulus als unkonditionierten Stimulus (US). Der Sättigungszustand beeinflusst die Wahrnehmung des US und damit auch den Lernerfolg [18]. In satten Tieren verliert der US an Bedeutung, dies zeigt sich an der schlechteren Stimulierbarkeit der Tiere im Empfindlichkeitstests, sowie darin, dass vollständig gesättigte Tiere in appetitiven Lernparadigmen kein Gedächtnis ausbilden.

Um die Wechselwirkungen zwischen der Histonacetylierung und der US-Wahrnehmung zu überprüfen, wurde zunächst der Einfluss des Sättigungszustands auf die Histonacetylierung untersucht. Dabei hat sich gezeigt, dass die Histonacetylierung an Position 18 am Histon H3 in satten Tieren höher ist, als in hungrigen Tieren. Eine erhöhte Histonacetylierung ist ein Signal für eine gesteigerte Transkription [99, 124]. Die Transkription ist ein energieverbrauchender Prozess, somit stellt sich die Histonacetylierung im Gehirn der Honigbiene als Regulator eines energieverbrauchenden Prozesses dar, da vermehrt Energie verbraucht wird, wenn Energie für die Reaktion vorhanden ist. Bisher existiert nur eine

Untersuchung, die eine zu geringe Energiezufuhr mit Histonacetylierung verknüpft, dabei stieg die Acetylierung am Histon H4, wenn die *Arabidopsis*-Zellen in einem Sucrose-Mangelmedium gezogen wurden [138]. Für die Richtung oder den Grund dieser Regulation haben die Autoren keine Erklärung.

In anderen Tieren existieren nur Untersuchungen zu den Einflüssen von Mangeldiäten einzelner Substanzen auf Imprinting und fötale Programmierung [33, 43, 70]. Daher lassen sich keine weiteren Aussagen zu dem Befund treffen.

Durch die Gabe von TSA nimmt die Acetylierung an den Histonen zu, so wird künstlich der Zustand erzeugt, der theoretisch dem von satten Tieren entspricht. Daher ergeben sich verschiedene Möglichkeiten, wie sich eine künstlich induzierte Acetylierung auf die US-Wahrnehmung auswirken könnte. Zum einen könnte es durch die Hyperacetylierung an den Histonen zu einer verstärkten Transkription kommen, die im Extremfall zu einem gesteigerten Energiebedarf und somit zu verstärkt hungrigen Tieren führt. Zum anderen könnte es sich bei der Histonacetylierung nicht nur um das Resultat des Sättigungszustands handeln, sondern könnte ebenso wie bei der Aufspaltung der Aufgabengebiete das Verhalten beeinflussen. In einem appetitiven Lernparadigma, lernen hungrige Tiere besser und satte Tiere schlechter. Dies zeigt wie Veränderungen in der sensorischen Wahrnehmung Auswirkungen auf die Gedächtnisbildung haben können. Die bisherigen Arbeiten zeigen zwar Effekte durch TSA beim assoziativen Gedächtnis, zeigen aber nicht, dass die Sensorik durch die verwendeten HDAC-Inhibitoren unbeeinflusst ist. Daher könnte es sein, dass die Effekte von TSA beim Gedächtnis nicht durch die Wirkung auf das Gedächtnis selbst zustande kommen, sondern durch Wirkungen auf die Sensorik, also die Wahrnehmung der verwendeten Stimuli. Aus diesem Grund habe ich den Einfluss des von mir verwendeten HDAC-Inhibitors (TSA) auf die Wahrnehmung der beim assoziativen Lernen verwendeten Stimuli, Zuckerwasser (US) und Nelkenduft (CS), untersucht.

Um Veränderungen der US-Wahrnehmung durch TSA zu überprüfen, wurden TSA-injizierte Bienen auf Veränderungen in der Zuckerwasserempfindlichkeit und der Habituation untersucht. Dabei zeigt sich, dass TSA, in der beim assoziativen Lernen verwendeten Konzentration, weder die Zuckerwasserempfindlichkeit noch die Habituation beeinflusst. Daher kann davon ausgegangen werden, dass es zu keiner Beeinflussung der US-Wahrnehmung durch TSA kommt. Es ist allerdings nicht auszuschließen, dass es bei höheren Konzentrationen und längerer Einwirkungsdauer von TSA zu Veränderungen in der US-Wahrnehmung kommt. Ein Hinweis auf eine solche Veränderung könnte die verringerte Nahrungsaufnahme bei den Fütterungsexperimenten sein.

Veränderungen in der Wahrnehmung des CS lassen sich nicht wie beim US durch Variierung der Stimulusintensität untersuchen, da es sich beim CS um einen Stimulus handelt, auf den die Tiere nicht mit dem PER reagieren. Daher habe ich die Sensitisierung für die Untersuchung des TSA-Einflusses auf die CS-Wahrnehmung gewählt, weil dabei die Bedeutung des CS gesteigert wird und die Bienen vermehrt auf den CS mit dem PER reagieren. Es zeigt sich, dass die CS-Wahrnehmung ebenfalls nicht durch die TSA-Injektion beeinflusst wird.

Es kommt also durch die einmalige Injektion von TSA zu keiner messbaren Veränderung der Sensorik. Daraus kann gefolgert werden, dass die durch TSA induzierten Unterschiede im assoziativen Gedächtnis auf eine spezifische Wirkung von TSA auf das Gedächtnis zurückzuführen sind.

Bei der Habituation und der Sensitisierung handelt es sich nicht nur um Experimente, die der Überprüfung der Sensorik dienen, sondern auch um nicht-assoziative Lernparadigmen. Daher kann auch ausgeschlossen werden, dass TSA einen Einfluss auf das nicht-assoziative Lernen hat. Das nicht-assoziative Gedächtnis hingegen wurde von mir nicht untersucht.

Die Wirkung von TSA wäre, da es sich bei TSA um einen Modulator der Transkription handelt, erst in der Gedächtnisphase und nicht beim Lernen selbst zu erwarten. Um das Gedächtnis zu testen, wäre es notwendig, Langzeit-Habituation und Langzeit-Sensitisierung in der Biene zu induzieren, dies ist bisher nur für die Langzeit-Habituation gelungen [20].

5.3 Der TSA-Effekt im assoziativen Gedächtnis

2004 wurden erste Experimente veröffentlicht, die zeigen, dass es durch HDAC-Inhibitoren zur Verbesserung des Gedächtnisses nach einem assoziativen Lernparadigma kommt, der kontextabhängigen Angst-Konditionierung in der Maus [115].

Bis jetzt (02/2009) wurden nur 5 Untersuchungen zu Einflüssen der HDAC-Inhibitoren auf Lernen und Gedächtnisbildung veröffentlicht, in denen 3 verschiedene Inhibitoren (Natriumbutyrat, Valproat und Trichostatin A) auf 6 verschiedene Lernparadigmen (LTP, fear conditioning [one, three, four trial], eyeblink conditioning, object recognition, extinction, reconsolidation) angewendet wurden [28, 62, 110, 115, 179]. Diese Fülle erschwert es, Aussagen zu treffen, die für alle assoziativen Lernparadigmen gelten. Ein Beispiel liefert die Beeinflussung des Kurzzeitgedächtnisses (eng. short-term memory, STM) durch HDAC-Inhibitoren, hier widersprechen sich die Ergebnisse [62, 115]. Da die Untersuchungen mit unterschiedlichen Inhibitoren und unterschiedlichen Lernparadigmen durchgeführt wurden, ist keine differenzierte Aussage möglich. Daher ist eine Betrachtung der Gemeinsamkeiten dieser

Untersuchungen hilfreicher. Alle Untersuchungen wurden an der Maus durchgeführt, wobei die HDAC-Inhibitoren entweder vor oder direkt nach der Trainingsprozedur verabreicht wurden. Die bereits beschriebene Verbesserung des Eintagesgedächtnis, sowie des LTPs ist transkriptionsabhängig [115, 179]. Aufgrund der ersten Befunde habe ich zunächst getestet, ob sich die Experimente aus der Maus auf die Biene übertragen lassen.

Daher habe ich Bienen 2h vor dem Training mit TSA injiziert, weil sich im Gehirn der Honigbiene 2h nach Injektion mit TSA eine signifikante Erhöhung der Histonacetylierung am Histon H3 induzieren lässt. Anhand meiner Ergebnisse ist zu sehen, dass es durch die Wirkung von TSA zu keiner Veränderung des Lernens oder des STM (2h-Abruf) kommt, dagegen zeigt sich ein signifikanter Unterschied beim Eintagesgedächtnis. Damit wurde zum ersten Mal die Wirkung von HDAC-Inhibitoren auf das Gedächtnis außerhalb des Mausmodells gezeigt. Dies lässt darauf schließen, dass diesem Effekt ein allgemein gültiger Mechanismus zugrunde liegt.

5.4 Eingrenzung des Wirkzeitpunkts von TSA auf die Konsolidierungsphase

Bisher wurden allerdings alle Experimente in der Maus in der Weise durchgeführt, dass die HDAC-Inhibitoren entweder vorher oder sofort im Anschluss an das Training appliziert wurden [28, 62, 110, 179]. Dadurch wirken die HDAC-Inhibitoren auf alle durch das Training induzierten Mechanismen.

Aus der Literatur ist aber bekannt, dass das Gedächtnis aus verschiedenen Phasen und ineinandergreifenden Signalkaskaden beruht [55, 88]. Als eine einfache Einteilung lässt sich das Gedächtnis in die Phase der Gedächtnisbildung (Lernen) und der Phase der Gedächtnisfestigung (Konsolidierung) einteilen. Um zu ermitteln, auf welche dieser Phasen TSA wirkt, habe ich Bienen zu unterschiedlichen Zeitpunkten, relativ zum Trainingszeitpunkt, mit TSA injiziert.

Dabei zeigt sich der TSA-Effekt auf das Eintagesgedächtnis auch, wenn 30min-4h nach dem Training injiziert wird, was deutlich nach der Bildung des Gedächtnisses ist. Daher wirkt TSA während der Konsolidierung. Dies ist das erste Mal, dass die Wirkung eines HDAC-Inhibitors auf eine bestimmte Gedächtnisphase eingegrenzt wurde.

Bei der Konsolidierung laufen Prozesse ab, die das Gedächtnis stabilisieren, so dass es weniger anfällig für störende Einflüsse (z.B. Bildung eines anderen Gedächtnisses, Abkühlen des Gehirns und Inhibitoren der Translation) ist [128, 137, 156]. Der Prozess der Konsolidierung selbst wurde unter Verwendung des Lernparadigmas Ein-Trial-

Angstkonditionierung [55] oder der Langzeit-Potenzierung [1] (eng. long-term potentiation, LTP), ein Analogon von Lernen auf zellulärer Ebene, hauptsächlich in der Maus untersucht. Durch Untersuchungen am LTP ist die Vorstellung entstanden, dass die Transkription und die nachfolgende Translation für die synaptische Konsolidierung wichtig sind, da sie die Bausteine (Cytoskelett, Rezeptoren usw.) für die Verstärkung der Synapsen liefern [1].

Ein einheitliches Bild der Konsolidierung lässt sich nur sehr schwer ausmachen, da sich für die verschiedenen Gedächtnismodulatoren (Inhibitoren und Aktivatoren) in verschiedenen Gehirnbereichen und in verschiedenen Zellen und Geweben unterschiedliche Kinetiken und Wirkmuster ergeben. Als einziges einheitlich übergreifendes Muster ergeben sich zwei Wirkzeitfenster bei Lernen und Gedächtnisbildung: ein Erstes während oder sofort nach dem Training und ein Zweites 2-6h später [88]. Meine Ergebnisse deuten daraufhin, dass das Zeitfenster, in dem TSA wirkt, von ca. 1h nach dem Training bis ca. 5h nach dem Training reicht. Daher lässt sich die Wirkung von TSA mit großer Wahrscheinlichkeit dem zweiten Wirkzeitfenster zuordnen.

Aus der Literatur ist bekannt, dass HDAC-Inhibitoren zu einer verstärkten Expression von BDNF und c-fos bei der Gedächtnisbildung führen [62]. Von diesen ist bekannt, dass sie eine wichtige Rolle bei der Konsolidierung spielen [133, 154, 168]. Daneben existiert auch noch die Möglichkeit, dass CBP (CREB binding protein), eine Histonacetyltransferase, ein Zielprotein der HDACs ist. Ohne CBP kommt es nicht zur Konsolidierung [103]. Dies sind die möglichen Kandidaten, die durch die HDACs beeinflusst werden. Zu einem späteren Zeitpunkt komme ich noch einmal auf die Wechselwirkungen zwischen HDACs und CBP bzw. BDNF zurück.

5.5 Induktion eines transienten transkriptionsabhängigen Gedächtnisses

Bei der Maus zeigt sich nach einer Ein-Trial-Angstkonditionierung bereits nach einem Tag ein transkriptions- und translationsabhängiges Gedächtnis [26, 63]. Daher können die Ergebnisse mit TSA so gedeutet werden, dass der HDAC-Inhibitor während der Konsolidierungsphase die Transkription verbessert oder erleichtert. Die Biene dagegen zeigt ein transkriptionsabhängiges Gedächtnis beim Drei-Trial-Training erst am dritten Tag nach dem Training [64, 190]. Durch ein Ein-Trial-Training wird gar kein transkriptionsabhängiges oder störungsanfälliges Gedächtnis induziert [64].

Wie im vorangegangenen Kapitel besprochen, wirkt TSA während der Konsolidierungsphase, dies gilt auch für das Ein-Trial-Training, das gar keine solche Phase aufweist. Um zu klären,

ob die Wirkung von TSA, wie für die Maus beschrieben, nur auf das transkriptionsabhängige Gedächtnis wirkt und TSA somit im Ein-Trial-Training eine transkriptionsabhängige Gedächtnisphase induziert, habe ich die Transkription mit Hilfe des Transkriptionsinhibitors Actinomycin D (ActD) geblockt, indem ich TSA und ActD zusammen injiziert habe.

Dabei zeigt sich am ersten Tag nach dem Ein-Trial-Training sowie am ersten und zweiten Tag nach dem Drei-Trial-Training eine Transkriptionsabhängigkeit des TSA-Effekts. (s. Abb. 5-3).

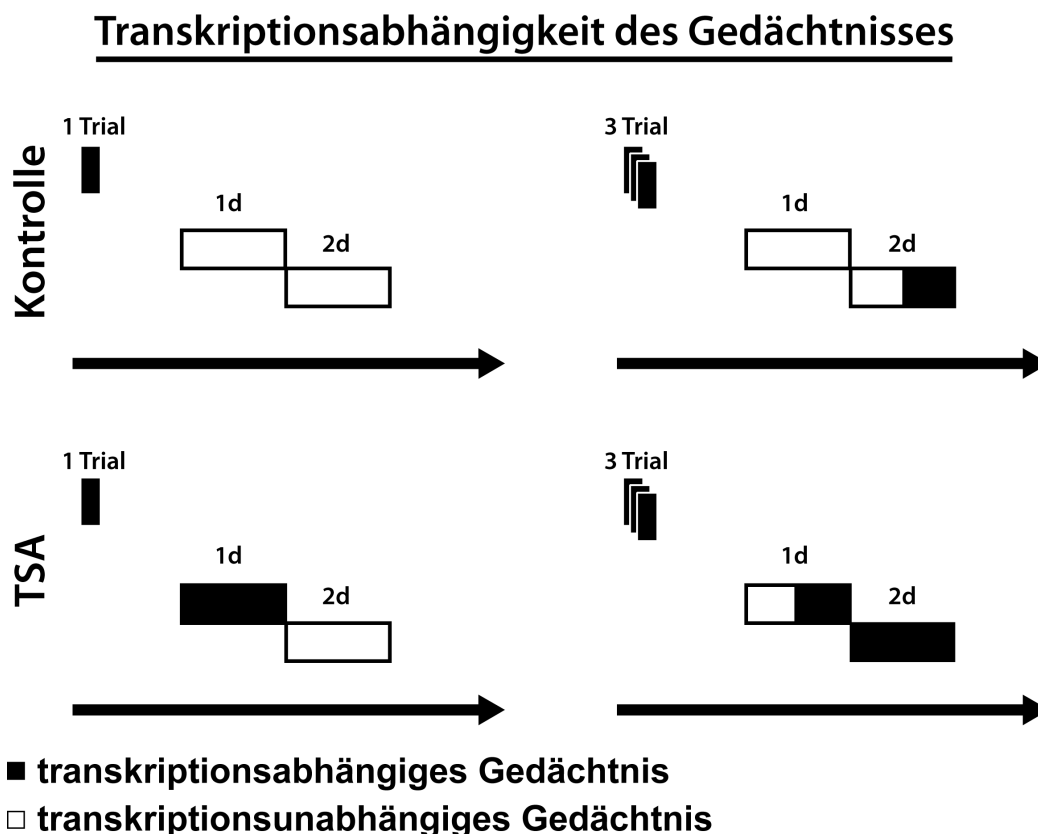


Abb. 5-3: Transkriptionsabhängigkeit des Gedächtnisses abhängig von Training und TSA-Gabe

Wiedergegeben ist die Transkriptionsabhängigkeit der Gedächtnisse am ersten (1d) und zweiten Tag (2d) nach dem Training für Ein-Trial- (links) und Drei-Trial-Training (rechts). Gegenübergestellt werden Bienen, die entweder mit Kontrolllösung (oben) oder TSA (unten) injiziert wurden.

Im Unterschied zu den Befunden in der Maus induziert TSA im Ein-Trial-Training in der Honigbiene ein transkriptionsabhängiges Gedächtnis, das ohne TSA nicht zu beobachten ist (s. Abb. 5-3). Beim Drei-Trial-Training hingegen ist unklar, ob es sich bei dem durch TSA induzierten Gedächtnis um eine vorgezogene Induktion des normalen transkriptionsabhängigen Gedächtnisses oder ob es sich um die Induktion eines zusätzlichen früheren transkriptionsabhängigen Gedächtnisses handelt.

In der Literatur wird die Induktion eines transkriptionsabhängigen Gedächtnisses mit der Bildung von Langzeitgedächtnis (eng. long-term memory, LTM) gleichgesetzt [54, 102, 192].

Meine Ergebnisse zeigen, dass es zwar durch TSA im Ein-Trial-Training zur Ausbildung einer transkriptionsabhängigen Gedächtnisphase kommt, diese ist jedoch transient ist und nicht in ein permanentes Langzeitgedächtnis überführt wird. Es stellt sich die Frage, wieso die durch TSA induzierte Gedächtnisverbesserung im Ein-Trial-Training nicht wie im Drei-Trial-Training auch beim 2d-Abruf zu sehen ist. Welcher Unterschied zwischen den beiden Trainingsmethoden verhindert die Überführung in das permanente LTM?

Der Unterschied zwischen diesen beiden Trainingsmethoden ist die Trainingsstärke, die sich darin ausdrückt, wie häufig dem Tier die CS-US-Paarung präsentiert wird. Es existieren bisher keine Veröffentlichungen, die unterschiedliche Trainingsstärken unter TSA-Einfluss miteinander vergleichen. Bisher ist nur eine Publikation veröffentlicht, die ein schwaches Training unter TSA-Einfluss mit einem starken Training ohne TSA-Einfluss in der Maus vergleicht [62]. Hierbei zeigt sich, dass es durch den Einfluss von TSA zu einer Steigerung der Expression von BDNF und c-fos sowie des 24h-Gedächtnisses auf das Niveau des starken Trainings kommt. Im Gegensatz zu meinen Ergebnissen wird das durch TSA induzierte Gedächtnis hier allerdings in ein permanentes Langzeitgedächtnis überführt (persönliches Gespräch mit M. Wood; UC Irvine).

Was macht das von mir verwendete Ein-Trial-Training so besonders, dass es hier nicht zu einer Übertragung ins permanente Langzeitgedächtnis kommt?

Die molekularen Mechanismen, die das Gedächtnis bilden, das durch ein Ein-Trial-Training induziert wird, sind noch völlig unbekannt. Daher können nur Mutmaßungen geäußert werden, wie die Überführung ins permanente Langzeitgedächtnis verhindert wird.

Bei dem zugrunde liegenden Mechanismus müsste es sich um einen Schalter handeln, der im Drei-Trial-Training die Überführung des Gedächtnisses vom Kurzzeit- ins Langzeitgedächtnis ermöglicht, dies aber im Ein-Trial-Training verhindert. Die bisher bekannten Schalter, die zwischen Kurzzeit- und Langzeitgedächtnis vermitteln, sind die erneute oder verlängerte Aktivierung der PKA [135] und die damit sehr wahrscheinlich einhergehende Aktivierung des Transkriptionsfaktors CREB [192].

Bei Mäusen, die ein funktionsuntüchtiges CREB besitzen, induziert TSA keine Verbesserung des Gedächtnisses [179]. Da es sich allerdings um eine Ein-Trial-Angstkonditionierung handelt, die bereits von sich aus ein transkriptionsabhängiges Gedächtnis induziert, kann es nicht mit dem Ein-Trial-Lernparadigma aus der Biene verglichen werden, welches kein transkriptionsabhängiges Gedächtnis induziert [64]. Es wäre möglich, dass in der Biene ein transkriptionsabhängiges Gedächtnis induziert wird, das aber nicht von CREB abhängig ist und daher eventuell nicht ins Langzeitgedächtnis übertragen wird.

Ein weiterer Hinweis, wie vielleicht die Überführung des Gedächtnisses im Ein-Trial-Training verhindert wird, liefert meine Untersuchung zu den verschiedenen TSA-Injektionszeitpunkten. Hier hat sich gezeigt, dass sich der TSA-Effekt bei einer Injektion 6h nach dem Training umkehrt. Dies könnte auf eine Transkriptionsphase hindeuten, die sich negativ auf das Gedächtnis auswirkt. Weiterführende Experimente mit Actinomycin D, das ebenfalls 6h nach einem Ein-Trial-Training injiziert wurde, liefern das entgegengesetzte Ergebnis von TSA, eine Gedächtnisverbesserung (s. Abb. 5-4 auf Seite 79). Beide Ergebnisse sind nur Tendenzen, sie sind beide nicht signifikant. Aus der Literatur ist bekannt, dass die Injektion von Actinomycin D 6h nach einem Drei-Trial-Training keinen Einfluss auf das Eintagesgedächtnis hat [190]. Zusammengenommen könnte dies auf eine inhibitorische Transkriptionsphase hinweisen, die nur nach einem Ein-Trial-Training auftritt und somit verhindert, dass einmalige und damit nicht verhaltensrelevante Ereignisse ins Langzeitgedächtnis übergehen. Um solch ein Modell zu verifizieren, sind aber deutlich mehr Experimente notwendig.

Injektion 6h nach Ein-Trial-Training

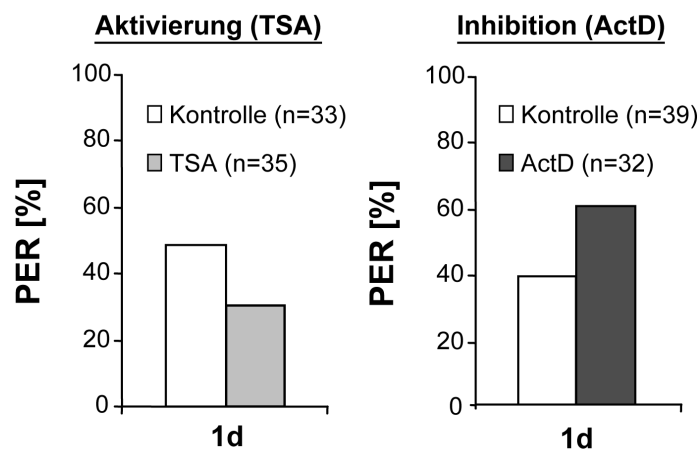


Abb. 5-4: Abhängigkeit des 1d-Gedächtnisses von der Aktivierung und Inhibition der Transkription

Dargestellt sind die Anzahl der Bienen in %, die auf den Nelkenduft (CS) mit dem PER reagierten. Gezeigt ist nur das Gedächtnis beim 1d-Abruf. Beim Training handelte es sich um ein Ein-Trial-Training. Die Tiere wurden vor dem Training gefüttert. Die Tiere wurden 6h nach dem Training mit 1µl der entsprechenden Lösung injiziert: **Aktivierung:** **Kontrolle:** Kontrolllösung (PBS/DMSO 4:1); **TSA:** Trichostatin A 0,5µg/µl in Kontrolllösung (aus Abb. 4-12 auf Seite 48); **Inhibition:** **Kontrolle:** Kontrolllösung (PBS/DMSO 1:1); **ActD:** Actinomycin D 2µg/µl in Kontrolllösung

5.6 Einfluss von 5-Azacytidin auf Histonmodifikationen und Gedächtnisbildung

Die bisherigen Untersuchungen zeigen, dass zumindest die HDACs und damit sehr wahrscheinlich die Histonacetylierung und mit ihr die Histonmodifikation allgemein, eine wichtige Rolle bei Lernen und Gedächtnis spielen. Wie sieht es mit der Modifikation der DNA aus? Dazu muss geklärt werden, wie die DNA-Methylierung die Chromatinstruktur beeinflusst.

Durch eine Hypermethylierung der DNA kommt es zur Deacetylierung der Histone, wohingegen aus einem Verlust der DNA-Methylierung alleine keine Erhöhung der Histonacetylierung folgt [111]. Das bedeutet, dass es durch die DNA-Methylierung zwar zur Schließung der Chromatinstruktur kommt, aber durch eine Demethylierung nicht zwangsweise zu einer Öffnung. Um zu testen, ob dies auch für die Biene zutrifft, habe ich die *de novo* Methyltransferase (DNMTs) mit Hilfe von 5-Azacytidin geblockt. Durch die Inhibition der DNMTs sollte sich die DNA-Methylierung verringern.

Ich konnte keine Veränderungen in den von mir untersuchten Histonmodifikationen nach Gabe von 5-Azacytidin feststellen. Aus der Literatur ist bekannt, dass es an einzelnen Promotor-Regionen [60] zu Veränderungen in der Histonacetylierung kommen kann, es könnte sein, dass sie eventuell einen zu kleinen Beitrag am Gesamtsignal ausmachen und daher nicht detektiert werden. Ich habe die DNA-Methylierung nicht direkt gemessen, deshalb kann nicht festgestellt werden, ob die verwendete Konzentration von 5-Azacytidin im Futter für eine Reduktion der DNA-Methylierung ausreichend war.

In der Maus konnte gezeigt werden, dass 5-Azacytidin einen negativen Effekt auf das Gedächtnis ausübt [132]. Um zu überprüfen, ob in der Biene, ebenso wie in der Maus, die DNA-Methylierung bei der Gedächtnisbildung eine Rolle spielt, wurden Bienen vor dem Training mit 5-Azacytidin injiziert. In meinen Experimenten zeigen sich im Gegensatz zu den Experimenten mit Mäusen keine Unterschiede im Gedächtnis nach 5-Azacytidin-Injektion.

Da 5-Azacytidin in nur einer Konzentration untersucht wurde, kann es durchaus sein, dass die verwendete Konzentration nicht ausreichend war. Vergleicht man die Konzentration im Experiment (1µg pro Biene – systemische Konzentration von ca. 10ng/µl) mit der Konzentration in dem Verhaltensexperiment der Mäuse, so zeigt sich, dass die im Bienenexperiment verwendete Konzentration um den Faktor 20 geringer ist. Injektionen mit einer 20x erhöhten Konzentration direkt ins Gehirn, das korrespondierende Experiment wie in der Maus, war nicht aussagekräftig und wurden in Anbetracht der fehlenden Wirkung auf das allgemeine Verhalten im Fütterungsexperiment nicht wiederholt.

5.7 DNA-Methylierung: Säugetiere und Insekten unterschiedlich bei der Gedächtnisbildung

Im Gegensatz zur Maus, deuten meine Ergebnisse an, dass die DNA-Methylierung in der Biene keinen Einfluss auf die Gedächtnisbildung hat (s. Abb. 5-5 auf Seite 82). Es stellt sich daher die Frage, ob die DNA-Methylierung in Insekten und Säugern die gleiche Aufgabe bei der Gedächtnisbildung übernimmt.

Im Vergleich zu Wirbeltieren besitzt *Drosophila* ein um den Faktor 1000 geringere DNA-Methylierung [72]. Dennoch wurde gezeigt, dass künstlich hypermethylierte DNA in *Drosophila*-Zellen ebenso stark kondensiert und durch Histone verpackt wird, wie in Säugetierzellen [183]. Daher scheinen die notwendigen Signalkaskaden, die für die Schließung der DNA notwendig sind, auch in *Drosophila* zu existieren.

In der Biene sind alle drei DNMT-Familien [182], die auch im Menschen bekannt sind, vertreten, in *Drosophila* dagegen nur eine. Darum kann es sein, dass es Unterschiede in der DNA-Methylierung zwischen *Drosophila* und Biene gibt. Bisher sind noch keine Daten veröffentlicht, die die Menge der DNA-Methylierung in der Biene zeigen. Untersuchungen in unserem Labor deuten darauf hin, dass die Methylierungsstärke in der Honigbiene deutlich geringer ist als in Mäusen und in etwa der von *Drosophila* entspricht. Die Häufigkeit der DNA-Methylierung könnte deshalb ein möglicher Grund sein, weshalb 5-Azacytidin keinen Einfluss auf die appetitive olfaktorische Konditionierung in der Biene hat.

Vergleicht man das Gedächtnis von Insekten mit dem von Säugetieren, so zeigt sich in der längeren Lebensspanne eine mögliche Notwendigkeit für einen langanhaltenden, stabilen Gedächtnisspeicher.

Es ist daher denkbar, dass Insekten die DNA-Methylierung nicht für die Bildung des Gedächtnisses verwenden. Welche Konsequenzen lassen sich dann daraus ziehen?

Eine Idee wäre, dass Gedächtnisse, die auf die DNA-Methylierung zurückgreifen, stabiler sind, als Gedächtnisse ohne die Mitwirkung der DNA-Methylierung.

In Experimenten an der Maus, in denen sowohl 5-Azacytidin als auch TSA verwendet wurde, zeigt sich, dass sich die Wirkungen der beiden Inhibitoren gegenseitig aufheben [131]. Dieser Befund steht im Widerspruch zu der gesamten bisherigen Literatur, die einheitlich auf ein Zusammenwirken dieser beiden Inhibitoren hinweist [42, 53, 67, 121, 196]. Durch die gleichzeitige Verwendung von 5-Azacytidin und HDAC-Inhibitoren kommt es zu einer stärkeren Histonacetylierung als durch die HDAC-Inhibitoren alleine.

Das Zusammenwirken der beiden Inhibitoren deutet auf ein Modell der epigenetischen Mechanismen bei Lernen und Gedächtnisbildung hin, das in Abb. 5-5 auf Seite 82

zusammengefasst ist. Dabei besteht die in der Chromatinstruktur gespeicherte Information aus zwei Ebenen, aus der Histonebene und der DNA-Ebene. Die Transkription wird sehr wahrscheinlich durch das Lernen induziert, was eine Rekrutierung von Histonmodifizierenden Enzymen an die DNA zur Folge hat (z.B. CBP – eine Histonacetyltransferase) [189]. Die Acetylierung der Histone führt in einem noch nicht verstandenen Prozess zur Demethylierung der DNA [48, 142]. Somit wird die Information in die nächste Ebene übertragen. Die Reduktion der DNA-Methylierung führt zu einer Stabilisierung der Chromatinstruktur im offenen Zustand, so dass sich die beiden Ebenen gegenseitig stützen.

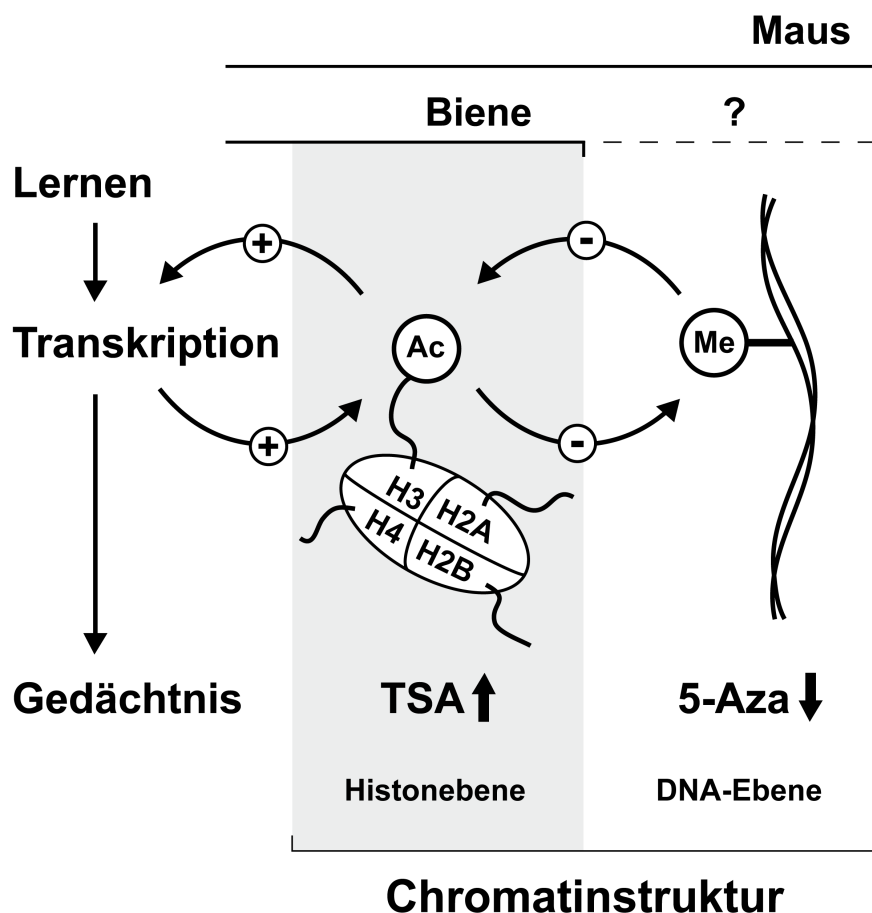


Abb. 5-5: Modifizierungsebenen der Chromatinstruktur und ihre Interaktion mit Lernen und Gedächtnis

Lernen induziert mit Hilfe von Signalkaskaden die Transkription. Bei diesem Prozess werden Histonacetyltransferasen an die DNA rekrutiert, die die Histone acetylieren. Dies hat wiederum eine Öffnung der Chromatinstruktur zur Folge, was bei einer erneuten Induktion der Transkription zu einer erleichterten und damit stärkeren Transkription führt. Dies sollte ein transkriptionsabhängiges Gedächtnis fördern. Durch die Öffnung kommt es aber ebenso zur Demethylierung der DNA. Dieser Prozess ist bisher noch nicht verstanden. Dadurch wird die Schließung der DNA geschwächt, was zu einer Stabilisierung der DNA im offenen Zustand führt, was sich ebenso positiv auf ein transkriptionsabhängiges Gedächtnis auswirken sollte.

5.8 Allgemeine Proteinacetylierung und ihr Einfluss aufs Gedächtnis

Neben der Modifikation der Histone können HDACs auch einen Einfluss auf eine allgemeine Proteinacetylierung besitzen. Ein erster Hinweis, dass es möglicherweise noch andere acetylierungsabhängige Mechanismen gibt, die zum Gedächtnis beitragen, jedoch nicht transkriptionsabhängig sind, zeigt sich in der Verbesserung des Kurzzeitgedächtnisses durch HDAC-Inhibitoren (Natriumbutyrat und TSA) in einem Objekt-Erkennungstest [62]. Ein weiterer Hinweis für diese Möglichkeit zeigen meine Befunde an der Biene. Hier wird das durch TSA induzierte Gedächtnis im Drei-Trial-Training am ersten Tag nicht vollständig von Actinomycin D inhibiert (s. Abb. 4-14 auf 51 Seite).

In der bisherigen Literatur wurde die Tatsache, dass die HDACs in Lernen und Gedächtnisbildung nicht nur Histone deacetylieren, völlig ignoriert. Dabei deuten sowohl die Tatsache, dass die HDACs phylogenetisch älter sind als die Histone [114], als auch weitere Befunde für Proteindeacetylierungen und Proteininteraktionen, die durch HDACs beeinflusst werden [32, 39, 40, 69, 76], darauf hin.

Eine Suche nach acetylierten Proteinen in der UniProt Knowledgebase (Swiss-Prot and TrEMBL) liefert über 2.500 Treffer [Volltextsuche nach „N6-acetyllysine“ auf www.expasy.org]. Bei näherer Betrachtung der Sucheergebnisse zeigt sich, dass Proteine aus allen Bereichen acetyliert sind: Stoffwechsel, Transkription, Translation, Cytoskelett, Transporter, Rezeptoren, Stützproteine, Kinasen, Phosphatasen etc. Dies deutet darauf hin, dass es sich bei der Acetylierung, wie bei der Phosphorylierung, um eine post-translationale Modifikation handelt, die einen Einfluss auf die Enzymaktivität und Proteininteraktionen haben kann. Für einige der Acetylierungen sind solche Funktionen bereits nachgewiesen. Bisher sind allerdings noch keine Signalkaskaden bekannt, die ähnlich wie bei den Kinase-Kaskaden eine Signalweitergabe durch Acetylierung vermitteln.

Als Donor der Acetylgruppe fungiert das Acetyl-CoA, welches als Thiolester einen sehr hohen Energiebetrag speichert (-7,5 kcal/mol – Vergleich mit ATP: -7,3 kcal/mol). Durch die Übertragung der Acetylgruppe auf Proteine entsteht ein einfacher Ester, der deutlich weniger Energie speichert (~ -1,9 kcal/mol). Im Vergleich mit der Phosphorylierung enthält der Acetylester zwischen 15-80% weniger Energie, was ihn chemisch stabiler macht [90, 136].

Dies kann bedeuten, dass sich die Acetylierung weniger gut für schnell modulierende Signale eignet, da durch den geringeren Energiegehalt im Ester sich die Acetylierung schlechter entfernen lässt.

Durch die Fülle der möglichen Zielproteine der HDACs, sowie der zum Teil recht schlecht untersuchten Funktion der Acetylierung an den jeweiligen Proteinen, ist es unmöglich im

Rahmen dieser Arbeit alle möglichen Wirkungen der HDACs zu diskutieren. Daher werden anhand von ausgewählten Beispielen die verschiedenen Wirkmöglichkeiten der HDACs beleuchtet.

Die Acetylierung, die von HDACs abgebaut wird, kann vielfältige Wirkungen ausüben. Allein bei verschiedenen Transkriptionsfaktoren und Transkriptions-Cofaktoren existieren unterschiedlichste Wirkungen der Acetylierungen. Im Fall von Stat1 [76] sehen wir eine Inaktivierung, CBP/p300 wird aktiviert und NF- κ B [40] wird abhängig von der Acetylierung unterschiedlich schnell wieder aus dem Kern heraustransportiert. Die Deacetylierung von NF- κ B beschleunigt den Transport aus dem Kern und sorgt so möglicherweise für ein „schärferes“ Signal. Es werden aber nicht nur Transkriptionsfaktoren acetyliert. Die Acetylierung von α -Tubulin [37, 178] sorgt zum Beispiel für einen beschleunigten Transport entlang der Microtubuli.

Die HDACs nehmen weitere Funktionen wahr, die nicht über die Deacetylierung vermittelt werden. Sie können einen Komplex mit der Proteinphosphatase 1 (PP1) bilden, der durch HDAC-Inhibitoren aufgelöst werden kann, was eine Aktivierung der PP1 zur Folge hat [32].

5.8.1 CBP: Zielprotein der HDACs?

Unter den vielen möglichen Nicht-Histon-Zielproteinen der HDACs befindet sich auch das CBP (CREB binding protein). CBP/p300 sind beides Histonacetyltransferasen (HAT) [104], die durch die Aktivierung von CREB, z.B. über den cAMP-Signalweg (s. Abb. 1-1 auf 8 Seite), an die DNA rekrutiert werden [38]. Dort sorgen sie bei der Transkription für die Acetylierung der Histone und helfen so die DNA für die RNA-Polymerase von Histonen zu befreien [84]. Die beiden HATs sind zum Beispiel für die in dieser Arbeit untersuchte Acetylierung am Histon H3 Lysin-18 mit verantwortlich [144].

Für CBP und p300 ist gezeigt, dass sie einen Einfluss auf die Etablierung vom Langzeitgedächtnis haben [2, 103, 139]. Ebenso hat sich heraus gestellt, dass bei Fehlen der Interaktion von CREB und CBP, TSA nicht zu einer Verstärkung des Gedächtnisses führt [179]. Daher ist anzunehmen, dass die Wirkung von TSA ein funktionelles CBP benötigt. Bei p300 kommt es zu einer Autoacetylierung, welche die Interaktion mit weiteren Transkriptions-Cofaktoren steuert [96]. HDAC1 baut diese Autoacetylierung wieder ab [169]. Eine Inhibition der HDACs könnte daher zu einer verlängerten Aktivität von CBP führen, was vielleicht zu einer Verstärkung der durch CREB induzierten Transkription und damit zu einem stärkeren Gedächtnis führt. Da allerdings CBP, wie bereits beschrieben, für die Induktion eines transkriptionsabhängigen Gedächtnis unerlässlich ist, kann mit den bisherigen

Mitteln nicht zwischen der TSA-Wirkung auf Histone und CBP unterschieden werden (s. Abb. 5-6 auf Seite 85). Dies gilt sowohl für Säugetiere, als auch für Insekten.

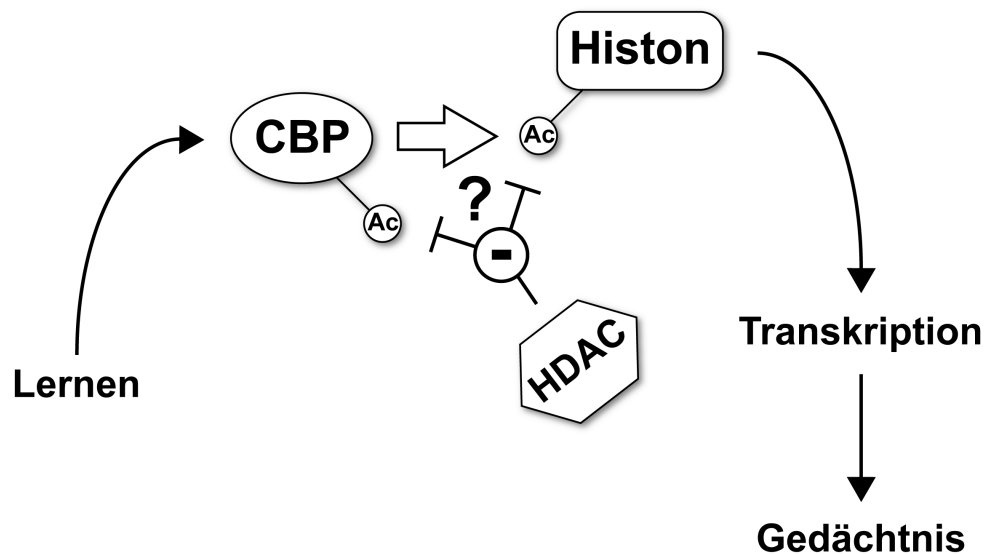


Abb. 5-6: Schema der HDAC-Wirkung bei Lernen und Gedächtnisbildung

Gezeigt ist der Ausschnitt der Signalkaskade, der zu einem transkriptionsabhängigem Gedächtnis führt, in dem die HDACs wirken.

5.8.2 BDNF: Ziel aller epigenetischen Modulation bei der Gedächtnisbildung?

Die meisten Veröffentlichungen, die epigenetische Mechanismen in Lernen und Gedächtnisbildung zum Thema haben, deuten daraufhin, dass BDNF eine zentrale Rolle in der durch HDAC-Inhibitoren erhöhten Gedächtnisleistung spielt [29, 41, 62, 125, 176]. Die Expression von BDNF wird dabei sowohl durch MeCP2 [41], ein Methylcytosin bindendes Protein, sowie durch die DNA-Methylierung selbst reguliert [125, 194]. Ebenso erhöht die Inhibition der HDACs die Expression von BDNF [62, 176].

Von BDNF ist bekannt, dass es die späte proteinabhängige Phase des LTPs (long-term potentiation – eine zelluläres Modell von Lernen und Gedächtnisbildung) induziert [195], sowie eine wichtige Rolle bei der Erhaltung des Gedächtnisses spielt [13, 14].

Damit kommt BDNF eine zentrale Rolle bei Lernen und Gedächtnisbildung zu. Da scheinbar alle epigenetischen Mechanismen einen Einfluss auf die Expression von BDNF besitzen, ist es nahezu unmöglich, den Einfluss der Chromatinstruktur auf Lernen und Gedächtnisbildung im Allgemeinen zu untersuchen. Eine Möglichkeit, die Effekte von TSA ohne den Einfluss von BDNF zu studieren, wäre die Verwendung BDNF Knock-Out-Mäusen [58, 91, 101]. Diese Mäuse zeigen starke Fehlentwicklungen der sensorischen Neuronen, ein um 75%

reduziertes Gewicht und Größe und sie sterben bereits nach 2-4 Wochen. Daraus lässt sich ersehen, dass es durch das Fehlen von BDNF während der Entwicklung zu erheblichen Beeinträchtigungen kommt. Für eine Untersuchung wäre daher ein induzierbarer Knock-down die bessere Wahl, wie es z.B. mit RNAi möglich wäre [10].

In Insekten ist bisher kein Analogon von BDNF bekannt. Da dennoch durch TSA ein stärkeres Gedächtnis induziert wird, ist es entweder möglich, dass in der Biene ein BDNF-Homolog vorhanden ist, oder, dass BDNF nicht für die Erhöhung des Gedächtnisses benötigt wird und die stärkere BDNF-Expression nur ein Nebenprodukt der TSA-Verabreichung ist.

5.9 Fazit

Die komplexen, ineinandergreifenden Mechanismen, die die Chromatinstruktur modulieren und steuern, machen es mit den bisher zur Verfügung stehenden Werkzeugen unmöglich, zwischen Transkriptionsfaktor- und Chromatinstruktur-basierter Transkriptionsregulation zu unterscheiden. Dies macht es sehr schwer, den Beitrag der Chromatinstruktur bei Lernen und Gedächtnisbildung und auf das Verhalten im Allgemeinen zu untersuchen.

Die ursprüngliche Idee, dass die Chromatinstruktur ein Langzeitspeicher für Gedächtnis ist, kann im Moment weder bestätigt noch widerlegt werden. Die schnelle Wirkung von TSA deutet allerdings eher auf die direkte Beeinflussung der Transkription via CBP hin.

Um den Einfluss der Chromatinstruktur zu studieren, müssen also Ansätze entwickelt werden, die eine Unterscheidung zwischen den schnellen und transienten Mechanismen bisheriger Untersuchungen und langanhaltender Mechanismen, wie es für Veränderungen der Chromatinstruktur zu erwarten ist, ermöglichen. Dazu ist es sehr wahrscheinlich notwendig Verhalten zu untersuchen, das sich für längere Zeit stabil erhält, wie z.B. die Aufspaltung der Aufgabengebiete oder andere vielleicht: konstante sehr stabile Gedächtnisse. Denn: bisher wurde noch nie der Einfluss von epigenetischen Mechanismen auf langanhaltende Gedächtnisse untersucht.

6 Zusammenfassung

Epigenetische Mechanismen beeinflussen die Chromatinstruktur indem sie Histone und/oder die DNA modifizieren und so die Effizienz der Transkription regulieren. In meiner Dissertation habe ich den Einfluss epigenetischer Mechanismen auf Lernen und Gedächtnisbildung, sowie der Aufspaltung der Aufgabengebiete (Flieger und Ammen) der Honigbiene untersucht. Um Veränderungen zu messen, wurde auf Basis des ELISAs eine Methode entwickelt, mit der spezifische Histonmodifikationen quantifizierbar sind. Mit dieser Methode habe ich die Effizienz des Histondeacetylase-Inhibitors TSA und dessen transiente Wirkung im Gehirn der Honigbiene bestätigt.

Bei der Verwendung von TSA in verschiedenen Lernparadigmen der Honigbiene konnte erstmals ausserhalb des Mausmodells gezeigt werden, dass es auch in Insekten zu einer Verstärkung des Gedächtnisses durch TSA kommt. Die detaillierte Verhaltensanalyse zeigte einen spezifischen TSA Effekt auf die Bildung von assoziativem Gedächtnis und demonstriert erstmals wie das TSA während der Konsolidierungsphase dabei wirkt. Neu war auch der Befund, dass TSA bei schwachem Training ein transientes transkriptionsabhängiges Gedächtnis induziert, das nicht in ein stabiles Langzeitgedächtnis überführt wird.

Die Untersuchung der Rolle der Histonacetylierung bei der Aufspaltung der Tätigkeiten von Arbeitsbienen, welche die Basis der sozialen Organisation im Bienenstock darstellt, zeigt erstmals eine Korrelation zwischen Tätigkeit der Bienen und der Histonacetylierung am Lysin 18 von Histon H3. Die Experimente deuten darauf hin, dass Änderungen der Histonacetylierung der Auslöser für die Aufspaltung der Aufgabengebiete im Bienenstock sind.

Meine Ergebnisse demonstrieren somit erstmals eine Funktion der Histonacetylierung bei Insekten und bilden die Basis um den Beitrag der Chromatinstruktur als übergeordneten Modulator beim Lernen und komplexeren Prozessen wie der Arbeitsteilung im Detail zu analysieren.

7 Summary

Epigenetic mechanisms alter the chromatin structure by modifying histones and/or DNA and thus change the accessibility of the transcription machinery. In my thesis I investigated the contribution of epigenetic mechanisms in learning and memory, and the complex process of labor division in honeybees. Based on ELISA I developed a technique to quantify specific histone modifications in the honeybee brain. Using this method I verified the functionality of the histone deacetylase inhibitor TSA in the honeybee and described its transient action in the brain.

By combining these tools with behavioral analysis I studied the impact of TSA on different learning paradigms. For the first time I demonstrated that the enhancement of associative memory known from mice also applies to insects. The thorough behavioral analysis demonstrated a specific effect on associative memory and provided first evidence that TSA acts during the consolidation phase. Moreover I found a novel aspect of TSA action on memory formation: after a weak training session, TSA induces a transient transcription dependent memory that is not transformed into long-term memory.

In addition I analyzed the role of histone acetylation in division of labor of worker bees that is the basis of the social organization in the hive. My experiments demonstrated a correlation between the task of the bee and the acetylation of lysine 18 on histone 3, and provided first evidence for a key role of this modification in initiating the division of labor. This together with the specific role in learning provides a new basis to understand and further analyse the impact of the chromatin structure as a comprehensive modulator of simple and complex behavior in insects.

8 Danksagung

Prof. Dr. Uli Müller verdanke ich, dass ich der Wissenschaftler bin, der ich bin.

Als Student hat er mein wissenschaftliches Verständnis und Denkweise geformt und hat mir gezeigt, dass Wissenschaft nicht Wissen anhäufen, sondern das Verständnis der Welt fördern sollte. Während der Doktorarbeit gab er mir die Freiheit mein Thema selbst zu wählen und sorgte gleichzeitig durch Diskussionen und Anregungen für den nötigen Rückhalt, der zum Erfolg dieser Arbeit geführt hat. Nicht zu letzt bin ich für die ständige, unerschöpfliche Unterstützung dankbar, die er all meinen Vorhaben und Unternehmungen zuteil werden ließ und die sich auch in dieser Arbeit widerspiegeln.

Bei Prof. Dr. Jörn Walter möchte ich mich für die Aufnahme in seiner Arbeitsgruppe bedanken, in der ich mich stets willkommen gefühlt habe, sowie für die Einladung zu Veranstaltungen und Tagungen, die mein Verständnis auf dem Gebiet der Epigenetik erweitert haben. Zudem möchte ich mich für Übernahme des Amtes des Zweitkorrektors bedanken.

Angelika Gardezi gilt mein dank, da sie durch ihre unermüdliche Arbeit mit den Bienen diese Arbeit erst ermöglicht hat. Danke auch für die Hilfe bei den Kohorten, sowie die Einführung in den Umgang mit den Bienenvölkern. Bedanken möchte ich mich auch für die viele Zeit und Arbeit, die sie in die leider Brotlos gebliebene Histologie gesteckt hat. Damned antibodies! Weiteren Dank auch für die Vermittlung der Bienen von Christian Spieldenner.

Mein Dank gilt Christian Spieldenner und seinen Bienen. Seine Bienen sind die Besten! Ohne sie wäre das Revertierungsexperiment nicht möglich gewesen (3000 Bienen!) Seinen Bienen verdanke ich auch die Erkenntnis, dass selbst die komplexesten Experimente einfach gelingen, wenn es sich um die richtigen Bienen handelt.

David Raccuglia möchte ich danken, dass er dafür gesorgt hat, dass das Brett vor meinen Kopf nun unter meinen Füßen einem besserem Zweck dient, auch wenn ich dadurch jetzt häufiger auf der Nase liege. Seine Diskussionsbereitschaft und seine Begeisterung für die Wissenschaft werde ich vermissen.

Den weiteren Doktoranden (Javaid Iqbal, Bärbel Heidtmann, Fabian Büttner, Silke Pabst und Tina Martin) der Arbeitsgruppe möchte ich für die gemeinsame Zeit und die Organisation des 19th Neuro-DoWo danken. Tina Martin möchte ich zusätzlich für die Korrektur meiner Arbeit danken. Sollten noch Fehler zu finden sein, dann liegt es wohl eher an mir als an ihr.

Ich möchte mich auch bei den Studenten bedanken, die bei mir F-Arbeit oder HiWi gemacht haben Timo Schuhmann, Michael Dieli, Kathy Rether, Anika Zimmermann, Katja Merschbächer, Aline Schwarz, Cornelia Schmitt, Katja Berger, Heike Wech. Es war eine schöne Zeit mit euch und ich hoffe das ihr alle euern Weg macht und vielleicht sehen wir uns mal wieder.

Meine Mutter Sabine Herzig möchte ich danken, für das durch lesen meiner Arbeit und für die Aufmunterungen als es mit dem Schreiben nicht vorwärts ging. Uli Herzig danke ich für ein „e“.

Franziska Meier gebührt mein Dank, weil sie immer für mich da war, auch wenn sie in England weilte und die ganzen 3 Jahre das Pendeln zwischen Deutschland und England mit gemacht hat.

9 Verzeichnisse

9.1 Abkürzungsverzeichnis

(v/v)	volume per volume - Volumenprozent
(w/v)	weight per volume - Gewichtsprozent
°C	Grad Celsius
μ	Mycro – 10 ⁻⁶
5-Aza	5-Azacytidin
A	Amper
Abb.	Abbildung
Ac	Adenylylcyclase
Ac-18	Acetylierung an Lysin 18
ActD	Actinomycin D
AMP	Adenosinmonophosphat
AS	Aminosäure
ATP	Adenosintriphosphate
BDNF	Brain-derived neurotrophic factor
ca.	circa
Ca ²⁺	Kalzium-Ion
CaM-Kinase	Ca ²⁺ /calmodulin-dependent protein kinase
cAMP	cyclisches Adenosinmonophosphat
CBP/p300	CREB binding protein
cGMP	Cyclic guanosine monophosphate
CREB	cAMP response element binding protein
CS	konditionierter Stimulus
d	Tag
d.h.	dass heißt
Da	Dalton
DMSO	Dimethyl sulfoxide
DNA	Desoxiribonucleinsäure
DNMT	<i>de novo</i> Methyltransferase
ECL	Enhanced chemiluminescence
ELISA	Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay
eng.	englisch
EtOH	Ethanol
g	Gramm
griech.	grichisch
h	Stunde
H3/H4	Histon 3 / Histon 4
HAT	Histonacetyltransferase
HDAC	Histondeacetylase
Hz	Herz - Anzahl pro Sekunde
k	kilo - 10 ³
K ⁺	Kalium-Ion
Kr-h1	Krüppel homolog-1 - Transkriptionsfaktor
l	Liter
LTM	long-term memory - Langzeitgedächtnis
LTP	long-term potentiation
Lys	Lysin
m	Milli – 10 ⁻³

M	Molar (mol pro Liter)
MAPK	Mitogen-activated protein kinases
MBD	Methylcytosinbindende Domäne
MeCP2	methyl CpG binding protein 2
Met-27,3	Tri-Methylierung an Lysin 27
Met-4,1	Mono-Methylierung an Lysin 4
min	Minute
n	Anzahl der Tiere pro Gruppe
NAD ⁺	Nicotinamide adenine dinucleotide
NAM	Nicotinamid
NF-κB	nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells
No-Synthase	Nitric oxide synthase
OD	optische Dichte
PBS	Phosphate buffered saline
PDE	Phosphodiesterase
PER	proboscis extension reflex – Rüsselrausstreck-Reflex
PKA	Proteinkinase A
PKC	Proteinkinase C
PKG	cGMP-dependent protein kinase oder Proteinkinase G
PP1	Proteinphosphatase 1
RNA/mRNA	Ribonucleinsäure/messengerRNA
RNAi	RNA interference
RT	Raumtemperatur
s	Sekunde
s.	siehe
sec	Sekunde
STM	short-term memory - Kurzzeitgedächtnis
Tab.	Tabelle
TSA	Trichostatin A
UC Irvine	University of California, Irvine
US	unkonditionierter Stimulus
UV	Ultraviolett
VPA	Valproat
WB	Westernblot
z.B.	zum Beispiel

9.2 Abbildungsverzeichnis

Abb. 1-1: Reduziertes Schema, der im Lernen beteiligten Signalkaskaden	8
Abb. 1-2: Auswahl von Modifikationen am N-terminalen Schwanz von Histon 3 (H3)	10
Abb. 1-3: Einfluss der Histonacetylierung auf die Genexpression	11
Abb. 3-1: Eingespannte Biene für Einzeltierexperimente.....	23
Abb. 3-2: Schematische Zeichnung eines Bienenkopfes (A) und eines Bienenhirns (B).....	24
Abb. 3-3: Käfig für die orale Applikation der Inhibitoren mit zusätzlichem Futtertrog.....	29
Abb. 4-1: Multialignment von Histon H3	32
Abb. 4-2: Westernblot: Test der Antikörper H3, Met-4,1, Met-27,3, Ac-18 gegen Bienenhirn	34
Abb. 4-3: Etablierung der ELISA	36
Abb. 4-4: Kinetik der biologischen Wirksamkeit des HDAC-Inhibitormixes.....	38
Abb. 4-5: HDAC-Inhibition durch VPA, TSA und TSA + VPA (anhand von Ac-18 an H3). 39	
Abb. 4-6: Einfluss des Ernährungszustands auf Histonmodifikationen.....	40
Abb. 4-7: Einfluss von TSA auf die Empfindlichkeit gegenüber verschiedenen Zuckerkonzentrationen.....	41
Abb. 4-8: Einfluss von TSA auf die Sensitisierung	42
Abb. 4-9: Einfluss von TSA auf die Habituation	43
Abb. 4-10: Einfluss von TSA auf assoziatives Lernen und Gedächtnis bei verschiedenen Trainingsstärken.....	46
Abb. 4-11: Abhängigkeit des TSA-Effekts von der Trainingsstärke	47
Abb. 4-12: Einfluss des Injektionszeitpunkts auf den TSA-Effekt – Injektion erfolgte nach dem Training	48
Abb. 4-13: Abhängigkeit des TSA-Effekts vom Injektionszeitpunkt.....	49
Abb. 4-14: Abhängigkeit des TSA-Effekts von der Transkription je nach Trainingsmethode 51	
Abb. 4-15: Gedächtnisabruf des ersten und zweiten Tages des Versuchs aus Abb. 4-12 A auf Seite 48.....	52
Abb. 4-16: Einfluss von 5-Azacytidin auf die Histonmodifikationen	53
Abb. 4-17: Einfluss von 5-Azacytidin auf Lernen und Gedächtnisbildung	54
Abb. 4-18: Schema der Reihenfolge der Aufgabenbereiche der Arbeiterin	56
Abb. 4-19: Histonmodifikationsstärke in Abhängigkeit vom Aufgabenbereich der Arbeiterin	57
Abb. 4-20: Westernblot: Test der Antikörper p42/44 MAPK, PKA und PKC gegen Bienenhirn	58
Abb. 4-21: Expression ausgewählter Proteine in Abhängigkeit vom Aufgabenbereich der Arbeiterin	59
Abb. 4-22: Veränderung der Acetylierung abhängig vom Alter und Applikationsdauer von TSA	60

Abb. 4-23: Einfluss der oralen Verabreichung von TSA auf die Histonmodifikationen.....	61
Abb. 4-24: Einfluss von TSA auf die Expression von PKA, PKC und MAPK.....	62
Abb. 4-25: Einfluss von TSA auf das Ausflugsverhalten.....	64
Abb. 5-1: Aufspaltung in die Arbeitsgebiete	65
Abb. 5-2: Neues mögliches Modell der Aufspaltung der Aufgabengebiete	71
Abb. 5-3: Transkriptionsabhängigkeit des Gedächtnisses abhängig von Training und TSA-Gabe	77
Abb. 5-4: Abhängigkeit des 1d-Gedächtnisses von der Aktivierung und Inhibition der Transkription	79
Abb. 5-5: Modifizierungsebenen der Chromatinstruktur und ihre Interaktion mit Lernen und Gedächtnis	82
Abb. 5-6: Schema der HDAC-Wirkung bei Lernen und Gedächtnisbildung	85

9.3 Tabellenverzeichnis

Tab. 3-1: Verwendete Antikörper	19
Tab. 3-2: Puffer und Lösungen	21
Tab. 3-3: Gelzusammensetzung für die SDS-PAGE	21
Tab. 3-4: Details der Kohorten.....	30
Tab. 4-1: Übersicht über die auf Bienenhirn getesteten Antikörper	33
Tab. 4-2: Zusammenfassung der Ergebnisse der verschiedenen Probenbehandlungen.....	37
Tab. 5-1: Übersicht über Unterschiede zwischen Flieger und Ammen	69

9.4 Literaturverzeichnis

1. **Abraham, W.C. and J.M. Williams**, *Properties and mechanisms of LTP maintenance*. Neuroscientist, (2003). 9(6): p. 463-74.
2. **Alarcon, J.M., G. Malleret, K. Touzani, S. Vronskaya, S. Ishii, E.R. Kandel, and A. Barco**, *Chromatin acetylation, memory, and LTP are impaired in CBP+/- mice: a model for the cognitive deficit in Rubinstein-Taybi syndrome and its amelioration*. Neuron, (2004). 42(6): p. 947-59.
3. **Altfelder, K., Müller, U.**, *Cyclic nucleotide-dependent protein kinases in the neural tissue of the honeybee Apis mellifera*. Insect Biochemistry, (1991). 21(5): p. 487-494.
4. **Altfelder, K., Müller, U. , Menzel, R.**, *Ca²⁺/calmodulin and Ca²⁺/phospholipid-dependent protein kinases in the neural tissue of the honeybee Apis mellifera*. Insect Biochemistry, (1991). 21(5): p. 479-486.
5. **Amdam, G.V. and S.W. Omholt**, *The hive bee to forager transition in honeybee colonies: the double repressor hypothesis*. J Theor Biol, (2003). 223(4): p. 451-64.
6. **Ament, S.A., M. Corona, H.S. Pollock, and G.E. Robinson**, *Insulin signaling is involved in the regulation of worker division of labor in honey bee colonies*. Proc Natl Acad Sci U S A, (2008). 105(11): p. 4226-31.
7. **Bacskai, B.J., B. Hochner, M. Mahaut-Smith, S.R. Adams, B.K. Kaang, E.R. Kandel, and R.Y. Tsien**, *Spatially resolved dynamics of cAMP and protein kinase A subunits in Aplysia sensory neurons*. Science, (1993). 260(5105): p. 222-6.
8. **Bailey, C.H. and E.R. Kandel**, *Structural changes accompanying memory storage*. Annu Rev Physiol, (1993). 55: p. 397-426.
9. **Bailey, D.J., J.J. Kim, W. Sun, R.F. Thompson, and F.J. Helmstetter**, *Acquisition of fear conditioning in rats requires the synthesis of mRNA in the amygdala*. Behav Neurosci, (1999). 113(2): p. 276-82.
10. **Baker-Herman, T.L., D.D. Fuller, R.W. Bavis, A.G. Zabka, F.J. Golder, N.J. Doperaliski, R.A. Johnson, J.J. Watters, and G.S. Mitchell**, *BDNF is necessary and sufficient for spinal respiratory plasticity following intermittent hypoxia*. Nat Neurosci, (2004). 7(1): p. 48-55.
11. **Bannister, A.J., R. Schneider, and T. Kouzarides**, *Histone methylation: dynamic or static?* Cell, (2002). 109(7): p. 801-6.
12. **Behrends, A., R. Scheiner, N. Baker, and G.V. Amdam**, *Cognitive aging is linked to social role in honey bees (Apis mellifera)*. Exp Gerontol, (2007). 42(12): p. 1146-53.
13. **Bekinschtein, P., M. Cammarota, I. Izquierdo, and J.H. Medina**, *BDNF and memory formation and storage*. Neuroscientist, (2008). 14(2): p. 147-56.

14. **Bekinschtein, P., M. Cammarota, C. Katche, L. Slipczuk, J.I. Rossato, A. Goldin, I. Izquierdo, and J.H. Medina**, *BDNF is essential to promote persistence of long-term memory storage*. Proc Natl Acad Sci U S A, (2008). 105(7): p. 2711-6.
15. **Ben-Shahar, Y.**, *The foraging gene, behavioral plasticity, and honeybee division of labor*. J Comp Physiol A Neuroethol Sens Neural Behav Physiol, (2005). 191(11): p. 987-94.
16. **Ben-Shahar, Y., H.T. Leung, W.L. Pak, M.B. Sokolowski, and G.E. Robinson**, *cGMP-dependent changes in phototaxis: a possible role for the foraging gene in honey bee division of labor*. J Exp Biol, (2003). 206(Pt 14): p. 2507-15.
17. **Ben-Shahar, Y., A. Robichon, M.B. Sokolowski, and G.E. Robinson**, *Influence of gene action across different time scales on behavior*. Science, (2002). 296(5568): p. 741-4.
18. **Ben-Shahar, Y. and G.E. Robinson**, *Satiation differentially affects performance in a learning assay by nurse and forager honey bees*. J Comp Physiol A Neuroethol Sens Neural Behav Physiol, (2001). 187(11): p. 891-9.
19. **Bernier, L., V.F. Castellucci, E.R. Kandel, and J.H. Schwartz**, *Facilitatory transmitter causes a selective and prolonged increase in adenosine 3':5'-monophosphate in sensory neurons mediating the gill and siphon withdrawal reflex in Aplysia*. J Neurosci, (1982). 2(12): p. 1682-91.
20. **Bicker, G. and I. Hahnlein**, *Long-term habituation of an appetitive reflex in the honeybee*. Neuroreport, (1994). 6(1): p. 54-6.
21. **Bitterman, M.E., R. Menzel, A. Fietz, and S. Schafer**, *Classical conditioning of proboscis extension in honeybees (Apis mellifera)*. J Comp Psychol, (1983). 97(2): p. 107-19.
22. **Bloch, G. and G.E. Robinson**, *Chronobiology. Reversal of honeybee behavioural rhythms*. Nature, (2001). 410(6832): p. 1048.
23. **Bloch, G., C.D. Rubinstein, and G.E. Robinson**, *period expression in the honey bee brain is developmentally regulated and not affected by light, flight experience, or colony type*. Insect Biochem Mol Biol, (2004). 34(9): p. 879-91.
24. **Blokland, A., R. Schreiber, and J. Prickaerts**, *Improving memory: a role for phosphodiesterases*. Curr Pharm Des, (2006). 12(20): p. 2511-23.
25. **Bolden, J.E., M.J. Peart, and R.W. Johnstone**, *Anticancer activities of histone deacetylase inhibitors*. Nat Rev Drug Discov, (2006). 5(9): p. 769-84.
26. **Bourtchuladze, R., B. Frenguelli, J. Blendy, D. Cioffi, G. Schutz, and A.J. Silva**, *Deficient long-term memory in mice with a targeted mutation of the cAMP-responsive element-binding protein*. Cell, (1994). 79(1): p. 59-68.
27. **Braun, A.C.**, *An epigenetic model for the origin of cancer*. Q Rev Biol, (1981). 56(1): p. 33-60.

28. **Bredy, T.W. and M. Barad**, *The histone deacetylase inhibitor valproic acid enhances acquisition, extinction, and reconsolidation of conditioned fear*. Learn Mem, (2008). 15(1): p. 39-45.
29. **Bredy, T.W., H. Wu, C. Crego, J. Zellhoefer, Y.E. Sun, and M. Barad**, *Histone modifications around individual BDNF gene promoters in prefrontal cortex are associated with extinction of conditioned fear*. Learn Mem, (2007). 14(4): p. 268-76.
30. **Breed, M.D., M.F. Garry, A.N. Pearce, B.E. Hibbard, L.B. Bjostad, and R.E. Page Jr.**, *The role of wax comb in honey bee netsmate recognition*. Anim. Behav., (1995) (50): p. 489-496.
31. **Breed, M.D., E. Guzman-Novoa, and G.J. Hunt**, *Defensive behavior of honey bees: organization, genetics, and comparisons with other bees*. Annu Rev Entomol, (2004). 49: p. 271-98.
32. **Brush, M.H., A. Guardiola, J.H. Connor, T.P. Yao, and S. Shenolikar**, *Deactylase inhibitors disrupt cellular complexes containing protein phosphatases and deacetylases*. J Biol Chem, (2004). 279(9): p. 7685-91.
33. **Burdge, G.C., M.A. Hanson, J.L. Slater-Jefferies, and K.A. Lillycrop**, *Epigenetic regulation of transcription: a mechanism for inducing variations in phenotype (fetal programming) by differences in nutrition during early life?* Br J Nutr, (2007). 97(6): p. 1036-46.
34. **Byers, D., R.L. Davis, and J.A. Kiger, Jr.**, *Defect in cyclic AMP phosphodiesterase due to the dunce mutation of learning in Drosophila melanogaster*. Nature, (1981). 289(5793): p. 79-81.
35. **Cao, R., L. Wang, H. Wang, L. Xia, H. Erdjument-Bromage, P. Tempst, R.S. Jones, and Y. Zhang**, *Role of histone H3 lysine 27 methylation in Polycomb-group silencing*. Science, (2002). 298(5595): p. 1039-43.
36. **Castellucci, V.F., E.R. Kandel, J.H. Schwartz, F.D. Wilson, A.C. Nairn, and P. Greengard**, *Intracellular injection of the catalytic subunit of cyclic AMP-dependent protein kinase simulates facilitation of transmitter release underlying behavioral sensitization in Aplysia*. Proc Natl Acad Sci U S A, (1980). 77(12): p. 7492-6.
37. **Catalano, M.G., R. Poli, M. Pugliese, N. Fortunati, and G. Boccuzzi**, *Valproic acid enhances tubulin acetylation and apoptotic activity of paclitaxel on anaplastic thyroid cancer cell lines*. Endocr Relat Cancer, (2007). 14(3): p. 839-45.
38. **Chakravarti, D., V.J. LaMorte, M.C. Nelson, T. Nakajima, I.G. Schulman, H. Juguilon, M. Montminy, and R.M. Evans**, *Role of CBP/P300 in nuclear receptor signalling*. Nature, (1996). 383(6595): p. 99-103.
39. **Chen, C.S., S.C. Weng, P.H. Tseng, H.P. Lin, and C.S. Chen**, *Histone acetylation-independent effect of histone deacetylase inhibitors on Akt through the reshuffling of protein phosphatase 1 complexes*. J Biol Chem, (2005). 280(46): p. 38879-87.
40. **Chen, L., W. Fischle, E. Verdin, and W.C. Greene**, *Duration of nuclear NF-kappaB action regulated by reversible acetylation*. Science, (2001). 293(5535): p. 1653-7.

41. **Chen, W.G., Q. Chang, Y. Lin, A. Meissner, A.E. West, E.C. Griffith, R. Jaenisch, and M.E. Greenberg**, *Derepression of BDNF transcription involves calcium-dependent phosphorylation of MeCP2*. *Science*, (2003). 302(5646): p. 885-9.
42. **Claus, R., M. Fliegauf, M. Stock, J.A. Duque, M. Kolanczyk, and M. Lubbert**, *Inhibitors of DNA methylation and histone deacetylation independently relieve AML1/ETO-mediated lysozyme repression*. *J Leukoc Biol*, (2006). 80(6): p. 1462-72.
43. **Cobiac, L.**, *Epigenomics and nutrition*. *Forum Nutr*, (2007). 60: p. 31-41.
44. **Collins, A.L., J.M. Levenson, A.P. Vilaythong, R. Richman, D.L. Armstrong, J.L. Noebels, J. David Sweatt, and H.Y. Zoghbi**, *Mild overexpression of MeCP2 causes a progressive neurological disorder in mice*. *Hum Mol Genet*, (2004). 13(21): p. 2679-89.
45. **Consortium**, *Insights into social insects from the genome of the honeybee *Apis mellifera**. *Nature*, (2006). 443(7114): p. 931-49.
46. **Csordas, A.**, *On the biological role of histone acetylation*. *Biochem J*, (1990). 265(1): p. 23-38.
47. **Czermin, B., R. Melfi, D. McCabe, V. Seitz, A. Imhof, and V. Pirrotta**, *Drosophila enhancer of Zeste/ESC complexes have a histone H3 methyltransferase activity that marks chromosomal Polycomb sites*. *Cell*, (2002). 111(2): p. 185-96.
48. **D'Alessio, A.C., I.C. Weaver, and M. Szyf**, *Acetylation-induced transcription is required for active DNA demethylation in methylation-silenced genes*. *Mol Cell Biol*, (2007). 27(21): p. 7462-74.
49. **Dash, P.K., B. Hochner, and E.R. Kandel**, *Injection of the cAMP-responsive element into the nucleus of *Aplysia* sensory neurons blocks long-term facilitation*. *Nature*, (1990). 345(6277): p. 718-21.
50. **de la Cruz, X., S. Lois, S. Sanchez-Molina, and M.A. Martinez-Balbas**, *Do protein motifs read the histone code?* *Bioessays*, (2005). 27(2): p. 164-75.
51. **Dehe, P.M., M. Pamblanco, P. Luciano, R. Lebrun, D. Moinier, R. Sendra, A. Verreault, V. Tordera, and V. Geli**, *Histone H3 lysine 4 mono-methylation does not require ubiquitination of histone H2B*. *J Mol Biol*, (2005). 353(3): p. 477-84.
52. **Deisseroth, K., H. Bito, and R.W. Tsien**, *Signaling from synapse to nucleus: postsynaptic CREB phosphorylation during multiple forms of hippocampal synaptic plasticity*. *Neuron*, (1996). 16(1): p. 89-101.
53. **Ding, X., Y. Wang, D. Zhang, Z. Guo, and Y. Zhang**, *Increased pre-implantation development of cloned bovine embryos treated with 5-aza-2'-deoxycytidine and trichostatin A*. *Theriogenology*, (2008). 70(4): p. 622-30.
54. **Dudai, Y.**, *Molecular bases of long-term memories: a question of persistence*. *Curr Opin Neurobiol*, (2002). 12(2): p. 211-6.
55. **Dudai, Y.**, *The neurobiology of consolidations, or, how stable is the engram?* *Annu Rev Psychol*, (2004). 55: p. 51-86.

56. **Dudai, Y., Y.N. Jan, D. Byers, W.G. Quinn, and S. Benzer**, *dunce, a mutant of Drosophila deficient in learning*. Proc Natl Acad Sci U S A, (1976). 73(5): p. 1684-8.
57. **Eban-Rothschild, A.D. and G. Bloch**, *Differences in the sleep architecture of forager and young honeybees (Apis mellifera)*. J Exp Biol, (2008). 211(Pt 15): p. 2408-16.
58. **Ernfors, P., K.F. Lee, and R. Jaenisch**, *Mice lacking brain-derived neurotrophic factor develop with sensory deficits*. Nature, (1994). 368(6467): p. 147-50.
59. **Eydmann, T., E. Sommariva, T. Inagawa, S. Mian, A.J. Klar, and J.Z. Dalggaard**, *Rtf1-mediated eukaryotic site-specific replication termination*. Genetics, (2008). 180(1): p. 27-39.
60. **Fahrner, J.A., S. Eguchi, J.G. Herman, and S.B. Baylin**, *Dependence of histone modifications and gene expression on DNA hypermethylation in cancer*. Cancer Res, (2002). 62(24): p. 7213-8.
61. **Feuerbacher, E., J.H. Fewell, S.P. Roberts, E.F. Smith, and J.F. Harrison**, *Effects of load type (pollen or nectar) and load mass on hovering metabolic rate and mechanical power output in the honey bee Apis mellifera*. J Exp Biol, (2003). 206(Pt 11): p. 1855-65.
62. **Fontan-Lozano, A., R. Romero-Granados, J. Troncoso, A. Munera, J.M. Delgado-Garcia, and A.M. Carrion**, *Histone deacetylase inhibitors improve learning consolidation in young and in KA-induced-neurodegeneration and SAMP-8-mutant mice*. Mol Cell Neurosci, (2008). 39(2): p. 193-201.
63. **Frankland, P.W., S.A. Josselyn, S.G. Anagnostaras, J.H. Kogan, E. Takahashi, and A.J. Silva**, *Consolidation of CS and US representations in associative fear conditioning*. Hippocampus, (2004). 14(5): p. 557-69.
64. **Friedrich, A., U. Thomas, and U. Muller**, *Learning at different satiation levels reveals parallel functions for the cAMP-protein kinase A cascade in formation of long-term memory*. J Neurosci, (2004). 24(18): p. 4460-8.
65. **Fuks, F.**, *DNA methylation and histone modifications: teaming up to silence genes*. Curr Opin Genet Dev, (2005). 15(5): p. 490-5.
66. **Fussnecker, B. and C. Grozinger**, *Dissecting the role of Kr-h1 brain gene expression in foraging behavior in honey bees (Apis mellifera)*. Insect Mol Biol, (2008). 17(5): p. 515-22.
67. **Ghoshal, K., J. Datta, S. Majumder, S. Bai, X. Dong, M. Parthun, and S.T. Jacob**, *Inhibitors of histone deacetylase and DNA methyltransferase synergistically activate the methylated metallothionein I promoter by activating the transcription factor MTF-1 and forming an open chromatin structure*. Mol Cell Biol, (2002). 22(23): p. 8302-19.
68. **Giurfa, M.**, *Behavioral and neural analysis of associative learning in the honeybee: a taste from the magic well*. J Comp Physiol A Neuroethol Sens Neural Behav Physiol, (2007). 193(8): p. 801-24.

69. **Glozak, M.A., N. Sengupta, X. Zhang, and E. Seto**, *Acetylation and deacetylation of non-histone proteins*. *Gene*, (2005). 363: p. 15-23.
70. **Godfrey, K.M. and D.J. Barker**, *Fetal programming and adult health*. *Public Health Nutr*, (2001). 4(2B): p. 611-24.
71. **Gonzalez, G.A. and M.R. Montminy**, *Cyclic AMP stimulates somatostatin gene transcription by phosphorylation of CREB at serine 133*. *Cell*, (1989). 59(4): p. 675-80.
72. **Gowher, H., O. Leismann, and A. Jeltsch**, *DNA of Drosophila melanogaster contains 5-methylcytosine*. *EMBO J*, (2000). 19(24): p. 6918-23.
73. **Gregoret, I.V., Y.M. Lee, and H.V. Goodson**, *Molecular evolution of the histone deacetylase family: functional implications of phylogenetic analysis*. *J Mol Biol*, (2004). 338(1): p. 17-31.
74. **Grotinger, C.M. and G.E. Robinson**, *Endocrine modulation of a pheromone-responsive gene in the honey bee brain*. *J Comp Physiol A Neuroethol Sens Neural Behav Physiol*, (2007). 193(4): p. 461-70.
75. **Grotinger, C.M., N.M. Sharabash, C.W. Whitfield, and G.E. Robinson**, *Pheromone-mediated gene expression in the honey bee brain*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, (2003). 100 Suppl 2: p. 14519-25.
76. **Guo, L., H. Guo, C. Gao, Z. Mi, W.B. Russell, and P.C. Kuo**, *Stat1 acetylation inhibits inducible nitric oxide synthase expression in interferon-gamma-treated RAW264.7 murine macrophages*. *Surgery*, (2007). 142(2): p. 156-62.
77. **Hammer, M. and R. Menzel**, *Learning and memory in the honeybee*. *J Neurosci*, (1995). 15(3 Pt 1): p. 1617-30.
78. **Hasan, S. and M.O. Hottiger**, *Histone acetyl transferases: a role in DNA repair and DNA replication*. *J Mol Med*, (2002). 80(8): p. 463-74.
79. **Hebb, D.**, *The Organization of Behavior: a neuropsychological approach*. (1949), New York: Wiley.
80. **Higginson, A.D. and F. Gilbert**, *Paying for nectar with wingbeats: a new model of honeybee foraging*. *Proc Biol Sci*, (2004). 271(1557): p. 2595-603.
81. **Holliday, R.**, *DNA methylation and epigenetic mechanisms*. *Cell Biophys*, (1989). 15(1-2): p. 15-20.
82. **Holliday, R.**, *Is there an epigenetic component in long-term memory?* *J Theor Biol*, (1999). 200(3): p. 339-41.
83. **Hong, J., S. Sang, H.J. Park, S.J. Kwon, N. Suh, M.T. Huang, C.T. Ho, and C.S. Yang**, *Modulation of arachidonic acid metabolism and nitric oxide synthesis by garcinol and its derivatives*. *Carcinogenesis*, (2006). 27(2): p. 278-86.

-
84. **Howe, L., C.E. Brown, T. Lechner, and J.L. Workman**, *Histone acetyltransferase complexes and their link to transcription*. Crit Rev Eukaryot Gene Expr, (1999). 9(3-4): p. 231-43.
85. **Huang, Z.-Y. and G.E. Robinson**, *Regulation of honey bee division of labor by colony age demography*. Behav Ecol Sociobiol, (1996). 39: p. 147-158.
86. **Humphries, M.A., U. Muller, M.K. Fondrk, and R.E. Page, Jr.**, *PKA and PKC content in the honey bee central brain differs in genotypic strains with distinct foraging behavior*. J Comp Physiol A Neuroethol Sens Neural Behav Physiol, (2003). 189(7): p. 555-62.
87. **Imhof, A. and P.B. Becker**, *Modifications of the histone N-terminal domains. Evidence for an "epigenetic code"?* Mol Biotechnol, (2001). 17(1): p. 1-13.
88. **Izquierdo, I., L.R. Bevilacqua, J.I. Rossato, J.S. Bonini, J.H. Medina, and M. Cammarota**, *Different molecular cascades in different sites of the brain control memory consolidation*. Trends Neurosci, (2006). 29(9): p. 496-505.
89. **Jassim, O., Z.Y. Huang, and G.E. Robinson**, *Juvenile hormone profiles of worker honey bees, Apis mellifera, during normal and accelerated behavioural development*. J Insect Physiol, (2000). 46(3): p. 243-249.
90. **Jencks, W.P., S. Cordes, and J. Carriuolo**, *The free energy of thiol ester hydrolysis*. J Biol Chem, (1960). 235: p. 3608-14.
91. **Jones, K.R., I. Farinas, C. Backus, and L.F. Reichardt**, *Targeted disruption of the BDNF gene perturbs brain and sensory neuron development but not motor neuron development*. Cell, (1994). 76(6): p. 989-99.
92. **Jones, P.A. and S.M. Taylor**, *Hemimethylated duplex DNAs prepared from 5-azacytidine-treated cells*. Nucleic Acids Res, (1981). 9(12): p. 2933-47.
93. **Jones, P.L., G.J. Veenstra, P.A. Wade, D. Vermaak, S.U. Kass, N. Landsberger, J. Strouboulis, and A.P. Wolffe**, *Methylated DNA and MeCP2 recruit histone deacetylase to repress transcription*. Nat Genet, (1998). 19(2): p. 187-91.
94. **Kaang, B.K., E.R. Kandel, and S.G. Grant**, *Activation of cAMP-responsive genes by stimuli that produce long-term facilitation in Aplysia sensory neurons*. Neuron, (1993). 10(3): p. 427-35.
95. **Kandel, E.R. and J.H. Schwartz**, *Molecular biology of learning: modulation of transmitter release*. Science, (1982). 218(4571): p. 433-43.
96. **Karanam, B., L. Wang, D. Wang, X. Liu, R. Marmorstein, R. Cotter, and P.A. Cole**, *Multiple roles for acetylation in the interaction of p300 HAT with ATF-2*. Biochemistry, (2007). 46(28): p. 8207-16.
97. **Kim, S.C., R. Sprung, Y. Chen, Y. Xu, H. Ball, J. Pei, T. Cheng, Y. Kho, H. Xiao, L. Xiao, N.V. Grishin, M. White, X.J. Yang, and Y. Zhao**, *Substrate and functional diversity of lysine acetylation revealed by a proteomics survey*. Mol Cell, (2006). 23(4): p. 607-18.

98. **Klein, M. and E.R. Kandel**, *Mechanism of calcium current modulation underlying presynaptic facilitation and behavioral sensitization in Aplysia*. Proc Natl Acad Sci U S A, (1980). 77(11): p. 6912-6.
99. **Knezetic, J.A. and D.S. Luse**, *The presence of nucleosomes on a DNA template prevents initiation by RNA polymerase II in vitro*. Cell, (1986). 45(1): p. 95-104.
100. **Kornberg, R.D.**, *Chromatin structure: a repeating unit of histones and DNA*. Science, (1974). 184(139): p. 868-71.
101. **Korte, M., P. Carroll, E. Wolf, G. Brem, H. Thoenen, and T. Bonhoeffer**, *Hippocampal long-term potentiation is impaired in mice lacking brain-derived neurotrophic factor*. Proc Natl Acad Sci U S A, (1995). 92(19): p. 8856-60.
102. **Korzus, E.**, *The relation of transcription to memory formation*. Acta Biochim Pol, (2003). 50(3): p. 775-82.
103. **Korzus, E., M.G. Rosenfeld, and M. Mayford**, *CBP histone acetyltransferase activity is a critical component of memory consolidation*. Neuron, (2004). 42(6): p. 961-72.
104. **Korzus, E., J. Torchia, D.W. Rose, L. Xu, R. Kurokawa, E.M. McInerney, T.M. Mullen, C.K. Glass, and M.G. Rosenfeld**, *Transcription factor-specific requirements for coactivators and their acetyltransferase functions*. Science, (1998). 279(5351): p. 703-7.
105. **Kouzarides, T.**, *Histone methylation in transcriptional control*. Curr Opin Genet Dev, (2002). 12(2): p. 198-209.
106. **Kucharski, R., J. Maleszka, S. Foret, and R. Maleszka**, *Nutritional control of reproductive status in honeybees via DNA methylation*. Science, (2008). 319(5871): p. 1827-30.
107. **Kuo, M.H. and C.D. Allis**, *Roles of histone acetyltransferases and deacetylases in gene regulation*. Bioessays, (1998). 20(8): p. 615-26.
108. **Kuwabara, M.**, *Bildung des bedingten Reflexes von Pavlovs Typus bei der Honigbiene, Apis mellifica*. J Fac Sci Hokkaido Univ Ser VI Zool, (1957) (13): p. 458-464.
109. **Latham, J.A. and S.Y. Dent**, *Cross-regulation of histone modifications*. Nat Struct Mol Biol, (2007). 14(11): p. 1017-1024.
110. **Lattal, K.M., R.M. Barrett, and M.A. Wood**, *Systemic or intrahippocampal delivery of histone deacetylase inhibitors facilitates fear extinction*. Behav Neurosci, (2007). 121(5): p. 1125-31.
111. **Law, R.D. and J.C. Suttle**, *Chromatin remodeling in plant cell culture: patterns of DNA methylation and histone H3 and H4 acetylation vary during growth of asynchronous potato cell suspensions*. Plant Physiol Biochem, (2005). 43(6): p. 527-34.

-
112. **Lee, H., N. Rezai-Zadeh, and E. Seto**, *Negative regulation of histone deacetylase 8 activity by cyclic AMP-dependent protein kinase A*. Mol Cell Biol, (2004). 24(2): p. 765-73.
113. **Lehman, H.K., D.J. Schulz, A.B. Barron, L. Wraight, C. Hardison, S. Whitney, H. Takeuchi, R.K. Paul, and G.E. Robinson**, *Division of labor in the honey bee (Apis mellifera): the role of tyramine beta-hydroxylase*. J Exp Biol, (2006). 209(Pt 14): p. 2774-84.
114. **Leipe, D.D. and D. Landsman**, *Histone deacetylases, acetoin utilization proteins and acetylpolyamine amidohydrolases are members of an ancient protein superfamily*. Nucleic Acids Res, (1997). 25(18): p. 3693-7.
115. **Levenson, J.M., K.J. O'Riordan, K.D. Brown, M.A. Trinh, D.L. Molfese, and J.D. Sweatt**, *Regulation of histone acetylation during memory formation in the hippocampus*. J Biol Chem, (2004). 279(39): p. 40545-59.
116. **Levenson, J.M., T.L. Roth, F.D. Lubin, C.A. Miller, I.C. Huang, P. Desai, L.M. Malone, and J.D. Sweatt**, *Evidence that DNA (cytosine-5) methyltransferase regulates synaptic plasticity in the hippocampus*. J Biol Chem, (2006). 281(23): p. 15763-73.
117. **Levenson, J.M. and J.D. Sweatt**, *Epigenetic mechanisms in memory formation*. Nat Rev Neurosci, (2005). 6(2): p. 108-18.
118. **Levin, L.R., P.L. Han, P.M. Hwang, P.G. Feinstein, R.L. Davis, and R.R. Reed**, *The Drosophila learning and memory gene rutabaga encodes a Ca²⁺/Calmodulin-responsive adenylyl cyclase*. Cell, (1992). 68(3): p. 479-89.
119. **Li, W., T. Tully, and D. Kalderon**, *Effects of a conditional Drosophila PKA mutant on olfactory learning and memory*. Learn Mem, (1996). 2(6): p. 320-33.
120. **Liao, C.H., C.T. Ho, and J.K. Lin**, *Effects of garcinol on free radical generation and NO production in embryonic rat cortical neurons and astrocytes*. Biochem Biophys Res Commun, (2005). 329(4): p. 1306-14.
121. **Liu, Z., M. Marquez, S. Nilsson, and A.R. Holmberg**, *Incubation with somatostatin, 5-aza decitabine and trichostatin up-regulates somatostatin receptor expression in prostate cancer cells*. Oncol Rep, (2008). 20(1): p. 151-4.
122. **Livingstone, M.S., P.P. Sziber, and W.G. Quinn**, *Loss of calcium/calmodulin responsiveness in adenylate cyclase of rutabaga, a Drosophila learning mutant*. Cell, (1984). 37(1): p. 205-15.
123. **Lonze, B.E. and D.D. Ginty**, *Function and regulation of CREB family transcription factors in the nervous system*. Neuron, (2002). 35(4): p. 605-23.
124. **Lorch, Y., J.W. LaPointe, and R.D. Kornberg**, *Nucleosomes inhibit the initiation of transcription but allow chain elongation with the displacement of histones*. Cell, (1987). 49(2): p. 203-10.

125. **Lubin, F.D., T.L. Roth, and J.D. Sweatt**, *Epigenetic regulation of BDNF gene transcription in the consolidation of fear memory*. J Neurosci, (2008). 28(42): p. 10576-86.
126. **Maher, P., T. Akaishi, D. Schubert, and K. Abe**, *A pyrazole derivative of curcumin enhances memory*. Neurobiol Aging, (2008).
127. **Mansuy, I.M. and S. Shenolikar**, *Protein serine/threonine phosphatases in neuronal plasticity and disorders of learning and memory*. Trends Neurosci, (2006). 29(12): p. 679-86.
128. **McGaugh, J.L.**, *Memory--a century of consolidation*. Science, (2000). 287(5451): p. 248-51.
129. **Melefors, O. and M.W. Hentze**, *Translational regulation by mRNA/protein interactions in eukaryotic cells: ferritin and beyond*. Bioessays, (1993). 15(2): p. 85-90.
130. **Menzel, C.R. and U. Greggers**, *Natural phototaxis and its relationship to color vision in honey bees*. J Comp Physiol [A], (1985) (157): p. 311-322.
131. **Miller, C.A., S.L. Campbell, and J.D. Sweatt**, *DNA methylation and histone acetylation work in concert to regulate memory formation and synaptic plasticity*. Neurobiol Learn Mem, (2008). 89(4): p. 599-603.
132. **Miller, C.A. and J.D. Sweatt**, *Covalent modification of DNA regulates memory formation*. Neuron, (2007). 53(6): p. 857-69.
133. **Monfils, M.H., K.K. Cowansage, and J.E. LeDoux**, *Brain-derived neurotrophic factor: linking fear learning to memory consolidation*. Mol Pharmacol, (2007). 72(2): p. 235-7.
134. **Moretti, P., J.M. Levenson, F. Battaglia, R. Atkinson, R. Teague, B. Antalffy, D. Armstrong, O. Arancio, J.D. Sweatt, and H.Y. Zoghbi**, *Learning and memory and synaptic plasticity are impaired in a mouse model of Rett syndrome*. J Neurosci, (2006). 26(1): p. 319-27.
135. **Muller, U.**, *Prolonged activation of cAMP-dependent protein kinase during conditioning induces long-term memory in honeybees*. Neuron, (2000). 27(1): p. 159-68.
136. **Murray, R.K., D.K. Granner, P.A. Mayes, and V.W. Rodwell**, *Harper's Biochemistry*. 25 ed. (2000), New York: McGraw-Hill.
137. **Nadel, L. and V. Bohbot**, *Consolidation of memory*. Hippocampus, (2001). 11(1): p. 56-60.
138. **Nicolai, M., M.A. Roncato, A.S. Canoy, D. Rouquie, X. Sarda, G. Freyssinet, and C. Robaglia**, *Large-scale analysis of mRNA translation states during sucrose starvation in arabidopsis cells identifies cell proliferation and chromatin structure as targets of translational control*. Plant Physiol, (2006). 141(2): p. 663-73.

139. **Oliveira, A.M., M.A. Wood, C.B. McDonough, and T. Abel**, *Transgenic mice expressing an inhibitory truncated form of p300 exhibit long-term memory deficits*. *Learn Mem*, (2007). 14(9): p. 564-72.
140. **Osborne, K.A., A. Robichon, E. Burgess, S. Butland, R.A. Shaw, A. Coulthard, H.S. Pereira, R.J. Greenspan, and M.B. Sokolowski**, *Natural behavior polymorphism due to a cGMP-dependent protein kinase of Drosophila*. *Science*, (1997). 277(5327): p. 834-6.
141. **Oswald, J., S. Engemann, N. Lane, W. Mayer, A. Olek, R. Fundele, W. Dean, W. Reik, and J. Walter**, *Active demethylation of the paternal genome in the mouse zygote*. *Curr Biol*, (2000). 10(8): p. 475-8.
142. **Ou, J.N., J. Torrisani, A. Unterberger, N. Provencal, K. Shikimi, M. Karimi, T.J. Ekstrom, and M. Szyf**, *Histone deacetylase inhibitor Trichostatin A induces global and gene-specific DNA demethylation in human cancer cell lines*. *Biochem Pharmacol*, (2007). 73(9): p. 1297-307.
143. **Pavlov, I.P.**, *Conditioned Reflexes: An Investigation of the Physiological Activity of the Cerebral Cortex*. (1927), London: Oxford University Press.
144. **Peterson, C.L. and M.A. Laniel**, *Histones and histone modifications*. *Curr Biol*, (2004). 14(14): p. R546-51.
145. **Pittenger, C., Y.Y. Huang, R.F. Paletzki, R. Bourtchouladze, H. Scanlin, S. Vronskaya, and E.R. Kandel**, *Reversible inhibition of CREB/ATF transcription factors in region CA1 of the dorsal hippocampus disrupts hippocampus-dependent spatial memory*. *Neuron*, (2002). 34(3): p. 447-62.
146. **Plekhanova, I.**, *The role of MAPK p44/42 and MAPK p38 in associative olfactory*, in *570 Biowissenschaften; Biologie*. 2005, Freie Universität Berlin: Berlin.
147. **Rall, T.W. and E.W. Sutherland**, *The regulatory role of adenosine-3', 5'-phosphate*. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*, (1961). 26: p. 347-54.
148. **Reik, W. and J. Walter**, *Genomic imprinting: parental influence on the genome*. *Nat Rev Genet*, (2001). 2(1): p. 21-32.
149. **Rentoft, M., K. Kim, Y. Cho, C.H. Lee, and A. Kim**, *Enhancer requirement for histone methylation linked with gene activation*. *FEBS J*, (2008). 275(23): p. 5994-6001.
150. **Ribbands, C.R.**, *Division of labour in the honeybee community*. *Proc R Soc Lond B Biol Sci*, (1952). 140(898): p. 32-43.
151. **Rice, J.C. and C.D. Allis**, *Histone methylation versus histone acetylation: new insights into epigenetic regulation*. *Curr Opin Cell Biol*, (2001). 13(3): p. 263-73.
152. **Robinson, G.E., M.L. Winston, Z. Huang, and T. Pankiw**, *Queen mandibular gland pheromone influences worker honey bee (*Apis mellifera* L.) foraging ontogeny and juvenile hormone titers*. *J Insect Physiol*, (1998). 44(7-8): p. 685-692.

153. **Santi, D.V., C.E. Garrett, and P.J. Barr**, *On the mechanism of inhibition of DNA-cytosine methyltransferases by cytosine analogs*. Cell, (1983). 33(1): p. 9-10.
154. **Santini, E., H. Ge, K. Ren, S. Pena de Ortiz, and G.J. Quirk**, *Consolidation of fear extinction requires protein synthesis in the medial prefrontal cortex*. J Neurosci, (2004). 24(25): p. 5704-10.
155. **Santos-Rosa, H., R. Schneider, A.J. Bannister, J. Sherriff, B.E. Bernstein, N.C. Emre, S.L. Schreiber, J. Mellor, and T. Kouzarides**, *Active genes are tri-methylated at K4 of histone H3*. Nature, (2002). 419(6905): p. 407-11.
156. **Sara, S.J. and B. Hars**, *In memory of consolidation*. Learn Mem, (2006). 13(5): p. 515-21.
157. **Schaefer, M. and F. Lyko**, *DNA methylation with a sting: an active DNA methylation system in the honeybee*. Bioessays, (2007). 29(3): p. 208-11.
158. **Schermelleh, L., A. Haemmer, F. Spada, N. Rosing, D. Meilinger, U. Rothbauer, M.C. Cardoso, and H. Leonhardt**, *Dynamics of Dnmt1 interaction with the replication machinery and its role in postreplicative maintenance of DNA methylation*. Nucleic Acids Res, (2007). 35(13): p. 4301-12.
159. **Schubeler, D., D.M. MacAlpine, D. Scalzo, C. Wirbelauer, C. Kooperberg, F. van Leeuwen, D.E. Gottschling, L.P. O'Neill, B.M. Turner, J. Delrow, S.P. Bell, and M. Groudine**, *The histone modification pattern of active genes revealed through genome-wide chromatin analysis of a higher eukaryote*. Genes Dev, (2004). 18(11): p. 1263-71.
160. **Schulz, D.J., A.B. Barron, and G.E. Robinson**, *A role for octopamine in honey bee division of labor*. Brain Behav Evol, (2002). 60(6): p. 350-9.
161. **Schulz, D.J., J.P. Sullivan, and G.E. Robinson**, *Juvenile hormone and octopamine in the regulation of division of labor in honey bee colonies*. Horm Behav, (2002). 42(2): p. 222-31.
162. **Schwartz, Y.B. and V. Pirrotta**, *Polycomb silencing mechanisms and the management of genomic programmes*. Nat Rev Genet, (2007). 8(1): p. 9-22.
163. **Selker, E.U.**, *Trichostatin A causes selective loss of DNA methylation in Neurospora*. Proc Natl Acad Sci U S A, (1998). 95(16): p. 9430-5.
164. **Seol, J.H., H.J. Kim, Y.J. Yang, S.T. Kim, H.D. Youn, J.W. Han, H.W. Lee, and E.J. Cho**, *Different roles of histone H3 lysine 4 methylation in chromatin maintenance*. Biochem Biophys Res Commun, (2006). 349(2): p. 463-70.
165. **Shemesh, Y., M. Cohen, and G. Bloch**, *Natural plasticity in circadian rhythms is mediated by reorganization in the molecular clockwork in honeybees*. FASEB J, (2007). 21(10): p. 2304-11.
166. **Siegelbaum, S.A., J.S. Camardo, and E.R. Kandel**, *Serotonin and cyclic AMP close single K⁺ channels in Aplysia sensory neurones*. Nature, (1982). 299(5882): p. 413-7.

-
167. **Silva, A.J., J.H. Kogan, P.W. Frankland, and S. Kida**, *CREB and memory*. *Annu Rev Neurosci*, (1998). 21: p. 127-48.
168. **Soule, J., E. Messaoudi, and C.R. Bramham**, *Brain-derived neurotrophic factor and control of synaptic consolidation in the adult brain*. *Biochem Soc Trans*, (2006). 34(Pt 4): p. 600-4.
169. **Stiehl, D.P., D.M. Fath, D. Liang, Y. Jiang, and N. Sang**, *Histone deacetylase inhibitors synergize p300 autoacetylation that regulates its transactivation activity and complex formation*. *Cancer Res*, (2007). 67(5): p. 2256-64.
170. **Sullivan, J.P., S.E. Fahrbach, J.F. Harrison, E.A. Capaldi, J.H. Fewell, and G.E. Robinson**, *Juvenile hormone and division of labor in honey bee colonies: effects of allatectomy on flight behavior and metabolism*. *J Exp Biol*, (2003). 206(Pt 13): p. 2287-96.
171. **Sullivan, J.P., S.E. Fahrbach, and G.E. Robinson**, *Juvenile hormone paces behavioral development in the adult worker honey bee*. *Horm Behav*, (2000). 37(1): p. 1-14.
172. **Sutton, M.A., S.E. Masters, M.W. Bagnall, and T.J. Carew**, *Molecular mechanisms underlying a unique intermediate phase of memory in aplysia*. *Neuron*, (2001). 31(1): p. 143-54.
173. **Swigut, T. and J. Wysocka**, *H3K27 demethylases, at long last*. *Cell*, (2007). 131(1): p. 29-32.
174. **Tempel, B.L., N. Bonini, D.R. Dawson, and W.G. Quinn**, *Reward learning in normal and mutant Drosophila*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, (1983). 80(5): p. 1482-6.
175. **Toth, A.L., S. Kantarovich, A.F. Meisel, and G.E. Robinson**, *Nutritional status influences socially regulated foraging ontogeny in honey bees*. *J Exp Biol*, (2005). 208(Pt 24): p. 4641-9.
176. **Tsankova, N.M., O. Berton, W. Renthal, A. Kumar, R.L. Neve, and E.J. Nestler**, *Sustained hippocampal chromatin regulation in a mouse model of depression and antidepressant action*. *Nat Neurosci*, (2006). 9(4): p. 519-25.
177. **Turner, B.M.**, *Cellular memory and the histone code*. *Cell*, (2002). 111(3): p. 285-91.
178. **Vaughan, E.E., R.C. Geiger, A.M. Miller, P.L. Loh-Marley, T. Suzuki, N. Miyata, and D.A. Dean**, *Microtubule acetylation through HDAC6 inhibition results in increased transfection efficiency*. *Mol Ther*, (2008). 16(11): p. 1841-7.
179. **Vecsey, C.G., J.D. Hawk, K.M. Lattal, J.M. Stein, S.A. Fabian, M.A. Attner, S.M. Cabrera, C.B. McDonough, P.K. Brindle, T. Abel, and M.A. Wood**, *Histone deacetylase inhibitors enhance memory and synaptic plasticity via CREB:CBP-dependent transcriptional activation*. *J Neurosci*, (2007). 27(23): p. 6128-40.
180. **Volpe, P.**, *The language of methylation in genomics of eukaryotes*. *Biochemistry (Mosc)*, (2005). 70(5): p. 584-95.

181. **Wagener-Hulme, C., J.C. Kuehn, D.J. Schulz, and G.E. Robinson**, *Biogenic amines and division of labor in honey bee colonies*. J Comp Physiol [A], (1999). 184(5): p. 471-9.
182. **Wang, Y., M. Jorda, P.L. Jones, R. Maleszka, X. Ling, H.M. Robertson, C.A. Mizzen, M.A. Peinado, and G.E. Robinson**, *Functional CpG methylation system in a social insect*. Science, (2006). 314(5799): p. 645-7.
183. **Weissmann, F., I. Muyrers-Chen, T. Musch, D. Stach, M. Wiessler, R. Paro, and F. Lyko**, *DNA hypermethylation in Drosophila melanogaster causes irregular chromosome condensation and dysregulation of epigenetic histone modifications*. Mol Cell Biol, (2003). 23(7): p. 2577-86.
184. **Whitfield, C.W., Y. Ben-Shahar, C. Brillet, I. Leoncini, D. Crauser, Y. Leconte, S. Rodriguez-Zas, and G.E. Robinson**, *Genomic dissection of behavioral maturation in the honey bee*. Proc Natl Acad Sci U S A, (2006). 103(44): p. 16068-75.
185. **Whitfield, C.W., A.M. Cziko, and G.E. Robinson**, *Gene expression profiles in the brain predict behavior in individual honey bees*. Science, (2003). 302(5643): p. 296-9.
186. **Williams, J.B., S.P. Roberts, and M.M. Elekonich**, *Age and natural metabolically-intensive behavior affect oxidative stress and antioxidant mechanisms*. Exp Gerontol, (2008). 43(6): p. 538-49.
187. **Winston, M.L.**, *The Biology of the Honey Bee*. (1987), Cambridge: Harvard Univ Press. p. 294.
188. **Wolschin, F. and G.V. Amdam**, *Plasticity and robustness of protein patterns during reversible development in the honey bee (Apis mellifera)*. Anal Bioanal Chem, (2007). 389(4): p. 1095-100.
189. **Wood, M.A., M.P. Kaplan, A. Park, E.J. Blanchard, A.M. Oliveira, T.L. Lombardi, and T. Abel**, *Transgenic mice expressing a truncated form of CREB-binding protein (CBP) exhibit deficits in hippocampal synaptic plasticity and memory storage*. Learn Mem, (2005). 12(2): p. 111-9.
190. **Wustenberg, D., B. Gerber, and R. Menzel**, *Short communication: long- but not medium-term retention of olfactory memories in honeybees is impaired by actinomycin D and anisomycin*. Eur J Neurosci, (1998). 10(8): p. 2742-5.
191. **Xu, W.S., R.B. Parmigiani, and P.A. Marks**, *Histone deacetylase inhibitors: molecular mechanisms of action*. Oncogene, (2007). 26(37): p. 5541-52.
192. **Yin, J.C. and T. Tully**, *CREB and the formation of long-term memory*. Curr Opin Neurobiol, (1996). 6(2): p. 264-8.
193. **Yin, J.C., J.S. Wallach, M. Del Vecchio, E.L. Wilder, H. Zhou, W.G. Quinn, and T. Tully**, *Induction of a dominant negative CREB transgene specifically blocks long-term memory in Drosophila*. Cell, (1994). 79(1): p. 49-58.
194. **Yossifoff, M., T. Kisliouk, and N. Meiri**, *Dynamic changes in DNA methylation during thermal control establishment affect CREB binding to the brain-derived neurotrophic factor promoter*. Eur J Neurosci, (2008). 28(11): p. 2267-77.

195. **Zhou, L.J., Y. Zhong, W.J. Ren, Y.Y. Li, T. Zhang, and X.G. Liu**, *BDNF induces late-phase LTP of C-fiber evoked field potentials in rat spinal dorsal horn*. *Exp Neurol*, (2008). 212(2): p. 507-14.
196. **Zhu, W.G., R.R. Lakshmanan, M.D. Beal, and G.A. Otterson**, *DNA methyltransferase inhibition enhances apoptosis induced by histone deacetylase inhibitors*. *Cancer Res*, (2001). 61(4): p. 1327-33.