

Die Bedeutung der Mikrotubuli-Integrität für das olfaktorische Lernen und Gedächtnis der Honigbiene (*Apis mellifera*)

Dissertation

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

von

Tina Martin

Saarbrücken

2011

Tag des Kolloquiums:

Dekan:

Berichterstatter:

.....

Vorsitz:

Akad. Mitarbeiter:

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung	V
Summary - Zusammenfassung in englischer Sprache	VI
Abkürzungsverzeichnis	VII
1 Einleitung	1
1.1 Lernen und Gedächtnisbildung	1
1.1.1 Zelluläre Grundlagen des Lernens und der Gedächtnisbildung .	1
1.1.2 Molekulare Grundlagen des Lernens und der Gedächtnisbildung	2
1.1.3 Mikrotubuli bei Lernen und Gedächtnisbildung	4
1.1.4 Proteinacetylierung in Lernen und Gedächtnis	6
1.1.5 Die Rolle der Proteinacetylierung	7
1.1.5.1 Die Rolle der α -Tubulin Acetylierung	8
1.2 Der Modellorganismus Honigbiene	10
1.2.1 Klassifizierung von Lernprozessen	10
1.2.1.1 Nicht-assoziative Lernparadigmen (Sensitisierung und Habituation)	11
1.2.1.2 Assoziatives Lernparadigma (Die klassische Konditio- nierung)	11
1.2.2 Lernparadigma der Honigbiene	12
1.3 Zielsetzung	12
2 Material	14
2.1 Chemikalien	14
2.2 Geräte	16
2.3 Antikörper	17
2.3.1 Primäre Antikörper	17
2.3.2 Sekundäre Antikörper	17
2.4 Puffer und Lösungen	18
2.4.1 Injektionslösungen	18
2.4.2 Futterlösung	18
2.4.3 Probenvorbereitung	18
2.4.4 ELISA Lösungen	19
2.4.5 SDS PAGE Lösungen	19
2.4.6 Western Blot Lösungen	20
2.4.7 Lösungen zur Mikrotubuli-Anreicherung	20
2.4.8 Lösungen für Histologie	20
2.4.9 Lösungen für AChE Assay	21

2.5	Verbrauchsmaterialien	21
3	Methoden	23
3.1	Haltung der Honigbienen <i>Apis mellifera carnica</i> L.	23
3.1.1	Im Sommer	23
3.1.2	Im Winter	23
3.2	Vorbereitung der Versuchstiere	23
3.2.1	Injektion der Inhibitoren	24
3.2.2	Behandlung mit UV-Licht	24
3.3	Verhaltensexperimente	25
3.3.1	Test der Zuckerwasserempfindlichkeit (Responsiveness)	25
3.3.2	Nicht-assoziative Lernparadigmen	25
3.3.2.1	Sensibilisierung	26
3.3.2.2	Habituation	26
3.3.3	Assoziative olfaktorische Konditionierung	27
3.4	Biochemische Nachweismethoden	29
3.4.1	Präparation des Bienenhirns	29
3.4.2	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)	29
3.4.2.1	Herstellung des Homogenats	29
3.4.2.2	Herstellung des Polyacrylamidgels	30
3.4.2.3	Molekulargewichtsstandard für Western Blot Analysen	30
3.4.2.4	Western Blot	30
3.4.2.5	Immunfärbung von Proteinen im Western Blot	30
3.4.3	ELISA (Enzyme-linked Immunosorbent Assay)	31
3.4.4	Mikrotubuli-Anreicherung	32
3.5	Histologie	32
3.6	Acetylcholin Esterase Assay	33
3.6.1	Etablierung eines Acetylcholin Esterase Assays für Honigbiene	34
3.6.2	Bestimmung der einzusetzenden Homogenatmenge	34
3.6.3	Modulation der AChE Aktivität <i>in vitro</i> und <i>in vivo</i>	36
3.7	Herstellung polyklonaler Antikörper	38
3.7.1	Chemische Acetylierung von Antigenen	38
3.7.2	Dialyse	38
3.7.3	Antigen-Injektion in Maus	39
3.7.4	Serumgewinnung aus Mausblut	39
4	Ergebnisse	40
4.1	Colchizin verschlechtert Lernen und die Gedächtnisbildung	40
4.1.1	Austesten verschiedener Colchizin-Konzentrationen	40
4.1.2	Auswirkungen von Colchizin auf die Responsiveness und das nicht-assoziative Lernen	41
4.1.3	Auswirkungen von Colchizin auf assoziatives Lernen und Gedächtnisbildung	45

4.1.3.1	Einfluss von Colchizin auf assoziatives Lernen und Gedächtnis bei unterschiedlichen Injektionszeitpunkten . . .	45
4.1.3.2	Einfluss von Colchizin auf assoziatives Lernen und Gedächtnis bei unterschiedlichen Trainingsstärken	50
4.1.3.3	Einfluss von Colchizin auf assoziatives Lernen und Gedächtnis bei unterschiedlichen Inter-Trial-Intervallen . .	54
4.2	Taxol verbessert Lernen und die Gedächtnisbildung	57
4.2.1	Auswirkungen von Taxol auf die Responsiveness und das nicht-assoziative Lernen	59
4.2.2	Auswirkungen von Taxol auf assoziatives Lernen und Gedächtnisbildung	60
4.2.2.1	Einfluss von Taxol auf das assoziative Lernen und Gedächtnis bei schwachem Training	60
4.2.2.2	Transkriptionsabhängigkeit der Gedächtnisbildung nach schwachem Training	61
4.2.2.3	Einfluss von Taxol auf assoziatives Lernen und Gedächtnis bei starkem Training	63
4.2.2.4	Transkriptionsabhängigkeit der Gedächtnisbildung bei starkem Training	64
4.2.3	Gegenüberstellung der Colchizin- sowie Taxol-Behandlung . . .	65
4.3	Biochemische Untersuchung der Colchizin- sowie Taxol-Behandlung . .	67
4.3.1	Histologische Untersuchung der Colchizin-Behandlung	67
4.3.2	Histologische Untersuchung der Taxol-Behandlung	69
4.3.3	Integrität der Mikrotubuli nach Colchizin-Behandlung	70
4.3.4	Integrität der Mikrotubuli nach Taxol-Behandlung	72
4.3.5	Aktivität der Acetylcholin Esterase nach Colchizin-Behandlung .	74
4.3.6	Aktivität von Ca ²⁺ -Kanälen	75
4.4	Acetylierung von α -Tubulin als molekularer Modulator für Lernen und die Gedächtnisbildung	78
4.4.1	Spezifität der verwendeten Acetylierungs-Antikörper	78
4.4.1.1	Charakterisierung des kommerziellen Acetylierungs-Antikörpers	78
4.4.1.2	Charakterisierung der Antikörper gegen α -Tubulin . . .	79
4.4.2	Charakterisierung eines selbst hergestellten Acetylierungs-Antikörpers	80
4.4.2.1	aceBSA 4 unterscheidet zwischen acetylierten und nicht-acetylierten Antigenen	81
4.4.2.2	aceBSA 4 erkennt nur ein Protein im Bienenhirn	82
4.4.3	Modulation der Proteinacetylierung mit Lern- und Gedächtnisbeeinflussenden Faktoren	83
4.4.3.1	Die HDAC-Inhibition mit TSA aktiviert die Tubulin-, die allgemeine Protein- sowie die Histonacetylierung	83

4.4.3.1.1	TSA fördert die Mikrotubuli-Integrität im Zentralkörper	85
4.4.3.2	UV-Behandlung reduziert die α -Tubulin Acetylierung und aktiviert die allgemeine Protein- sowie Histonacetylierung	86
4.4.3.3	Sättigung aktiviert die Tubulin-Acetylierung sowie die allgemeine Proteinacetylierung	88
5	Diskussion	91
5.1	Bedeutung der Mikrotubuli-Integrität für lang- und kurzfristige Prozesse	91
5.2	Die Mikrotubuli-Integrität ist entscheidend bei assoziativem, jedoch nicht bei nicht-assoziativem Lernen	93
5.3	Bedeutung der Mikrotubuli-Integrität für die Akquisition	95
5.4	Zusammenhang zwischen Akquisitionseffekt und Langzeitgedächtnis .	96
5.5	Dem Akquisitionseffekt zugrundeliegende intrazelluläre Prozesse	98
5.5.1	Bedeutung der Mikrotubuli-Integrität für die Aktivität von Ca^{2+} -Kanälen	99
5.5.2	Einfluss von Colchizin auf die Aktivität der Acetylcholin Esterase	100
5.5.3	Bedeutung der Mikrotubuli-Integrität für intrazellulären Transport	100
5.5.3.1	Gedächtnisbildung erfordert Transport langfristig benötigter Moleküle	102
5.5.3.2	Akquisition erfordert einen schnellen Transport	104
5.5.4	Acetylierung des α -Tubulins als Modulator von Lernen und Gedächtnis	107
5.5.5	Fazit	108
6	Literatur	110
7	Danksagung	126

Zusammenfassung

Die vorliegende Arbeit zeigt die Bedeutung der Mikrotubuli-Integrität für das olfaktorische Lernen und Gedächtnis der Honigbiene.

Die Desintegration verursachte schwere assoziative Lern- und damit zusammenhängend Gedächtnisdefizite, die lediglich nach starkem Training mit kurzem Inter-Trial-Intervall auftraten. Die Stabilisierung der Mikrotubuli hingegen förderte unabhängig von den Trainingsparametern sowohl assoziatives Lernen als auch die Gedächtnisbildung. Nicht-assoziatives Lernen blieb jeweils unbeeinflusst.

Wider Erwarten bewirkte eine veränderte Integrität bereits während des Trainings Akquisitionseffekte, denen schnelle Prozesse im Minutenbereich zugrundeliegen müssen. Die Auswirkung auf die Aktivität von Ca^{2+} -Kanälen oder der Acetylcholin Esterase konnte hierbei ausgeschlossen werden. Mit der Integrität veränderte sich ebenso die Acetylierung des α -Tubulins, die zur Effizienz intrazellulärer Transportprozesse beiträgt. Dies deutet daher auf einen veränderten intrazellulären Transport während der Akquisition hin.

Weitere die Akquisition beeinflussende Faktoren veränderten ebenfalls die Acetylierung des α -Tubulins. Damit liefert diese Arbeit erste Hinweise für die Beteiligung der Tubulin-Acetylierung sowie die Notwendigkeit der Mikrotubuli-Integrität während assoziativem Lernen und der Gedächtnisbildung bei spezifischen Trainingsparametern.

Summary - Zusammenfassung in englischer Sprache

The present work shows the importance of microtubule integrity on olfactory learning and memory in the honeybee.

The disintegration caused severe deficits in associative learning and related memory only after a strong training with short inter-trial-interval. Pharmacological stabilization of microtubules promoted both associative learning and memory formation regardless of the training parameters. Non-associative learning remained unaffected.

Unexpectedly, an altered integrity induced acquisition effects already during training. Acquisition is driven by fast processes in the range of minutes. Effects on the activity of Ca^{2+} -channels or on acetylcholine esterase could be excluded. Together with the integrity the acetylation of α -tubulin changed. Latter contributes to the efficiency of intracellular transport processes. A change in intracellular transport during acquisition therefore seems likely.

Other factors affecting acquisition in addition changed the acetylation of α -tubulin. Thus this work provides first evidence of the involvement of tubulin acetylation and the necessity of microtubule integrity during associative learning and memory formation at specific training parameters.

Abkürzungsverzeichnis

(v/v)	volume per volume, Volumenprozent
(w/v)	weight per volume, Gewichtsprozent
°C	Grad Celsius
5-HT	Serotonin
A	Ampere, Stromstärke
Abb.	Abbildung
Ac	Acetylierung
AC	Adenylatcyclase
H3K18ac	Acetylierung an Lysin 18 von H3
ACh	Acetylcholin
AChE	Acetylcholin Esterase
Ac-Lys	Acetylierung von Lysinen
AMPA	α -Amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazol-Propionsäure
APS	Ammoniumpersulfat
Arc	aktivitäts-reguliertes Cytoskelett-assoziiertes Protein
ATP	Adenosintriphosphat
BDNF	Brain-derived neurotrophic factor
BSA	Bovines Serumalbumin
ca.	circa
Ca ²⁺	Kalzium-Ion
CaM-Kinase	Ca ²⁺ /Calmodulin-abhängige Kinase
cAMP	cyclisches Adenosinmonophosphat
CBP	CREB binding protein
C/EBP	CCAAT/enhancer binding protein
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
CPEB	cytoplasmic polyadenylation element binding protein
CREB	cAMP response element binding protein
CS	konditionierter Stimulus
Cy3	Carbocyanin 3
d	Tag

DAPI	4,6-Diamidino-2-phenylindol
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonucleinsäure
DTNB	Dithiobisnitrobenzoat
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGG	Eggalbumin
EGTA	Ethylenglykol-bis(aminoethylether)-N,N'-tetraacetat
ELISA	Enzyme-Linked Immunosorbend Assay
Elp3	Elongator Protein 3
EtOH	Ethanol
g	Gramm
h	Stunde
H3	Histon 3
HAT	Histonacetyltransferase
HCl	Salzsäure
HDAC	Histondeacetylase
Hz	Hertz, Anzahl pro Sekunde
IEG	Immediate Early Genes, unmittelbar frühe Gene
JIP	JNK interacting protein
JNK	c-Jun N-terminale Kinasen
k	Kilo, 10^3
K ⁺	Kaliumion
kDa	Kilodalton
l	Liter
LTD	long-term depression, Langzeitdepression
LTM	long-term memory, Langzeitgedächtnis
LTP	long-term potentiation, Langzeitpotentierung
Lys	Lysin (Dreibuchstabencode)
m	Milli, 10^{-3}
M	Molar (mol pro Liter)
MAP	Mikrotubuli-assoziiertes Protein
MAPK	Mitogen-activated protein kinase
min	Minute

mRNA	messengerRNA
MTM	mid-term memory, Mittelzeitgedächtnis
n	Anzahl der Tiere pro Gruppe
NaCl	Natriumchlorid
NAD ⁺	Nikotinamid-adenin-dinukleotid
NAM	Nikotinamid
NMDA	N-Methyl-D-Aspartat
PBS	phosphate buffered saline
PER	proboscis extension reflex, Rüssel-Reflex
PKA	Proteinkinase A
RNA	Ribonucleinsäure
RT	Raumtemperatur
SAHA	suberoylanilide hydroxamic acid
SDS	sodium dodecylsulfate
SDS PAGE	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese
SIRT	Sirtuin
sek	Sekunde
SIRT2	Sirtuin 2
STM	short-term memory, Kurzzeitgedächtnis
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
TSA	Trichostatin A
Tub	Tubulin
u.a.	unter anderem
US	unkonditionierter Stimulus
UV	Ultraviolett
V	Volt, Spannung
ZCL	Zentrales Chemikalienlager
ZNS	Zentrales Nervensystem
μ	Mikro, 10 ⁻⁶

1 Einleitung

1.1 Lernen und Gedächtnisbildung

Als Lernen ist der Erwerb von geistigen, körperlichen und sozialen Kenntnissen, Fähigkeiten und Fertigkeiten definiert. Dies ermöglicht Lebewesen eine Änderung ihres Verhaltens. Die Fähigkeit zu Lernen und auch die Fähigkeit des Erinnerns (Gedächtnis) sind im gesamten Tierreich hoch konserviert, da im Grunde alle Nervenzellen in allen Individuen ähnlich funktionieren. So werden während des Lernprozesses die Erfahrungen im Gehirn bewertet, können als Erinnerungen in Form eines Gedächtnisses gespeichert, jederzeit wieder abgerufen und somit zu einer bestimmten Verhaltensweise umgesetzt werden. Nach dem Aneignen des Gedächtnisses, der sogenannten Akquisition, kommt es zu dessen Festigung (Konsolidierung). Die gespeicherte Information kann für kurze Zeit, mittelfristig oder sogar lebenslang zur Verfügung stehen. Basierend auf dieser Zeitspanne wird das Gedächtnis unterteilt in Kurzzeit- (short-term memory, STM), Mittelzeit- (mid-term memory, MTM) und Langzeit-Gedächtnis (long-term memory, LTM).

1.1.1 Zelluläre Grundlagen des Lernens und der Gedächtnisbildung

Lernen und die Gedächtnisbildung sind dynamische Prozesse, die aus verschiedenen Phasen bestehen und durch unterschiedliche Mechanismen in Gang gesetzt und aufrecht erhalten werden [169]. Sie unterliegen einer andauernden Veränderung.

Neuronale Grundlage dieser Modulationsfähigkeit im Gehirn bildet die synaptische Plastizität. Sie kann als Modell zur Untersuchung der zellulären Mechanismen der Gedächtnisbildung dienen, da hierbei synaptische Verbindungen zwischen Neuronen verknüpft werden [5, 6, 123]. Diese sind nicht starr, sondern unterliegen ständigen Umstrukturierungen. So werden beispielsweise während des Lernens neue Verbindungen geschaffen oder es werden bereits bestehende geschwächt bzw. verstärkt, so dass die neuronale Aktivität moduliert wird. Zur Änderung der Stärke der synaptischen Übertragung wachsen beteiligte Synapsen, damit Kontaktflächen zwischen Neuronen vergrößert werden. Weiterhin kann die Rezeptorausstattung verändert und auch die

Transmitterfreisetzung angepasst werden. Damit die synaptische Verknüpfung allerdings verstärkt werden kann, müssen nach der Hebb'schen Regel beide Neurone, also die prä- und postsynaptische Nervenzelle gleichzeitig aktiv sein (Koinzidenz) [72].

1.1.2 Molekulare Grundlagen des Lernens und der Gedächtnisbildung

Auf molekularer Ebene spielen second messenger Kaskaden eine zentrale Rolle bei der Modulation der neuronalen Aktivität sowie der Konnektivität zwischen Neuronen und tragen so zur Gedächtnisbildung bei [137]. Die Grundlagen hierzu wurden in vielen Organismen wie der Maus (*Mus musculus*) [18], der Meeresschnecke (*Aplysia californica*) [4, 37], der Taufliege (*Drosophila melanogaster*) [114, 207] und der Honigbiene (*Apis mellifera*) [53, 136] untersucht. Die molekularen Mechanismen sind sehr ähnlich und evolutionär stark konserviert [131].

So spielt sowohl in Mollusken, in Insekten aber auch in Säugetieren der second messenger cAMP (cyclisches Adenosinmonophosphat) und die cAMP-abhängige Proteinkinase A (PKA) eine entscheidende Rolle beim Lernen sowie der neuronalen Plastizität [137] und bildet damit die molekulare Basis aller Gedächtnisse. Zwar beruhen demnach das Kurzzeit- und Langzeitgedächtnis grundlegend auf der Aktivität der PKA, dennoch unterscheidet sich aber die Konsolidierung beider Gedächtnisse (vgl. Abbildung 1).

Der molekulare Ablauf zur Gedächtnisbildung wurde besonders an *Aplysia* erforscht und beginnt mit einer Erhöhung der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration, sowohl durch Depolarisation der Präsynapse als auch durch Stimulation der Postsynapse nach Transmitterfreisetzung. Der erhöhte Ca^{2+} -Spiegel aktiviert nachfolgend eine membranständige Adenylatcyclase, welche als Koinzidenzdetektor fungiert und unter ATP-Verbrauch den second messenger cAMP erzeugt. Durch cAMP wird wiederum die PKA aktiviert. Diese kann nun ihre Zielproteine phosphorylieren und kurzzeitig die Signalweiterleitung zwischen Neuronen verstärken, indem beispielsweise die Empfindlichkeit der Zelle erhöht wird [102, 103]. Die Effekte sind nur von kurzer Dauer, da auch Phosphodiesterasen (PDE) und Proteinphosphatasen aktiv sind, die cAMP abbauen und Phosphorylierungen wieder entfernen, wodurch der PKA-Aktivität entgegengewirkt wird [120]. Dennoch bilden diese posttranslationalen Modifikationen die Grundlage des STM.

Während zur Ausbildung eines Kurzzeitgedächtnisses bereits vorhandene Proteine

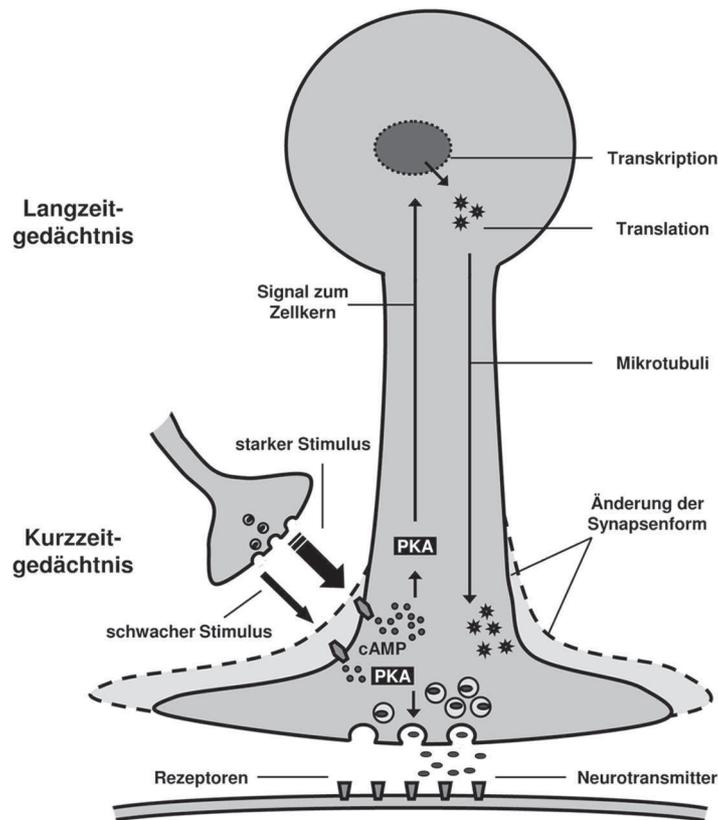


Abbildung 1: **Molekularer Unterschied zwischen Kurz- und Langzeitgedächtnis.** Ein schwacher Stimulus bewirkt durch die Aktivität von Proteinkinasen wie PKA eine vermehrte Transmitterfreisetzung und erhöht damit die Intensität der Reizweiterleitung an der Synapse (Kurzzeitgedächtnis). Ein starker Stimulus, z.B. durch längere Reizung der Synapse bewirkt einen Transport der PKA in den Zellkern, wo die Expression gedächtnis-relevanter Gene induziert wird und zur Neusynthese von Proteinen führt, die z.B. für morphologische Änderungen der Synapse gebraucht werden (Langzeitgedächtnis). Proteine werden jeweils entlang der Mikrotubuli transportiert. Nach [93].

oder Ionenkanäle modifiziert werden, müssen zur Erzeugung eines Langzeitgedächtnisses neue Proteine sowie weitere Zellbestandteile hergestellt werden, damit strukturelle Veränderungen wie das Wachstum neuer Synapsen oder die Festigung bestehender Verbindungen erfolgen können. Hierzu muss die PKA stärker oder andauernder arbeiten, beispielsweise durch mehrmalige Aktivierung. Trifft dies zu, wandert die Kinase in den Nukleus und phosphoryliert den Transkriptionsfaktor CREB (CRE-binding protein), was dessen Aktivierung bewirkt [40, 177, 202]. Durch die Aktivität von CREB und des Cofaktors CBP (CREB binding protein), eine beim Lernen und der Gedächtnisbildung essentiell beteiligte Histonacetyltransferase, kann die Genexpression und somit auch die Synthese von Proteinen, die für die Gedächtnisbildung nötig sind, angeschal-

tet werden [192]. Dies trägt langfristig zur Verstärkung der Signaltransduktion und damit zur Ausbildung eines langandauernden Gedächtnisses bei. Demnach besitzt die Genexpression, v.a. die Transkription gedächtnis-relevanter Gene eine entscheidende Rolle bei der Konsolidierung des LTM [205].

Neben der gleichzeitigen Aktivität zweier Neurone und der cAMP-PKA Signalkaskade wirken sich auch weitere Kaskaden wie die Ca^{2+} -CamK Kaskade [11] oder der inhibierende Transkriptionsregulator CREB-2 auf die Gedächtniskonsolidierung aus [29, 138]. In höheren Organismen mit komplexen Lernformen spielen bei der Ausbildung eines stabilen Gedächtnisses auch Faktoren wie Motivation, circadiane Rhythmik, Sättigungszustand, Alter, aber auch Stress eine wichtige Rolle.

1.1.3 Mikrotubuli bei Lernen und Gedächtnisbildung

Um die zur LTM Bildung hergestellten Proteine und Organelle vom Soma aus an ihren Wirkort zu befördern, werden Mikrotubuli benötigt, entlang derer der axonale Transport in Neuronen geschieht. Mikrotubuli sind Elemente des Cytoskeletts der Zelle, welche u.a. am intrazellulären Transport von beispielsweise Vesikeln oder Organellen [25, 30, 161], bei der Zellteilung (Mitose), bei der Bewegung von Zellen, aber auch an der Polarität der Zelle beteiligt sind [189, 210]. Dabei sind die Mikrotubuli in allen Eukaryonten stark konserviert.

Die strukturellen Untereinheiten der Mikrotubuli stellen das α - sowie β -Tubulin dar, welche sich einander sehr ähneln. Beide Untereinheiten haben eine ähnliche Sekundär- und Tertiärstruktur, GTP-Bindefähigkeit sowie ein Molekulargewicht von etwa 50 kDa [199]. Um einen Mikrotubulus aufzubauen, kommt es zunächst zur Bildung von Heterodimeren, bestehend aus α - und β -Tubulin. Diese Heterodimere sind eng aneinander gebunden und dissoziieren nur unter denaturierenden Bedingungen. Nachfolgend formen sie nach ihrer Bindung kurze Protofilamente, von denen sich 13 zu einer zylinderförmigen Struktur, den sogenannten Mikrotubuli zusammenlagern (siehe Abbildung 2). Die entstandene Struktur ist polar, denn sie besitzt an ihrer Basis, dem sogenannten MTOC (microtubule organisation center) ein Minus-Ende. Neue Dimere lagern sich am gegenüberliegenden Plus-Ende an, so dass der Mikrotubulus in Plus-Richtung polymerisiert und demnach wachsen kann. Bei den Mikrotubuli handelt es sich ferner um dynamische Strukturen. Es wechseln sich Polymerisations- mit schnellen Depolymerisationsphasen ab. Dies ist u.a. nötig, damit die Zelle flexibel reagieren kann [91].

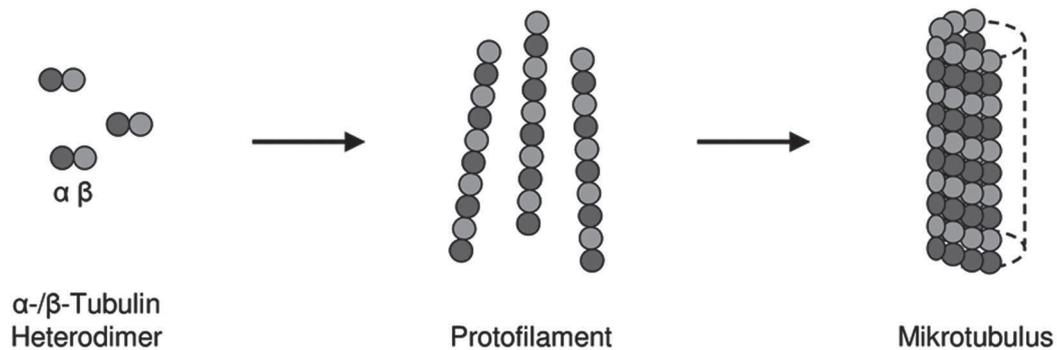


Abbildung 2: **Schematischer Aufbau der Mikrotubuli.** Heterodimere aus α - und β -Tubulin bilden kurze Protofilamente, von denen sich 13 weiter zu den zylinderförmigen Mikrotubuli zusammenlagern.

Für den intrazellulären Transport werden zudem auch Motorproteine benötigt, die an Mikrotubuli binden und z.B. Organelle oder Vesikel mit Proteinen in der Zelle in eine bestimmte Richtung transportieren. Kinesine befördern ihre Fracht in Richtung Zellperipherie entlang der Mikrotubuli zu deren Plus-Ende hin. Dies bezeichnet man als anterograden Transport. Den retrograden Transport zum Minus-Ende der Mikrotubuli steuern Dyneine.

Essentiell ist so beispielsweise der intrazelluläre Transport von Vesikeln mit N-methyl-D-aspartat (NMDA) bzw. α -Amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazol-Propionsäure (AMPA) Rezeptor-Untereinheiten während des Lernens und der Gedächtnisbildung. Auch dieser Vesikeltransport in die Dendriten verläuft entlang der Mikrotubuli [77, 172, 203]. Gardiner *et al.* [57] stellten ein Modell auf, welches die Verbesserung des anterograden Transports verdeutlicht. Hierbei handelt es sich um den Transport des JIP (JNK interacting protein), was außerdem die Beteiligung der JNK Proteinkinase am intrazellulären Transport aufzeigt.

Die Störung der intrazellulären Transportabläufe führt häufig zur Krankheitsentwicklung wie beispielsweise bei Huntington (Chorea Huntington). Bei Patienten mit dieser Krankheit ist der Transport des BDNF (brain-derived neurotrophic factor) gestört. Durch HDAC6-Inhibition lässt sich in der Zellkultur jedoch das Transportdefizit ausgleichen, indem eine Erhöhung der Tubulin-Acetylierung induziert wird [42], weshalb der Tubulin-Acetylierung als posttranslationale Modifikation folglich eine wichtige Funktion zukommt.

1.1.4 Proteinacetylierung in Lernen und Gedächtnis

Posttranslationale Modifikationen (PTM) sind Veränderungen von Proteinen, die nach der Translation stattfinden und unterschiedliche Auswirkungen besitzen können. Modifikationen wie z.B. die Phosphorylierung von Serin- oder Threoninresten bestimmter Proteine oder Kanäle spielen eine zentrale Rolle beim Lernen und der Gedächtnisbildung. Beispiele weiterer Modifikationen, die für Lernen und Gedächtnis relevant sind, stellen die Methylierung von Lysinen bzw. Argininen, die Glykosylierung, die Ubiquitinierung, die Palmitoylierung und v.a. die Acetylierung von Proteinen dar [184].

In diesem Zusammenhang beeinflusst die Acetylierung beispielsweise die Ausbildung des Angstgedächtnisses [1, 66, 145, 192], die Fähigkeit zur Objekterkennung [17, 104, 128, 146, 204] oder die Bildung eines räumlichen Gedächtnisses [64, 104, 127, 146].

Bei der Acetylierung handelt es sich um eine Proteinmodifikation, an der zwei verschiedene Enzymgruppen beteiligt sind. Die Acetylierungsreaktion wird von sogenannten Histonacetyltransferasen (HATs) katalysiert. Dies geschieht an internen Lysinresten von Proteinen, wodurch eine Ladungsänderung hervorgerufen wird [159]. Die Deacetylierung hingegen, also das reversible Entfernen der Acetylgruppe wird von den Histondeacetylasen (HDACs) übernommen (siehe Abbildung 3).

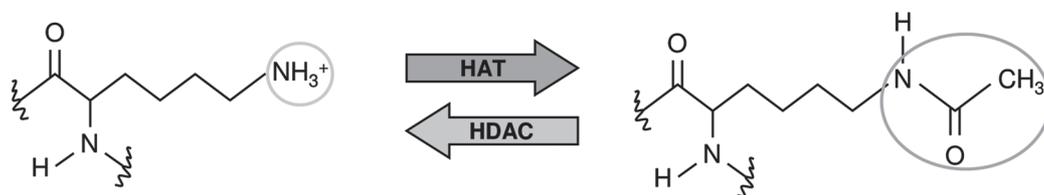


Abbildung 3: **Schematische Darstellung der Proteinacetylierung.** Die Acetylierung erfolgt an Protein-internen Lysinresten und wird durch HATs (Histonacetyltransferasen) katalysiert. Dies hat eine Ladungsänderung im Protein zur Folge. Die Rückreaktion, die Deacetylierung wird von HDACs (Histondeacetylasen) übernommen.

Die HDACs können in vier Klassen eingeteilt werden [38]: HDACs der Klasse I besitzen eine Lokalisation im Zellkern, wohingegen Mitglieder der Klasse II sowohl im Kern als auch im Cytoplasma vorkommen. Enzyme beider Klassen können durch die bekannten HDAC-Inhibitoren TSA (Trichostatin A), SAHA (Suberoylanilide hydroxamic acid) und Valproat gehemmt werden [16]. Die HDACs der Klasse III, deren Enzyme nach ihrem Hefe-Homolog SIR2 auch Sirtuine genannt werden, besitzen einen Nikotinamidadenindinukleotid (NAD^+)-abhängigen Mechanismus und können daher mit Niko-

tinamid (NAM) inhibiert werden. Enzyme dieser Klasse sind demnach auch unempfindlich gegenüber Hemmstoffen für HDAC Klasse I und II [12]. Die Klasse IV der HDACs stellt mit der humanen HDAC 11 nur ein einziges Mitglied, die zu allen anderen HDACs große Sequenzunterschiede aufweist [63].

Histonacetyltransferasen sind wie die Histondeacetylasen evolutionär stark konservierte Enzyme und können aufgrund ihrer Lokalisation in der Zelle in zwei Kategorien unterteilt werden [163, 179]: Typ A-HATs sind im Zellkern lokalisiert, wo sie an der Histonacetylierung beteiligt sind und somit einen Einfluss auf die Transkription ausüben. Typ B-HATs hingegen sind im Cytoplasma zu finden und acetylieren neben neu synthetisierten Histonen auch andere Proteine. Aufgrund konservierter Struktur motive, also Ähnlichkeiten im Aufbau der verschiedenen HATs können sie auch in fünf verschiedene Familien eingeteilt werden: die MYST-, GNAT-, p300/CBP-, TAF II 250-Familie sowie die Coaktivatoren der nukleären Rezeptoren [163, 179]. Die Hemmung der HAT-Aktivität ist durch die Inhibitoren Garcinol, Curcumin sowie Anacardinsäure möglich [7, 8].

1.1.5 Die Rolle der Proteinacetylierung

Auf molekularer Ebene beeinflusst die Acetylierung z.B. die DNA-Protein-Interaktion, die Replikation und auch die Transkription. Weiterhin trägt die Acetylierung zur Stabilität von Proteinen oder zur erleichterten Interaktion mit anderen Proteinen bei. Globaler betrachtet besitzt die Acetylierung eine Funktion bei der Regulation enzymatischer Aktivität, dem Fortschreiten des Zellzyklus sowie bei der Apoptose. Außerdem spielt die Acetylierung eine Rolle bei der Peptid-Rezeptor-Erkennung [159, 179].

All diese vielfältigen Funktionen der Acetylierung sind zurückzuführen auf das Vorhandensein einer Vielzahl an Substraten der HATs bzw. HDACs. Dabei stammen die Namen der Enzyme jeweils von ihrem bekanntesten Substrat, den Histonen, ab. Da die Enzyme evolutionär älter sind als die Histone selbst [59], liegt es nahe, dass die HATs und HDACs auch noch weitere, sogenannte Nicht-Histon-Substrate besitzen. Dazu zählen u.a. Transkriptionsfaktoren und -coaktivatoren, aber auch Kernimportfaktoren. Ein weiteres wichtiges Acetylierungssubstrat in der Zelle ist das Strukturprotein α -Tubulin [105, 159].

1.1.5.1 Die Rolle der α -Tubulin Acetylierung

Eines der Nicht-Histon-Zielproteine der HATs bzw. HDACs ist das im Cytoplasma lokalisierte α -Tubulin [55, 68].

Sowohl die α - als auch β -Tubulin Untereinheit der Mikrotubuli werden durch zahlreiche posttranslationale Modifikationen (PTMs) verändert. Die beteiligten Enzyme bevorzugen meist Tubulin-Untereinheiten, die bereits im Mikrotubulus eingebaut sind. Dabei sprachen Verhey *et al.* [193] von einem sogenannten Tubulin-Code, da es einige Parallelen zum beschriebenen Histon-Code gibt. Während Histone im Zellkern zu finden sind, kommt Tubulin im Cytoplasma der Zelle vor. Sowohl die DNA, die im Chromatin um die Histone gewickelt wird, als auch die Tubulin-Untereinheiten bilden „höher-geordnete Strukturen“ aus. Teile dieser gebildeten Polymere können durch PTMs modifiziert werden. Dies kontrolliert die biologische Funktion, wobei spezifische Proteinkomplexe rekrutiert werden können.

Zu den möglichen PTMs der Tubulin-Untereinheiten zählen z.B. die Tyrosinierung bzw. die Detyrosinierung, die Phosphorylierung, aber auch Polymodifikationen wie das Anhängen mehrerer Glutamat- bzw. Glycinreste an das Protein [68, 88]. Eine entscheidende und in dieser Arbeit untersuchte PTM ist die Acetylierung des α -Tubulins, die an Lysin40 stattfindet [55, 155]. Als beteiligte HATs gelten ARD1-NAT1 [144] sowie Elp3 (Elongator Protein 3) [36, 57, 178]. Als Deacetylasen hingegen wurden zunächst sowohl HDAC6 als auch SIRT2 (Sirtuin 2) vermutet, da beide mit α -Tubulin im Cytoplasma der Zelle co-lokalisieren. Nach diesem ersten Interaktionshinweis konnte auch in Zellkultur nachgewiesen werden, dass es sich bei HDAC6 und SIRT2 tatsächlich um die beiden Tubulin-Deacetylasen handelt. Eine siRNA-Transfektion zeigte eine Zunahme des Levels an acetyliertem Tubulin, wenn entweder HDAC6 oder SIRT2 herunterreguliert wurden [83, 143].

Durch solche Studien konnte auch die Bedeutung der Tubulin-Acetylierung aufgeklärt werden. Demnach hat die Acetylierung des α -Tubulins einen Einfluss auf die Motilität der Zelle; sie reduziert sich, wenn es zu verstärkter Acetylierung nach TSA-Behandlung kommt [83, 189]. Für die Motilität einer Zelle wird ein dynamisches Cytoskelett benötigt. Die Acetylierung verändert die Dynamik, da sie Mikrotubuli stabilisiert und deren Depolymerisation, also das Schrumpfen der Mikrotubuli verlangsamt [126]. Das Netzwerk acetylierter Mikrotubuli bleibt nach TSA-Behandlung deutlich länger intakt, selbst wenn Colchizin, eine Droge, die die Depolymerisation der Mikrotubuli

auslöst, zugegeben wird. Des Weiteren verändert die Acetylierung auch die Wachstumsgeschwindigkeit der Mikrotubuli. So konnte gezeigt werden, dass nach HDAC6-Inhibition mit Tubacin, einem selektiven HDAC6-Hemmstoff, die Wachstumsrate herabgesetzt wird [210].

Weiterhin hat die Acetylierung des α -Tubulins Einfluss auf Protein-Interaktionen wie z.B. die Bindung von Motorproteinen an Mikrotubuli. Die Tubulin-Acetylierung verbessert die Bindungsaffinität des Kinesins [161] sowie des Dyneins [42] und erleichtert daher den intrazellulären Transport, wodurch es beispielsweise zu einem verstärkten Vesikel- [25, 161] sowie zu einem gesteigerten Mitochondrien-Transport in der Zelle kommt [30].

So besitzt die Tubulin-Acetylierung auch eine Funktion beim Lernen und der Gedächtnisbildung. Eine Studie am Alzheimer-Mausmodell konnte zeigen, dass Nikotinamid (NAM) das Lernen und das Gedächtnis verbessert [62]. Die Inhibition der Sirtuine durch NAM reduziert die Menge einer bestimmten Phospho-Tau Spezies, die mit der Depolymerisation der Mikrotubuli assoziiert wird. Des Weiteren wird durch NAM-Gabe die Menge an acetyliertem α -Tubulin sowie an MAP2c (Mikrotubuli-assoziiertes Protein 2c) erhöht. Diese Effekte bewirken eine verbesserte Mikrotubuli-Stabilität und somit einen verbesserten neuronalen Transport.

Essentiell ist auch die Integrität der Mikrotubuli während des Lernens. Werden Ratten mit Colchizin behandelt, schränkt die Desintegration das räumliche Lernverhalten sowie das Gedächtnis ein [108, 141].

Auf zellulärer Ebene spielt für die Gedächtnisbildung die Umstrukturierung der synaptischen Verbindungen eine entscheidende Rolle. Gerade in dendritischen Dornfortsätzen wird diese synaptische Plastizität v.a. durch das Aktin-Cytoskelett vermittelt. An der zeitlichen und räumlichen Organisation und damit der Regulation von Aktin in der Synapse wird mittlerweile über eine Beteiligung dynamischer Mikrotubuli diskutiert [79]. So zeigten auch Fanara *et al.* [50] eine Mitwirkung der Mikrotubuli an der synaptischen Plastizität und damit an der Gedächtnisbildung.

Die Acetylierung des α -Tubulins spielt zudem eine Rolle bei neurodegenerativen Erkrankungen, was Veröffentlichungen über Krankheitsbilder, die mit Proteinablagerungen (Aggregate) assoziiert sind, aufzeigen [35, 99, 148, 156]. Die schädigenden Aggregate fehlgefalteter Proteine, wie sie z.B. bei Alzheimer oder Parkinson entstehen, werden von HDAC6 erkannt und über eine Rekrutierung von Dynein entlang der Mikrotubuli zum Zellzentrum hin abtransportiert, wo sie in sogenannten Aggresomen

entfernt werden. Nach TSA-Behandlung befinden sich 77 % weniger Aggregate in der Zelle, da sie nach gesteigerter Acetylierung besser abtransportiert wurden [35].

Die Untersuchungen zur Rolle der Tubulin-Acetylierung wurden bislang nur in *in vitro* Zellkulturmodellen oder in Vertebraten durchgeführt. Ob die Acetylierung des α -Tubulins auch in Invertebraten von Bedeutung ist, wurde im Rahmen dieser Arbeit in Honigbienen überprüft.

1.2 Der Modellorganismus Honigbiene

Bei der Honigbiene (*Apis mellifera*) handelt es sich um einen Invertebraten mit komplexem Lernverhalten. Die Biene dient als gut etabliertes Modell zur Untersuchung der molekularen Grundlagen der Gedächtnisbildung [129, 131]. Bienen erfassen in kürzester Zeit ihre Umwelt, Farben und Gerüche der Pollen und des Nektars von Blüten. Sie können sich dies praktisch ihr Leben lang merken. Bienen verfügen des Weiteren über ein gutes Ortsgedächtnis, um sich den Standpunkt ihres Bienenstockes und von Nahrungsquellen, welche sie auch bewerten können, zu merken. Dies wiederum wird ihnen durch ein olfaktorisches Gedächtnis ermöglicht. Im Labor lässt sich dieses Gedächtnis leicht induzieren, indem Duftreize gegeben werden, womit so beispielsweise durch klassische olfaktorische Konditionierung das assoziative Lernen untersucht werden kann [129]. Ein weiterer Vorteil, weshalb sich die Biene als Modellorganismus zur Untersuchung von Lernen und Gedächtnis eignet, ist die Zugänglichkeit des Bienenhirns für verschiedene neurophysiologische Techniken. Des weiteren ist auch das Genom der Honigbiene sequenziert, was genomische Analysen zulässt [34].

1.2.1 Klassifizierung von Lernprozessen

Eine Klassifizierung von Lernprozessen kann nach der Komplexität des gelernten Verhaltens stattfinden. So werden einfache Anpassungen beispielsweise durch Sensitisierung oder Habituation (nicht-assoziativ) erworben. Eine komplexere Lernform ist das assoziative Lernen. Hierbei werden zwei Ereignisse miteinander verknüpft (assoziiert), wie beispielsweise bei der bekanntesten Art des assoziativen Lernens: der klassischen Konditionierung.

1.2.1.1 Nicht-assoziative Lernparadigmen (Sensitisierung und Habituation)

Nicht-assoziative Lernformen führen unbewusst zur Veränderung der Reaktion auf Reize. Man unterscheidet Reize, die von Bedeutung sind und eine Reaktion auslösen sowie Reize, die keinerlei Bedeutung für den Organismus darstellen und somit auch zu keiner Reaktion führen.

Während der Sensitisierung gewinnt ein zuvor bedeutungsloser Reiz an Bedeutung. Der Reiz kann daher nun eine Reaktion auslösen, da es zu einer erhöhten Reaktionsbereitschaft oder einer erhöhten Empfindlichkeit gekommen ist. Der Sinn dieser Verhaltensänderung liegt in der Erhöhung bzw. Aufrechterhaltung der Alarmbereitschaft des Lebewesens. Die Dauer des Effektes hängt von der Stärke des dargebotenen Stimulus ab, ist aber in der Regel recht kurzzeitig. Sensitisierung ist wenig reizspezifisch, denn es treten häufig auch Reaktionen auf andere Reize in verstärkter Form auf, da das generelle Erregungsniveau des Organismus erhöht wurde.

Der gegenteilige Prozess, also die Abnahme der Reaktionsstärke wird als Habituation bezeichnet. Habituation ist eine Form von Gewöhnung. Es wird gelernt einen sich wiederholenden Reizstimulus zu ignorieren, um sich beispielsweise vor einer Reizüberflutung zu schützen. Es handelt sich demnach um eine Anpassung von Aufmerksamkeitsleistungen, dadurch dass sich Reaktionen auf wiederholt dargebotene Reize abschwächen. Somit verliert ein bedeutungsvoller Reiz an Bedeutung und damit auch seine Fähigkeit eine Reaktion auszulösen. Die Habituation ist reizspezifisch, d.h. ein späterer, neuer Reiz kann eine Reaktion, die aufgrund von Habituation nachgelassen hat, auch wieder aufleben lassen. Ist ein Reiz allerdings sehr intensiv, tritt möglicherweise keine Habituation auf. Habituation ist jedoch klar von Adaptation, also Anpassungen, abzugrenzen.

1.2.1.2 Assoziatives Lernparadigma (Die klassische Konditionierung)

Die bekannteste Form des assoziativen Lernens ist die klassische Konditionierung nach Pavlov [154]. In solchen Lernparadigmen wird ein neutraler Reiz (konditionierter Stimulus, CS) mit einem belohnenden oder bestrafenden Reiz (unkonditionierter Stimulus, US) gepaart. Der US hat hierbei eine angeborene Bedeutung, wohingegen der CS vor der Konditionierung keine offensichtliche Reaktion auslöst. Die Reaktion wird erst durch eine oder mehrere CS/US Paarungen antrainiert. Nach der Assoziation des CS mit dem US wird somit bereits durch alleinige Gabe des CS eine konditionierte

Reaktion sichtbar. Art und Stärke der Reize (CS und US) sowie deren zeitliche Abfolge während des Lernens müssen genau kontrolliert werden, damit die Assoziation im Gehirn stattfindet. Das zeitlich und auch räumlich gleichzeitige Auftreten der Reize wird als Kontiguität bezeichnet.

1.2.2 Lernparadigma der Honigbiene

Das hier angewandte Lernparadigma ist das appetitive Lernen bei der Honigbiene [13, 131, 137]. Dabei nutzt man die Begabung der Bienen einen Blütenduft zu lernen, der mit der Belohnung in Form von Pollen oder Nektar verbunden ist. Werden im Labor die Antennen einer eingespannten Biene mit Zuckerlösung berührt, streckt diese reflexartig ihren Rüssel heraus, was als Rüsselreflex bzw. PER (englisch: proboscis extension reflex) bezeichnet wird. Diese natürliche Reaktion ist eine beobachtbare Verhaltensänderung der Biene. Mit Hilfe des PER kann die Biene während des appetitiven Lernens auf einen Duftreiz hin konditioniert und ihr Gedächtnis abgerufen werden, indem man ihr einen Duft (CS) appliziert, der mit der Berührung der Antennen und des Rüssels mit Zuckerwasser (US) gepaart ist. Bereits nach einer oder weniger solcher Paarungen wird die Biene den PER zeigen, auch wenn keine Belohnung in Form des Zuckerwassers angeboten wird. Sie ist somit auf den Duft, also den CS konditioniert worden. Je nach Häufigkeit der Reizpaarung kann ein mehr oder weniger stabiles und zeitlich andauerndes Gedächtnis induziert werden.

1.3 Zielsetzung

In der vorliegenden Arbeit soll die Bedeutung der Mikrotubuli-Integrität für das olfaktorische Lernen und die Gedächtnisbildung der Honigbiene aufgeklärt werden.

Es soll die Hypothese überprüft werden, dass eine Colchizin-induzierte Störung der Mikrotubuli-Integrität und damit des intrazellulären Transportes die Ausbildung des Langzeitgedächtnisses beeinträchtigt. Weiterhin soll untersucht werden, ob eine Stabilisierung der Mikrotubuli durch Taxol die Ausbildung des LTM begünstigt, da relevante Transportabläufe erleichtert ablaufen können (vgl. Abbildung 4).

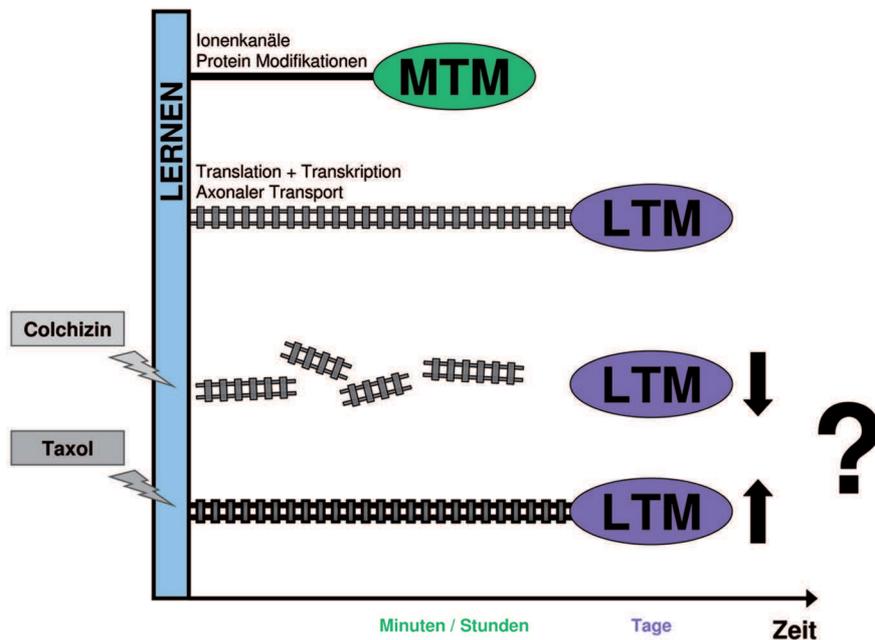


Abbildung 4: **Aufklärung einer Beteiligung der Mikrotubuli-Integrität bei Lernen und Gedächtnisbildung.** Nach assoziativem Lernen kommt es zur Ausbildung eines Mittelzeitgedächtnisses (MTM), das auf der posttranslationalen Modifikation von Ionenkanälen oder vorhandener Proteine beruht und nur vorübergehend einige Stunden existiert. Die Ausbildung eines Langzeitgedächtnisses (LTM) von mehreren Tagen erfordert Translation und Transkription sowie axonalen Transport dieser neuen Proteine und mRNA. Wird der Transport mit Colchizin gestört, stellt sich die Frage, ob sich ein LTM noch induzieren lässt. Die Förderung des Transports mit Taxol könnte die LTM Bildung begünstigen.

Hieraus ergeben sich folgende Fragestellungen, die anhand dieser Dissertation aufgeklärt werden sollen:

- Verschlechtert die Colchizin-Behandlung das assoziative olfaktorische Lernen und Gedächtnis, insbesondere das LTM der Honigbiene?
- Verschlechtert die Colchizin-Behandlung auch nicht-assoziatives Lernen und die Zuckerwasserempfindlichkeit der Honigbiene?
- Verbessert im Gegensatz zu Colchizin die Taxol-Behandlung das olfaktorische Lernen und Gedächtnis der Honigbiene?
- Worauf beruhen die Effekte beim olfaktorischen Lernen und Gedächtnis nach Colchizin- und Taxol-Behandlung?
- Spielt hierbei die Acetylierung des α -Tubulins eine entscheidende Rolle und wodurch kann diese moduliert werden?

2 Material

2.1 Chemikalien

1-Butanol (wassergesättigt)	ZCI
2-Mercaptoethanol	Merck, Darmstadt
Acetanhydrid	ZCI
Acetylthiocholin	Sigma-Aldrich, München
Actinomycin D	Appli-Chem. Darmstadt
Agarose	Sigma-Aldrich, München
APS (Ammoniumpersulfat)	ZCI
Bis-Acrylamid (30% (w/v) Acrylamid + 0.8% (w/v) Bisacrylamid)	Roth, Karlsruhe
Bromphenolblau	Appli-Chem, Darmstadt
BSA (Rinderserumalbumin)	Roth, Karlsruhe
Chloroform	ZCI
Colchizin	Sigma-Aldrich, München
Diltiazem	Sigma-Aldrich, München
Dithiobisnitrobenzoat (DTNB)	Sigma-Aldrich, München
DMSO (Dimethylsulfoxid)	ZCI
EDTA (Ethylendiamintetraessigsäure)	ZCI
Eggalbumin	Appli-Chem, Darmstadt
Eserin	Fluka
Formaldehyd	ZCI
Glycerin	ZCI
Glycin	Roth, Karlsruhe
Harnstoff	ZCI
HCl (Salzsäure)	Merck, Darmstadt
Heparin	Sigma-Aldrich, München
Histon Mix	Sigma-Aldrich, München
Histon H3	Sigma-Aldrich, München
Isopropylalkohol	ZCI

KCl (Kaliumchlorid)	Merck, Darmstadt
KH ₂ PO ₄ (Kaliumdihydrogenphosphat)	Merck, Darmstadt
Methanol	ZCI
MgCl ₂ •6 H ₂ O (Magnesiumchlorid)	Merck, Darmstadt
Na ₂ HPO ₄ (Dinatriumhydrogenphosphat)	ZCI
NaCl (Natriumchlorid)	ZCI
NaN ₃ (Natriumazid)	ZCI
NaHCO ₃ (Natriumbicarbonat)	ZCI
Nelkenöl	Apotheke
p-NPP (4-Nitrophenylphosphat-Dinatrium-salz-Hexahydrat)	Appli-Chem, Darmstadt
Poly-L-Lysin	Sigma-Aldrich, München
Proteinmarker ColorPlus Prestained	New England Bioloabs, Frankfurt
Protein Ladder	
SDS (Natriumdodecylsulfat)	Roth, Karlsruhe
Stimune	Prionics, Lelystad NL
Taxol	Sigma-Aldrich, München
TEMED (N,N,N',N'-Tetramethylethylenediamin)	Appli-Chem, Darmstadt
tri-Natriumcitratdihydrat	ZCI
Tris (Tris(hydroxymethyl)-aminomethan)	Sigma-Aldrich, München
Triton-X-100 (Polyethylen-glycol-tert-octylphenylether)	Fluka, Neu-Ulm
TSA (Trichostatin A)	Sigma-Aldrich, München
Tween20 (Polyoxyethylen(20)-sorbitan-monolaurat)	Appli-Chem, Darmstadt
Verapamil	Sigma-Aldrich, München
Xylol	ZCI

2.2 Geräte

1 ml-Glashomogenisator mit Glas-S-Stößel	Braun
Binokular S6D	Leica
Block-Heizgerät Accu Block™ digital	Labnet
Blotkammer	Owl
Cool Snap HQ ² Kamera	Photometrics, München
Digitalkamera ProgRes C10	Jenoptik
Fluoreszenzmikroskop Axiovert 200 M	Zeiss, Jena
Gelelektrophoreseapparatur	C.B.S.
Kaltlichtquelle KL 1500 LCD	Schott
Klingenbrecher	Faulhaber
LötKolben	eigene Herstellung
Microtom Autocut 2040	Reichert-Jung
Mikropipetten Puller Model P-87	Sutter Instrument Co.
pH-Meter (inoLab pH 730)	WTW
Pinzetten	Dumont
Plastikwanne	Einzelhandel
Plate-Reader safire ²	Tecan
Powerstation 300 PLUS	Labnet
Präparationsbesteck	Laborbedearf
Rotor TLA-100 Beckman Coulter, Krefeld	
Rührheizgerät RCT basic	IKA-Labortechnik
Schüttler KS501 digital	IKA-Labortechnik
Tischzentrifuge (Spectrafuge 24D)	Labnet
Ultraschallgerät HTU Soni 130	Heinemann
Ultrazentrifuge TL-100	Beckman Coulter, Krefeld
UV Leuchtstoffröhre, 8W, 365nm	Phillips
Vortex VX 100	Labnet
Waage CP3202S und CP225D	Sartorius
Wärmeschrank	MELAG Medizintechnik, Berlin
Weißlicht Leuchtstoffröhre, 6W, neutralweiß	Osram
Zentrifuge 5804 R	Eppendorf, Hamburg

2.3 Antikörper

2.3.1 Primäre Antikörper

Zum Nachweis acetylierter Proteine wird der Acetylated-Lysine Antikörper (Ac-Lys) der Firma cell signaling in der Konzentration 1:2000 in Blockpuffer (1x PBS + 0.5% (w/v) BSA) verwendet. Der Antikörper ist polyklonal und stammt aus Kaninchen.

Zur Detektion der Acetylierung an Lysin 18 von Histon H3 wird der H3K18ac Antikörper der Firma cell signaling in der Konzentration 1:1000 in Blockpuffer (1x PBS + 0.5% (w/v) BSA) verwendet. Dieser Antikörper ist ebenfalls polyklonal und wurde in Kaninchen hergestellt.

Der Histon H3 Antikörper der Firma Sigma-Aldrich wird zum Nachweis von Histon 3 verwendet. Dieser polyklonale Antikörper wird in der Konzentration 1:5000 in Blockpuffer (1x PBS + 0.5% (w/v) BSA) eingesetzt und stammt ebenfalls aus Kaninchen.

Mithilfe der monoklonalen Maus Antikörper Anti- α -Tubulin sowie Anti-Acetylated-Tubulin (Ac-Tub), beide stammen von der Firma Sigma-Aldrich, gelingt der Nachweis von Tubulin bzw. seiner Acetylierung. Beide Antikörper werden in der Verdünnung 1:10000 in Blockpuffer (1x PBS + 0.5% (w/v) BSA) eingesetzt. Weiterhin wird zum Nachweis von Tubulin ein Antikörper der Firma Acris in der Verdünnung 1:5000 in Blockpuffer (1x PBS + 0.5% (w/v) BSA) verwendet. Dieser Primärantikörper ist ebenfalls monoklonal und wurde in Ratte hergestellt.

2.3.2 Sekundäre Antikörper

Die verwendeten Sekundärantikörper für Western Blot-Analysen sind mit Meerrettich-Peroxidase gekoppelt, wodurch ein Chemilumineszenz-Nachweis ermöglicht wird. Sie sind in Ziege hergestellt worden. Der sekundäre Anti-Maus IgG-Antikörper, der sekundäre Anti-Kaninchen IgG-Antikörper sowie der sekundäre Anti-Ratte IgG-Antikörper (alle Sigma-Aldrich) werden in der Verdünnung 1:10000 in 1x PBS + 0.5% (w/v) BSA + 0.1% (v/v) Tween20 eingesetzt.

Für ELISA-Analysen werden sekundäre Antikörper verwendet, die mit alkalischer Phosphatase konjugiert sind, so dass durch Zugabe des Substrates p-NPP (4-Nitrophenylphosphat-Dinatriumsalz-Hexahydrat, Appli-Chem) die durch Umsetzung entstehende Gelbfärbung zur Quantifizierung genutzt werden kann. Diese Antikörper sind ebenfalls in Ziege hergestellt worden. Der sekundäre Anti-Maus IgG-Antikörper so-

wie der sekundäre Anti-Kaninchen IgG-Antikörper (beide Sigma-Aldrich) werden in der Verdünnung 1:4000 in 1x PBS + 0.5% (w/v) BSA eingesetzt.

Histologische Untersuchungen werden mit sekundären Antikörpern durchgeführt, die mit einem fluoreszierenden Farbstoff konjugiert sind. Hierzu dient der Cy-3 konjugierte AffiniPure Anti-Ratte Antikörper aus Ziege der Firma Dianova, Hamburg. Er wird in der Verdünnung 1:500 in PBS + 1% (w/v) BSA + 0.1% (v/v) Triton verdünnt.

2.4 Puffer und Lösungen

2.4.1 Injektionslösungen

Actinomycin D	2 mg/ml in 100% DMSO
Diltiazem	10 mM in 1x PBS
Colchizin	1 mM in 1x PBS
Eserin	1 mM in 100% DMSO
Taxol	1 mM in 100% DMSO
Trichostation A (TSA)	1.65 mM in 100% DMSO
Verapamil	5 mM in 100% DMSO

2.4.2 Futterlösung

Futterlösung	1 M Sucrose (Haushaltszucker) in Leitungswasser
--------------	---

2.4.3 Probenvorbereitung

1x PBS	137 mM NaCl
	2.7 mM KCl
	8 mM Na ₂ HPO ₄
	1.5 mM KH ₂ PO ₄ ; pH 7.3-7.4

Homogenisierungspuffer	1x PBS 1 mM EDTA
------------------------	---------------------

2.4.4 ELISA Lösungen

ELISA Blocklösung	1x PBS 0.5% (w/v) BSA
-------------------	--------------------------

RxN Puffer	0.1 M Tris-HCl; pH 8.7 1 mM MgCl ₂ •6 H ₂ O
------------	--

Färbelösung	1x RxN-Puffer 1 mM p-NPP
-------------	-----------------------------

2.4.5 SDS PAGE Lösungen

5x SDS Probenpuffer	10% (w/v) SDS 200 mM Tris-HCl; pH 6.8 10 mM 2-Mercaptoethanol 20% (v/v) Glycerin 0.05% (w/v) Bromphenolblau
---------------------	---

10x SDS Laufpuffer	250 mM Tris-HCl; pH 8.8 2 M Glycin 1% (w/v) SDS
--------------------	---

Sammelgel Puffer	0.5 M Tris-HCl; pH 6.8
------------------	------------------------

Trenngel Puffer	1.5 M Tris-HCl; pH 8.8
-----------------	------------------------

2.4.6 Western Blot Lösungen

Blotting Puffer	0.25 M Tris-HCl; pH 8.3 0.2 M Glycin 20% (v/v) Methanol
Blocklösung	1x PBS 0.5% (w/v) BSA 0.1% (v/v) Tween20

2.4.7 Lösungen zur Mikrotubuli-Anreicherung

Probenpuffer	1x PBS 1 mM EGTA
--------------	---------------------

2.4.8 Lösungen für Histologie

Carnoy Lösung	30 ml Ethanol absolut 15 ml Chloroform 5 ml Eisessig
Histologie Blocklösung	1x PBS 0.5% (w/v) BSA 0.1% (v/v) Triton
PBS-T	1x PBS 0.1% (v/v) Triton

2.4.9 Lösungen für AChE Assay

0.1 M Phosphatpuffer pH7.0	57.7 ml 1 M Na ₂ HPO ₄ 42.3 ml 1 M NaH ₂ PO ₄ 900 ml Aqua dest.
0.1 M Phosphatpuffer pH8.0	93.2 ml 1 M Na ₂ HPO ₄ 6.8 ml 1 M NaH ₂ PO ₄ 900 ml Aqua dest.
Substratlösung	75 mM Acetylthiocholin in Phosphatpuffer; pH8.0
DTNB-Lösung	39.6 mg Dithiobisnitrobenzoat in 10 ml Phosphatpuffer; pH7.0 15 mg NaHCO ₃

2.5 Verbrauchsmaterialien

96-well-ELISA Platten	Nunc, Wiesbaden
Bienenröhrchen (Plastik)	eigene Herstellung
Bienenracks	eigene Herstellung
Deckgläschen	Roth, Karlsruhe
Dentalwachs	Ubert, Raesfeld
Falcon Röhrchen, steril (15 ml und 50 ml)	Greiner, Nürtingen
Fangröhrchen (PS-Röhrchen 68ML)	Greiner, Nürtingen
Glaskapillaren (10µl)	Servoprax®, Wesel
Glasobjektträger	Roth, Karlsruhe
Haushaltszucker	Einzelhandel
Kanülen	Braun, Melsungen
Metallkolben zur Injektion	eigene Herstellung
Nitrocellulose Membran Protran™	Schleicher/Schuell, Dassel

Paraffin Histowax	Leica, Solms
Pasteurpipetten	VWR, Darmstadt
Pollen	Einzelhandel
Rasierklingen	Faulhaber, Schönaich
Reaktionsgefäße (1,5 ml)	Sarstedt, Nümbrecht
Röntgenfilm Amershan Hyperfilm™ MP	GE Healthcare, München
Röntgenfilm-Entwickler	ZCL
Röntgenfilm-Fixierer	ZCL
Spritzen zur Fütterung und Duftapplikation (2 bzw. 20 ml)	Braun, Melsungen
Textilklebeband	Einzelhandel
Tissue-Tek®	Sakura, Staufen
Western Lightning-Enhanced Chemiluminescence-Substrate	PerkinElmer, Rodgau
Whatman-Filterpapier	Schleicher/Schuell, Dassel
Zahnstocher	Drogerie
Zentrifugenröhrchen	Beckman Coulter, Krefeld

3 Methoden

3.1 Haltung der Honigbienen *Apis mellifera carnica* L.

3.1.1 Im Sommer

Die Bienen wurden in Bienenstöcken im Botanischen Garten der Universität des Saarlandes im Freien mit natürlichen Futterquellen gehalten. Es wurden stets nur aktiv fliegende Bienen verwendet. Diese wurden mithilfe einer Plexiglaspyramide vor der Öffnung des Bienenstockes beim Ausfliegen gefangen und in Fangröhrchen überführt.

3.1.2 Im Winter

Im Winter wurden die Bienen zunächst einer künstlichen Winterperiode ausgesetzt. Anschließend wurde der Stock im Winterflughaus mit UV-durchlässigem Glasdach (Temperatur: 23-25°C mit Nachtabsenkung; Luftfeuchtigkeit: 50%) gehalten. Als Futter dienten 30% (w/v) Sucrosewasser und gemahlene Pollen. Die Versuchstiere wurden mit Fangröhrchen direkt aus einer mit Gaze bespannten Voliere gefangen.

3.2 Vorbereitung der Versuchstiere

Die Bienen wurden in den Fangröhrchen auf Eis immobilisiert und anschließend per Hand mit Textilklebeband in kleine Röhrchen fixiert, so dass der Rüssel und die Antennen freilagen (siehe Abbildung 5). Die Bienen wurden, wenn nicht weiter angegeben, 2x täglich mithilfe einer 2 ml-Spritze mit 1 M Sucroslösung gefüttert, morgens 2 und abends 3 Tropfen. Zwischen den Experimenten bzw. über Nacht wurden die Bienen in einem dunklen und mit feuchtem Papier ausgelegten Behälter bei Raumtemperatur aufbewahrt.

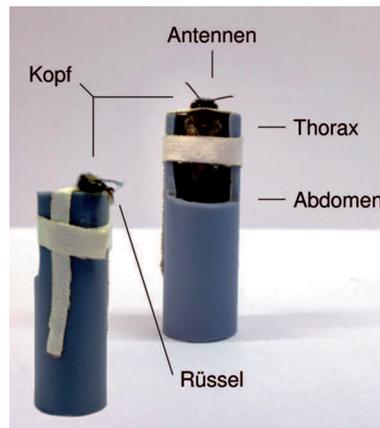


Abbildung 5: Im Röhrchen eingespannte Biene. Die Bienen wurden mithilfe von Textilklebeband an Kopf und Körper fixiert, so dass der Rüssel und die Antennen frei beweglich blieben.

3.2.1 Injektion der Inhibitoren

Die Bienen wurden mit einer Mikropipette, die zuvor aus einer Glaskapillare gefertigt wurde, in den Thorax injiziert (Injektionsstelle siehe Abbildung 6). Das Injektionsvolumen betrug jeweils $1 \mu\text{l}$. Die Zusammensetzung der injizierten Lösungen sowie der Injektionszeitpunkt ist dem Kapitel 2.4.1 bzw. den einzelnen Bildunterschriften im Ergebnisteil zu entnehmen.

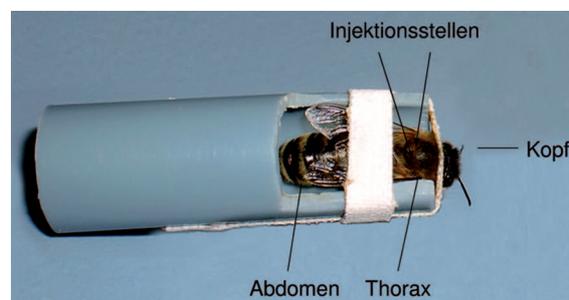


Abbildung 6: Die Injektion von Inhibitoren erfolgte an den markierten Stellen in den Thorax der Bienen. Es wurde je nach Zugänglichkeit nur eine der beiden möglichen Stellen verwendet und die Droge mithilfe einer Glaskapillare injiziert.

3.2.2 Behandlung mit UV-Licht

Die UV-Behandlung der Bienen erfolgte mithilfe einer UV-Leuchtstoffröhre, die die Wellenlängenbereiche UV-A und UV-C (366 nm und 254 nm) mit einer Intensität von etwa 27 mW/cm (UV-A) und 16 mW/cm (UV-C) abdeckte. Die UV-Leuchte befand sich in

einer verschließbaren Kartonbox. Zur Kontrolle wurden Bienen in einer gleich gebauten Box unter einer Weißlichtröhre mit einer Intensität von 15 mW/cm gehalten. An die 30 minütige Behandlung schloss sich eine Ruhephase von weiteren 30 min an.

3.3 Verhaltensexperimente

3.3.1 Test der Zuckerwasserempfindlichkeit (Responsiveness)

Die Untersuchung der Empfindlichkeit von Bienen gegenüber Zuckerwasser, also der Belohnung beim appetitiven Lernen, wird als Responsiveness bezeichnet.

Die in Röhrchen eingespannten Bienen wurden durch Antippen der Antennen mit einem in aufsteigende Sucroslösungen (0 mM, 30 mM, 100 mM, 300 mM und 1 M) getränkten Zahnstocher auf den Rüsselreflex (proboscis extension reflex, PER) getestet.

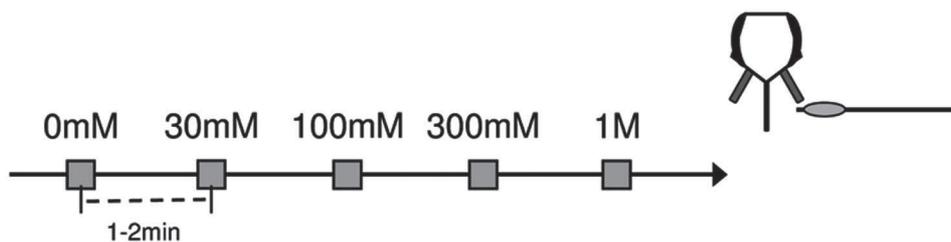


Abbildung 7: **Protokoll zum Testen der Zuckerwasserempfindlichkeit (Responsiveness)**. Bienen wurden im Abstand von circa 1-2 min mit einem in aufsteigende Sucroslösungen (0 mM, 30 mM, 100 mM, 300 mM und 1 M) getränkten Zahnstocher an ihren Antennen berührt und auf den PER getestet.

Die Auswertung der Daten erfolgte mit Microsoft Office Excel 2003. In einem Säulendiagramm wurde der Prozentsatz der auf den Sucrorestimulus positiv reagierenden Bienen im Vergleich zur Gesamtanzahl der Bienen dargestellt. Zur statistischen Auswertung wurde ein Fisher Exact Test (Software Primer) durchgeführt.

3.3.2 Nicht-assoziative Lernparadigmen

Die Untersuchungen der nicht-assoziativen Lernformen (Sensitisierung und Habituation) wurden nacheinander mit den gleichen Bienen durchgeführt.

3.3.2.1 Sensitisierung

Bei der Sensitisierung wurde die Biene vor einem Abzug mit Nelkenduft angeblasen, indem Luft mithilfe einer 20 ml-Spritze durch einen mit Nelkenöl getränkten Zellstoff gedrückt wurde. Dabei wurde der PER notiert. Nach einer Wartezeit von 2 min wurde die Biene mit 1 M Sucroslösung an den Antennen stimuliert (Sensitisierung) sowie 20 s danach der Test mit dem Nelkenduft wiederholt und ebenfalls der PER notiert. Aus dem Experiment wurden die Tiere entfernt, die nicht mit dem PER auf eine Stimulation mit einer 1 M Sucroslösung reagierten.

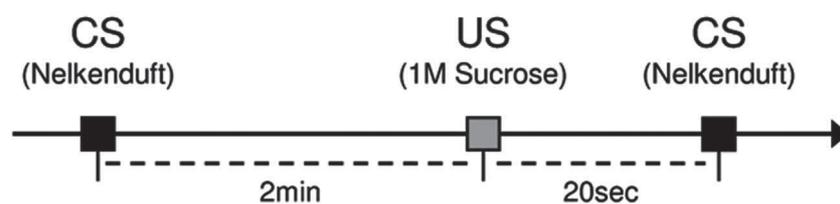


Abbildung 8: **Protokoll zur Sensitisierung.** Bienen wurden auf den PER getestet, zunächst als Reaktion auf Nelkenduft, 2 min später auf 1 M Sucroslösung, dargereicht an die Antennen, sowie als Reaktion auf erneuten Nelkenduft nach weiteren 15-20 sec.

Die Auswertung der Daten erfolgte mithilfe von Microsoft Office Excel 2003. Dargestellt wurde der prozentuale Anteil der Bienen, die vor und nach der Sensitisierung auf den Duft mit einem PER reagierten. Die statistische Auswertung erfolgte mithilfe des Fisher Exact Tests (Software Primer).

3.3.2.2 Habituation

Die Bienen wurden mit einem in 100 mM Sucroslösung getauchten Zahnstocher mit einer Frequenz von etwa 2 Hz an einer Antenne stimuliert, solange bis entweder der Cut-Off (50 Stimuli) erreicht war oder die Bienen auf 5 hintereinander gegebene Stimuli nicht mehr mit dem PER reagierten. Da es sich bei dem PER um eine Alles-oder-Nichts-Reaktion handelt, gelangt man nach 5 Stimuli in den Bereich der Signifikanz (50%, 25%, 12.5%, 6.25%, 3.125% Wahrscheinlichkeit des PER). Solche Bienen wurden als habituiert betrachtet und die Anzahl der benötigten Stimuli bis zu ihrer Habituation notiert. Direkt nach der Habituation muss die Dishabituation getestet werden, um zu untersuchen, ob es sich um eine tatsächliche Habituation oder um eine Ermüdung

handelt. Dazu wurden die Bienen mit der 100 mM Sucroslösung an der anderen Antenne auf den PER getestet und sollten reagieren (Dishabituation). Vom Experiment ausgeschlossen wurden solche Bienen, die von Beginn an nicht auf die 1 M Sucroslösung reagierten sowie Bienen, deren Dishabituation ausblieb.

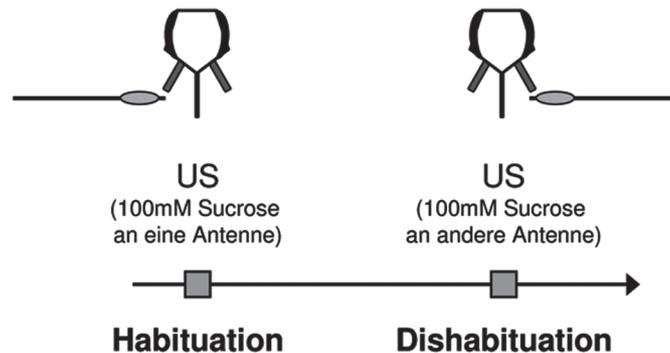


Abbildung 9: **Protokoll zur Habituation.** Bienen wurden auf den PER getestet, wobei sie mit einem in 100 mM Sucroslösung getränkten Zahnstocher an einer Antenne mit einer Frequenz von etwa 2 Hz berührt wurden. Nach Ausbleiben des PER (= Habituation) wurde die Dishabituation getestet, indem die andere Antenne mit der Sucroslösung stimuliert wurde.

Zur Auswertung der Daten wurde Microsoft Office Excel 2003 benutzt. Dargestellt wurde die durchschnittlich benötigte Anzahl der Stimuli bis die Bienen habituiert waren. Zur statistischen Analyse wurde mittels der Datensoftware Microsoft Office Excel 2003 ein Student's t-Test (studentsche t-Verteilung) durchgeführt.

3.3.3 Assoziative olfaktorische Konditionierung

Sofern nicht anders erwähnt, erfolgte das Training mit Bienen, die am Tag zuvor eingespannt und ca. 18 h zuvor das letzte Mal gefüttert wurden. Die Konditionierung der Bienen erfolgte vor einem Abzug, wobei Nelkenduft (konditionierter Stimulus, CS) mit einer 1 M Sucroslösung (unkonditionierter Stimulus, US) gepaart wurde. Der Nelkenduft wurde, wie bei der Sensitisierung (siehe 3.3.2.1) beschrieben, mit einer Spritze verabreicht. Nach etwa der Hälfte des Volumens aus der 20 ml-Spritze wurde die 1 M Sucroslösung mithilfe eines getränkten Zahnstochers zunächst an den Antennen und dann, nach Herausstrecken des Rüssels, auch am Rüssel dargereicht. Die Präsentation dauerte etwa 6 s. Handelte es sich um ein Training mit mehreren Trainingseinheiten (2 bzw. 3 Trial Training), so wurde zwischen den einzelnen Trainingseinheiten ein Abstand von 2 oder 10 min eingehalten (Inter-Trial-Intervall). Durch erneutes Anblasen

mit Nelkenduft, ebenfalls vor dem Abzug, wurde das Gedächtnis zu den Zeitpunkten 2 h, 1 d, 2 d sowie 3 d nach dem Training getestet. Die Tiere wurden wie in Kapitel 3.2 beschrieben gefüttert, frühestens jedoch 30 min nach dem jeweiligen Abruf (2 h, 1 d, 2 d). Die Injektion erfolgte wie in Kapitel 3.2.1 beschrieben. Der Zeitpunkt sowie die Zusammensetzung der verwendeten Injektionslösungen sind der jeweiligen Bildunterschrift im Ergebnisteil zu entnehmen.

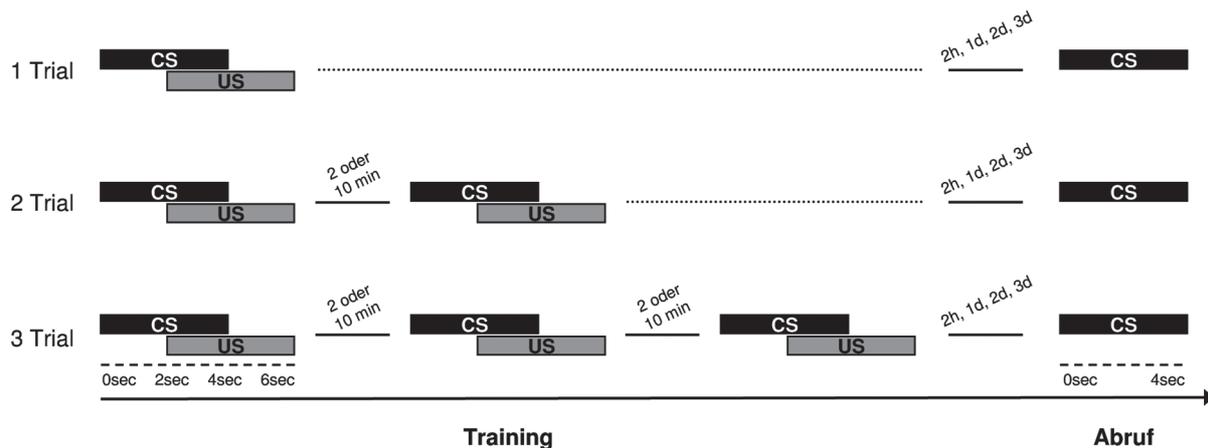


Abbildung 10: **Protokoll zur assoziativen Konditionierung der Honigbiene.** Bienen wurden zunächst nur mit Nelkenduft (CS) stimuliert. Nach 2 sec wurde gleichzeitig Zuckerwasser (US) an die Antennen und den Rüssel gegeben. Die Biene durfte weitere 4 sec ihre Belohnung lecken. Die CS/US Paarung erfolgte je nach Trainingsstärke 1, 2 oder 3x mit einem Inter-Trial-Intervall von 2 oder 10 min. Beim Abruf nach 2 h bzw. 1, 2, 3 d wurde die Biene nur auf den Duftreiz getestet.

Zur Auswertung der Verhaltensdaten wurde während des Lernens dokumentiert, ob Bienen auf den Duft (CS) und die Zuckerwasserbelohnung (US) mit dem PER reagierten. Bienen, die bereits auf den Duft reagierten oder keinerlei Reaktion auf den US zeigten, wurden bei der Auswertung nicht berücksichtigt. Tote und katatonische Bienen wurden ebenfalls aussortiert. Beim Abruf wurde die Reaktion auf den Duft (CS) notiert. Die Auswertung der Daten erfolgte mithilfe Microsoft Office Excel 2003. In einem Säulendiagramm wurde der Prozentsatz der auf den Duft positiv reagierenden Bienen im Vergleich zur Gesamtanzahl der Bienen zum Zeitpunkt des Trainings und der verschiedenen Abrufe dargestellt. Die Diagramme beinhalten alle überlebenden Bienen zum Zeitpunkt des letzten Abrufs. Die statistische Auswertung erfolgte mithilfe des Fisher Exact Tests (bei $n < 100$) bzw. Chi Square Test (bei $n > 100$, jeweils Software Primer).

3.4 Biochemische Nachweismethoden

3.4.1 Präparation des Bienenhirns

Die Biene wurde zunächst auf Eis betäubt, woraufhin ihr der Kopf mithilfe eines Skalpells abgetrennt und dieser in Wachs eingebettet wurde. Die Kopfkapsel wurde mit einem feinen Skalpell geöffnet. Dabei verlief der Schnitt von den Antennen durch die Komplexaugen bis kurz über die oberste Ocelle. Anschließend wurden die über dem Gehirn liegenden Tracheen und Futtersaftdrüsen sowie die Hirnhaut entfernt. Nun konnte das Zentralhirn mittels einer Pinzette entnommen werden (siehe Abbildung 11).

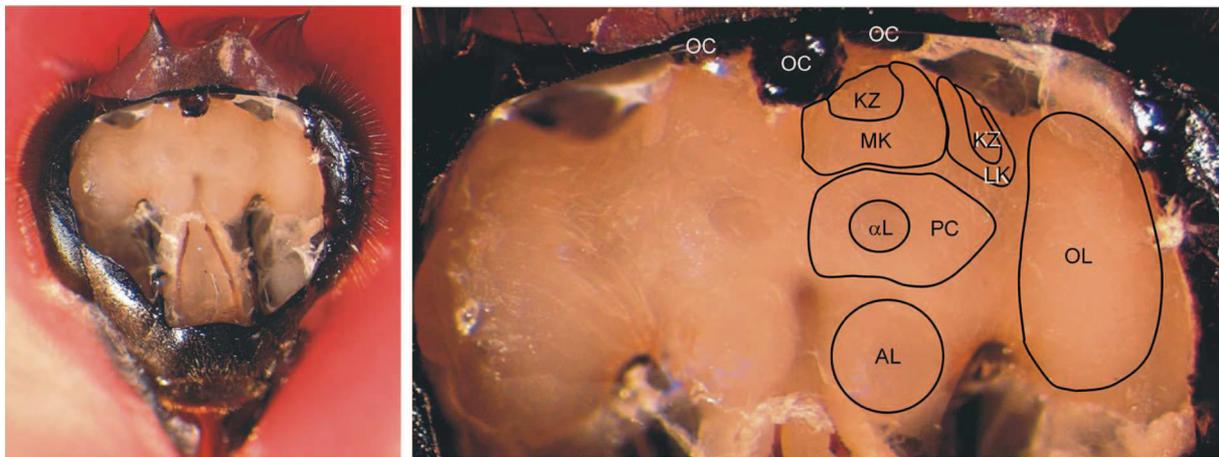


Abbildung 11: Links: Bienenhirn mit geöffneter Kopfkapsel. Rechts: Bei der Präparation des Bienenhirns wurde nur das Zentralhirn, bestehend aus Antennallobus (AL), Alpha-Lobun (α L), Protocerebrum (PC), Kelchen des medianen (MK) sowie lateralen (LK) Pilzkörpers und dessen Kenyon Zellen (KZ), entnommen. Die optischen Loben (OL) und die Ocellen (OC) wurden nicht verwendet.

3.4.2 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

3.4.2.1 Herstellung des Homogenats

Zur Untersuchung von Bienenhirn im Western Blot wurde ein Zentralhirn in 500 μ l Homogenisierungspuffer [1x PBS; 1 mM EDTA] mit einem S-Pistill auf Eis in einem Glashomogenisator homogenisiert. Die Probe wurde in ein Eppendorf Reaktionsgefäß überführt. Anschließend wurden 100 μ l 5x SDS Probenpuffer (0.2 M Tris; 10 mM 2-Mercaptoethanol; 10% (w/v) SDS; 20% (v/v) Glycerin; 0.05% (w/v) Bromphenolblau;

pH 6.8 (HCl)) hinzugegeben. Die Proben wurden 5 min bei 95°C gekocht und auf das Polyacrylamidgel aufgetragen.

3.4.2.2 Herstellung des Polyacrylamidgels

Es erfolgte eine diskontinuierliche SDS-PAGE nach Laemmli. Hierbei handelt es sich um ein 4%iges Sammelgel (oben) und ein höherprozentiges Trenngel (unten). Zur Untersuchung von Histonen wurde ein 15%iges, zur Untersuchung von größeren Proteinen wie dem α -Tubulin wurde ein 10%iges Trenngel (Lösungen siehe 2.4.5) verwendet. Das Gel wurde bei 20 mA pro Gel für ca. 40-60 min laufen gelassen, so dass die Lauffront noch im Gel verblieb.

3.4.2.3 Molekulargewichtsstandard für Western Blot-Analysen

Für SDS-Polyacrylamidgele, die nachfolgend auf eine Nitrocellulose Membran (Schleicher/Schuell) transferiert werden, wurde ein vorgefärbter Molekulargewichtsstandard der Firma New England Biolabs („Color Plus Prestained Protein Ladder“) verwendet.

3.4.2.4 Western Blot

Unter einem Western Blot versteht man den Transfer elektrophoretisch aufgetrennter Proteine auf eine Membran. Dies geschieht mithilfe eines elektrischen Feldes. Die Proteine werden durch hydrophobe Wechselwirkungen an der Membran immobilisiert. Das Gel wurde im Semi-Dry-Verfahren auf eine Nitrozellulosemembran (Schleicher/Schuell) bei 20 V und 400 mA pro Gel für 40 min geblottet, so dass Proteine anschließend immunologisch detektiert werden konnten.

3.4.2.5 Immunfärbung von Proteinen im Western Blot

Nach dem Blotten ist es nötig die aufgetrennten Proteinbanden sichtbar zu machen. Zur Detektion wurde die Membran für 1 h bei RT in Blocklösung (1x PBS; 0.5% (w/v) BSA; 0.1% (v/v) Tween20, siehe 2.4.6) inkubiert, um unspezifische Bindungsstellen abzusättigen. Die primären Antikörper, gelöst in Blocklösung (1x PBS; 0.5% (w/v) BSA; 0.1% (v/v) Tween20), wurden alternativ über Nacht bei 4°C oder für 1 h bei RT inkubiert. Anschließend wurde die Membran 3x für je 5 min bei RT mit 1x PBS gewaschen und mit dem Meerrettich-Peroxidase gekoppelten, sekundären Antikörper, ebenfalls

gelöst in Blocklösung (1x PBS; 0.5% (w/v) BSA; 0.1% (v/v) Tween20), für 1 h bei RT inkubiert. Es folgte ein weiterer Waschschrift mit 1x PBS (3x 5 min). Anschließend wurde die Membran nach Anleitung in ECL-Entwicklerlösung (PerkinElmer) geschwenkt und der Blot mit einem Röntgenfilm (GE Healthcare) in der Dunkelkammer entwickelt. Die Konzentrationen der verwendeten Antikörper sind Kapitel 2.3 zu entnehmen.

3.4.3 ELISA (Enzyme-linked Immunosorbent Assay)

Ein Zentralhirn wurde in 500 μ l Homogenisierungspuffer (1x PBS; 1 mM EDTA, siehe 2.4.3) mit einem S-Pistill in einem Glashomogenisator auf Eis homogenisiert (siehe 3.4.1). Anschließend wurden die Proben zusätzlich mit Ultraschall behandelt (10x für ca. 1 s bei einer Amplitude von 40%, 52 Watt). Danach wurden die Proben zur Tubulin-Untersuchung nochmals 1:5 mit Homogenisierungspuffer vorverdünnt. Je 50 μ l aller Proben wurden direkt auf die Mikrotiterplatte (Maxisorp, Nunc) aufgetragen und eine 6 stufige Verdünnungsreihe gefertigt. Die Proben wurden für mindestens 30 min bei RT auf einem Schüttler inkubiert (=coating). Anschließend wurde 1 h bei RT mit 400 μ l Blocklösung (1x PBS; 0.5% (w/v) BSA) je Kavität geblockt. Die Primärantikörper (50 μ l je Kavität), gelöst in Blocklösung (1x PBS; 0.5% (w/v) BSA), wurden alternativ über Nacht bei 4°C oder für 1 h bei RT auf einem Schüttler inkubiert. Es folgte ein Waschen mit 1x PBS (3x 3 min) und nachfolgend eine Inkubation mit alkalische Phosphatase gekoppelten, sekundären Antikörpern (50 μ l je Kavität), ebenfalls gelöst in Blocklösung (1x PBS; 0.5% (w/v) BSA), für 1 h bei RT. Nach erneutem Waschen mit PBS (3x 3 min) wurden je 200 μ l Färbelösung (1x RxN-Puffer; 1 mM p-NPP, siehe 2.4.4) in die Kavitäten pipettiert und die ELISA-Platte bei 37°C im Brutschrank (in der Regel über Nacht) entwickelt. Die Konzentrationen der verwendeten Antikörper sind dem Kapitel 2.3 zu entnehmen. Die Gelbfärbung der Proben konnte im Plate-Reader safire² (Tecan) bei einer Absorptionswellenlänge von 405nm und einer Referenzwellenlänge von 620nm gemessen werden.

Die Auswertung erfolgte mithilfe der Datensoftware Microsoft Office Excel 2003. Anhand der durchgeführten Homogenat-Verdünnungsreihe und den gemessenen Absorptionen wurden die Steigungen der einzelnen Kurven ermittelt. Es wurden nur Werte im linearen Messbereich verwendet. Um Steigungen von verschiedenen Platten miteinander vergleichbar zu machen oder zusammenzufassen, mussten diese zuvor auf die Platte normiert werden. Anschließend wurden die Proben jeweils auf die Kontrolle

normiert. Zur statistischen Analyse wurde mittels der Datensoftware Microsoft Office Excel 2003 ein Student's t-Test (studentsche t-Verteilung) durchgeführt.

3.4.4 Mikrotubuli-Anreicherung

Zur Anreicherung polymerisierter Mikrotubuli erfolgte eine Fraktionierung mittels präparativer Ultrazentrifugation. Hierzu wurde je ein Bienenhirn in 300 μ l Probenpuffer (1x PBS, 1 mM EGTA, siehe 2.4.7) bei RT präpariert und homogenisiert (siehe 3.4.1). Die Proben wurden anschließend bei 5000 x g abzentrifugiert (10 min bei 30°C), um Zelltrümmer zu beseitigen. Der daraus erhaltene Überstand wurde nachfolgend ultrazentrifugiert (90 min bei 30°C mit 436 000 x g, Beckman Rotor TLA-100). Im gewonnenen Überstand nach der Ultrazentrifugation befindet sich lösliches Tubulin, wohingegen im Pellet cytoskeletale, also polymerisierte Mikrotubuli zu finden sind. Die Überprüfung der Anreicherung erfolgte mit der ELISA (Enzyme-linked Immunosorbent Assay, siehe 3.4.3), wobei das coating mit Probenpuffer der MT-Anreicherung (1x PBS, 1 mM EGTA, siehe 2.4.7) erfolgte.

3.5 Histologie

Zur Anfertigung histologischer Präparate wurde die Biene auf Eis betäubt, der Kopf mit einem Skalpell abgetrennt und in Wachs immobilisiert. Die Kopfkapsel wurde mit einem feinen Skalpell geöffnet und die Drüsen entfernt. Nachfolgend wurde ein Tropfen Carnoy Lösung (siehe 2.4.8) aufgebracht und das Gehirn herauspräpariert. Es folgte eine Fixierung in Carnoy für 4 h bei RT. Danach wurden die Hirne in absolutem Ethanol (2x 30 min) gewaschen, für 1 h in Isopropylalkohol bei RT sowie 1 h in Isopropylalkohol bei 45°C im Wärmeschrank inkubiert. Nachfolgend wurden sie in ein Isopropylalkohol-Paraffingemisch (1:1) überführt und erneut 1 h bei 70°C im Wärmeschrank inkubiert. Anschließend wurden die Hirne über Nacht in flüssigem Paraffin bei 60°C im Wärmeschrank aufbewahrt. Am nächsten Tag wurde das Paraffin ausgewechselt. Nachdem das Paraffin fest geworden war (etwa 2 h später), konnten die Hirne ausgeblockt werden. Für die Paraffinschnitte am Mikrotom wurde der überschüssige Wachs grob entfernt. Aus den angepassten kleinen Paraffinblöcken wurden nun 7 μ m dünne Serienschnitte angefertigt. Diese wurden mit Aqua dest. auf einen mit Poly-L-Lysin beschichteten Glasobjektträger aufgebracht und anschließend bei 40°C auf ei-

ner Heizplatte gestreckt und getrocknet. Danach verblieben die Schnitte über Nacht bei 45°C im Wärmeschrank. Zur Färbung der Schnitte mit Antikörpern mussten die Schnitte auf dem Objektträger vom Paraffin befreit werden. Hierzu wurden die Objektträger in Xylol (2x 5 min), anschließend in einer absteigenden Ethanolreihe (96, 90, 80, 70 und 50%) sowie in Aqua dest. für je 2 min behandelt. Nachfolgend erfolgten alle Schritte in einer dunklen Schale. Die Schnitte wurden für 30 min in Blockpuffer PBS-T (1x PBS, 0.5% (w/v) BSA, 0.1% (v/v) Triton, siehe 2.4.8) geblockt und nachfolgend mit dem Primärantikörper (siehe 2.3.1) inkubiert. Nach der Inkubation über Nacht wurde der Primärantikörper abgespült und die Schnitte 3x für je 5 min bei RT mit PBS-T gewaschen. Es folgte die Inkubation mit dem Fluorophor-markierten Sekundärantikörper (siehe 2.3.2) für 1.5 h bei RT, woraufhin sich ein erneuter Waschschrift (3x je für 5 min bei RT mit PBS-T) anschloss. Anschließend wurde ein Tropfen eines Glycerin-Aqua dest. Gemisches (1:1) auf die Schnitte aufgebracht und diese mit einem Deckgläschen abgedeckt. Zur Aufbewahrung konnten die Schnitte im Kühlschrank bei 4°C gelagert werden.

Nach erfolgreicher Färbung wurden die Schnitte mithilfe eines inversen Fluoreszenzmikroskops (Axiovert 200 M, Zeiss) und einer Kamera (Cool Snap HQ²⁺, Photometrics) fotografiert und die Bilder anschließend mit dem Programm ImageJ ausgewertet.

Hierzu wurde die zu untersuchende Region (Alphalobus des Pilzkörpers sowie der Zentralkörper) ausgewählt und die durchschnittliche Intensität dieser Fläche abgelesen. Es wurden die Intensitäten von jeweils drei aufeinanderfolgenden Schnitten gemittelt und die Werte jeweils auf die Kontrolle normiert. Zur statistischen Analyse wurde mittels der Datensoftware Microsoft Office Excel 2003 ein ungepaarter Student's t-Test (studentsche t-Verteilung) durchgeführt.

3.6 Acetylcholin Esterase Assay

Zur Bestimmung der Acetylcholin Esterase (AChE) Aktivität im Bienenhirn wurde ein colorimetrischer Aktivitätsassay etabliert. Die Messung basiert auf der entwickelten Methode von Ellman *et al.* [45] und wurde zur Durchführung mit Bienenhirn in einer 96-well Mikrotiterplatte angepasst. Die Aktivitätsbestimmung beruht auf der Umsetzung des Esterase-Substrates Acetylthiocholin zu Thiocholin und Acetat. In Anwesenheit von Dithiobisnitrobenzoat (DTNB) ruft das entstandene Thiocholin eine Gelbfärbung hervor, deren Absorption bei einer Wellenlänge von 412nm gemessen wird.

3.6.1 Etablierung eines Acetylcholin Esterase Assays für Honigbiene

Hierzu wurde ein Zentralhirn präpariert und in 3 ml Phosphatpuffer pH8.0 (siehe 2.4.9) mit einem S-Pistill in einem Glashomogenisator auf Eis homogenisiert (siehe 3.4.1). 300 μ l dieses Homogenates wurden mit 50 μ l DTNB-Reagenz (Sigma-Aldrich, Zusammensetzung siehe 2.4.9) für 5 min auf einer Mikrotiterplatte (Maxisorp, Nunc) bei RT inkubiert. Anschließend wurden 4 μ l Substratlösung (Acetylthiocholin, Sigma-Aldrich, siehe 2.4.9) hinzupipettiert und die Absorptionsänderung (Gelbfärbung) bei 412nm im 1 min-Intervall im Plate-Reader safire² (Tecan) für insgesamt 30 min verfolgt.

Die Auswertung erfolgte mithilfe der Datensoftware Microsoft Office Excel 2003. Anhand der einzelnen Messwerte wurde die Steigung der einzelnen Kurven, also die Absorptionzunahme pro Minute ermittelt. Die Steigung entspricht der Aktivität der AChE.

3.6.2 Bestimmung der einzusetzenden Homogenatmenge

Zur Etablierung des Assays mit dem Hirn der Honigbiene wurde zunächst eine Verdünnungsreihe mit Homogenat erstellt, um die optimale Enzymmenge für die Aktivitätsmessung zu ermitteln. Hierzu wurde das laut 3.6.1 hergestellte Homogenat eines Bienenhirns zusätzlich 1:1, 1:3 sowie 1:5 verdünnt und die AChE Aktivität photometrisch verfolgt. Als Negativkontrolle wurde ein Ansatz ohne Homogenat mitgeführt. Abbildung 13 zeigt die Absorptionzunahme in den einzelnen Verdünnungen. Hieraus wurden nachfolgend die Steigung bestimmt; dies entspricht der Aktivität der AChE (siehe Abbildung 12).

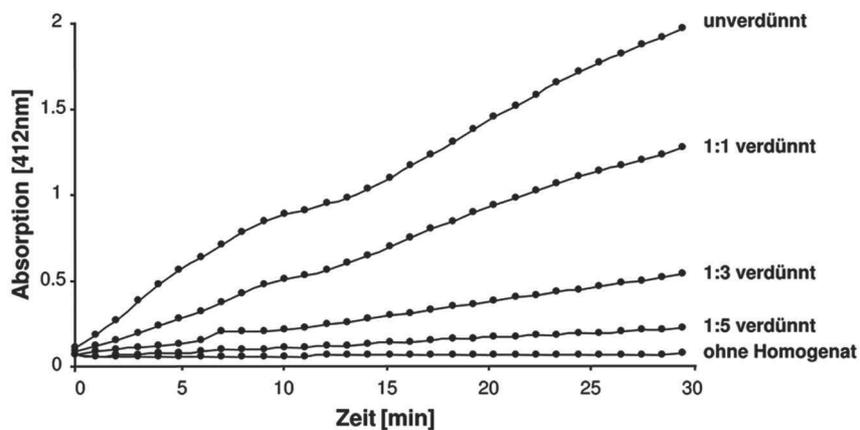


Abbildung 12: **Verlauf der Absorptionskurve unterschiedlicher Homogenatverdünnungen im AChE Assay.** Dargestellt sind die gemessenen Absorptionswerte in Abhängigkeit von der Zeit. Homogenat eines Bienenhirns wurde mit DTNB-Reagenz inkubiert und nach Zugabe des Substrates der AChE wurde die Absorptionsänderung für 30 min photometrisch bei einer Wellenlänge von 412nm verfolgt. Gemessen wurden eine unverdünnte Homogenatprobe, eine 1:1, 1:3 sowie 1:5 verdünnte Probe; eine Probe ohne Homogenat diente als Negativkontrolle.

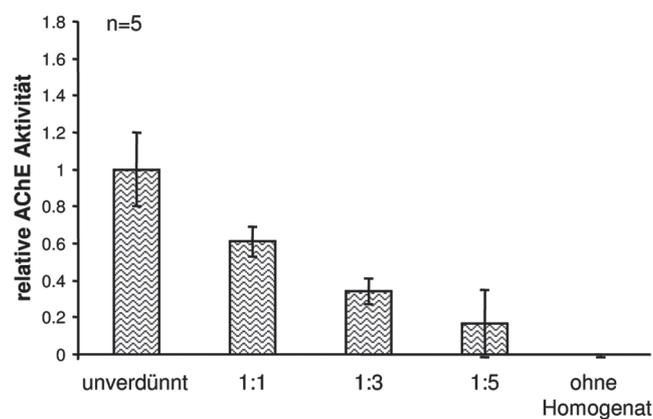


Abbildung 13: **Effekt unterschiedlicher Homogenatmengen auf die AChE Aktivität.** Gezeigt ist die relative AChE Aktivität der gemessenen Absorptionskurve unterschiedlicher Homogenatverdünnungen (unverdünnte Proben, 1:1, 1:3 sowie 1:5 verdünnte Proben sowie Proben ohne Homogenat als Negativkontrolle). Die Daten sind auf die unverdünnte Probe normiert und als Mittelwert +/- Standardabweichung dargestellt. Gemessen wurde die Absorptionszunahme pro Minute bei einer Wellenlänge von 412nm nach Inkubation mit DTNB-Reagenz bzw. nach Zugabe des Substrates der AChE. Dies entspricht der Steigung der Kurve und der Aktivität der AChE. n=Anzahl der getesteten Proben.

Als optimale Homogenatmenge, die sich zur Messung im AChE Assay eignet, wurde die 1:1 Verdünnung ermittelt. Hier zeigte die Absorptionskurve den linearsten Anstieg. Die Werte liegen in einem gut messbaren Bereich und die Aktivität lässt sich hoch und herunter regulieren. Die nachfolgenden Experimente wurden demnach alle mit einer 1:1 Verdünnung des präparierten Homogenats durchgeführt.

3.6.3 Modulation der AChE Aktivität *in vitro* und *in vivo*

Anschließend wurde getestet, ob sich die Aktivität der Acetylcholin Esterase im Homogenat des Bienenhirns modulieren lässt. Hierzu wurde das Homogenat aufgeteilt. Ein Ansatz wurde 5 min bei 95°C gekocht oder dem Homogenat wurde Eserin, ein spezifischer Acetylcholin Esterase Inhibitor, für 5 min zugegeben und die Aktivität des Enzyms bestimmt.

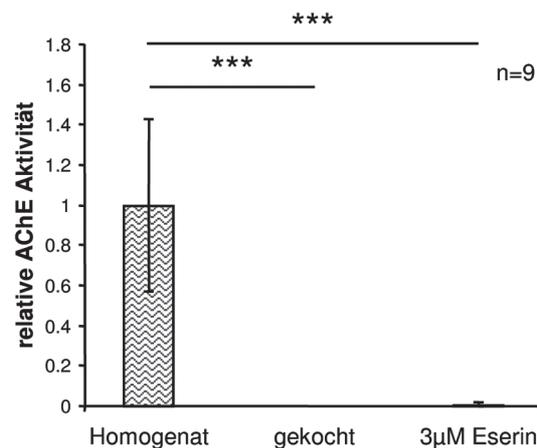


Abbildung 14: **Auswirkung unterschiedlicher Homogenatbehandlungen auf die AChE Aktivität.** Gezeigt ist die relative AChE Aktivität der gemessenen Absorptionskurve unterschiedlich behandelte Homogenatproben. Die Daten sind auf die unbehandelte Homogenatprobe normiert und als Mittelwert \pm Standardabweichung dargestellt. Das Homogenat des Bienenhirns wurde aufgeteilt und unbehandelt gelassen; ein Ansatz wurde für 5 min bei 95°C gekocht oder für 5 min mit Eserin (3 μ M) inkubiert. Anschließend wurden die Proben mit DTNB-Reagenz inkubiert. Nach Zugabe des Substrates der AChE wurde die Absorptionzunahme pro Minute bei einer Wellenlänge von 412nm gemessen. Dies entspricht der Steigung der Kurve und der Aktivität der AChE. n=Anzahl der getesteten Proben. ***: $p < 0.001$ (gepaarter Student's t-Test)

Aus Abbildung 14 geht hervor, dass sich im Homogenat des Bienenhirns die Aktivität der AChE sowohl durch Erhitzen, also Denaturierung der Proteine als auch durch Inkubation mit dem Inhibitor Eserin hemmen lässt.

Es wurde nachfolgend geprüft, ob die Aktivität der Acetylcholin Esterase mithilfe von Eserin sowohl *in vitro* als auch *in vivo* gehemmt werden kann. Hierzu wurde das Homogenat aufgeteilt und einzelne Ansätze 5 min mit unterschiedlichen Konzentrationen an Eserin inkubiert (*in vitro*). Für *in vivo* Untersuchungen wurden Bienen 0.5 h vor der Präparation mit Eserin in den Thorax injiziert.

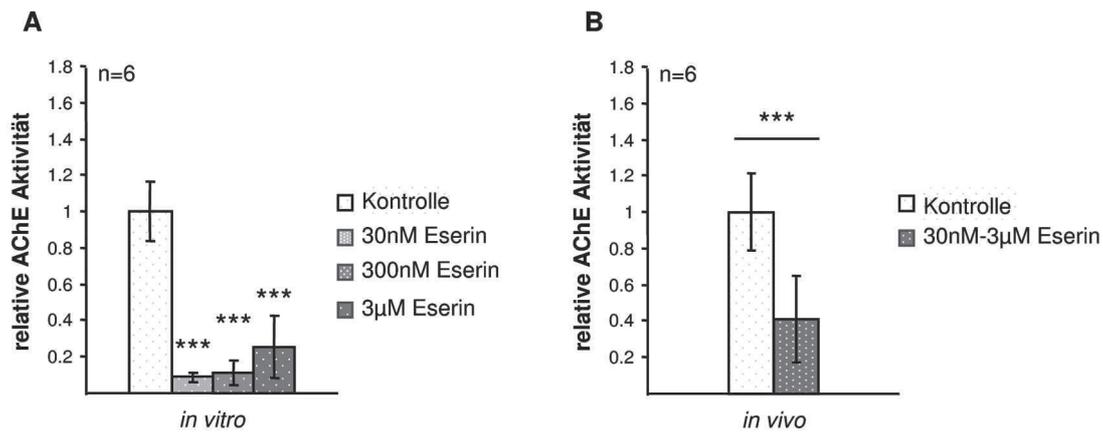


Abbildung 15: **Auswirkung der *in vitro* sowie *in vivo* Behandlung mit Eserin auf die AChE Aktivität.** A: Dargestellt ist die relative AChE Aktivität der gemessenen Absorptionskurve mit Eserin behandelte Homogenatproben. Die Daten sind auf die Kontrollprobe normiert und als Mittelwert \pm Standardabweichung gezeigt. Das Homogenat des Bienenhirns wurde aufgeteilt und die Ansätze für 5 min mit unterschiedlichen Eserin-Konzentrationen (0 M, 30 nM, 300 nM, 3 μ M) inkubiert =*in vitro*. B: Dargestellt ist die relative AChE Aktivität der gemessenen Absorptionskurve mit Eserin behandelte Bienen =*in vivo*. Die Bienen wurden 0.5 h vor dem Präparation der Gehirne mit 1 μ l der entsprechenden Lösung injiziert. Kontrolle: 100% DMSO; Eserin: injiziert mit 3-300 μ M Eserin in 100% DMSO, Endkonzentration in der Biene 30 nM-3 μ M. Die Daten sind auf die Kontrolle normiert und als Mittelwert \pm Standardabweichung dargestellt. Die einzelnen Homogenatproben wurden mit DTNB-Reagenz inkubiert. Nach Zugabe des AChE Substrates wurde die Absorptionzunahme pro Minute bei einer Wellenlänge von 412nm verfolgt. Dies entspricht der Steigung der Kurve und der Aktivität der AChE. n=Anzahl der getesteten Proben bzw. Bienen. ***: $p < 0.001$ (gepaarter Student's t-Test für A, ungepaart für B)

Es zeigte sich, dass Eserin nach *in vitro* Inkubation die Aktivität der Acetylcholin Esterase im Bienenhirnhomogenat stark hemmt. Diese Inhibition war auch deutlich zu erkennen, wenn Eserin direkt in lebende Bienen injiziert wurde und die Aktivität nach der Präparation des Bienenhirns im Homogenat bestimmt wurde (vgl. Abbildung 15). Hierbei wurden die Daten der beiden verwendeten Eserin-Konzentrationen (30 nM sowie 3 μ M) zusammengefasst, da sie das gleiche Ergebnis lieferten. Die Modulation der AChE Aktivität ist folglich *in vitro* und *in vivo* möglich.

Des Weiteren wurde versucht, den Assay auch *in vivo* ablaufen zu lassen. Hierzu

wurde Bienen das DTNB-Reagenz sowie das Substrat der AChE entweder in den Thorax oder direkt ins Gehirn injiziert. Die Gehirne wurden 30 min nach der Injektion für die Messung präpariert. Eine Reaktion ließ sich jedoch in beiden Fällen nicht messen (nicht gezeigt).

3.7 Herstellung polyklonaler Antikörper

Zur Untersuchung der allgemeinen Proteinacetylierung wurde versucht, eigene polyklonale Antikörper in Mäusen herzustellen. Hierzu wurden Mäuse mit chemisch acetylierten Antigenen immunisiert und die so erhaltenen Antikörper im Serum gewonnen.

3.7.1 Chemische Acetylierung von Antigenen

Zur Immunisierung bzw. zur Überprüfung des gewonnenen Serums wurden Antigene benötigt, die viele Lysinreste aufweisen und daher gut acetyliert werden konnten. Als Antigene dienten BSA (Rinderserumalbumin), EGG (Eggalbumin), ein Mix aller Histone sowie Histon H3 allein. Die einzelnen Proteine wurden als 1 mg/ml Lösung in 1x PBS angesetzt. Zur chemischen Acetylierung eines 4 ml Ansatzes wurden schrittweise 1/10 Volumen Acetanhydrid zugegeben. Der pH-Wert der Lösung wurde ständig kontrolliert und mit 5 M NaOH auf pH6.0 gehalten. Als Negativkontrolle diente ein Ansatz, in dem die Proteine nicht durch Acetanhydrid acetyliert wurden. Nach einer Inkubation von 1 h bei RT wurden beide Ansätze über Nacht in getrennten Bechern gegen 1x PBS bei 4°C dialysiert.

3.7.2 Dialyse

Zur Dialyse wurde zunächst der Dialyseschlauch (Roth) vorbereitet. Hierzu wurde er zunächst einige Minuten in etwa 800 ml bidestilliertem Wasser gekocht, anschließend kurz in Wasser geschwenkt und nachfolgend in bidestilliertem Wasser mit einem gestrichenen Löffel EDTA (Ethyldiamintetraacetat) erneut gekocht. Nach einem weiteren Waschschrift in Wasser konnte der Dialyseschlauch zur Lagerung in bidestilliertem Wasser mit einer Spatelspitze Natriumazid bei 4°C aufbewahrt werden.

Zur Dialyse wurden die Proben über Nacht bei 4°C in den Dialyseschlach gegeben, der an beiden Enden wasserdicht verknotet und anschließend in einen mit 1x PBS gefüllten sowie auf einem Magnetrührer stehenden Behälter gehängt wurde.

3.7.3 Antigen-Injektion in Maus

Zur Immunisierung wurden balb/c Mäuse im Alter von etwa 8 Wochen mit Antigen gespritzt. Als Antigen diente das unter 3.7.1 hergestellte und dialysierte aceBSA bzw. aceEGG. 50 μ l aceBSA (1 mg/ml) wurden mit 50 μ l Adjuvanz (Stimune, Firma Pionics) gemischt und die Lösung subcutan im Rückenbereich in die Maus injiziert. Drei Wochen später wurde erneut immunisiert; hierzu wurden 50 μ l aceEGG (1 mg/ml) mit 50 μ l Adjuvanz gemischt und wie zuvor subcutan gespritzt. Zwei Wochen nach der 2. Injektion wurde der Antikörpertiter im Mausblut mittels Western Blot auf einem Mix aus aceBSA sowie aceEGG (0.2 μ g je Antigen) geprüft (nicht gezeigt). Wenn im Blut Antikörper nachgewiesen werden konnten, wurde erneut 2 Wochen später eine finale Immunisierung mit aceBSA ohne Adjuvanz in den Schwanz der Maus durchgeführt.

3.7.4 Serumgewinnung aus Mausblut

Zur Gewinnung des Mausserums wurde die Maus drei Tage nach der finalen Immunisierung mit CO₂-Gas eingeschläfert. Durch Herzpunktion mit einer heparinisierten Spritze wurde der Maus das Blut entnommen. Dieses wurde 15 min bei 2400 x g abzentrifugiert. Die im Überstand befindliche Antikörperlösung wurde abpipettiert und portioniert bei -20°C gelagert.

4 Ergebnisse

Anhand der vorliegenden Arbeit soll die Bedeutung der Mikrotubuli-Integrität für das olfaktorische Lernen und Gedächtnis der Honigbiene *Apis mellifera* aufgeklärt werden. Hierzu werden Inhibitoren injiziert, welche die Integrität der Mikrotubuli positiv und negativ verändern. Die Auswirkungen werden anhand assoziativer Konditionierung untersucht.

4.1 Colchizin verschlechtert Lernen und die Gedächtnisbildung

Colchizin, ein toxisches Alkaloid der Herbstzeitlosen (*Colchicum autumnale*), bindet an Tubulin, also an freie Mikrotubuli-Untereinheiten und verhindert so die Polymerisation und den Aufbau des Cytoskeletts. Bei entsprechend hoher Konzentration verursacht es die Depolymerisation und somit den Zusammenbruch der Mikrotubuli [91].

Im Folgenden wurde untersucht, welche Auswirkungen eine Störung der Mikrotubuli-Integrität durch Colchizin-Behandlung auf das appetitive Lernen und die Gedächtnisbildung in der Biene besitzt.

4.1.1 Austesten verschiedener Colchizin-Konzentrationen

Zu Beginn wurden zwei unterschiedliche Colchizin-Konzentrationen in Bienen injiziert und ihr appetitives Lernverhalten sowie das Mittelzeitgedächtnis (2 h nach Training) untersucht. Es wurde eine hohe (50 μM) sowie eine geringe (10 μM) Konzentration gewählt. Anhaltspunkt für die Wahl dieser Konzentrationen gab eine Studie, bei der Ratten mit Colchizin behandelt wurden und Lern- und Gedächtniseffekte zeigten [141]. Weiterhin wurden für Zellkultur Untersuchungen Konzentrationen von 1-10 μM verwendet, die eine Depolymerisation der Mikrotubuli im Minutenbereich bewirkten [126].

Zur Untersuchung der appetitiven Konditionierung nach Colchizin-Gabe wurde zunächst ein Zeitfenster von 1.5 h vor Trainingsbeginn ausgewählt. Die Ergebnisse der Konditionierung sind Abbildung 16 zu entnehmen.

So zeigte sich, dass, unabhängig von der eingesetzten Konzentration, die Colchizin-Behandlung eine Beeinträchtigung des Lernverhaltens bewirkte. Bienen, denen Col-

chizin injizierte wurde, lernten im Vergleich zu Kontrolltieren schlechter. Auf das Mittelzeitgedächtnis (2 h) der Bienen wirkten sich beide Colchizin-Konzentrationen nicht aus (Abbildung 16).

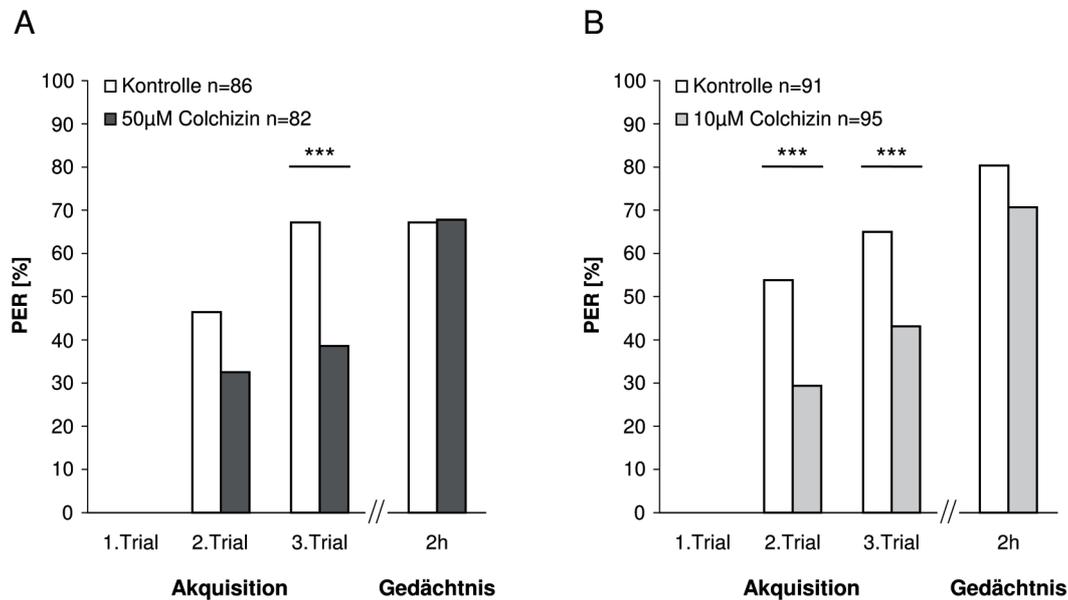


Abbildung 16: **Auswirkung unterschiedlicher Colchizin-Konzentrationen auf assoziatives Lernen und Mittelzeitgedächtnis.** Bienen wurden vor dem Experiment über Nacht gehungert. Es erfolgte ein 3 Trial Training (3 CS/US Paarungen). Beim Gedächtnisabruf wurde nur der CS präsentiert (2 h). Die Tiere wurden 1.5 h vor dem Training mit 1 µl der entsprechenden Lösung injiziert. Kontrolle: 1x PBS; Colchizin: injiziert mit 5 mM bzw. 1 mM Colchizin in 1x PBS, Endkonzentration in der Biene 50 µM (A) bzw. 10 µM (B). Dargestellt ist die Anzahl der Bienen in %, die auf den Nelkenduft (CS) mit einem PER reagierten. n=Anzahl der getesteten Bienen. ***: p<0.001 (Chi Square Test)

Um auszuschließen, dass Colchizin die Prozessierung der verwendeten Reize CS (Duft) und US (Zuckerwasserbelohnung) verändert, wurde die Zuckerwasserempfindlichkeit (Responsiveness) bzw. die Auswirkung der Colchizin-Behandlung auf nicht-assoziatives Lernen (Habituation und Sensibilisierung) getestet.

4.1.2 Auswirkungen von Colchizin auf die Responsiveness und das nicht-assoziative Lernen

Zur Überprüfung der CS- bzw. US-Verarbeitung nach Colchizin-Behandlung wurden Bienen 1.5 h vor dem Test injiziert und zunächst die Zuckerwasserempfindlichkeit (Responsiveness) getestet (Abbildung 17).

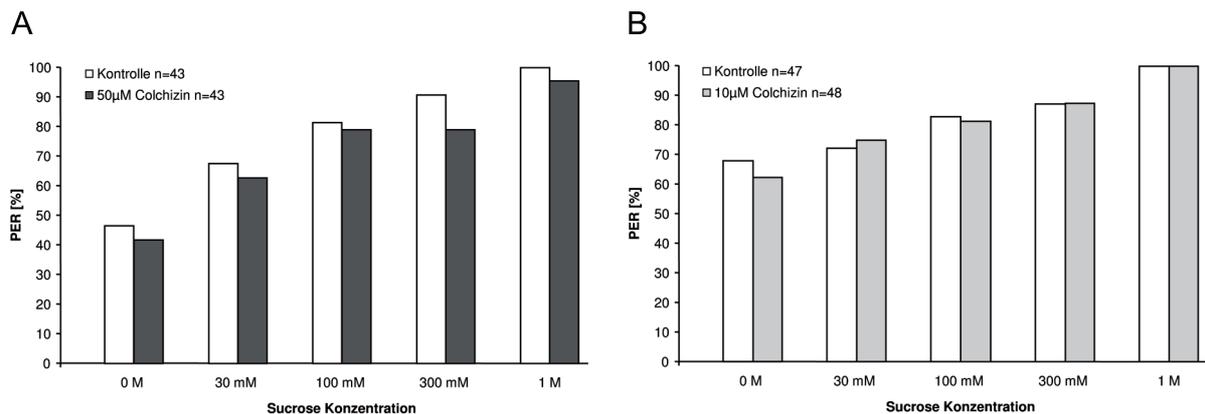


Abbildung 17: **Unterschiedliche Colchizin-Konzentrationen wirken sich nicht auf die Zuckerwasserempfindlichkeit aus.** Bienen wurden 1.5 h vor dem Test mit $1 \mu\text{l}$ der entsprechenden Lösung injiziert. Kontrolle: 1x PBS; Colchizin: injiziert mit 5 mM bzw. 1 mM Colchizin in 1x PBS, Endkonzentration in der Biene $50 \mu\text{M}$ (A) bzw. $10 \mu\text{M}$ (B). Gezeigt ist die Anzahl der Tiere in %, die auf den gegebenen Stimulus (Sucrosekonzentration in Lösung) an der Antenne mit einem PER reagierten. n=Anzahl der getesteten Bienen.

Da die Responsiveness der beiden Versuche ($50 \mu\text{M}$ bzw. $10 \mu\text{M}$ Colchizin) zu verschiedenen Jahreszeiten getestet wurde, war die Empfindlichkeit gegenüber 0 M Sucrose unterschiedlich stark. Aus Abbildung 17 geht dennoch hervor, dass weder $50 \mu\text{M}$ noch $10 \mu\text{M}$ Colchizin in der Biene deren Sensitivität gegenüber der Zuckerwasserbelohnung veränderten. Dies bedeutet, dass die US-Wahrnehmung nach Colchizin-Behandlung nicht verändert ist.

Anschließend wurde das nicht-assoziative Lernen nach Colchizin-Behandlung anhand der Habituation und Sensitisierung getestet.

Dabei zeigte sich, dass die Habituation, also die Gewöhnung an den Zuckerreiz, nach Colchizin-Behandlung der Bienen unverändert blieb (siehe Abbildung 18). Damit ist die Reizverarbeitung des US nicht betroffen.

Außerdem konnte im Rahmen von Sensitisierungsexperimenten auf die Verarbeitung des Duftreizes nach Colchizin-Gabe zurückgeschlossen werden. Es zeigte sich auch für die Sensitisierung kein Unterschied zwischen Colchizin-behandelten und Kontrolltieren, gleichgültig welche Dosis verwendet wurde (siehe Abbildung 19). Nach Applikation von Colchizin hatten die Bienen keine veränderte Bereitschaft für eine Reaktion auf den Duftreiz.

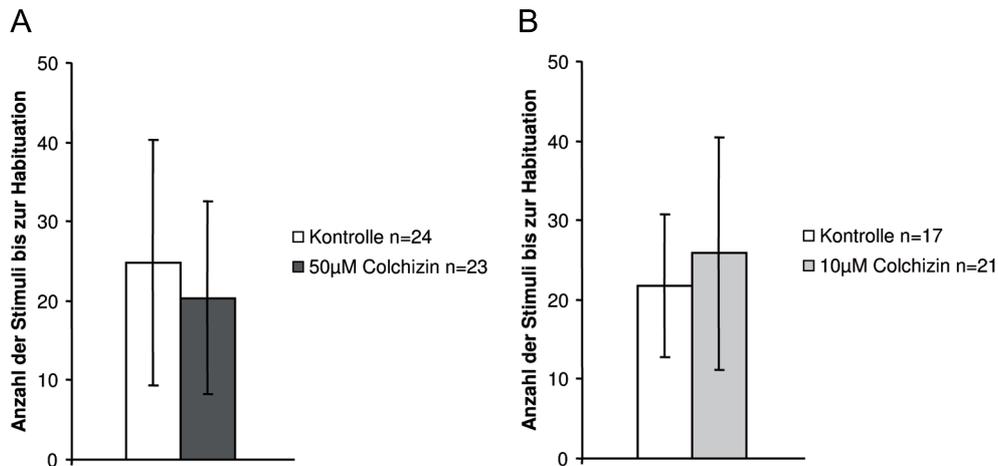


Abbildung 18: **Unterschiedliche Colchizin-Konzentrationen wirken sich nicht auf die Habituation aus.** Bienen wurden 1.5 h vor dem Test mit 1 μ l der entsprechenden Lösung injiziert und kurz vor der Test mit 2 Tropfen 1 M Sucrose angefüttert. Kontrolle: 1x PBS; Colchizin: injiziert mit 5 mM bzw. 1 mM Colchizin in 1x PBS, Endkonzentration in der Biene 50 μ M (A) bzw. 10 μ M (B). Dargestellt ist der Mittelwert der Anzahl gegebener Stimuli mit 100 mM Sucrose an einer der beiden Antennen bis zum Ausbleiben des PER (Habituation). Der Fehlerbalken entspricht der Standardabweichung. n=Anzahl der getesteten Bienen.

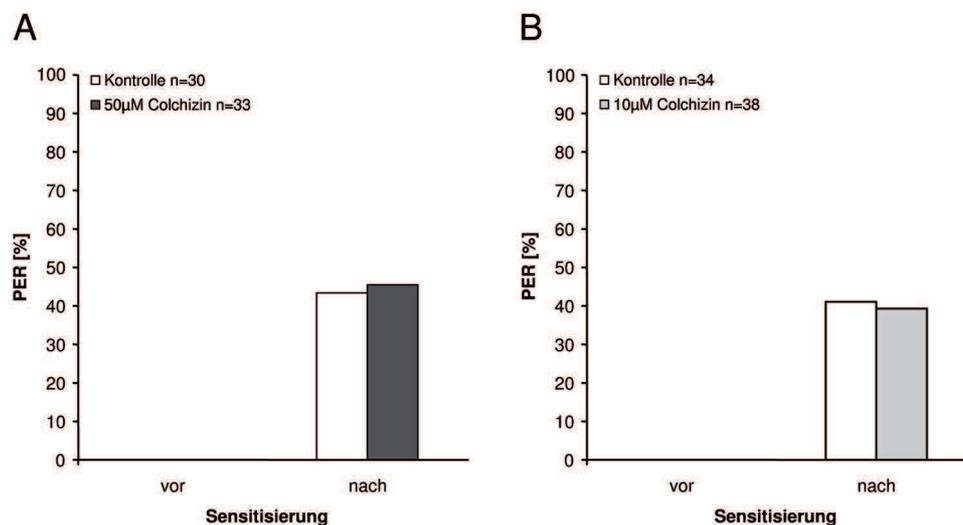


Abbildung 19: **Unterschiedliche Colchizin-Konzentrationen wirken sich nicht auf die Sensitivierung aus.** Bienen wurden 1.5 h vor dem Test mit 1 μ l der entsprechenden Lösung injiziert. Kontrolle: 1x PBS; Colchizin: injiziert mit 5 mM bzw. 1 mM Colchizin in 1x PBS, Endkonzentration in der Biene 50 μ M (A) bzw. 10 μ M (B). Dargestellt ist die Anzahl der Tiere in %, die vor und nach der Sensitivierung mit 1 M Sucrose an der Antenne auf Nelkenduft mit dem PER reagiert haben. n=Anzahl der getesteten Bienen.

Die mit Colchizin behandelten Bienen besaßen demnach eine gleiche Wahrnehmung bzw. Reizverarbeitung ihrer Belohnung sowie des Duftes und hatten somit die gleichen Ausgangsbedingungen für das Training im Rahmen der appetitiven Konditionierung wie Kontrolltiere. Entstehen folglich Effekte bei der assoziativen Konditionierung, handelt es sich hierbei um spezifische assoziative Lern- und Gedächtniseffekte, da CS und US alleine keine Effekte nach Colchizin-Behandlung verursachten.

Auch die Sterblichkeit blieb nach Colchizin-Behandlung unverändert (siehe Abbildung 20). Die letale Dosis von Colchizin liegt in Mäusen bei ca. 6 mg/kg Körpergewicht (Quelle: ChemIDplus). Die getesteten Dosen von 50 bzw. 10 μM Endkonzentration in der Biene belaufen sich auf 20 bzw. 4 mg/kg Körpergewicht. Betrachtet man die Überlebensrate der Bienen nach Colchizin-Injektion, so zeigte sich kein Unterschied zu Kontrolltieren (siehe Abbildung 20).

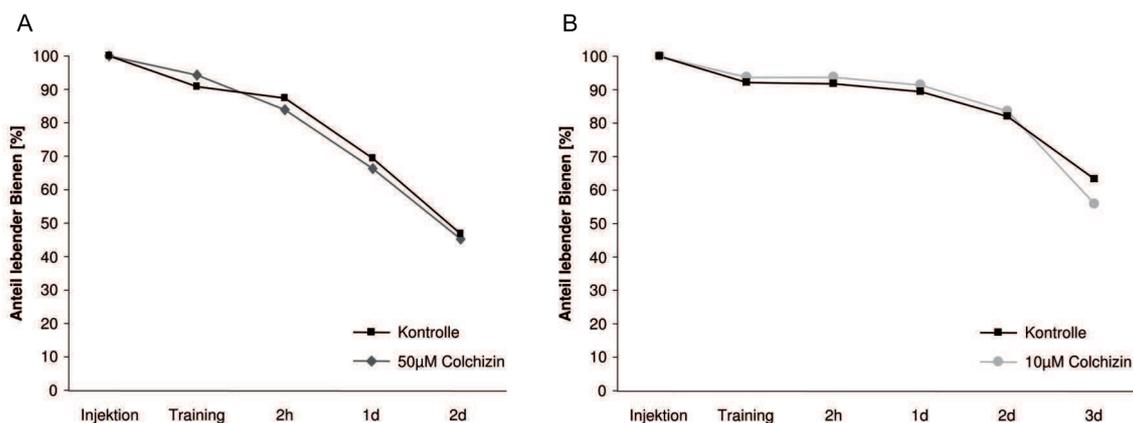


Abbildung 20: **Unterschiedliche Colchizin-Konzentrationen wirken sich nicht auf die Überlebensrate der Bienen aus.** Die Tiere wurden 1.5 h vor dem Training mit 1 μl der entsprechenden Lösung injiziert. Kontrolle: 1x PBS; Colchizin: injiziert mit 5 mM bzw. 1 mM Colchizin in 1x PBS, Endkonzentration in der Biene 50 μM (A) bzw. 10 μM (B). Dargestellt ist die Anzahl der Bienen in %, die zum Zeitpunkt der Injektion (88 Kontrollbienen sowie 86 Bienen mit 50 μM Colchizin bzw. 145 Kontrollbienen sowie 142 Bienen mit 10 μM Colchizin) und zu verschiedenen Zeitpunkten danach (beim Training, nach 2 h, 1, 2 bzw. 3 d) gelebt haben.

Anzumerken ist, dass bei den Untersuchungen zur Überlebensfähigkeit nach Injektion von Colchizin (50 bzw. 10 μM) Tiere verschiedener Jahreszeit verwendet wurden. Die Winterbienen (Versuche mit 50 μM) zeigten hierbei eine erhöhte Mortalität, weshalb Experimente nur bis Tag 2 verfolgt wurden.

Zusammenfassend ließ sich festhalten, dass eine Behandlung mit Colchizin, unabhängig von der eingesetzten Konzentration, keine Auswirkung auf die Zuckerwasserempfindlichkeit, das nicht-assoziative Lernen (Habituation und Sensitisierung) sowie die Vitalität der Bienen hatte, weshalb im Folgenden das assoziative Lernen und die Gedächtnisbildung nach Colchizin-Behandlung überprüft werden konnte.

Weitere Versuche wurden mit der geringeren Colchizin-Konzentration ($10 \mu\text{M}$) durchgeführt, da die gleichen Effekte beim Lernen sowie im Mittelzeitgedächtnis erzielt wurden (vgl. Abbildung 16) und diese Konzentration zusätzlich unter der für Maus geltenden letalen Dosis lag.

4.1.3 Auswirkungen von Colchizin auf assoziatives Lernen und Gedächtnisbildung

Um die Effekte von Colchizin auf das assoziative Lernverhalten und die Gedächtnisbildung zu untersuchen, wurden Bienen zu verschiedenen Zeitpunkten vor bzw. nach dem Training mit der Droge injiziert. Hiermit konnte zwischen der Akquisition und der Konsolidierung der Gedächtnisse unterschieden sowie geklärt werden, in welcher Phase die Integrität der Mikrotubuli eine Rolle spielt.

4.1.3.1 Einfluss von Colchizin auf assoziatives Lernen und Gedächtnis bei unterschiedlichen Injektionszeitpunkten

Zur Überprüfung, in welcher Phase die Mikrotubuli-Integrität bedeutsam ist, wurden verschiedene Injektionszeitpunkte getestet. Zunächst wurde Colchizin 1.5 h vor dem Training injiziert. Somit bestand ausreichend Zeit, damit sich Colchizin und damit die Störung der Mikrotubuli-Integrität während des Lernprozesses auswirken konnte (siehe Abbildung 21).

Es zeigt sich erneut der Akquisitionseffekt (vgl. Abbildung 16), also ein verschlechtertes Lernvermögen der Bienen nach Colchizin-Behandlung. Des Weiteren führte die Colchizin-Behandlung 1.5 h vor dem Training zu einer Beeinträchtigung des Langzeitgedächtnisses (LTM). Bienen, die mit Colchizin injiziert wurden, besaßen im Vergleich zu den Kontrollbienen ein deutlich schlechteres Gedächtnis am zweiten und dritten Tag (Abbildung 21). Keine Auswirkung besaß die Colchizin-Behandlung auf die Ausbildung des Mittelzeitgedächtnisses (2 h).

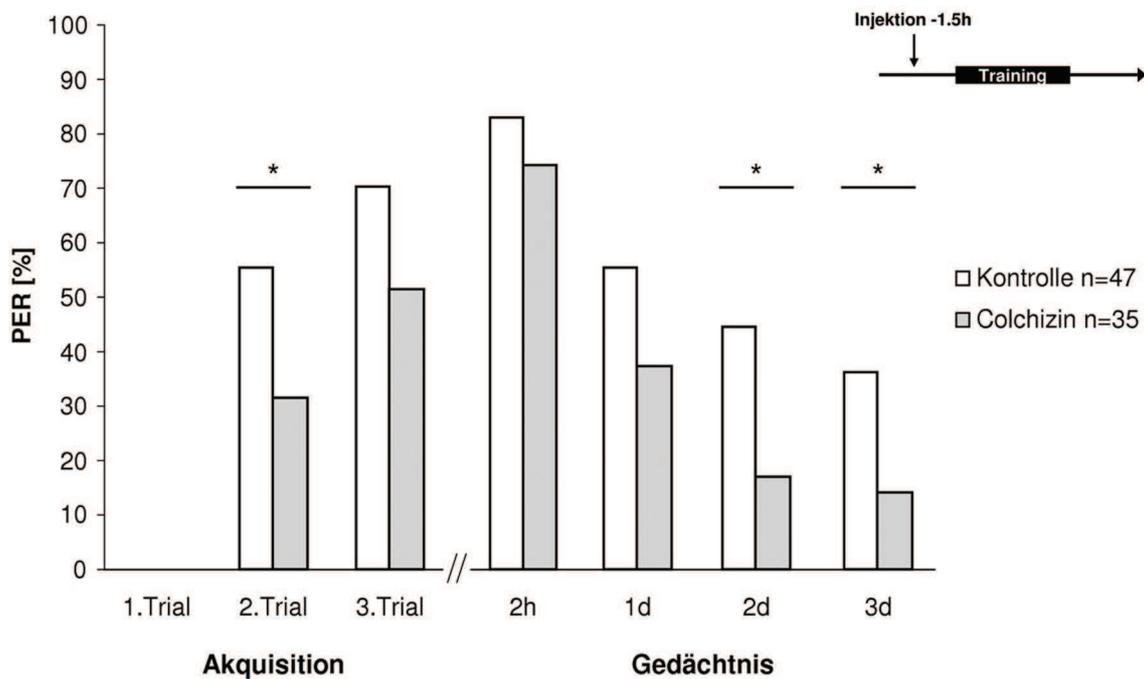


Abbildung 21: **Die Injektion von Colchizin 1.5 h vor starkem Training verschlechtert Lernen und Gedächtnis.** Bienen wurden vor dem Experiment über Nacht gehungert. Es erfolgte ein 3 Trial Training (3 CS/US Paarungen) mit einem Inter-Trial-Intervall von 2 min. Beim Gedächtnisabruf wurde nur der CS präsentiert (2 h, 1 d, 2 d, 3 d). Die Tiere wurden 1.5 h vor dem Training mit 1 μ l der entsprechenden Lösung injiziert. Kontrolle: 1x PBS; Colchizin: injiziert mit 1 mM Colchizin in 1x PBS, Endkonzentration in der Biene 10 μ M. Dargestellt ist die Anzahl der Bienen in %, die auf den Nelkenduft (CS) mit einem PER reagierten. n=Anzahl der getesteten Bienen. *: $p < 0.05$ (Fisher Exact Test)

Demnach schien die Integrität der Mikrotubuli bereits während des Lernens notwendig zu sein, um ein stabiles LTM zu erzeugen. Um zu überprüfen, ob das verschlechterte LTM der Colchizin-behandelten Bienen ausschließlich auf dem verminderten Lernvermögen basierte oder eine gestörte Integrität der Mikrotubuli während der Konsolidierungsphase auch in einem verschlechterten LTM mündet, wurde Colchizin anschließend erst 0.5 h nach dem Training injiziert (siehe Abbildung 22).

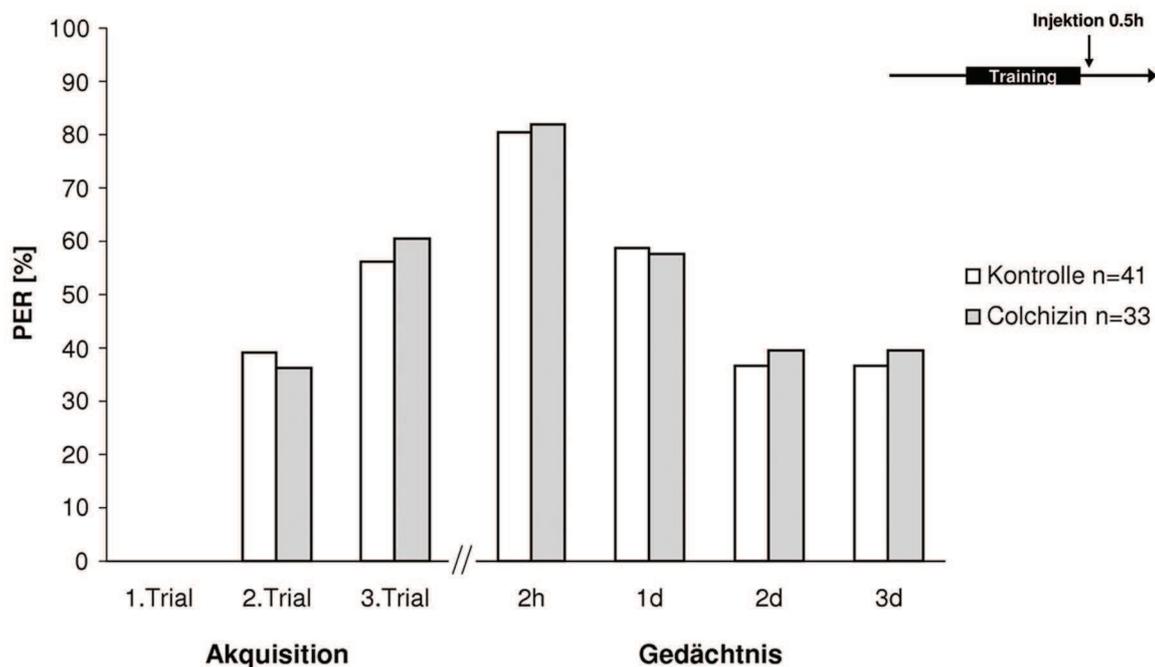


Abbildung 22: **Die Injektion von Colchizin 0.5 h nach starkem Training verursacht keine Gedächtniseffekte.** Bienen wurden vor dem Experiment über Nacht gehungert. Es erfolgte ein 3 Trial Training (3 CS/US Paarungen). Beim Gedächtnisabruf wurde nur der CS präsentiert (2 h, 1 d, 2 d, 3 d). Die Tiere wurden 0.5 h nach dem Training mit $1 \mu\text{l}$ der entsprechenden Lösung injiziert. Kontrolle: 1x PBS; Colchizin: injiziert mit 1 mM Colchizin in 1x PBS, Endkonzentration in der Biene $10 \mu\text{M}$. Dargestellt ist die Anzahl der Bienen in %, die auf den Nelkenduft (CS) mit einem PER reagierten. n=Anzahl der getesteten Bienen.

Eine Colchizin-Behandlung nach dem Training bewirkte keinerlei Unterschiede im Vergleich zu Kontrolltieren (Abbildung 22). Es erfolgte keine Beeinträchtigung des Lernens, des Mittel- oder Langzeitgedächtnisses.

Um herauszufinden, ab welchem Zeitpunkt sich Colchizin auf das Lernen und die Gedächtnisbildung auswirkte, wurde der Injektionszeitpunkt 0.5 h vor das Training gelegt (siehe Abbildung 23).

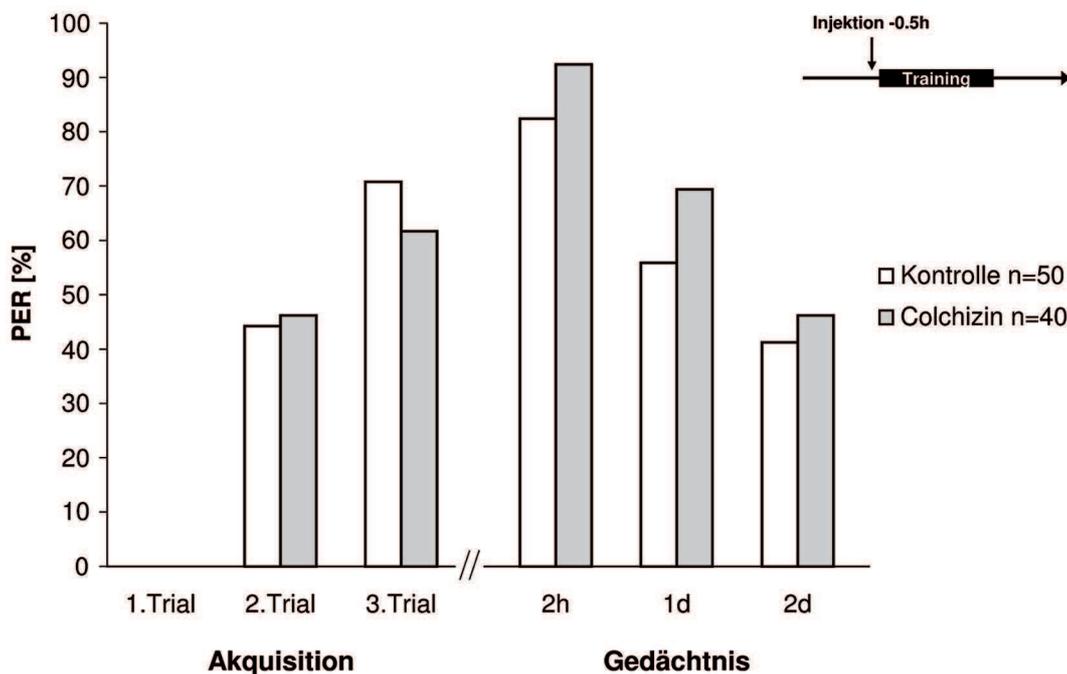


Abbildung 23: **Die Injektion von Colchizin 0.5 h vor starkem Training verursacht keine Lern- oder Gedächtniseffekte.** Bienen wurden vor dem Experiment über Nacht gehungert. Es erfolgte ein 3 Trial Training (3 CS/US Paarungen). Beim Gedächtnisabruf wurde nur der CS präsentiert (2 h, 1 d, 2 d). Die Tiere wurden 0.5 h vor dem Training mit 1 μ l der entsprechenden Lösung injiziert. Kontrolle: 1x PBS; Colchizin: injiziert mit 1 mM Colchizin in 1x PBS, Endkonzentration in der Biene 10 μ M. Dargestellt ist die Anzahl der Bienen in %, die auf den Nelkenduft (CS) mit einem PER reagierten. n=Anzahl der getesteten Bienen.

Wurden Bienen erst kurz vor dem Training mit Colchizin behandelt, waren sowohl Akquisition als auch Mittel- und Langzeitgedächtnis unbeeinflusst (Abbildung 23).

Demnach bewirkte eine Colchizin-Injektion mindestens 1.5 h vor dem Training eine Beeinträchtigung in der appetitiven Konditionierung; sowohl Lernen als auch das LTM waren verschlechtert (vgl. Abbildung 21).

Um die Wirkdauer des Colchizins weiter zu untersuchen, wurde zusätzlich ein längerer Zeitraum ausgetestet und Bienen bereits 18 h vor dem Training mit Colchizin injiziert (siehe Abbildung 24).

Hierbei zeigte sich ein reduziertes Lernvermögen. Anders als bei der Injektion von Colchizin 1.5 h vor dem Training, war bei 18 stündiger Behandlung auch das Mittelzeitgedächtnis (2 h) beeinträchtigt (Abbildung 24). Ergebnisse zur Untersuchung des Langzeitgedächtnisses nach 18 stündiger Colchizin-Behandlung konnten im Rahmen dieser Arbeit nicht erzielt werden, da die Versuche in einer Zeit durchgeführt wurden, in der generell eine hohe Sterblichkeitsrate der Bienen unter Laborbedingungen vorlag.

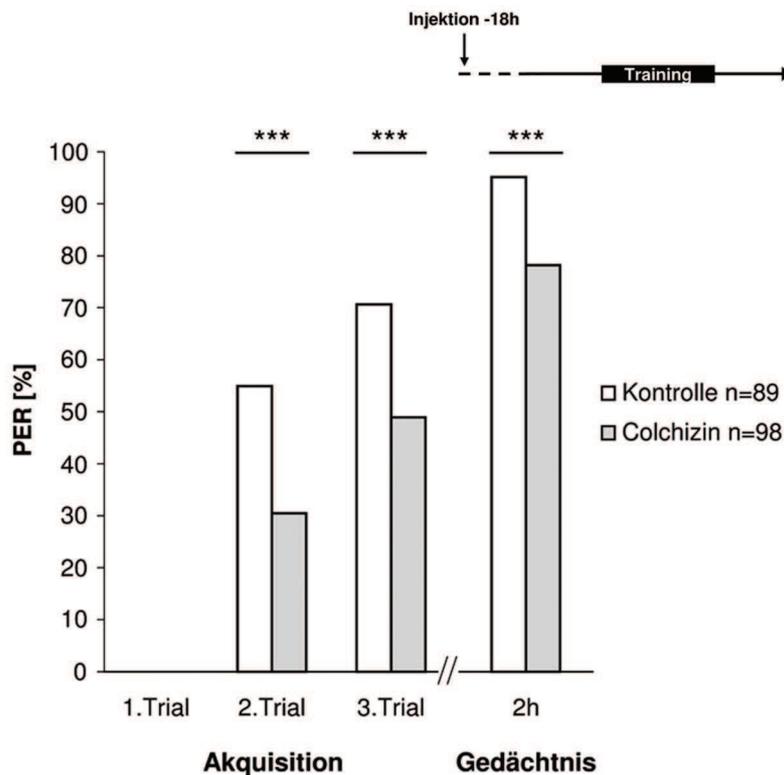


Abbildung 24: **Die Injektion von Colchizin 18 h vor starkem Training verursacht starke Lern- und Gedächtniseffekte.** Bienen wurden vor dem Experiment über Nacht gehungert und 18 h vor dem Training mit 1 μ l der entsprechenden Lösung injiziert. Kontrolle: 1x PBS; Colchizin: injiziert mit 1 mM Colchizin in 1x PBS, Endkonzentration in der Biene 10 μ M. Es erfolgte ein 3 Trial Training (3 CS/US Paarungen). Beim Gedächtnisabruf wurde nur der CS präsentiert (2 h). Dargestellt ist die Anzahl der Bienen in %, die auf den Nelkenduft (CS) mit einem PER reagierten. n=Anzahl der getesteten Bienen. ***: $p < 0.001$ (Chi Square Test)

Abbildung 25 fasst die Auswirkungen unterschiedlicher Injektionszeitpunkte vor bzw. nach dem Training auf die Akquisition, das Mittelzeit- sowie Langzeitgedächtnis der Colchizin-behandelten Bienen nach appetitiver Konditionierung zusammen.

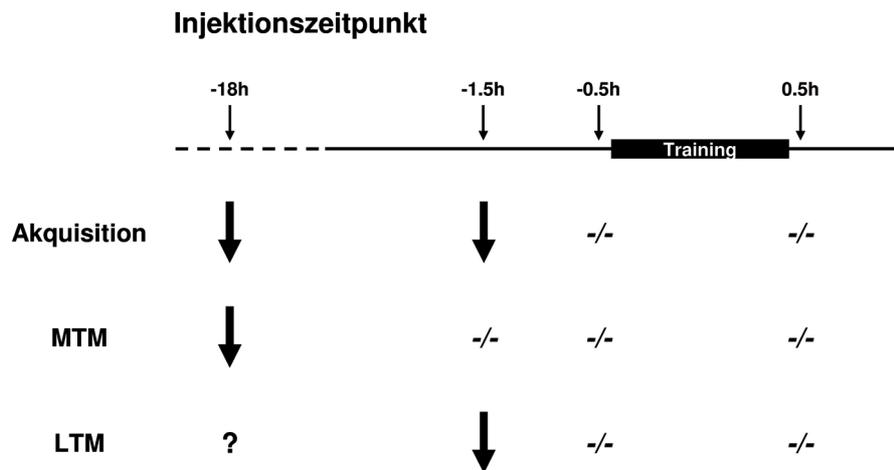


Abbildung 25: **Zusammenfassung: Auswirkung von Colchizin auf Lernen und Gedächtnis bei starkem Training in Abhängigkeit vom Injektionszeitpunkt.** Wurden Bienen kurz nach (0.5 h) oder kurz vor dem Training (-0.5 h) mit Colchizin behandelt, hatte dies keine Auswirkung auf das Lernen oder die Gedächtnisbildung (-/-). Wurden Bienen 1.5 h vor dem Training injiziert, verschlechterte dies die Akquisition sowie das LTM. Bei 18 stündiger Colchizin-Behandlung vor dem Training waren die Akquisition sowie zusätzlich das MTM beeinträchtigt; die Untersuchung des LTM wurde nicht durchgeführt. Pfeil=Beeinträchtigung.

4.1.3.2 Einfluss von Colchizin auf assoziatives Lernen und Gedächtnis bei unterschiedlichen Trainingsstärken

Bisher wurden die Auswirkungen von Colchizin bei starkem Training betrachtet. Um zu untersuchen, ob die Beeinträchtigung des Gedächtnisses mit der Trainingsstärke zusammenhängt, wurden im Folgenden die Effekte der Colchizin-Injektion bei verschiedenen Trainingsstärken überprüft.

Zunächst wurde ein schwaches Training (eine CS/US Paarung) 1.5 h nach Colchizin-Gabe durchgeführt und das Gedächtnis der Bienen untersucht (siehe Abbildung 26).

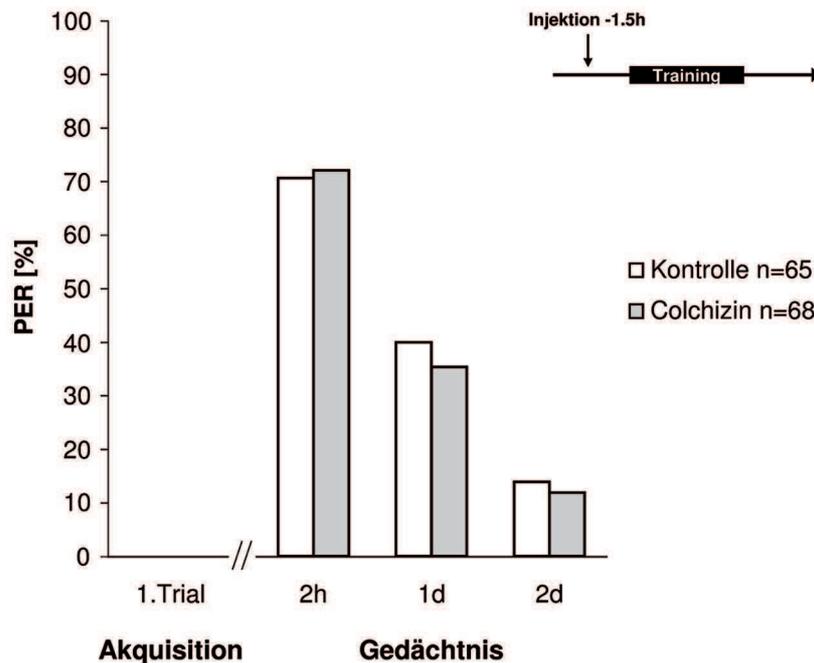


Abbildung 26: **Die Injektion von Colchizin 1.5 h vor schwachem Training hat keine Auswirkung auf die Gedächtnisbildung.** Bienen wurden vor dem Experiment über Nacht gehungert. Es erfolgte ein 1 Trial Training (nur 1 CS/US Paarung). Beim Gedächtnisabruf wurde nur der CS präsentiert (2 h, 1 d, 2 d). Die Tiere wurden 1.5 h vor dem Training mit $1 \mu\text{l}$ der entsprechenden Lösung injiziert. Kontrolle: 1x PBS; Colchizin: injiziert mit 1 mM Colchizin in 1x PBS, Endkonzentration in der Biene $10 \mu\text{M}$. Dargestellt ist die Anzahl der Bienen in %, die auf den Nelkenduft (CS) mit einem PER reagierten. n=Anzahl der getesteten Bienen.

Dabei zeigte sich, dass eine Colchizin-Injektion vor schwachem Training, im Gegensatz zum starken Training, keinen Effekt verursachte. Es gab keinen Unterschied im Gedächtnis von Colchizin- und Kontrollinjizierten Bienen (Abbildung 26).

Wurde allerdings die Trainingsstärke erhöht und ein 2 Trial Training angewandt, wirkte sich die Colchizin-Injektion negativ auf das Lernen sowie das Langzeitgedächtnis aus (vgl. Abbildung 27). Das Mittelzeitgedächtnis (2 h) war nicht betroffen.

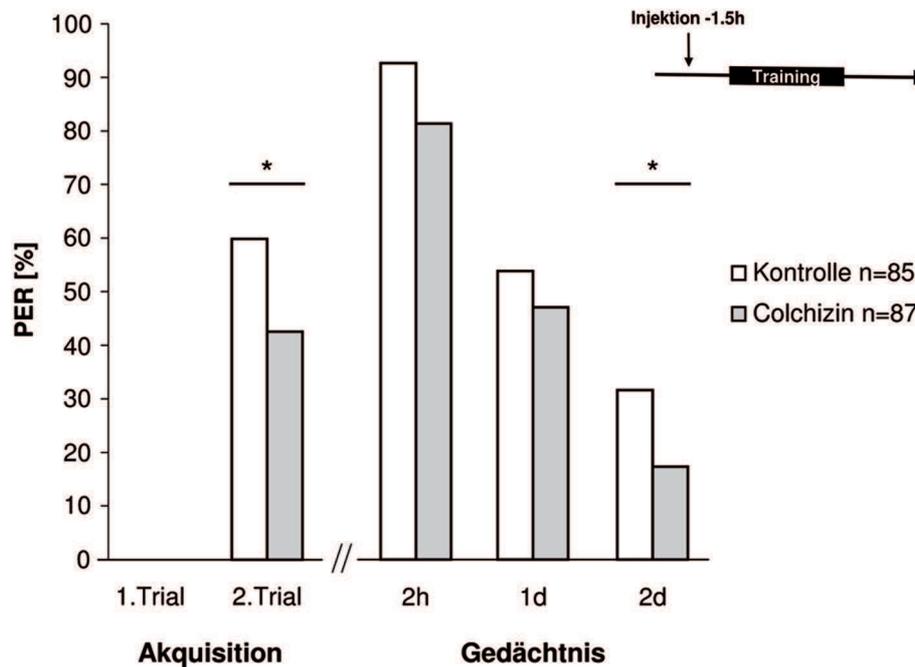


Abbildung 27: **Die Injektion von Colchizin 1.5 h vor einem 2 Trial Training verursacht Lern- und Gedächtniseffekte.** Bienen wurden vor dem Experiment über Nacht gehungert. Es erfolgte ein 2 Trial Training (2 CS/US Paarungen). Beim Gedächtnisabruf wurde nur der CS präsentiert (2 h, 1 d, 2 d). Die Tiere wurden 1.5 h vor dem Training mit 1 μ l der entsprechenden Lösung injiziert. Kontrolle: 1x PBS; Colchizin: injiziert mit 1 mM Colchizin in 1x PBS, Endkonzentration in der Biene 10 μ M. Dargestellt ist die Anzahl der Bienen in %, die auf den Nelkenduft (CS) mit einem PER reagierten. n=Anzahl der getesteten Bienen. *: $p < 0.05$ (Chi Square Test)

Abbildung 28 fasst die Auswirkungen unterschiedlicher Trainingsstärken auf die Akquisition sowie das Langzeitgedächtnis nach appetitiver Konditionierung zusammen.

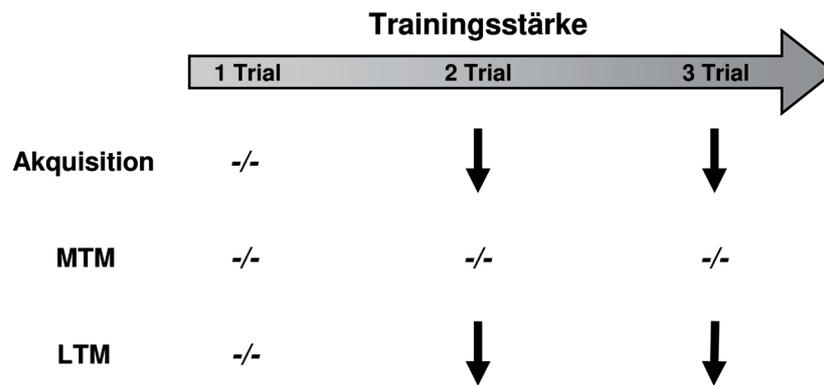


Abbildung 28: **Zusammenfassung: Auswirkung von Colchizin auf Lernen und Gedächtnis in Abhängigkeit von der Trainingsstärke.** Bienen wurden 1.5 h vor dem Training mit Colchizin injiziert. Wurde ein schwaches 1 Trial Training durchgeführt, verursachte dies keinen Effekt auf das Gedächtnis (-/-). Wurde ein 2 Trial oder starkes 3 Trial Training angewandt, so waren sowohl Lernen als auch Langzeitgedächtnis verschlechtert. Pfeil=Beeinträchtigung.

Nach dem Vergleich der verschiedenen Injektionszeiten sowie Trainingsstärken (Abbildung 25 und 28) traten die verschlechterte Akquisition sowie das beeinträchtigte LTM nach Colchizin-Behandlung stets gemeinsam auf. Der Erfolg des Lernens, also die Akquisitionsphase ist ausschlaggebend für den Erwerb eines stabilen LTM.

In der Akquisitionsphase werden, abhängig vom Training, Prozesse induziert, die letztendlich zur Bildung der verschiedenen Gedächtnisse führen. Dies könnte den Transport bestimmter Moleküle in die Prä- oder Postsynapse erfordern. Colchizin sollte die Mikrotubuli depolymerisieren, wodurch ein intrazelluläres Transportdefizit entstehen kann. Beim 1 Trial Training wären genügend Moleküle vorhanden, so dass kein Effekt nach Colchizin-Behandlung feststellbar ist. Erfolgt jedoch ein Multipel-Trial-Training, müssten vermehrt Moleküle transportiert werden, da hierdurch auch Translation sowie Transkription induziert werden. Liegen nach Colchizin-Behandlung depolymerisierte Mikrotubuli vor, könnte die Bereitstellung benötigter Moleküle während der Akquisition nach einzelnen Training-Trials erschöpft sein, was sich wie hier gezeigt negativ auf die Lerneffizienz auswirkt.

Um daher zu überprüfen, ob dieses Transportdefizit und damit die verschlechterte Akquisition auch auftritt, wenn mehr Zeit für den Transport benötigter Moleküle zur Verfügung steht, wurde nachfolgend das kurze Inter-Trial-Intervall von 2 min auf 10 min verlängert.

4.1.3.3 Einfluss von Colchizin auf assoziatives Lernen und Gedächtnis bei unterschiedlichen Inter-Trial-Intervallen

Zur Verlängerung des Zeitintervalls zwischen den CS/US Paarungen wurde ein Intervall von 10 min angewandt. Die Bienen wurden 1.5 h sowie 18 h vor dem starken Training mit Colchizin bzw. Kontrolllösung injiziert (siehe Abbildung 29 sowie 30).

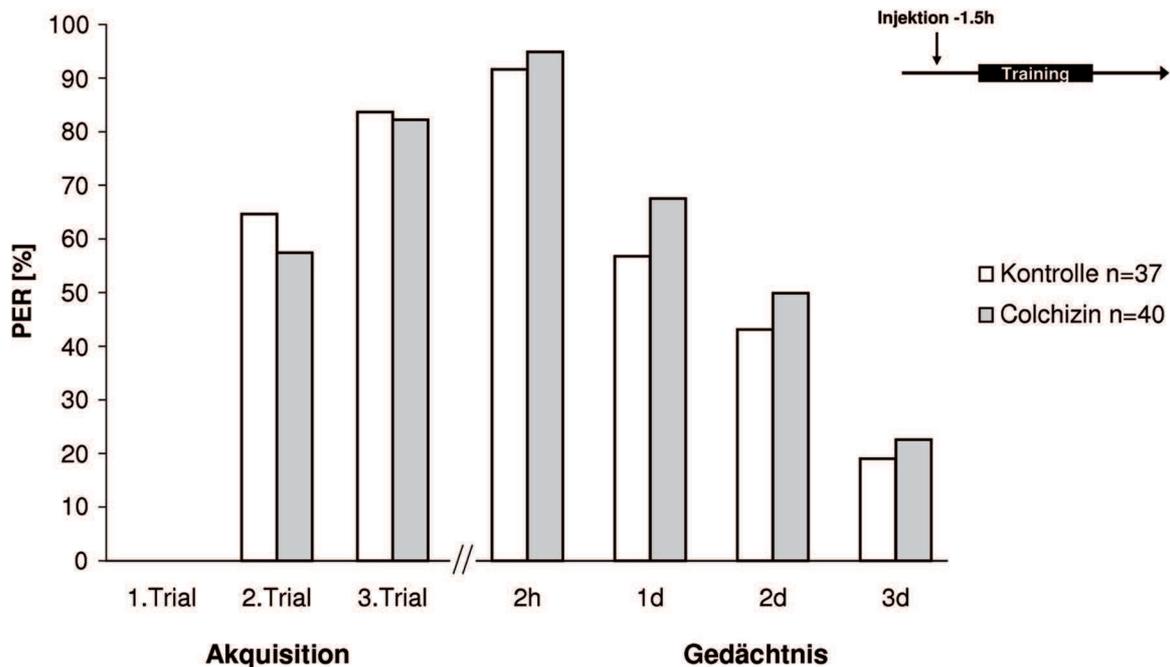


Abbildung 29: **Die Injektion von Colchizin 1.5 h vor starkem Training mit verlängertem Inter-Trial-Intervall verursacht keine Lern- oder Gedächtniseffekte.** Bienen wurden vor dem Experiment über Nacht gehungert. Es erfolgte ein 3 Trial Training (3 CS/US Paarungen) mit einem Inter-Trial-Intervall von 10 min. Beim Gedächtnisabruf wurde nur der CS präsentiert (2 h, 1 d, 2 d, 3 d). Die Tiere wurden 1.5 h vor dem Training mit 1 μ l der entsprechenden Lösung injiziert. Kontrolle: 1x PBS; Colchizin: injiziert mit 1 mM Colchizin in 1x PBS, Endkonzentration in der Biene 10 μ M. Dargestellt ist die Anzahl der Bienen in %, die auf den Nektenduft (CS) mit einem PER reagierten. n=Anzahl der getesteten Bienen.

Bei Training mit verlängertem Inter-Trial-Intervall trat das Akquisitionsdefizit nicht mehr auf (Abbildung 29). Bienen, die 1.5 h vor starkem Training mit Colchizin injiziert wurden, zeigten nun die gleiche Lernrate wie Kontrollbienen. Im Gegensatz zum Trainingsprotokoll mit kurzem Inter-Trial-Intervall war des Weiteren auch nicht mehr die Beeinträchtigung des LTM festzustellen (vgl. Abbildung 21).

Weiterhin wurde die Akquisition sowie das MTM von Bienen untersucht, die 18 h vor dem Training mit Colchizin injiziert und mit dem verlängerten Inter-Trial-Intervall von 10 min trainiert wurden (siehe Abbildung 30).

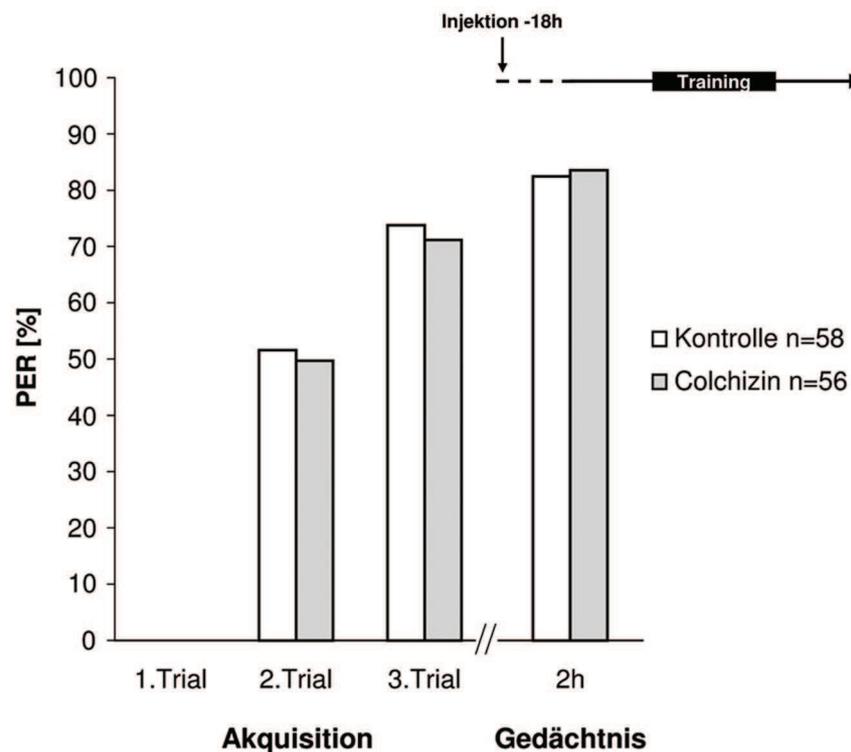


Abbildung 30: **Die Injektion von Colchizin 18 h vor starkem Training mit einem verlängerten Inter-Trial-Intervall verursacht keine Lern- oder MTM Effekte.** Bienen wurden vor dem Experiment über Nacht gehungert sowie 18 h vor dem Training mit $1 \mu\text{l}$ der entsprechenden Lösung injiziert. Kontrolle: 1x PBS; Colchizin: injiziert mit 1 mM Colchizin in 1x PBS, Endkonzentration in der Biene $10 \mu\text{M}$. Es erfolgte ein 3 Trial Training (3 CS/US Paarungen). Beim Gedächtnisabruf wurde nur der CS präsentiert (2 h). Dargestellt ist die Anzahl der Bienen in %, die auf den Nelkenduft (CS) mit einem PER reagierten. n=Anzahl der getesteten Bienen.

Wie zuvor gezeigt bewirkte die 18 stündige Colchizin-Behandlung vor dem Training mit einem 2 min Inter-Trial-Intervall ein reduziertes Lernvermögen sowie ein vermindertes MTM (vgl. Abbildung 24). Wurden Bienen allerdings 18 h nach Colchizin-Behandlung mit einem verlängerten Inter-Trial-Intervall trainiert, waren die Akquisition sowie das MTM nicht mehr beeinträchtigt (Abbildung 30).

Demnach scheint die Mikrotubuli-Integrität während der Akquisitionsphase maßgeblich entscheidend für die Ausbildung eines stabilen Gedächtnisses zu sein. Erfolgt die einzelnen Training-Trials in dieser Phase mit kurzem Abstand, führte dies zu einem durch Colchizin-induzierten schlechten Lernerfolg. Keine Beeinträchtigung wurde nach Colchizin-Behandlung festgestellt, wenn die Zeitspanne zwischen den Trials erhöht wurde (vgl. Abbildung 31).

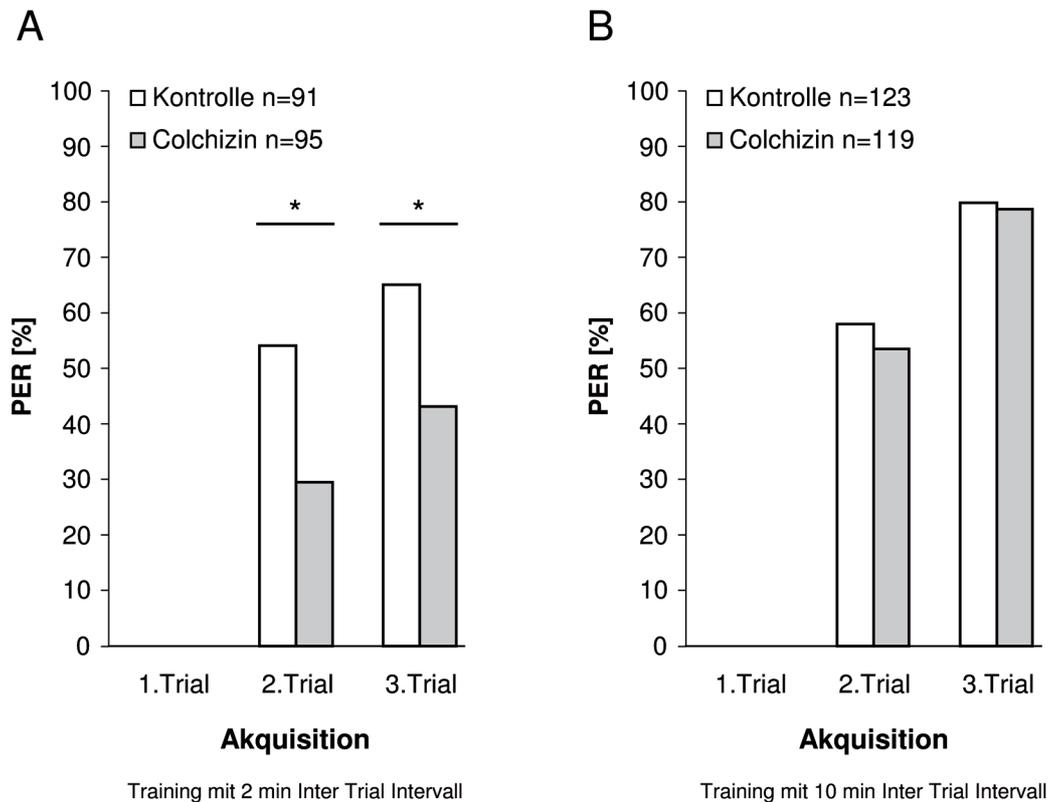


Abbildung 31: **Auswirkung von Colchizin auf die Akquisition bei verschiedenen Inter-Trial-Intervallen.** Bienen wurden vor dem Experiment über Nacht gehungert. Es erfolgte ein 3 Trial Training (3 CS/US Paarungen) mit einem Inter-Trial-Intervall von 2 (A) bzw. 10 min (B). Die Tiere wurden 1.5 h vor dem Training mit 1 μ l der entsprechenden Lösung injiziert. Kontrolle: 1x PBS; Colchizin: injiziert mit 1 mM Colchizin in 1x PBS, Endkonzentration in der Biene 10 μ M. Dargestellt ist die Anzahl der Bienen in %, die auf den Nelkenduft (CS) mit einem PER reagierten. n=Anzahl der getesteten Bienen. *: $p < 0.05$ (Chi Square Test)

Abbildung 32 fasst nachfolgend die Auswirkungen unterschiedlich langer Inter-Trial-Intervalle während starkem Training auf die Akquisition und dem damit einhergehenden Effekt auf das Langzeitgedächtnis der Bienen zusammen.

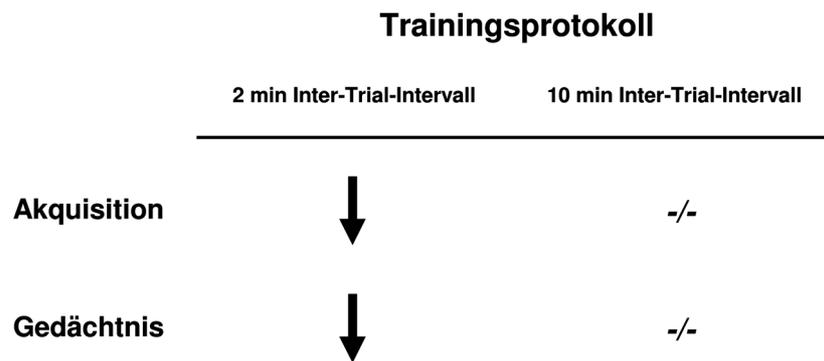


Abbildung 32: **Zusammenfassung: Auswirkung von Colchizin auf Lernen und Gedächtnis in Abhängigkeit von der Dauer des Inter-Trial-Intervalls.** Bienen wurden 1.5 h vor dem Training mit Colchizin injiziert. Wurde während eines starken Trainings ein Inter-Trial-Intervall von 2 min angewandt, führte dies zur Verschlechterung des Lernens sowie zur Beeinträchtigung des Langzeitgedächtnisses von Colchizin-behandelten Bienen. Ein verlängertes Inter-Trial-Intervall von 10 min verursachte keine Veränderung. Pfeil=Beeinträchtigung, (-/-)=kein Effekt.

Folglich handelte es sich bei der Akquisition tatsächlich um die entscheidende Phase, auf die Colchizin Einfluss nimmt. So trat beim Austesten unterschiedlicher Injektionszeiten sowie bei Anwendung von mehreren Training-Trials eine beeinträchtigte Akquisition auf, wodurch damit gekoppelt auch Gedächtniseffekte verursacht wurden. Keine Gedächtniseffekte entstanden jedoch, wenn die Akquisition nicht betroffen war. Ein verlängertes Inter-Trial-Intervall führte ebenfalls zum Ausgleich der Akquisitionsverschlechterung sowie der jeweiligen Gedächtniseffekte und schien ein Transportdefizit nach Colchizin-Behandlung zu kompensieren.

Nachfolgend wurden nun die Auswirkungen auf das olfaktorische Lernen und Gedächtnis nach Taxol-Behandlung der Bienen untersucht. Taxol ist eine Substanz, die gegensätzlich zu Colchizin wirkt und Mikrotubuli stabilisiert. Es stellte sich daher die Frage, ob sich durch Taxol-Behandlung die jeweiligen Colchizin-Effekte umkehren lassen.

4.2 Taxol verbessert Lernen und die Gedächtnisbildung

Taxol (Paclitaxel) ist ein Taxan der pazifischen Eibe (*Taxus brevifolia*) und wirkt gegensätzlich zu Colchizin. Es bindet an β -Tubulin und kann so den Abbau, also die Depolymerisation der Mikrotubuli verhindern. Das Cytoskelett gewinnt an Stabilität und intrazelluläre Transportprozesse werden erleichtert [124, 208].

Somit wurde vermutet, dass sich Taxol positiv auf die Gedächtnisbildung auswirkt. Es stellte sich zudem die Frage, ob Taxol wie Colchizin die Akquisition verändert. Da zur Bildung eines LTM Transkription sowie axonaler Transport erfolgen müssen, sollte Taxol auch transkriptionsabhängige Gedächtnisse verbessern können.

Um in der Biene das appetitive Lernen und Gedächtnis bei verbesserter Mikrotubuli-Situation zu testen, wurde zunächst Taxol alleine und später zusammen mit ActD injiziert, um die Transkriptionsabhängigkeit der Gedächtnisse aufzuklären (vgl. [205]). Der Transkriptionsblocker Actinomycin D (ActD) interkaliert in die DNA und verhindert damit eine DNA-abhängige RNA-Synthese [60].

Die letale Dosis von Taxol in Mäusen liegt bei 12 mg/kg Körpergewicht (Quelle: ChemIDplus). Die hier getestete Dosis von 10 μM Endkonzentration in der Biene besitzt eine Konzentration von 8.5 mg/kg Körpergewicht. Abbildung 33 zeigt, dass die Taxol-Injektion im Vergleich zur Kontrolle nicht zu einer verstärkten Sterblichkeit führte.

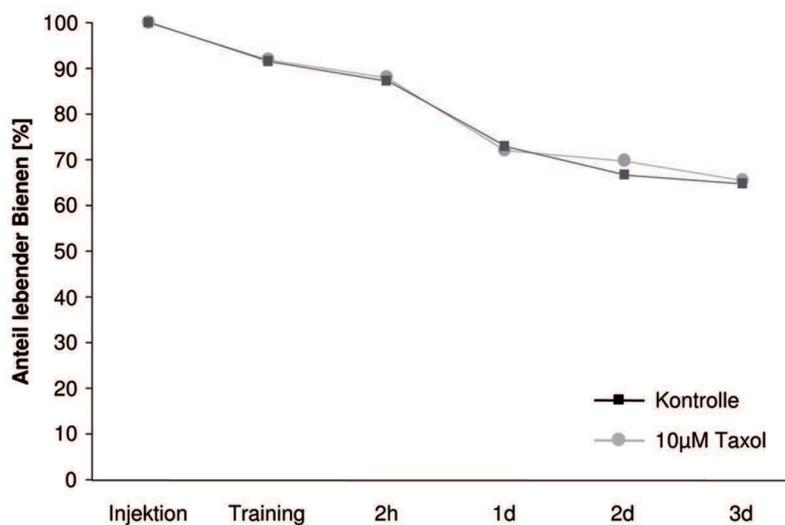


Abbildung 33: **Die Taxol-Injektion wirkt sich nicht auf die Überlebensrate der Bienen aus.** Die Tiere wurden 1.5 h vor dem Training mit 1 μl der entsprechenden Lösung injiziert. Kontrolle: 100% DMSO; Taxol: injiziert mit 1 mM Taxol in 100% DMSO, Endkonzentration in der Biene 10 μM . Dargestellt ist die Anzahl der Bienen in %, die zum Zeitpunkt der Injektion (141 Kontrollbienen sowie 133 Bienen mit 10 μM Taxol) und zu verschiedenen Zeitpunkten danach (beim Training, nach 2 h, 1, 2 sowie 3 d) gelebt haben.

Die Wahl dieser Konzentration wurde anhand von in der Literatur beschriebenen Zellkultur Studien getroffen, in denen 1 μM Taxol zur Stabilisierung der Mikrotubuli sowie zur Acetylierung des α -Tubulins führte [28, 189]. Für *in vivo* Untersuchungen mit Bienen wurde diese Konzentration verzehnfacht.

4.2.1 Auswirkungen von Taxol auf die Responsiveness und das nicht-assoziative Lernen

Analog zur Colchizin-Behandlung wurde zunächst untersucht, ob die Behandlung von Bienen mit Taxol die Bewertung und Verarbeitung des CS (Duftreiz) oder US (Zuckerwasserbelohnung) unverändert lässt. Dies ist eine notwendige Voraussetzung, damit es sich um spezifische assoziative Lern- und Gedächtniseffekte handelt.

Zur Überprüfung der CS- bzw. US-Prozessierung wurden die Zuckerwasserempfindlichkeit (Responsiveness) und das nicht-assoziative Lernen (Habituation und Sensibilisierung) überprüft. Bei allen mit Taxol durchgeführten Experimenten dieser Arbeit wurde die Droge 1.5 h vor dem Versuch injiziert.

In Abbildung 34 ist die Responsiveness, also die Zuckerwasserempfindlichkeit der Bienen nach Taxol-Behandlung dargestellt.

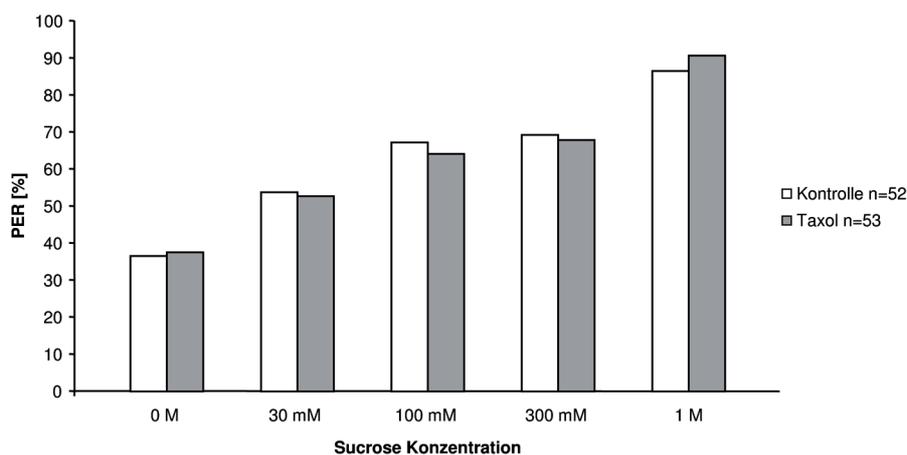


Abbildung 34: **Die Taxol-Injektion wirkt sich nicht auf die Zuckerwasserempfindlichkeit aus.** Bienen wurden 1.5 h vor dem Test mit 1 μ l der entsprechenden Lösung injiziert. Kontrolle: 100% DMSO; Taxol: injiziert mit 1 mM Taxol in 100% DMSO, Endkonzentration in der Biene 10 μ M. Gezeigt ist die Anzahl der Tiere in %, die auf den gegebenen Stimulus (Sucrosekonzentration in Lösung) an der Antenne mit einem PER reagierten. n=Anzahl der getesteten Bienen.

Aus Abbildung 34 wird ersichtlich, dass sich die Taxol-Injektion bei Bienen nicht auf die Sensitivität der Wahrnehmung ihrer Zuckerwasserbelohnung auswirkte.

Im Rahmen von Habituations- sowie Sensibilisierungsexperimenten konnte auch eine Veränderung der US- sowie CS-Verarbeitung nach Taxol-Behandlung ausgeschlossen werden (siehe Abbildung 35).

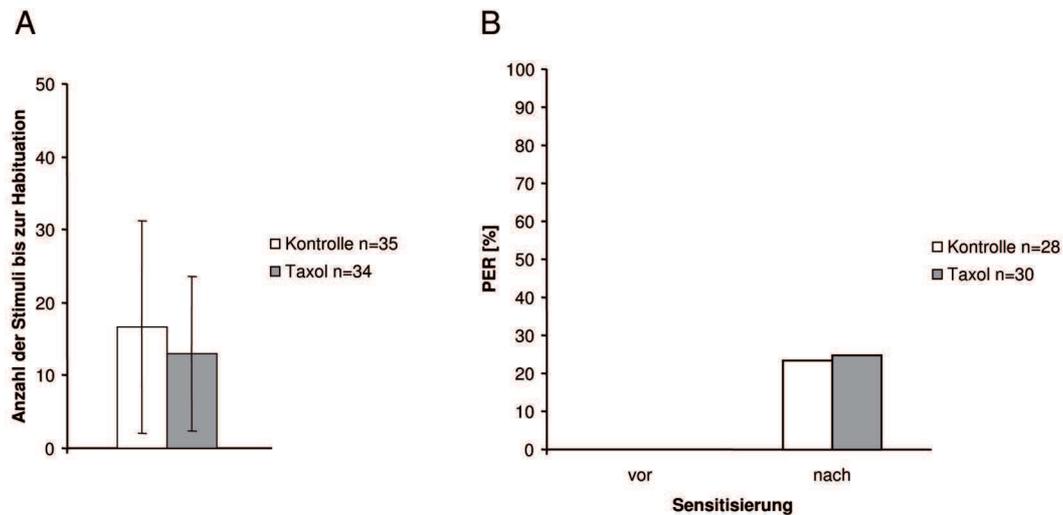


Abbildung 35: **Die Taxol-Injektion wirkt sich nicht auf die Habituation oder die Sensitisierung aus.** Bienen wurden 1.5 h vor dem Test mit $1 \mu\text{l}$ der entsprechenden Lösung injiziert. Kontrolle: 100% DMSO; Taxol: injiziert mit 1 mM Taxol in 100% DMSO, Endkonzentration in der Biene $10 \mu\text{M}$. A: Habituation nach Taxol-Behandlung. Dargestellt ist der Mittelwert der Anzahl gegebener Stimuli mit 100 mM Sucrose an einer der beiden Antennen bis zum Ausbleiben des PER (Habituation). B: Sensitisierung nach Taxol-Behandlung. Dargestellt ist die Anzahl der Tiere in %, die vor und nach der Sensitisierung mit 1 M Sucrose an der Antenne auf Nelkenduft mit dem PER reagiert haben. Der Fehlerbalken entspricht der Standardabweichung. n=Anzahl der getesteten Bienen.

Da es zu keinerlei Beeinträchtigung oder Begünstigung der Duft- bzw. Zuckerwahrnehmung nach Taxol-Injektion kam, wurde nachfolgend die Wirkung von Taxol auf das assoziative Lernen und die Gedächtnisbildung in der Biene untersucht.

4.2.2 Auswirkungen von Taxol auf assoziatives Lernen und Gedächtnisbildung

Zur Überprüfung, welche Effekte Taxol und damit einhergehend eine stabilere Mikrotubuli-Struktur in den Bienen bewirkt, wurde Bienen 1.5 h vor dem appetitiven Training die Droge injiziert. Die Auswirkungen dieser Injektion im Hinblick auf Lernen und Gedächtnisleistung sind in den folgenden Kapiteln beschrieben.

4.2.2.1 Einfluss von Taxol auf das assoziative Lernen und Gedächtnis bei schwachem Training

Zunächst wurde die Auswirkung von Taxol bei schwachem Training überprüft, indem ein 1 Trial Training 1.5 h nach der Injektion durchgeführt wurde (siehe Abbildung 36).

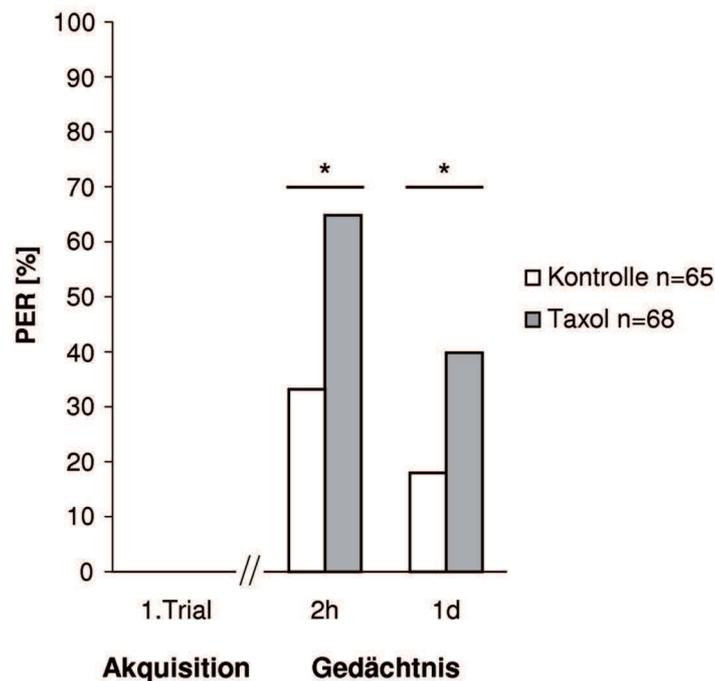


Abbildung 36: **Die Taxol-Injektion 1.5 h vor schwachem Training verbessert das Gedächtnis.** Bienen wurden vor dem Experiment über Nacht gehungert. Es erfolgte ein 1 Trial Training (nur 1 CS/US Paarung). Beim Gedächtnisabruf wurde nur der CS präsentiert (2 h, 1 d). Die Tiere wurden 1.5 h vor dem Training mit 1 μ l der entsprechenden Lösung injiziert. Kontrolle: 100% DMSO; Taxol: injiziert mit 1 mM Taxol in 100% DMSO, Endkonzentration in der Biene 10 μ M. Dargestellt ist die Anzahl der Bienen in %, die auf den Nelkenduft (CS) mit einem PER reagierten. n=Anzahl der getesteten Bienen. *: $p < 0.05$ (Chi Square Test)

Aus Abbildung 36 geht hervor, dass im Gegensatz zur Colchizin-Behandlung eine Taxol-Behandlung das Mittelzeitgedächtnis nach 2 h sowie 1 d verbesserte. Demnach scheint eine stabilere Mikrotubuli-Struktur die Gedächtnisbildung zu erleichtern.

4.2.2.2 Transkriptionsabhängigkeit der Gedächtnisbildung nach schwachem Training

Um zu testen, ob die Gedächtnisverbesserung durch Taxol von Transkriptionsprozessen abhängig ist, wurde zusätzlich der Transkriptionsblocker Actinomycin D (ActD) injiziert (siehe Abbildung 37).

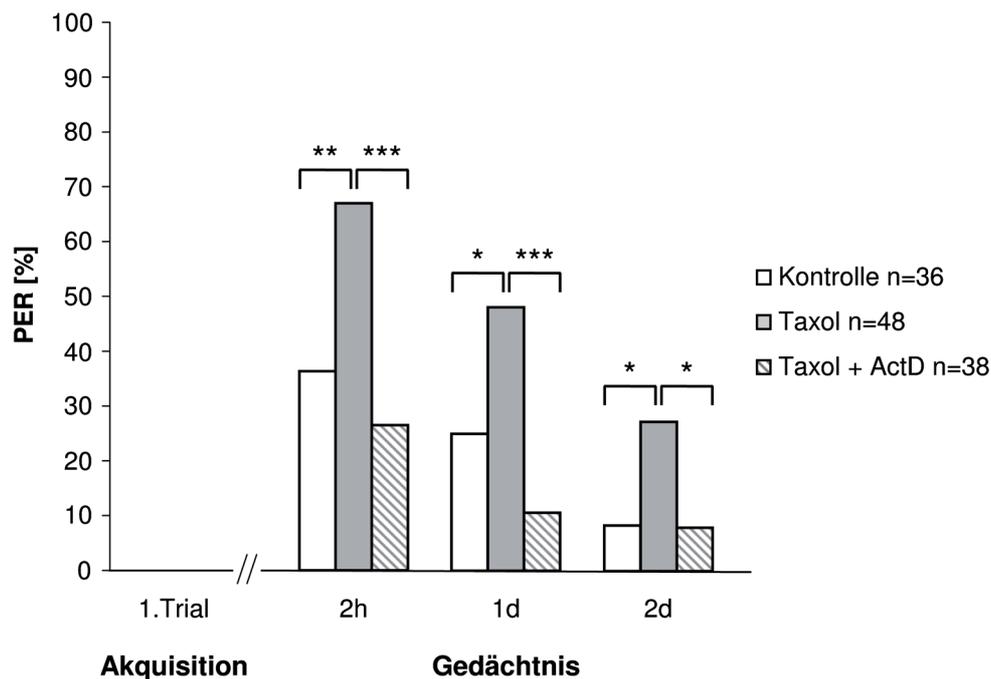


Abbildung 37: **Die Verbesserung des Gedächtnisses durch Taxol-Behandlung vor schwachem Training ist transkriptionsabhängig.** Bienen wurden vor dem Experiment über Nacht gehungert. Es erfolgte ein 1 Trial Training. Beim Gedächtnisabruf wurde nur der CS präsentiert (2 h, 1 d, 2 d). Die Tiere wurden 1.5 h vor dem Training mit 1 μ l der entsprechenden Lösung injiziert. Kontrolle: 100% DMSO; Taxol: injiziert mit 1 mM Taxol in 100% DMSO, Endkonzentration in der Biene 10 μ M; Taxol+ActD: injiziert mit 1 mM Taxol sowie 2 mg/ml Actinomycin D (ActD) in 100% DMSO. Dargestellt ist die Anzahl der Bienen in %, die auf den Nelkenduft (CS) mit einem PER reagierten. n=Anzahl der getesteten Bienen. ***: $p < 0.001$, **: $p < 0.01$, *: $p < 0.05$ (Fisher Exact Test)

Es zeigte sich, dass die Verbesserung des 2 h, 1 d sowie 2 d Gedächtnisses transkriptionsabhängig war (Abbildung 37). Die Taxol-Gabe alleine bewirkte zu allen getesteten Zeitpunkten eine Gedächtnisverbesserung im Vergleich zu Kontrolltieren. Wurde Taxol jedoch zusammen mit dem Transkriptionsblocker ActD gegeben, war diese Verbesserung nicht mehr sichtbar und die Tiere besaßen ein Gedächtnis wie Kontrolltiere. Folglich erleichtert die Taxol-Behandlung die Ausbildung transkriptionsabhängiger Gedächtnisse.

Das Resultat der mit Taxol und ActD behandelten Bienen war dennoch unerwartet, da in Biene erst nach 3 Tagen transkriptionsabhängige Gedächtnisse zum Tragen kommen [205]. Weiterhin wird nur durch starke Trainingsprotokolle (z.B. 3 Trial Training) ein transkriptionsabhängiges Langzeitgedächtnisse induziert.

Die Behandlung von Bienen mit Taxol schien folglich auch im Rahmen eines schwa-

chen Trainings transkriptionsabhängige Prozesse zur Ausbildung von Gedächtnissen zu erleichtern.

Nachfolgend wurde so auch die Auswirkung von Taxol auf assoziatives Lernen und die Gedächtnisbildung bei starkem Training untersucht.

4.2.2.3 Einfluss von Taxol auf assoziatives Lernen und Gedächtnis bei starkem Training

Anschließend wurde, analog zu Colchizin-Experimenten, die Trainingsstärke moduliert, damit die Auswirkungen einer Taxol-Behandlung bei stark trainierten Bienen untersucht werden konnten. Hierzu wurden Bienen 1.5 h vor dem 3 Trial Training mit Taxol injiziert (siehe Abbildung 38).

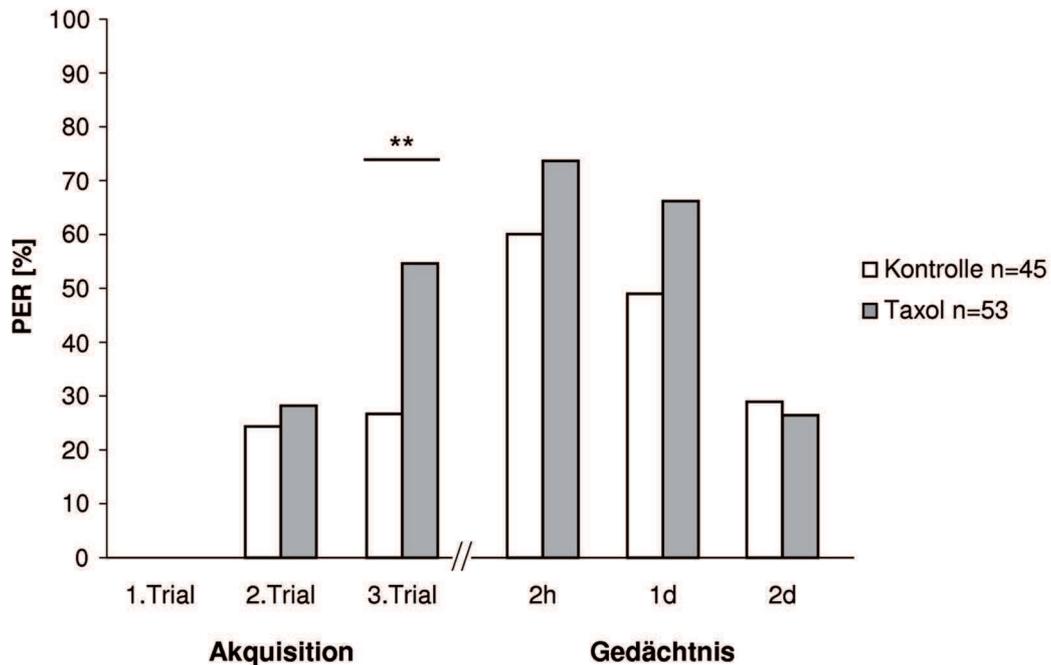


Abbildung 38: **Die Taxol-Injektion 1.5 h vor starkem Training verbessert die Akquisition.** Bienen wurden vor dem Experiment über Nacht gehungert. Es erfolgte ein 3 Trial Training (3 CS/US Paarungen) mit einem Inter-Trial-Intervall von 2 min. Beim Gedächtnisabruf wurde nur der CS präsentiert (2 h, 1 d, 2 d). Die Tiere wurden 1.5 h vor dem Training mit 1 μ l der entsprechenden Lösung injiziert. Kontrolle: 100% DMSO; Taxol: injiziert mit 1 mM Taxol in 100% DMSO, Endkonzentration in der Biene 10 μ M. Dargestellt ist die Anzahl der Bienen in %, die auf den Nelkenduft (CS) mit einem PER reagierten. n=Anzahl der getesteten Bienen. **: $p < 0.01$ (Fisher Exact Test)

Wie Abbildung 38 zeigt, verursachte die Behandlung mit Taxol eine verbesserte Lernleistung der Bienen. Colchizin hingegen verschlechterte die Akquisition (vgl. Abbildung 21). Es gab zudem eine Tendenz, dass sowohl das MTM nach 2 h als auch das Eintages-Gedächtnis durch die Taxol-Behandlung verbessert waren. Dies ließ sich jedoch nicht eindeutig zeigen, da das Signifikanzniveau nicht erreicht wurde.

Daher wurde im Folgenden versucht, den Unterschied zwischen Taxol-behandelten und Kontrolltieren durch Füttern vor dem Konditionieren zu vergrößern. Dieser Schritt wurde unternommen, da gesättigte Tiere eine verschlechterte Lernleistung aufweisen [53]. Demnach sollten Kontrolltiere weniger gut lernen und der positive Einfluss von Taxol auf die Lernfähigkeit stärker zum Vorschein kommen.

4.2.2.4 Transkriptionsabhängigkeit der Gedächtnisbildung bei starkem Training

Nachfolgende Experimente wurden mit Bienen durchgeführt, die 2 h vor dem Training mit 2 Tropfen Sucrose angefütert wurden, da zu erwarten war, dass gesättigte Bienen einen schlechteren Lernerfolg besitzen und so Unterschiede zwischen Taxol-injizierten und Kontrollbienen stärker hervortreten (vgl. [53]). Gleichzeitig wurde die Transkriptionsabhängigkeit der Gedächtnisbildung mit ActD getestet (siehe Abbildung 39).

Aus Abbildung 39 geht hervor, dass das Anfütern vor der appetitiven Konditionierung die Akquisition stark einschränkte. Dennoch wurden in allen Gruppen Gedächtnisse angelegt. Die Taxol-Behandlung bewirkte einen deutlichen Unterschied im Vergleich zur Kontrolle; sowohl das 2 h als auch das 1 d Gedächtnis waren verbessert. Diese Gedächtnisverbesserung war wiederum transkriptionsabhängig, da Taxol zusammen mit dem Transkriptionsblocker ActD keine Verbesserung mehr erzielte. Leider konnte keine konkrete Aussage über das 2 d Gedächtnis getroffen werden, da bei zwei von drei Experimenten, gleichgültig der Behandlung, unerwarteterweise an Tag 2 kaum Bienen mit einem PER reagierten.

Die verbesserte Mikrotubuli-Integrität nach Taxol-Behandlung bewirkte folglich eine erleichterte Ausbildung der Gedächtnisse. Ähnlich wie nach schwachem Training (vgl. Abbildung 37) war dieses transkriptionsabhängige Resultat bei 2 h sowie an Tag 1 unerwartet (siehe [205]).

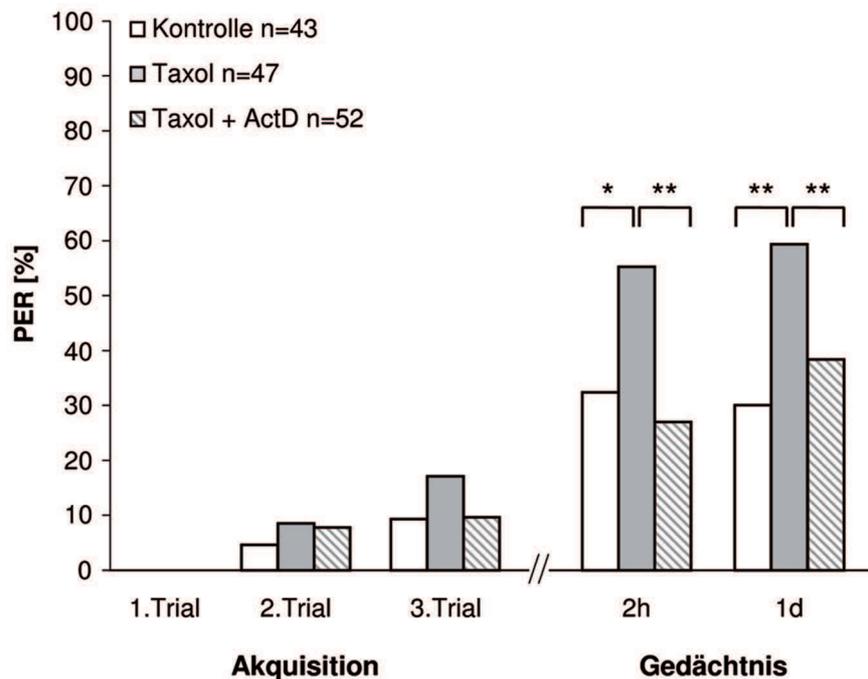


Abbildung 39: **Die Verbesserung des Gedächtnisses durch Taxol-Behandlung vor starkem Training ist transkriptionsabhängig.** Bienen wurden vor dem Experiment 2 h gehungert. Es erfolgte ein 3 Trial Training. Beim Gedächtnisabruf wurde nur der CS präsentiert (2 h, 1 d). Die Tiere wurden 1.5 h vor dem Training mit 1 μ l der entsprechenden Lösung injiziert. Kontrolle: 100% DMSO; Taxol: injiziert mit 1 mM Taxol in 100% DMSO, Endkonzentration in der Biene 10 μ M; Taxol+ActD: injiziert mit 1 mM Taxol sowie 2 mg/ml Actinomycin D (ActD) in 100% DMSO. Dargestellt ist die Anzahl der Bienen in %, die auf den Nelkenduft (CS) mit einem PER reagierten. n=Anzahl der getesteten Bienen. *: $p < 0.05$; **: $p < 0.01$ (Fisher Exact Test)

4.2.3 Gegenüberstellung der Colchizin- sowie Taxol-Behandlung

Im Vergleich der erhaltenen Resultate bezüglich der Auswirkung auf das olfaktorische Lernen und die Gedächtnisbildung lässt sich zusammenfassen, dass durch Injektion 1.5 h vor einem schwachen Training mit Colchizin keine Effekte sichtbar waren, wohingegen Taxol eine Verbesserung der Gedächtnisbildung (2 h, 1 d und 2 d) erzielte. Die Injektion von Colchizin vor starkem Training verursachte ein verschlechtertes Lernen und damit einhergehend eine Beeinträchtigung des LTM (2 d und 3 d). Im Gegensatz hierzu wurde durch die Taxol-Behandlung vor starkem Training das Lernen und die Ausbildung des LTM (2 h und 1 d) verbessert (siehe Abbildung 40).

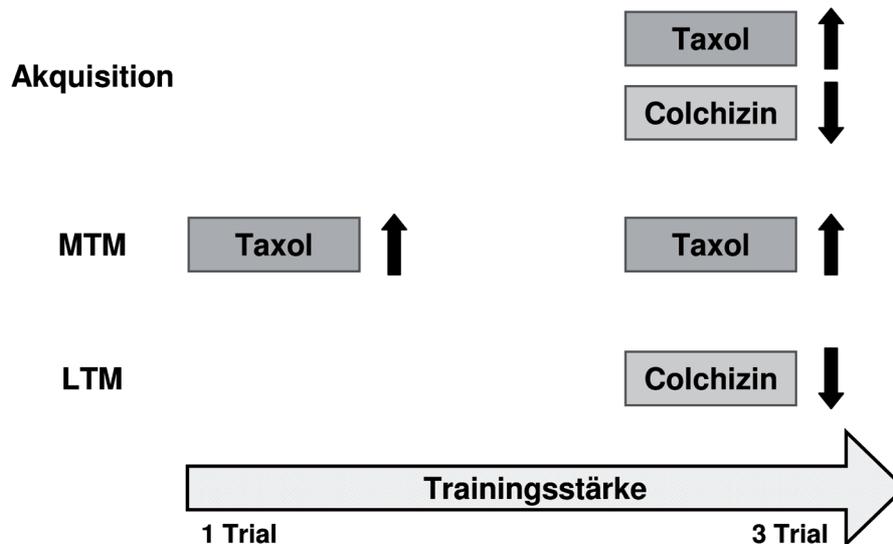


Abbildung 40: **Vergleich: Auswirkungen der Colchizin- sowie Taxol-Behandlung auf das olfaktorische Lernen und die Gedächtnisbildung.** Bienen wurden 1.5 h vor dem Training mit Colchizin bzw. Taxol injiziert. Dargestellt ist der gegensätzliche Effekt der beiden Drogen auf die Akquisition; Colchizin verschlechtert Lernen (Pfeil nach unten), wohingegen Taxol Lernen verbessert (Pfeil nach oben). Taxol verbessert auch die Ausbildung des MTM, im Gegensatz zu Colchizin, wodurch das LTM beeinträchtigt wird.

Die Drogen Colchizin und Taxol wirken konträr auf die Mikrotubuli-Integrität. Colchizin depolymerisiert, wohingegen Taxol Mikrotubuli stabilisiert. Beide Drogen zeigten einen gegensätzlichen Einfluss auch auf das olfaktorische Lernvermögen. Bienen, die mit Colchizin injiziert wurden, zeigten eine verschlechterte Akquisition. Bei Taxol-injizierten Bienen hingegen war die Akquisition verbessert. Zudem bewirkte Taxol sowohl bei schwachem als auch starkem Training eine Verbesserung des MTM, welche jeweils transkriptionsabhängig war. Colchizin hingegen verursachte eine Beeinträchtigung des LTM (Abbildung 40).

Es stellte sich die Frage, welche molekulare Auswirkungen die Colchizin- bzw. Taxol-Behandlung im Bienenhirn besitzen. Ob Mikrotubuli tatsächlich depolymerisiert bzw. stabilisiert werden, wurde im Folgenden anhand biochemischer Methoden überprüft (siehe Kapitel 4.3).

4.3 Biochemische Untersuchung der Colchizin- sowie Taxol-Behandlung

Die molekularen Auswirkungen der Colchizin- bzw. Taxol-Behandlung, die beide assoziative Lern- und Gedächtniseffekte hervorriefen, wurden anhand biochemischer sowie immunhistologischer Methoden untersucht.

4.3.1 Histologische Untersuchung der Colchizin-Behandlung

Colchizin sollte zur Depolymerisation der Mikrotubuli führen. Zur Überprüfung der Mikrotubuli-Integrität nach Colchizin-Behandlung im Bienenhirn (1.5 h sowie 18 h) wurde der Mikrotubuli-Gehalt bestimmt, indem Tubulin an Hirnschnitten immunhistologisch markiert und gemessen wurde. Damit war eine Aussage über die Depolymerisation der Mikrotubuli indirekt möglich: freie, also nicht inkorporierte Tubulin-Bausteine sind zu klein, um sie licht-mikroskopisch nachzuweisen. Weniger Signal lässt daher auf depolymerisierte Mikrotubuli schließen.

Die Tubulin-Färbung an den histologischen Schnitten erfolgte im Alphalobus des Pilzkörpers sowie im Zentralkörper von Bienenhirnen und ist in Abbildung 41 sowie 42 zu sehen. Bei den untersuchten Strukturen handelt es sich um wichtige Regionen für das olfaktorische Lernen. Zudem sind diese Strukturen in individuellen Schnitten stets eindeutig zu identifizieren.

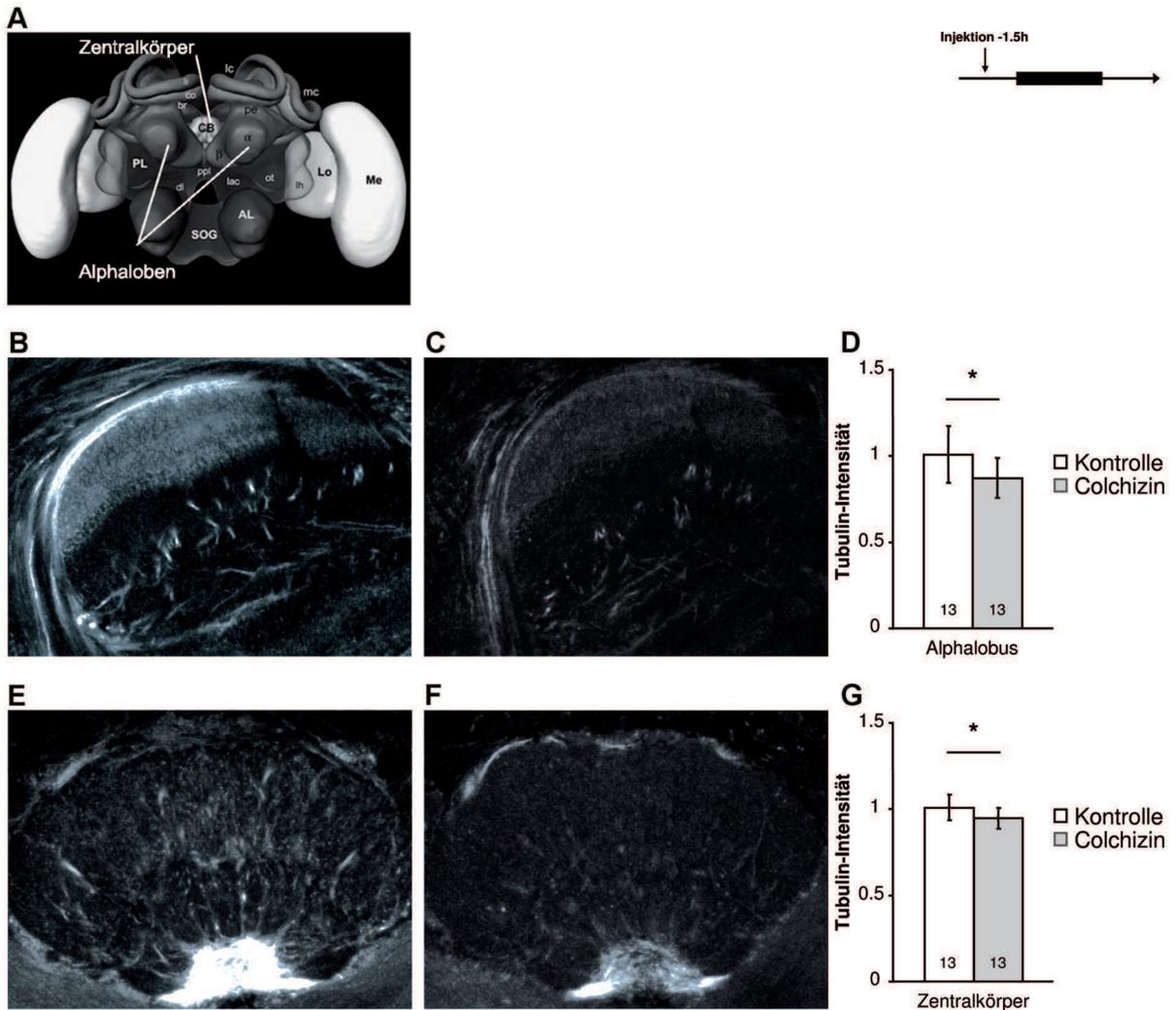


Abbildung 41: **Die 1.5 h Colchizin-Behandlung reduziert die Tubulin-Färbung im Alphasloben des Pilzkörpers sowie im Zentralkörper.** A: Übersicht der Strukturen eines Bienenhirns, angepasst aus Brandt *et al.* [22]. Anhand histologischer Schnitte (Beispiele siehe B, C, E, F) wurde die Tubulin-Intensität im Alphasloben sowie im Zentralkörper von Bienenhirnen bestimmt. Hierzu wurde den Bienen 1.5 h vor der Präparation der Gehirne $1 \mu\text{l}$ der entsprechenden Lösung injiziert. Kontrolle: 1x PBS; Colchizin: injiziert mit 1 mM Colchizin in 1x PBS, Endkonzentration in der Biene $10 \mu\text{M}$. B: Alphasloben (Kontrolle). C: Alphasloben (Colchizin). D: Auswertung der Färbungsintensität im Alphasloben. E: Zentralkörper (Kontrolle). F: Zentralkörper (Colchizin). G: Auswertung der Färbungsintensität im Zentralkörper. Die Daten sind auf die Tubulin-Intensität der Kontrolltiere normiert und als Mittelwert \pm Standardabweichung dargestellt. Vergrößerung 400x. Die Zahl im Balken entspricht der Anzahl der untersuchten Bienen. *: $p < 0.05$ (Student's t-Test)

Wurden Bienen 1.5 h mit Colchizin behandelt, so konnte sowohl im Alphalobus des Pilzkörpers als auch im Zentralkörper eine weniger starke Tubulin-Färbung festgestellt werden (Abbildung 41). Dies sprach für einen geringeren Polymerisationsgrad der Mikrotubuli durch Colchizin-Behandlung. Anschließend wurde die 18 h Colchizin-Behandlung überprüft (siehe Abbildung 42).

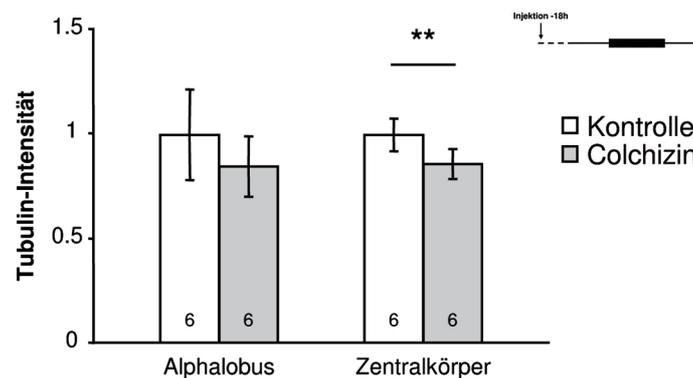


Abbildung 42: **Die 18 h Colchizin-Behandlung reduziert die Tubulin-Färbung im Zentralkörper.** Anhand histologischer Schnitte wurde die Tubulin-Intensität im Alphalobus sowie im Zentralkörper von Bienenhirnen bestimmt. Hierzu wurde den Bienen 18 h vor der Präparation der Gehirne 1 μ l der entsprechenden Lösung injiziert. Kontrolle: 1x PBS; Colchizin: injiziert mit 1 mM Colchizin in 1x PBS, Endkonzentration in der Biene 10 μ M. Die Daten sind auf die Tubulin-Intensität der Kontrolltiere normiert und als Mittelwert \pm Standardabweichung dargestellt. Die Zahl im Balken entspricht der Anzahl der untersuchten Bienen. **: $p < 0.01$ (Student's t-Test)

Auch nach 18 stündiger Colchizin-Behandlung wurde im Zentralkörper eine geringere Tubulin-Färbung festgestellt (Abbildung 42). Dies deutete ebenfalls auf die Depolymerisation der Mikrotubuli hin, die für den Akquisitionseffekt sowie das beeinträchtigte LTM bei der assoziativen Konditionierung verantwortlich zu sein scheint.

4.3.2 Histologische Untersuchung der Taxol-Behandlung

Taxol schützt die Mikrotubuli vor der Depolymerisation und verbessert folglich die Mikrotubuli-Integrität. Zur Überprüfung dieser Integrität wurde analog zu Colchizin auch nach Taxol-Behandlung die Tubulin-Intensität in Bienenhirnschnitten histologisch gemessen. Ein hohes Intensitätssignal deutet hierbei auf ein stabiles, polymerisiertes Mikrotubuli-Cytoskelett hin.

Die Tubulin-Färbung an den histologischen Schnitten erfolgte im Alphalobus des Pilzkörpers sowie im Zentralkörper von Bienenhirnen (siehe Abbildung 43).

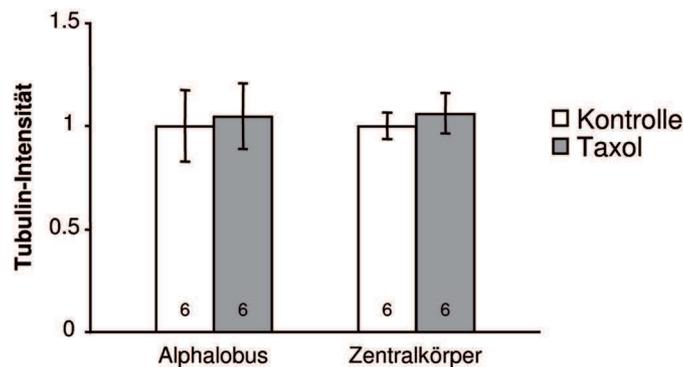


Abbildung 43: **Tubulin-Färbung im Alphasolus und im Zentralkörper nach Taxol-Behandlung.** Anhand histologischer Schnitte wurde die Tubulin-Intensität im Alphasolus sowie im Zentralkörper von Bienenhirnen bestimmt. Hierzu wurde den Bienen 1.5 h vor der Präparation der Gehirne $1 \mu\text{l}$ der entsprechenden Lösung injiziert. Kontrolle: 100% DMSO; Taxol: injiziert mit 1 mM Taxol in 100% DMSO, Endkonzentration in der Biene $10 \mu\text{M}$. Die Daten sind auf die Tubulin-Intensität der Kontrolltiere normiert und als Mittelwert \pm Standardabweichung dargestellt. Die Zahl im Balken entspricht der Anzahl der untersuchten Bienen.

Nach Taxol-Behandlung der Bienen konnte sowohl im Alphasolus als auch im Zentralkörper kein Unterschied in der Tubulin-Intensität festgestellt werden (Abbildung 43). Dies ist unter Umständen darauf zurückzuführen, dass bereits eine ausreichende Mikrotubuli-Integrität vorliegt, die mit Taxol nicht noch weiter verbessert werden konnte.

Um die Mikrotubuli-Integrität dennoch weiter zu untersuchen, wurde nachfolgend eine Anreicherung der Mikrotubuli nach Colchizin- bzw. Taxol-Behandlung durchgeführt (siehe Kapitel 4.3.3 sowie 4.3.4).

4.3.3 Integrität der Mikrotubuli nach Colchizin-Behandlung

Um die Depolymerisation nach Colchizin-Behandlung näher zu überprüfen, wurden Mikrotubuli aus Bienenhirnen mithilfe einer Ultrazentrifugation des Homogenates angereichert. Diese Methode ermöglichte die Auftrennung von polymerisiertem Tubulin, welches sich nach der Zentrifugation im Pellet befindet, sowie von freien Bausteinen der Mikrotubuli, die in Form von Tubulinmonomeren bzw. -dimeren im Überstand verbleiben.

Das Vorkommen von Tubulin in der Polymer-Fraktion (Pellet) wurde mittels ELISA nach der Ultrazentrifugation untersucht. Zusätzlich wurde die Tubulin-Acetylierung überprüft, da sie für die Integrität der Mikrotubuli bedeutsam ist und eine wichtige posttranslationale Modifikation für Lernen und Gedächtnis darstellt (siehe Abbildung 44).

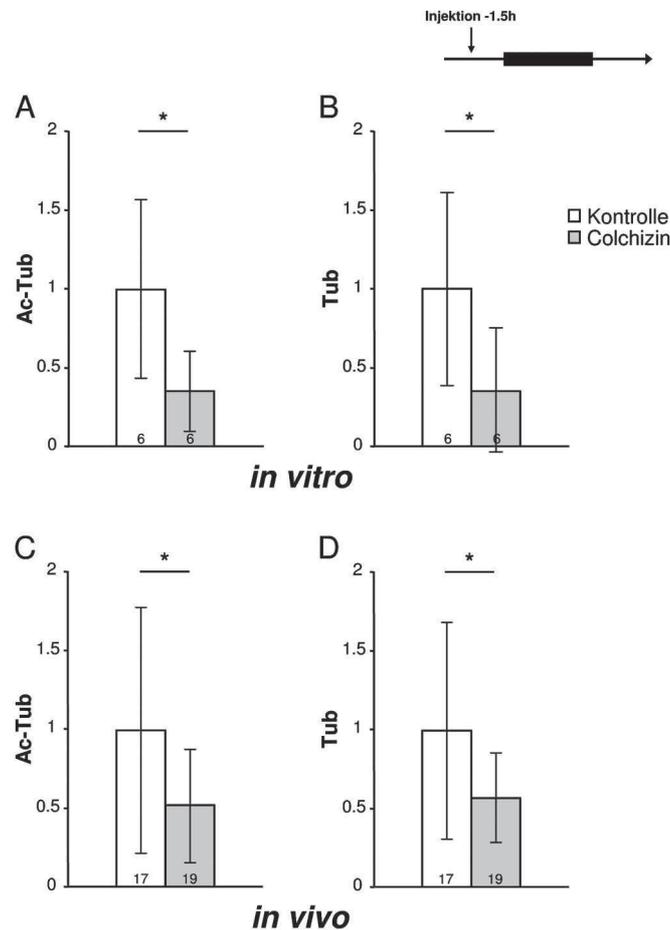


Abbildung 44: **Depolymerisation der Mikrotubuli im Bienenhirn nach *in vitro* sowie *in vivo* Colchizin-Behandlung.** A/B: Für *in vitro* Messungen wurde Homogenat aufgeteilt und 10 min mit der jeweiligen Lösung inkubiert. Kontrolle: 1x PBS; Colchizin: Endkonzentration 10 μ M. C/D: Für *in vivo* Messungen wurden Bienen mit 1 μ l der entsprechenden Lösung in den Thorax injiziert. Kontrolle: 1x PBS; Colchizin: injiziert mit 1 mM Colchizin in 1x PBS, Endkonzentration in der Biene 10 μ M. Nach 1.5 h wurden die Gehirne präpariert, polymerisierte Mikrotubuli mittels Ultrazentrifugation angereichert und die Tubulinmenge sowie Acetylierung in der erhaltenen Polymer-Fractionen im ELISA untersucht. Dargestellt sind die Mittelwerte der detektierten Menge von Ac-Tub sowie Tub, jeweils normalisiert auf die Kontrolle. Der Fehlerbalken gibt die Standardabweichung wieder. Die Zahl im Balken entspricht der Anzahl der getesteten Proben bzw. Bienen. *: $p < 0.05$ (gepaarter Student's t-Test für A/B, ungepaart für C/D)

Es zeigte sich, dass Colchizin sowohl *in vitro* als auch *in vivo* die Depolymerisation der Mikrotubuli sowie eine verminderte α -Tubulin Acetylierung im Bienenhirn induzierte (Abbildung 44). Die destruktive Mikrotubuli-Integrität könnte folglich die beeinträchtigte Akquisition bewirkt haben, da durch Depolymerisation sowie bei reduzierter Tubulin-Acetylierung intrazelluläre Transportstrecken zerstört sind.

4.3.4 Integrität der Mikrotubuli nach Taxol-Behandlung

Die stabilisierte Mikrotubuli-Struktur nach Taxol-Behandlung konnte in den histologischen Schnitten nicht gezeigt werden (vgl. Abbildung 43). Um eine mögliche Stabilisierung der Mikrotubuli dennoch weiter zu überprüfen, wurden polymerisierte Mikrotubuli aus Bienenhirnen mithilfe der Ultrazentrifugation des Homogenates angereichert, womit sich eine Aussage über die Mikrotubuli-Integrität nach Taxol-Behandlung erzielen ließ.

Das Vorkommen sowie die Acetylierung von Tubulin in der Polymer-Fraktion (Pellet) wurde analog zur Colchizin-Behandlung mittels ELISA nach Ultrazentrifugation untersucht (siehe Abbildung 45).

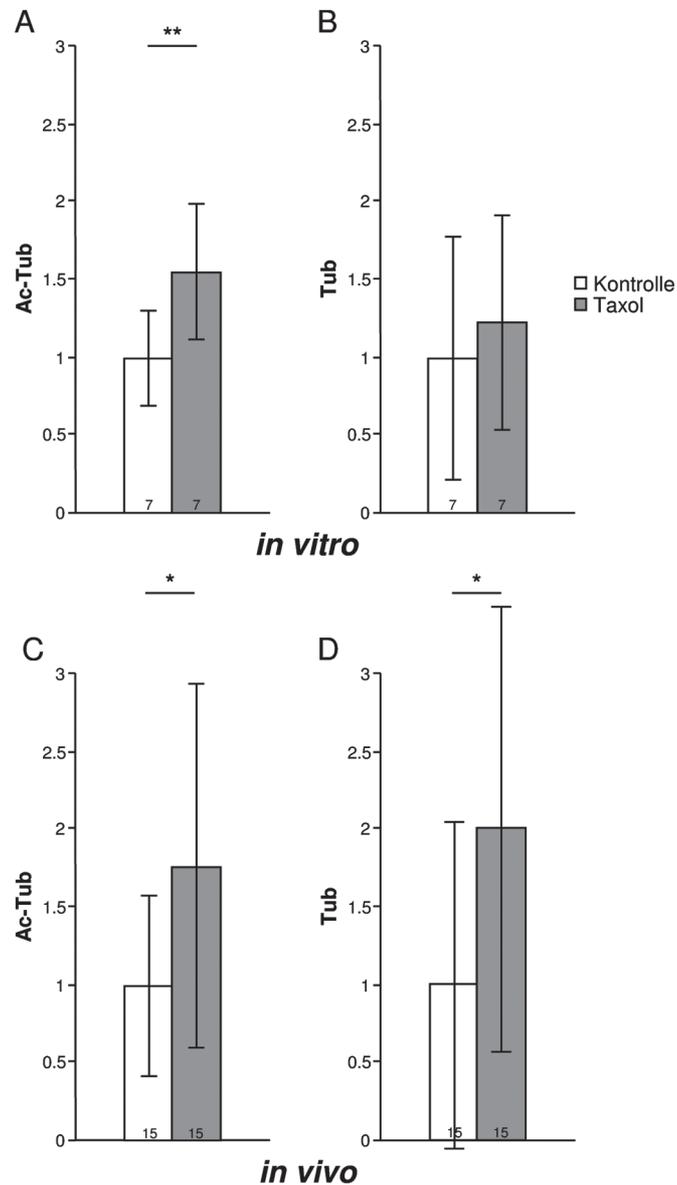


Abbildung 45: **Stabilisierung der Mikrotubuli im Bienenhirn nach *in vitro* sowie *in vivo* Taxol-Behandlung.** A/B: Für *in vitro* Messungen wurde Homogenat aufgeteilt und 10 min mit der jeweiligen Lösung inkubiert. Kontrolle: 100% DMSO; Taxol: Endkonzentration 10 μ M. C/D: Für *in vivo* Messungen wurden Bienen mit 1 μ l der entsprechenden Lösung in den Thorax injiziert. Kontrolle: 100% DMSO; Taxol: injiziert mit 1 mM Taxol in 100% DMSO, Endkonzentration in der Biene 10 μ M. Nach 1.5 h wurden die Gehirne präpariert, polymerisierte Mikrotubuli mittels Ultrazentrifugation angereichert und die Tubulinmenge sowie Acetylierung in der erhaltenen Polymer-Fractionen im ELISA untersucht. Dargestellt sind die Mittelwerte der detektierten Menge von Ac-Tub sowie Tub, jeweils normalisiert auf die Kontrolle. Der Fehlerbalken gibt die Standardabweichung wieder. Die Zahl im Balken entspricht der Anzahl der getesteten Proben bzw. Bienen. *: $p < 0.05$ **: $p < 0.01$ (gepaarter Student's t-Test für A/B, ungepaart für C/D)

Taxol stabilisierte sowohl *in vitro* als auch *in vivo* die Mikrotubuli, da neben vermehrt polymerisierten Mikrotubuli ebenso eine verstärkte Tubulin-Acetylierung festgestellt werden konnte (Abbildung 45). Dies könnte einen erleichterten intrazellulären Transport bewirkt und somit zu einer verbesserten Akquisition geführt haben. Des Weiteren könnte dadurch die Transkription schneller ablaufen und zur Gedächtnisverbesserung beitragen.

Folglich lassen sich die erhaltenen Lern- und Gedächtniseffekte nach Colchizin- bzw. Taxol-Behandlung durch eine veränderte Mikrotubuli-Integrität sowie veränderte Tubulin-Acetylierung im Bienenhirn erklären. Dennoch sind für Colchizin sowie Taxol zusätzliche Effekte beschrieben, die sich auf Lernen und Gedächtnis auswirken können und daher im Folgenden überprüft wurden. Hierbei wurde die Aktivität der Acetylcholin Esterase sowie die Aktivität von Ca^{2+} -Kanälen berücksichtigt, da gerade dem Akquisitionseffekt nach Colchizin- bzw. Taxol-Behandlung schnelle Prozesse zugrundeliegen müssen.

4.3.5 Aktivität der Acetylcholin Esterase nach Colchizin-Behandlung

Eine mögliche Wirkung von Colchizin, die in der Literatur gegensätzlich diskutiert wird, ist die Hemmung der Aktivität der Acetylcholin Esterase [106–109, 147]. Die AChE gilt als prä-synaptischer cholinergischer Marker, der in Alzheimer Patienten in seiner Aktivität reduziert ist, was auch durch Colchizin-Behandlung in Ratten induziert werden konnte (vgl. [108]). Das Enzym AChE gehört zur Gruppe der Cholinesterasen, welche spezifisch den Neurotransmitter Acetylcholin (ACh) in Essigsäure (Acetat) und Cholin hydrolysieren. Letzteres wird in die Synapse zurücktransportiert und recycelt. Ist die Aktivität der AChE vermindert, verbleibt ACh länger im synaptischen Spalt und das Recycling zur Erzeugung neuer Transmitter für neue Signalweiterleitungen ist verzögert. Dies könnte eine Erklärung für den Akquisitionsunterschied bei unterschiedlich langen Inter-Trial-Intervallen darstellen (vgl. Abbildung 31).

In der Literatur wird eine Reduktion der AChE Aktivität auf 30-40% nach einmaliger Colchizin-Behandlung beschrieben [108, 109]. Um die Aktivität der AChE im Bienenhirn zu messen, wurde ein colorimetrischer Aktivitätsassay angewandt. Der Assay basiert auf der entwickelten Methode von Ellman *et al.* [45] und musste zunächst zur Durchführung mit Bienenhirn etabliert sowie zur Messung in einer 96-well Mikrotiterplatte angepasst werden (siehe hierzu Kapitel 3.6.1 im Methodenteil).

Zur Überprüfung, ob die Colchizin-Behandlung in Bienen die AChE Aktivität hemmt, wurde Homogenat eines Bienenhirns *in vitro* mit Colchizin inkubiert bzw. Bienen mit Colchizin injiziert, um auch Rückschlüsse über die Wirkung von Colchizin *in vivo* ziehen zu können (siehe Abbildung 46).

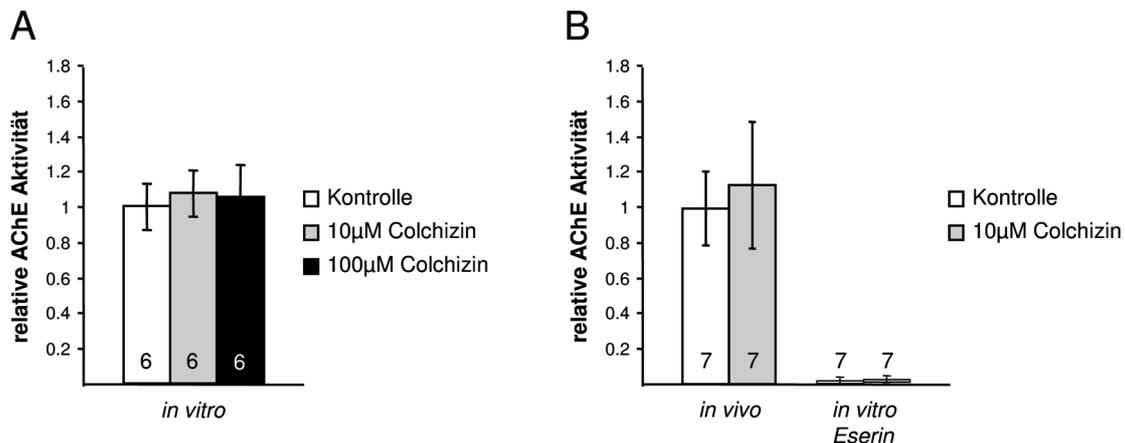


Abbildung 46: **Sowohl nach *in vitro* als auch *in vivo* Colchizin-Behandlung ist die ACh Esterase Aktivität unverändert.** Die Esterase Aktivität wurde colorimetrisch im Bienenhirnhomogenat gemessen. A: Für *in vitro* Messungen wurde Homogenat 10 min mit der jeweiligen Lösung inkubiert. Kontrolle: 1x PBS; Colchizin: Endkonzentration 10 µM bzw. 100 µM in 1x PBS. B: Für *in vivo* Messungen wurden Bienen 1.5 h vor der Präparation der Gehirne mit 1 µl der entsprechenden Lösung injiziert. Kontrolle: 1x PBS; Colchizin: injiziert mit 1 mM Colchizin in 1x PBS, Endkonzentration in der Biene 10 µM. Proben der *in vivo* Colchizin-Behandlung wurden zusätzlich *in vitro* mit 3 µM Eserin inkubiert. Die Zahl im Balken entspricht der Anzahl der getesteten Bienen.

Aus Abbildung 46 geht hervor, dass weder eine *in vitro* noch eine *in vivo* Colchizin-Behandlung die Aktivität der Acetylcholin Esterase im Bienenhirn veränderte. Weiterhin ließ sich feststellen, dass mit nachträglicher *in vitro* Eserin-Behandlung als Positivkontrolle die AChE Aktivität sowohl in der Kontrolle als auch in der Homogenatprobe Colchizin-behandelter Bienen reduziert werden konnte. Demnach konnte eine veränderte AChE Aktivität nach Colchizin-Behandlung als Ursache für den Akquisitionseffekt ausgeschlossen werden.

4.3.6 Aktivität von Ca²⁺-Kanälen

Eine weitere, mögliche Ursache des Akquisitionseffektes nach Modulation der Mikrotubuli-Integrität ist die Aktivität von Ca²⁺-Kanälen. Das Ca²⁺-Signal spielt als second messenger eine wichtige Rolle bei der Neurotransmission und damit bei Lernen und der Gedächtnisbildung.

So werden beispielsweise L-Typ Ca^{2+} -Kanäle durch Colchizin in Myocyten inaktiviert bzw. durch Taxol potentiell aktiviert [56]. Dies kann unabhängig von der Mikrotubuli-Integrität geschehen, wenn die beiden Drogen beispielsweise direkt an die Kanäle binden. Alternativ könnte es zur Änderung der Ca^{2+} -Kanal Kinetik aufgrund einer veränderten Mikrotubuli-Integrität nach Colchizin- bzw. Taxol-Behandlung und damit einhergehend einer veränderten Protein-Interaktion kommen.

Um in der Honigbiene die Aktivität von Ca^{2+} -Kanälen im Hinblick auf Lernen und Gedächtnis zu überprüfen, wurden Bienen 0.5 h vor starkem Training mit Diltiazem bzw. Verapamil, beides spezifische Inhibitoren der L-Typ Ca^{2+} -Kanäle, injiziert (siehe Abbildung 47). Damit sollte überprüft werden, ob die spezifische Hemmung der Ca^{2+} -Kanäle das gleiche Resultat, also eine beeinträchtigte Akquisition zum Vorschein bringt, wie es durch Colchizin-Behandlung gezeigt wurde (vgl. Abbildung 31).

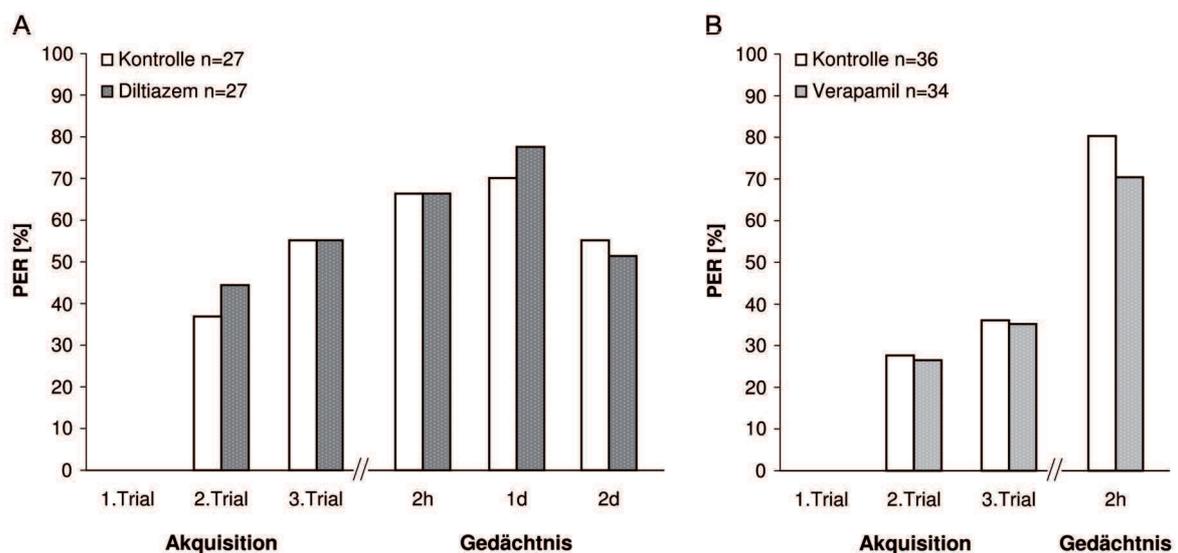


Abbildung 47: **Die Injektion von spezifischen Ca^{2+} -Kanal Inhibitoren vor starkem Training verursacht keine Lern- oder Gedächtniseffekte.** Bienen wurden vor dem Experiment über Nacht gehungert und 0.5 h vor dem Training mit $1 \mu\text{l}$ der entsprechenden Lösung injiziert. A: Kontrolle: 1x PBS. Diltiazem: injiziert mit 10 mM in 1x PBS, Endkonzentration in der Biene $100 \mu\text{M}$. B: Kontrolle: 10% DMSO in 1x PBS. Verapamil: injiziert mit 3-5 mM in 10% DMSO, Endkonzentration in der Biene $30\text{-}50 \mu\text{M}$. Es erfolgte ein 3 Trial Training (3 CS/US Paarungen) mit einem Inter-Trial-Intervall von 2 min. Beim Gedächtnisabruf wurde nur der CS präsentiert (2 h, 1 d, 2 d). Dargestellt ist die Anzahl der Bienen in %, die auf den Nelkenduft (CS) mit einem PER reagierten. n=Anzahl der getesteten Bienen.

Aus Abbildung 47 geht hervor, dass sich die Diltiazem-Behandlung nicht auf das Lernen und die Gedächtnisausbildung auswirkte. Es wurden zwei verschiedene Konzentrationen ($10+100 \mu\text{M}$) verwendet, die beide keinen Effekt verursachten. Exemplarisch

wurde die höhere Konzentration gezeigt (Abbildung 47 A).

Auch für Verapamil wurden zwei verschiedene Konzentrationen (30+50 μM) untersucht, die beide das gleiche Resultat hervorbrachten und daher zusammengefasst wurden (Abbildung 47 B). Da von besonderem Interesse die Überprüfung der Akquisition war und mit Diltiazem bereits keinerlei Effekte auf Lernen und die Gedächtnisbildung zu sehen waren, wurde bei den Experimenten mit Verapamil nur die Akquisition sowie das MTM betrachtet. Es war hierbei ebenfalls kein Effekt auf Lernen oder Gedächtnis zu sehen.

Es kann durch Inhibition der L-Typ Ca^{2+} -Kanäle folglich nicht der Akquisitionseffekt festgestellt werden, der nach Colchizin-Behandlung auftrat. Demnach konnte auch die verminderte Aktivität von L-Typ Ca^{2+} -Kanälen als Ursache für den Akquisitionseffekt ausgeschlossen werden.

Anzumerken ist jedoch, dass es sich hierbei um erste Versuche zur Ca^{2+} -Kanal Inhibition handelte. Es müsste in nachfolgenden Untersuchungen ferner sichergestellt werden, dass die verwendeten Konzentrationen an Diltiazem sowie Verapamil auch tatsächlich zur Inhibition der Kanäle führen.

Schlussendlich ist davon auszugehen, dass Colchizin und Taxol über ihren Einfluss auf die Mikrotubuli-Integrität die Effekte auf die Akquisition sowie die Gedächtnisbildung bewirken. Dem zugrunde muss ein schnell induzierbarer, molekularer Mechanismus wie die Acetylierung von α -Tubulin liegen, da andere schnelle Effekte wie die AChE Aktivität sowie die Aktivität von Ca^{2+} -Kanälen ausgeschlossen werden konnten.

Durchaus ist die Acetylierung von Proteinen eine bedeutsame posttranslationale Modifikation für das Lernen und die Gedächtnisbildung. Ob sich die Acetylierung des α -Tubulins sowie der Histone, als bekanntestes Substrat der Acetylierung, mit Parametern modulieren lässt, die wie Colchizin und Taxol Lern- und Gedächtniseffekte in Honigbienen hervorrufen, wurde daher im Folgenden näher überprüft. Dadurch konnte ferner untersucht werden, ob die Tubulin-Acetylierung als molekularer Modulator für Lernen und die Gedächtnisbildung gilt.

4.4 Acetylierung von α -Tubulin als molekularer Modulator für Lernen und die Gedächtnisbildung

Obwohl Tubulin ein Substrat der Acetylierung ist, stellen die Histone das wohl bekannteste Substrat der HATs bzw. HDACs dar und standen lange im Fokus der Untersuchungen. So zeigen zahlreiche Studien, dass die Acetylierung der Histone über eine veränderte Genexpression Gedächtniseffekte verursacht [1, 17, 64, 66, 104, 110, 112, 127, 128, 145, 146, 192, 204]. Die Tatsache, dass es neben den Histonen noch weitere Proteine geben muss, deren Acetylierung regulatorisch auf Lernen und Gedächtnis wirkt, wurde bisher in der Literatur kaum betrachtet (vgl. [174]).

Zur Überprüfung, ob neben der Histon- auch die Tubulin-Acetylierung für Lernen und die Gedächtnisbildung wichtig ist, mussten zunächst entsprechende Hilfsmittel etabliert werden, die eine Detektion der Acetylierung von Tubulin sowie eine Unterscheidung der einzelnen Acetylierungssubstrate erlaubten.

4.4.1 Spezifität der verwendeten Acetylierungs-Antikörper

Zur Untersuchung der Acetylierung von Proteinen, insbesondere von α -Tubulin erfolgte ein biochemischer Nachweis mithilfe von Antikörpern gegen die Gesamtprotein- sowie Tubulin-Acetylierung, wobei deren Spezifität zunächst überprüft werden musste. Die Histonacetylierung wurde als Referenz mit überprüft; die beiden Antikörper H3K18ac sowie H3 wurden bereits in unserer Arbeitsgruppe etabliert und ihre Spezifität ist kontrolliert (siehe [81]).

4.4.1.1 Charakterisierung des kommerziellen Acetylierungs-Antikörpers

Um in dieser Arbeit zu überprüfen, ob neben den Histonen noch weitere Proteine acetyliert werden, wurde die Gesamtproteinacetylierung mithilfe eines kommerziellen, polyklonalen Antikörpers (Acetylated-Lysine Antikörper (Ac-Lys), cell signaling) untersucht. Zur Überprüfung, welche acetylierten Proteine der Ac-Lys Antikörper erkennt, wurde der Antikörper zunächst im Western Blot auf Bienenhirnhomogenat ausgetestet (siehe Abbildung 48).

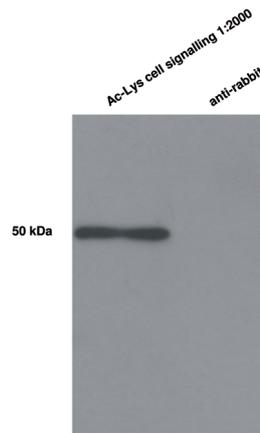


Abbildung 48: **Austesten des kommerziellen Acetylierungs-Antikörpers Ac-Lys im Western Blot.** Homogenat eines Bienenhirns wurde in einem 15%igen SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt und die Proteine auf eine Nitrocellulose Membran transferiert. Acetylierte Proteine wurden mit dem Acetylated-Lysine Antikörper (Ac-Lys) der Firma cell signaling nachgewiesen. Es wurde weiterhin eine Negativkontrolle für den sekundären anti-rabbit Antikörper mitgeführt.

Dabei fiel auf, dass der Ac-Lys Antikörper wider Erwarten nur eine Proteinbande bei ca. 50 kDa erkannte (Abbildung 48). Laut Hersteller sollte der Antikörper allerdings in der Lage sein acetylierte Histone, das Tumorsupressorprotein p53, die HATs CBP und PCAF sowie chemisch acetyliertes BSA zu detektieren. Damit wurde mehr als nur eine Bande erwartet.

Es stellt sich die Frage, welches 50 kDa große Protein von Ac-Lys erkannt wird. Ein Protein dieser Größe, welches häufig in der Zelle vorkommt und stark acetyliert wird, ist das α -Tubulin, so dass die Vermutung nahe liegt, dass Ac-Lys ausschließlich acetyliertes Tubulin erkennt.

4.4.1.2 Charakterisierung der Antikörper gegen α -Tubulin

Zur Untersuchung und zum Nachweis von α -Tubulin bzw. der Acetylierung des Proteins wurden die monoklonalen Antikörper Anti- α -Tubulin (Tub) sowie Anti-Acetylated-Tubulin (Ac-Tub) der Firma Sigma-Aldrich verwendet.

Zur Überprüfung, ob die beiden Antikörper lediglich Tubulin bzw. acetyliertes Tubulin detektieren, wurden sie im Western Blot auf Bienenhirnhomogenat getestet (siehe Abbildung 49).

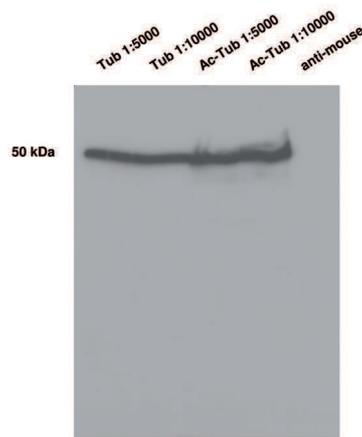


Abbildung 49: **Austesten der verwendeten Antikörper gegen α -Tubulin im Western Blot.** Homogenat eines Bienenhirns wurde in einem 10%igen SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt und die Proteine auf eine Nitrocellulose Membran transferiert. Tubulin wurde mit dem Anti- α -Tubulin (Tub) Antikörper und acetyliertes Tubulin mit dem Anti-Acetylated-Tubulin (Ac-Tub) Antikörper der Firma Sigma-Aldrich nachgewiesen. Für den sekundären Antikörper wurde ein Negativkontrolle (anti-mouse) mitgeführt.

Alle Antikörper gegen α -Tubulin bzw. gegen die Acetylierung des Proteins (an Lysin40) erkannten lediglich eine Proteinbande bei 50 kDa, was dem Molekulargewicht von Tubulin entspricht. Daher eignen sich alle Tubulin-Antikörper für ELISA Analysen oder zur Färbung histologischer Präparate.

4.4.2 Charakterisierung eines selbst hergestellten Acetylierungs-Antikörpers

Da bei Verwendung des Ac-Lys Antikörpers mehrere Banden im Western Blot zu erwarten waren und die zu sehende 50 kDa-Bande die einzige Proteinbande darstellte (vgl. Abbildung 48) wurde im Rahmen dieser Arbeit versucht, einen eigenen Antikörper zum Nachweis acetylierter Proteine in Mäusen herzustellen.

Das erhaltene Serum aceBSA 4 wurde für nachfolgende Untersuchungen ausgewählt. Zur Immunisierung wurden Proteine (BSA, EGG) verwendet, die zuvor chemisch acetyliert wurden. Die Proteine wurden beim Immunisieren der Mäuse abgewechselt, um die Erkennung acetylierter Lysinreste in verschiedenen Proteinen zu forcieren (siehe Kapitel 3.7 im Methodenteil).

Vor der Verwendung des erhaltenen Serums war zunächst dessen Charakterisierung nötig. Dazu zählte u.a. die Unterscheidung von acetylierten und nicht acetylierten Proteinen. Weiterhin sollte mithilfe des gewonnenen Serums die Detektion acetylierter

Proteine im Bienenhirnhomogenat möglich sein, so dass der polyklonale Antikörper z.B. auch für ELISA-Analysen tauglich ist.

4.4.2.1 aceBSA 4 unterscheidet zwischen acetylierten und nicht-acetylierten Antigenen

Zur Überprüfung, ob der selbst hergestellte Acetylierungs-Antikörper aceBSA 4 zwischen acetylierten und nicht-acetylierten Proteinen (BSA, EGG, Histone-Mix sowie Histone H3) diskriminiert, wurden die jeweiligen Proteine an eine Mikrotiterplatte gebunden und im ELISA mit dem Mauserum aceBSA 4 inkubiert (siehe Abbildung 50).

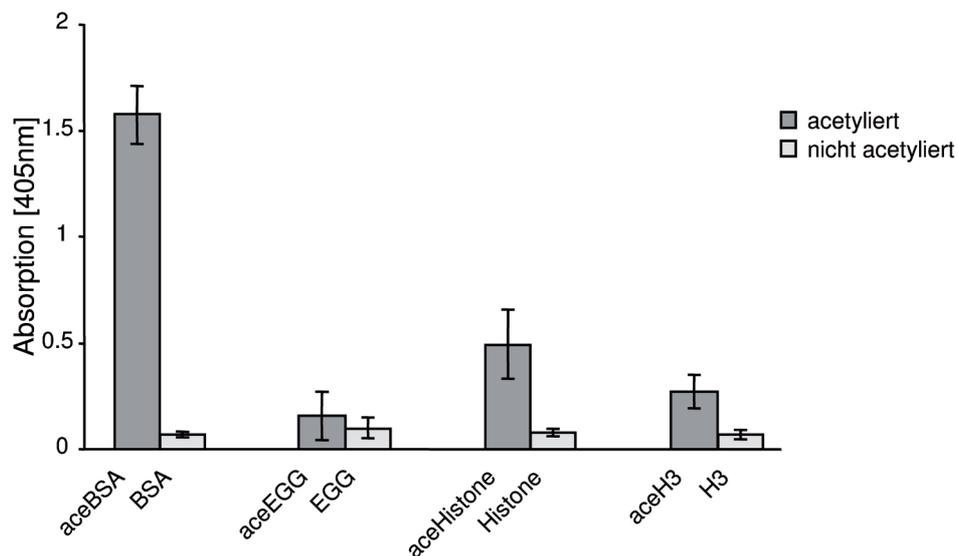


Abbildung 50: **Erkennung acetylierter Antigene mithilfe des Mauserums aceBSA 4.** Die Proteine BSA, EGG, Histone sowie H3 wurden chemisch acetyliert. Acetylierte (ace) und nicht-acetylierte Proteine (je 10 μg) wurden zum Austesten der Antikörperspezifität im ELISA mit dem Mauserum aceBSA 4 untersucht. Dargestellt sind die Mittelwerte der Absorption bei 405nm aus 9 unabhängigen Messungen. Der Fehlerbalken gibt die Standardabweichung wieder.

Das Mauserum aceBSA 4 unterschied zwischen der acetylierten (ace) und nicht acetylierten Form der untersuchten Proteine (Abbildung 50). Die höchste Absorption wurde für acetyliertes BSA (aceBSA) gemessen, da BSA die meisten Lysinreste besitzt. Kaum Unterschied wurde für die Diskriminierung zwischen aceEGG und EGG erreicht, wohingegen aceHistone sowie aceH3 gut von Histonen bzw. H3 in nicht acetylierter Form mithilfe des Serums unterschieden wurden.

Demnach eignete sich der gewonnene Antikörper zum Nachweis acetylierter Proteine und wurde nachfolgend für Untersuchungen der Proteinacetylierung in Bienen getestet.

4.4.2.2 aceBSA 4 erkennt nur ein Protein im Bienenhirn

Zur Überprüfung, welche Proteine der aceBSA 4 Antikörper in Bienen erkennt, wurde das Mausserum im Western Blot auf Bienenhirnhomogenat ausgetestet (siehe Abbildung 51).

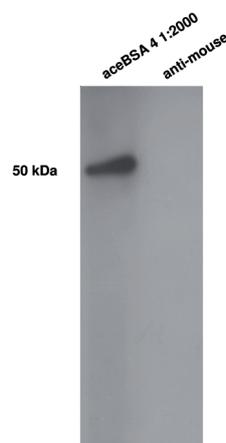


Abbildung 51: **Erkennung von Proteinen mithilfe aceBSA 4 im Western Blot.** Homogenat eines Bienenhirns wurde in einem 15%igen SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt und die Proteine auf eine Nitrocellulose Membran transferiert. Proteine wurden mit dem aceBSA 4 Mausserum nachgewiesen. Für den sekundären Antikörper wurde ein Negativkontrolle (anti-mouse) mitgeführt.

Das selbst hergestellte Mausserum aceBSA 4 zur Detektion acetylierter Proteine lieferte folglich das gleiche Resultat wie der kommerzielle Ac-Antikörper (vgl. Abbildung 48 und 51). Beide Antikörper detektierten im Western Blot nur eine Bande von ca. 50 kDa, sollten als Acetylierungs-Antikörper jedoch mehrere Proteinbanden detektieren können. Es liegt der Verdacht nahe, dass im Homogenat eines Bienenhirns eine sehr große Menge an acetyliertem Tubulin (50 kDa) vorliegt, so dass die Gesamtacetylierungsantikörper vornehmlich an Tubulin binden und dadurch keine weiteren Proteine detektiert werden. Nachfolgende Experimente wurden lediglich mit dem Ac-Lys Antikörper durchgeführt; aceBSA 4 wurde nicht weiter verwendet.

4.4.3 Modulation der Proteinacetylierung mit Lern- und Gedächtnis-beeinflussenden Faktoren

In dieser Arbeit wurde gezielt das Nicht-Histon-Zielprotein α -Tubulin untersucht, welches bedeutsam für das olfaktorische Lernen und Gedächtnis der Honigbiene ist (siehe Kapitel 4.1 und 4.2). Im Folgenden wird die Acetylierung des Tubulins näher überprüft. Hierzu werden Lern- und Gedächtnis-modulierende Faktoren verwendet, für die bereits Effekte in Honigbienen beschrieben sind. Dazu zählt die Hemmung der HDACs durch TSA, welches die Acetylierung von Histonen erhöht sowie die Gedächtnisbildung erleichtert [81]. Weiterhin werden auch mit physiologischen Behandlungen wie Stress in Form einer UV-Behandlung oder durch Sättigung der Bienen die Modulation der Acetylierung von α -Tubulin sowie den Histonen im Bienenhirn überprüft; beide Faktoren weisen wie die Behandlung mit Colchizin und Taxol bereits Effekte beim Lernen auf [53, 86].

4.4.3.1 Die HDAC-Inhibition mit TSA aktiviert die Tubulin-, die allgemeine Protein- sowie die Histonacetylierung

Eine HDAC-Inhibition führt bekanntermaßen zu einer gesteigerten Histonacetylierung, welche die Gedächtnisbildung positiv beeinflusst (vgl. [81, 104, 112, 192]). In der vorliegenden Arbeit wurde nun gezielt auch die α -Tubulin Acetylierung nach Behandlung mit TSA überprüft. Die allgemeine Protein- sowie Histonacetylierung an Histon H3 (H3K18ac) wurden als Referenz ebenfalls im ELISA untersucht (siehe Abbildung 52).

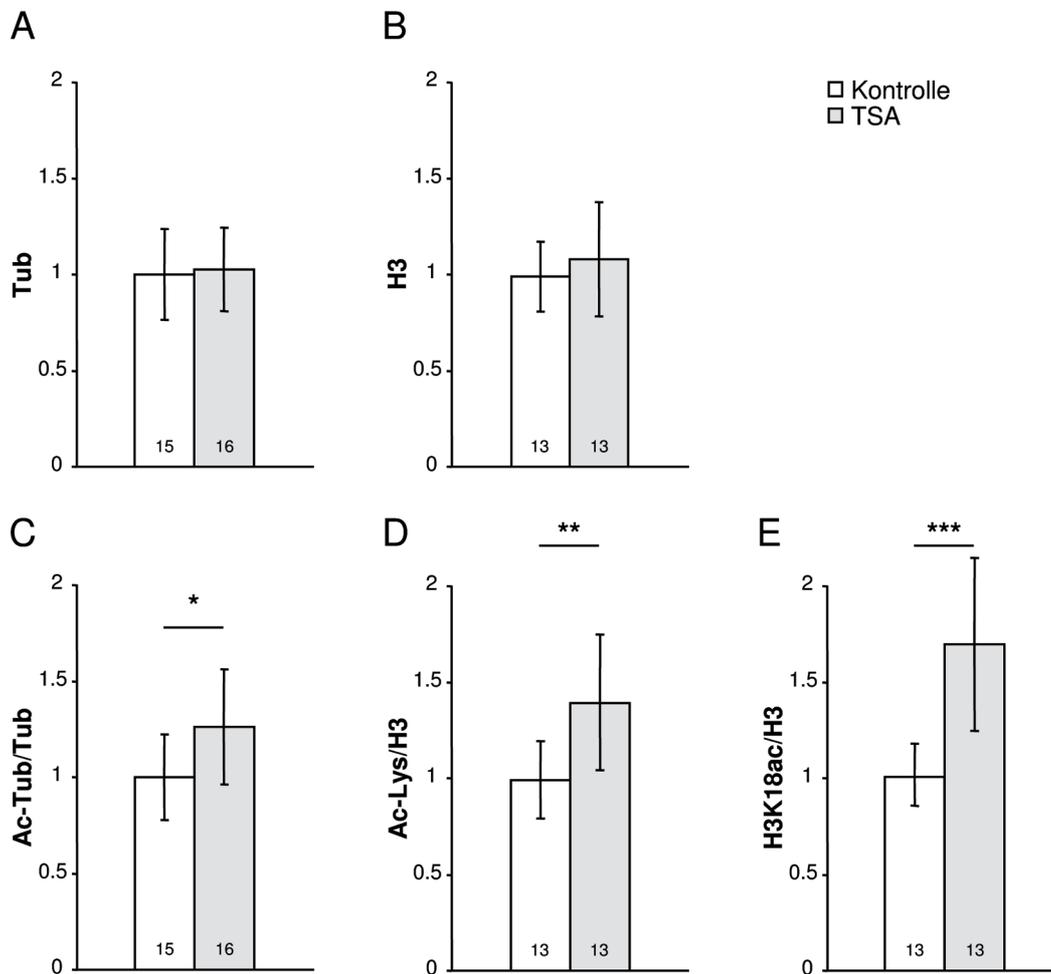


Abbildung 52: **Erhöhung der Tubulin-, der allgemeinen Protein- sowie der Histonacetylierung nach TSA-Behandlung.** Bienen wurden über Nacht gehungert und am Morgen mit $1 \mu\text{l}$ der entsprechenden Lösung injiziert. Kontrolle: injiziert mit 20% DMSO in 1x PBS. TSA: injiziert mit 1.65 mM in 20% DMSO, Endkonzentration in der Biene $165 \mu\text{M}$. 2 h nach Injektion wurden die Gehirne präpariert und die Acetylierung mittels ELISA untersucht. Dargestellt sind die Mittelwerte der detektierten Menge von Tub (A) sowie H3 (B) sowie die Mittelwerte des Verhältnisses von Ac-Tub zu Tub (C), Ac-Lys (D) bzw. H3K18ac (E) zu H3, jeweils normalisiert auf die Kontrolltiere. Der Fehlerbalken gibt die Standardabweichung wieder. Die Zahl im Balken entspricht der Anzahl der getesteten Bienen. *: $p < 0.05$; **: $p < 0.01$; ***: $p < 0.001$ (Student's t-Test)

Aus Abbildung 52 D und E geht hervor, dass die HDAC-Inhibition mit TSA in der Biene zu einer Zunahme der Gesamtprotein- sowie der Histonacetylierung führte. Die Gesamtmenge an Tubulin sowie Histon H3 war durch TSA-Behandlung unverändert (Abbildung 52 A und B), so dass die Proteinmenge jeweils zur Normalisierung der Acetylierung verwendet werden konnte.

Ferner konnte durch TSA-Behandlung eine Erhöhung der Acetylierung von α -Tubulin in Bienen erzielt werden (Abbildung 52 C), was im Einklang mit publizierten Ergebnissen in anderen Tiermodellen steht [42, 126, 210]. Die erhöhte Acetylierung von Tubulin nach TSA-Behandlung kann folglich die Mikrotubuli-Integrität verbessern und könnte so der Gedächtnisverbesserung dienen. Dies wurde nachfolgend durch histologische Analyse weiter überprüft.

4.4.3.1.1 TSA fördert die Mikrotubuli-Integrität im Zentralkörper

Zur Bestimmung des Mikrotubuli-Gehaltes nach TSA-Behandlung wurden histologische Schnitte angefertigt und die Tubulin-Intensität bestimmt, so dass indirekt eine Aussage über die Mikrotubuli-Integrität erreicht werden konnte. Die Tubulin-Färbung an den histologischen Schnitten erfolgte im Alphasolus des Pilzkörpers sowie im Zentralkörper von Bienenhirnen (siehe Abbildung 53).



Abbildung 53: **Erhöhte Tubulin-Färbung im Zentralkörper nach TSA-Behandlung.** Anhand histologischer Schnitte wurde die Tubulin-Intensität im Alphasolus sowie im Zentralkörper von Bienenhirnen bestimmt. Hierzu wurde den Bienen 2 h vor der Präparation der Gehirne $1 \mu\text{l}$ der entsprechenden Lösung injiziert. Kontrolle: 20% DMSO in 1x PBS. TSA: injiziert mit 1.65 mM in 20% DMSO, Endkonzentration in der Biene $165 \mu\text{M}$. Die Daten sind auf die Tubulin-Intensität der Kontrolltiere normiert und als Mittelwert \pm Standardabweichung dargestellt. Die Zahl im Balken entspricht der Anzahl der untersuchten Bienen. *: $p < 0.05$ (Student's t-Test)

Nach TSA-Behandlung der Bienen konnte im Zentralkörper eine stärkere Tubulin-Färbung festgestellt werden. Im Alphaschäufel des Pilzkörpers blieb die Intensität der Färbung unverändert (Abbildung 53). Dies sprach für einen höheren Polymerisationsgrad der Mikrotubuli im Zentralkörper, der durch TSA und damit durch eine verstärkte Tubulin-Acetylierung (vgl. Abbildung 52) induziert wurde.

4.4.3.2 UV-Behandlung reduziert die α -Tubulin Acetylierung und aktiviert die allgemeine Protein- sowie Histonacetylierung

Bislang ist recht wenig über die Regulation der α -Tubulin Acetylierung bekannt. Zwar moduliert die TSA-Behandlung die Acetylierung von Tubulin, bewirkt jedoch ausschließlich Gedächtniseffekte. Aus Kapitel 4.1 und 4.2 ergab sich, dass Colchizin sowie Taxol die Tubulin-Acetylierung und ebenso die Akquisition beeinflussten. Ob Lernen an sich schon die Integrität der Mikrotubuli bzw. die Tubulin-Acetylierung verändert, ist bisher *in vivo* noch nicht gezeigt worden.

Im Folgenden wurde daher untersucht, ob es auch mit physiologischen Faktoren, die Effekte bereits in der Akquisition hervorrufen, möglich ist, eine veränderte Tubulin- und auch Histonacetylierung in Honigbienen zu erzielen.

So wurde in der Arbeitsgruppe bislang gezeigt, dass sich Stress, z.B. in Form einer UV-Behandlung, negativ auf das olfaktorische Lernen der Honigbiene auswirkt [86]. Um zu untersuchen, ob dieser Stress die Acetylierung von Proteinen im Bienenhirn beeinflusst, wurden Bienen mit UV-Licht behandelt und nachfolgend die α -Tubulin Acetylierung, die allgemeine Protein- sowie die Histonacetylierung an Histon H3 (H3K18ac) im ELISA untersucht. Zur Kontrolle wurden Bienen parallel Weißlicht ausgesetzt (siehe Abbildung 54).

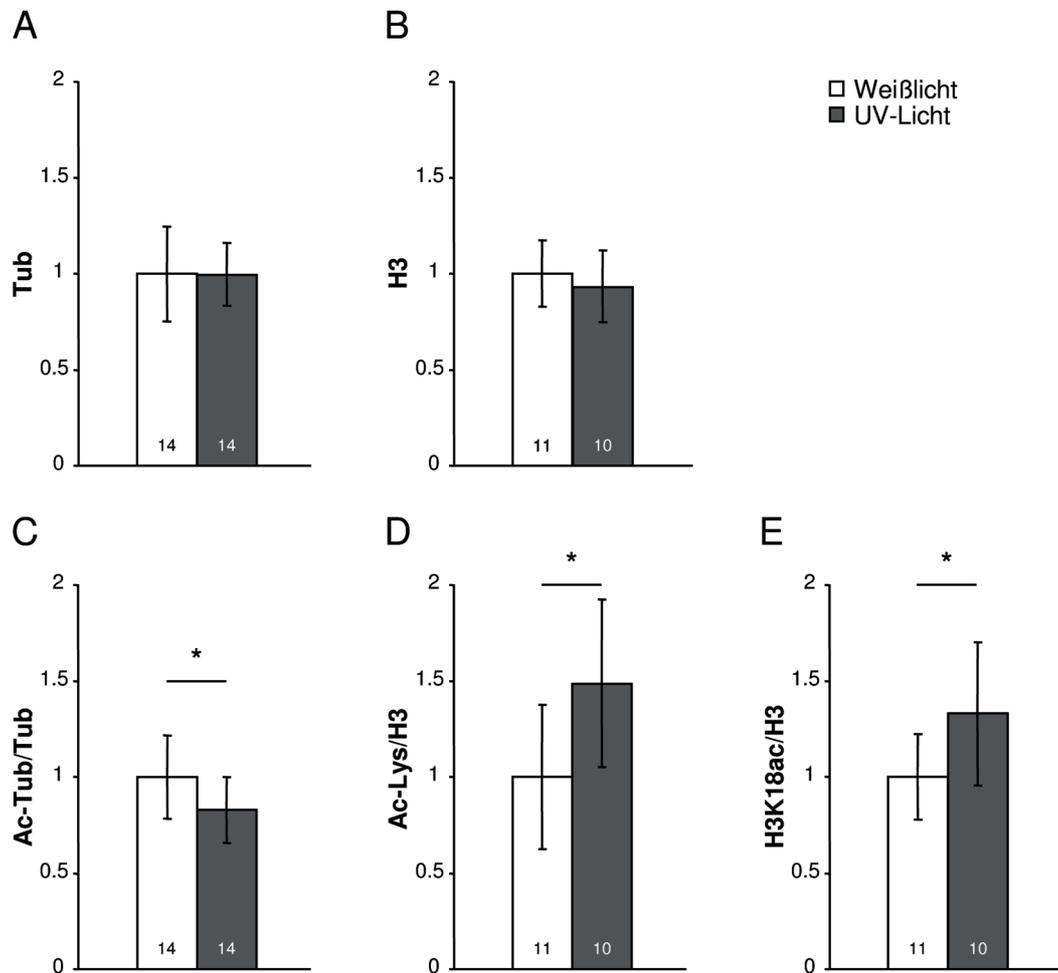


Abbildung 54: **Abnahme der Tubulin-Acetylierung sowie Anstieg der allgemeinen Protein- sowie Histoneacetylierung nach UV-Licht-Behandlung.** Bienen wurden für 30 min mit Weißlicht bzw. UV-Licht behandelt. Nach einer Ruhephase von 30 min wurden die Gehirne präpariert und die Acetylierung mittels ELISA untersucht. Dargestellt sind die Mittelwerte der detektierten Menge von Tub (A) sowie H3 (B) sowie die Mittelwerte des Verhältnisses von Ac-Tub zu Tub (C), Ac-Lys (D) bzw. H3K18ac (E) zu H3, jeweils normalisiert auf die Weißlichtkontrolle. Der Fehlerbalken gibt die Standardabweichung wieder. Die Zahl im Balken entspricht der Anzahl der getesteten Bienen. *: $p < 0.05$ (Student's t-Test)

Die Gesamtmenge an Tubulin sowie Histon H3 war durch UV-Licht-Behandlung unverändert (Abbildung 54 A und B), so dass die Proteinmenge erneut zur Normalisierung der Acetylierung verwendet werden konnte.

Hierbei zeigte sich, dass eine UV-Behandlung zwar zur Abnahme der Tubulin- (Abbildung 54 C), jedoch auch zum Anstieg der allgemeinen Protein- sowie der Histonacetylierung (Abbildung 54 D und E) führte. Mit dieser Stressform lassen sich folglich die Acetylierung sowie Lernen modulieren. Da die Acetylierung von α -Tubulin mit der Integrität der Mikrotubuli in Zusammenhang steht, könnten die erwähnten Akquisitionseffekte [86] u.a. auch auf der reduzierten Tubulin-Acetylierung nach UV-Behandlung beruhen.

4.4.3.3 Sättigung aktiviert die Tubulin-Acetylierung sowie die allgemeine Proteinacetylierung

Als weiteren physiologischen Faktor wurde getestet, ob sich auch der Sättigungszustand der Bienen auf die Acetylierung auswirkt. Hintergrund ist die Tatsache, dass Bienen, die kurzzeitig gehungert wurden, ein schlechteres Lernvermögen zeigen als Bienen, die beispielsweise über Nacht gehungert wurden [53]. Der metabolische Status beeinflusst folglich die Effizienz von appetitivem Lernen.

Um die Acetylierung in Abhängigkeit vom Sättigungszustand der Bienen zu untersuchen, wurden Bienen vor der Hirnpräparation entweder über Nacht gehungert (im Folgenden als „Hunger“ bezeichnet) oder über Nacht gehungert und am Morgen 2 h vor der Präparation mit 1 M Sucroslösung satt gefüttert (im Folgenden als „Satt“ bezeichnet). Die Untersuchung der α -Tubulin Acetylierung, der allgemeinen Protein- sowie der Histonacetylierung an Histon H3 (H3K18ac) erfolgte mittels ELISA (siehe Abbildung 55).

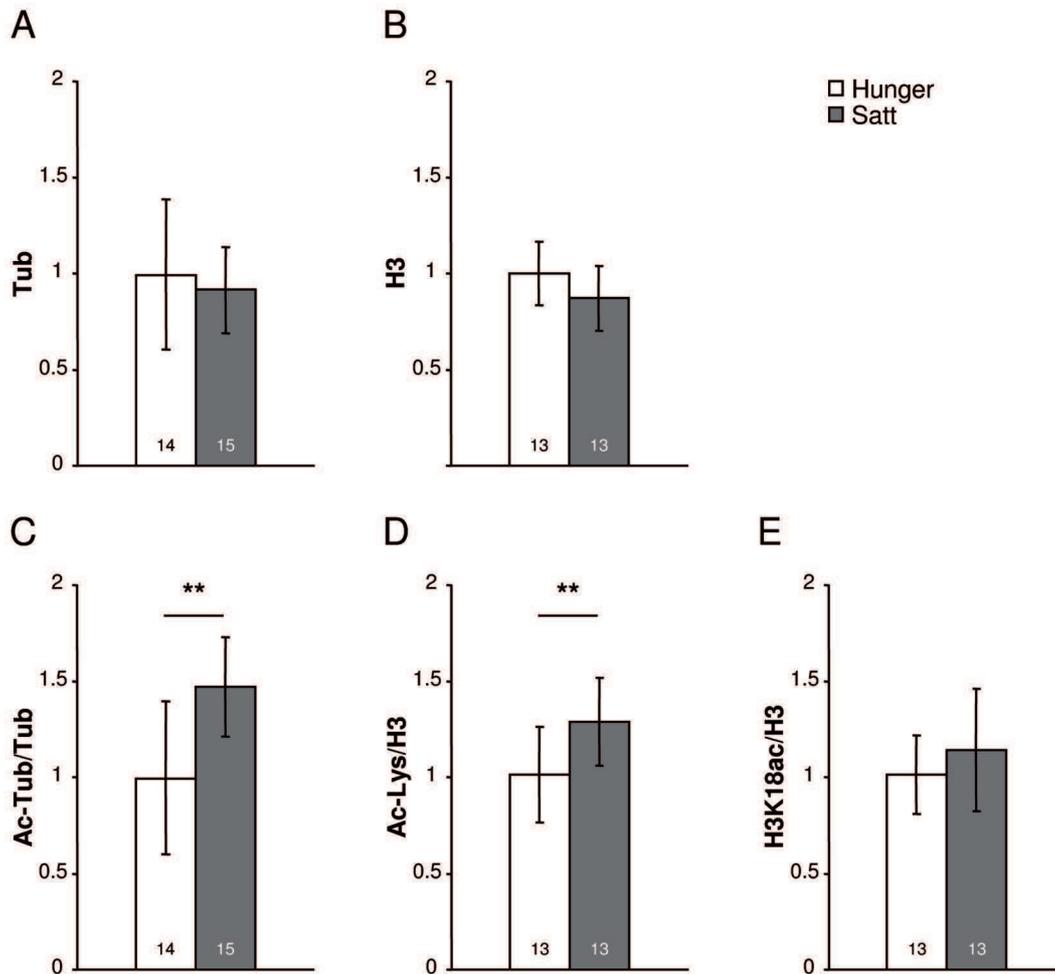


Abbildung 55: **Steigerung der Tubulin-Acetylierung sowie der allgemeinen Proteinacetylierung nach Satt Füttern.** Bienen wurden über Nacht gehungert bzw. über Nacht gehungert und am Morgen mit mindestens 5 Tropfen 1 M Sucroslösung satt gefüttert. Nach 2 h wurden die Gehirne präpariert und die Acetylierung mittels ELISA untersucht. Dargestellt sind die Mittelwerte der detektierten Menge von Tub (A) sowie H3 (B) sowie die Mittelwerte des Verhältnisses von Ac-Tub zu Tub (C), Ac-Lys (D) bzw. H3K18ac (E) zu H3, jeweils normalisiert auf die hungrigen Bienen. Der Fehlerbalken gibt die Standardabweichung wieder. Die Zahl im Balken entspricht der Anzahl der getesteten Bienen. **: $p < 0.01$ (Student's t-Test)

Der metabolische Status von Bienen bewirkte demnach eine gesteigerte Tubulin-Acetylierung sowie einen Anstieg der allgemeinen Proteinacetylierung (Abbildung 55 C und D). Daher lässt sich auch durch Fütterung der Bienen Lernen und gleichermaßen die Protein- sowie auch die Tubulin-Acetylierung modulieren. Der Sättigungszustand wirkt sich folglich auch auf die Mikrotubuli-Integrität aus.

Abbildung 56 fasst die erhaltenen Ergebnisse zur Untersuchung der Acetylierung von Tubulin bei Lern- und Gedächtnis-modulierenden Behandlungen zusammen.

Behandlung	α -Tubulin Acetylierung	Akquisition	Gedächtnis
Colchizin	↓	↓	↓
Taxol	↑	↑	↑
TSA	↑	-/-	↑
UV-Stress	↓	↓	↓
Sättigung	↑	↓	↓

Abbildung 56: **Zusammenhang zwischen der α -Tubulin Acetylierung und Effekten bei Lernen und Gedächtnisbildung.** Durch Behandlung von Bienen mit Pharmaka wie Colchizin, Taxol und TSA sowie mit physiologischen Faktoren wie UV-Stress und Sättigung lassen sich die Acetylierung sowie Lernen und Gedächtnis beeinflussen. Pfeil=Erhöhung/Reduktion der Acetylierung bzw. Akquisition und Gedächtnis.

Die TSA-Behandlung beeinflusste lediglich die Gedächtnisbildung, wohingegen die beiden Drogen Colchizin und Taxol vornehmlich auf die Akquisition wirkten und daran gekoppelt die Gedächtnisbildung beeinflussten. Ebenso wirken sich UV-Stress sowie die Fütterung bereits auf das Lernvermögen der Bienen aus. Alle untersuchten Parameter modulierten zudem die α -Tubulin Acetylierung.

Abschließend lässt sich somit feststellen, dass Tubulin tatsächlich ein für Lernen und Gedächtnis relevantes Nicht-Histon-Zielprotein der Acetylierung darstellt. Die Acetylierung des α -Tubulins sowie die Integrität des Mikrotubuli-Cytoskeletts spielen eine entscheidende Rolle für die Effizienz des olfaktorischen Lernens und für die Gedächtnisbildung der Honigbiene. Daher fungiert die Mikrotubuli-Integrität als zentraler molekularer Modulator für Lernen und Gedächtnis.

5 Diskussion

Anhand der vorliegenden Arbeit wurde die Bedeutung der Mikrotubuli-Integrität für das olfaktorische Lernen und Gedächtnis am Modellorganismus Honigbiene aufgezeigt.

Die Störung der Integrität verursachte schwere Lern- und Gedächtnisdefizite, wohingegen die Stabilisierung der Mikrotubuli sowohl Lernen als auch das Gedächtnis verbesserte. Die Modulation der Mikrotubuli-Integrität wirkte sich wider Erwarten bereits auf die Akquisition aus; jedoch wurde erstmals gezeigt, dass eine Beeinträchtigung des Gedächtnisses nur zusammen mit einer Beeinträchtigung der Akquisition auftrat und von der Anzahl der Training-Trials sowie von der Dauer des Inter-Trial-Intervalls abhing. Aufgrund dieses frühen Effektes ist die Mikrotubuli-Integrität für recht schnelle Prozesse im Minutenbereich notwendig. Da sich bei Modulation der Integrität auch die Acetylierung des α -Tubulins veränderte, könnte sie durch einen dadurch bedingt veränderten intrazellulären Transport zu den schnellen Effekten beitragen. Zudem wurde hier gezeigt, dass die Acetylierung von Tubulin als molekularer Modulator für Lernen und Gedächtnis fungiert.

5.1 Bedeutung der Mikrotubuli-Integrität für lang- und kurzfristige Prozesse

Zur Aufklärung einer Bedeutung der Mikrotubuli-Integrität für Lernen und Gedächtnis wurden die beiden Inhibitoren Colchizin und Taxol verwendet.

Der natürliche Hemmstoff Colchizin aus der Herbstzeitlosen (*Colchicum autumnale*) bindet äquimolar an das Strukturprotein α -Tubulin mit einer Halbwertszeit von 20-40 h [142] und verhindert dabei die Anheftung neuer Tubulin-Bausteine an das wachsende Plus-Ende der Mikrotubuli. Die Polymerisation ist dadurch blockiert und es kommt zur Depolymerisation der Mikrotubuli [91, 116]. Dies konnte auch im Rahmen dieser Arbeit im Zentralhirn von Colchizin-behandelten Bienen nachgewiesen werden.

Im Gegensatz hierzu wurde durch Taxol, einem natürlichen Extrakt der pazifischen Eibe (*Taxus brevifolia*), die Stabilisierung der Mikrotubuli im Zentralhirn der Bienen erreicht. Taxol bindet an GDP-gebundenes β -Tubulin und schützt so den Abbau, verhindert also die Depolymerisation der Mikrotubuli [124, 208]. Das Cytoskelett gewinnt

an Stabilität und intrazelluläre Transportprozesse werden erleichtert. Dies spiegelt sich auch in einer erhöhten Tubulin-Acetylierung wider, da dadurch Motorproteine eine höhere Affinität zur Bindung an Mikrotubuli besitzen, wodurch der Transport begünstigt ist [25, 57, 161].

Die hier verwendeten Drogen Colchizin und Taxol sind schon lange als sogenannte anti-karzinogene Substanzen bekannt [61, 133]. Sie verändern die Dynamik der Mikrotubuli, wodurch die Mitose (Zellteilung) verhindert wird und so der Zelltod in Krebszellen ausgelöst werden soll [91, 139, 167, 208]. Diese Wirkung besitzt allerdings keinen direkten Einfluss auf Lernen und Gedächtnis, da eine Zellteilung in Nervenzellen nicht mehr stattfindet. Dennoch bringt dies natürlich cytotoxische Effekte für den Organismus mit sich [51, 188]. Diese Toxizität lässt sich jedoch für die hier untersuchten Colchizin- sowie Taxol-Konzentrationen im Umgang mit Honigbienen ausschließen. Die Mortalitätskurven belegen, dass behandelte Tiere die gleiche Überlebensrate besaßen wie Kontrolltiere. Ein verändertes Lernen oder Gedächtnis kann folglich nicht auf eine erhöhte Apoptose oder veränderte Vitalität der Bienen zurückgeführt werden.

Aufgrund der Notwendigkeit der Mikrotubuli-Integrität für einen funktionierenden axonalen Transport in Neuronen war die Hypothese der vorliegenden Arbeit, dass eine Modulation dieser Integrität einzig Effekte im Langzeitgedächtnis verursacht.

Nach assoziativem Lernen kommt es so zur Ausbildung eines Mittelzeitgedächtnisses (MTM), welches auf posttranslationalen Modifikationen von Ionenkanälen oder vorhandenen Proteinen beruht [94]. Zur Ausbildung eines stabilen Langzeitgedächtnisses (LTM) ist jedoch die Neusynthese von Proteinen und mRNA, also Translation und Transkription sowie der axonale Transport dieser neuen Proteine und mRNA erforderlich, um langfristige morphologische Veränderungen in Neuronen auszubilden. Auf zellulärer Ebene sind hierzu koordinierte Strukturveränderungen in der prä- und postsynaptischen Nervenzelle erforderlich, an denen Mikrotubuli beteiligt sind. So wird die Größe der Synapsen angepasst, zusätzliche Synapsen werden ausgebildet oder bereits Existierende wieder eliminiert, wenn sie nicht benötigt werden [5, 6, 94].

Wird der intrazelluläre Transport der hierzu benötigten Moleküle durch Colchizin gestört, war folglich zu erwarten, dass kein LTM ausgebildet werden kann. Hingegen sollte die Förderung der Mikrotubuli-Integrität durch Taxol und damit des Transports die Ausbildung eines LTM begünstigen.

Bei appetitiven Konditionierungsexperimenten mit Honigbienen, in denen die Integrität der Mikrotubuli zuvor verändert wurde, traten jedoch wider Erwarten Effekte bereits

während der Akquisition und nicht ausschließlich im Langzeitgedächtnis auf. Die Integrität spielt also nicht nur bei der Ausbildung eines LTM, sondern auch für kurzfristige Prozesse eine wichtige Rolle. Es handelt sich um besonders schnelle Effekte, die bereits im Minutenbereich während des Trainings sichtbar wurden. Auch das Mittelzeitgedächtnis (2 h nach Training) war bei lang andauernder Störung der Mikrotubuli-Struktur durch Colchizin sowie nach Verbesserung der Mikrotubuli-Integrität durch Taxol betroffen, was letztlich ebenfalls auf recht frühe Prozesse hindeutet, an denen Mikrotubuli beteiligt sind.

5.2 Die Mikrotubuli-Integrität ist entscheidend bei assoziativem, jedoch nicht bei nicht-assoziativem Lernen

Nach Modulation der Mikrotubuli-Integrität durch die beiden Drogen waren in Bienen weder Zuckerwasserempfindlichkeit (Responsiveness) noch nicht-assoziative Lernformen (Habituation und Sensitisierung) verändert. Demnach führte die Injektion von Colchizin und Taxol nicht zu einer veränderten Wahrnehmung der Zuckerbelohnung oder gar zu einer veränderten Reizprozessierung des US. Dies ist Voraussetzung, um assoziative Lern- und Gedächtniseffekte eindeutig zu erfassen. Die Responsiveness beispielsweise sollte nach Injektion von Drogen unverändert sein, da Tiere mit hoher Empfindlichkeit für Zuckerwasser auch empfindlicher für andere Reize wie beispielsweise olfaktorische, gustatorische und visuelle Reize sind. Diese Empfindlichkeit könnte das assoziative Lernverhalten eines Tieres beeinflussen. So wurde gezeigt, dass Tiere mit hoher Empfindlichkeit für ihre Belohnung auch eine bessere Akquisition sowie ein verbessertes Gedächtnis bei appetitiver Konditionierung besitzen [166].

Mithilfe der einfachen Lernformen Habituation und Sensitisierung können Veränderungen der Reaktion auf Reize nach Injektion von Drogen aufgeklärt werden. Während der Habituation verliert der bedeutsame Reiz der Zuckerbelohnung (US) seinen Wert und löst keine Reaktion mehr aus. Die Verarbeitung des Reizes war nach Colchizin- bzw. Taxol-Behandlung nicht verändert. Während der Sensitisierung gewinnt der bedeutungslose Reiz (Duft, CS) an Bedeutung und löst eine Reaktion aus. Eine veränderte Duftwahrnehmung nach Modulation der Mikrotubuli-Integrität durch Colchizin und Taxol konnte ebenfalls ausgeschlossen werden.

Eine Behandlung von Ratten mit Taxol veränderte desgleichen nicht deren Aufmerk-

samkeit in einem kognitiven Test zur seriellen Wahlreaktion, führte jedoch zur einer erhöhten Sensitivität gegenüber mechanischer Stimulation [19]. Weitere, die Sensorik betreffende Untersuchungen wie Reizwahrnehmung oder Prozessierung nach Modulation der Mikrotubuli-Integrität wurden bisher in der Literatur noch nicht behandelt.

Somit wurde in dieser Arbeit gezeigt, dass die Modulation der Mikrotubuli-Integrität spezifisch nur assoziatives Lernen beeinflusst. Lediglich die Paarung der beiden Stimuli CS und US löste Effekte aus. Dies bedeutet, dass für das assoziative Lernen intakte Mikrotubuli erforderlich sind.

Nakayama *et al.* etablierten ein Modell für Alzheimer, welches ebenfalls auf einer gestörten Mikrotubuli-Integrität basiert [141]. Die hierzu durchgeführte Colchizin-Infusion in den Hippocampus von Ratten verursachte dosis-abhängig ein verzögertes Lernvermögen der räumlichen Lernaufgabe. Auch die auftretende motorische Beeinträchtigung der Ratten hing von der Colchizin-Dosis ab und beruhte auf der Depolymerisation der Mikrotubuli ohne neuronale Schäden hervorzurufen. Ältere Studien zeigten eine solche Lernbeeinträchtigung nur bei Verwendung von Colchizin-Konzentrationen, die die Zellen des Gyrus Dentatus im Hippocampus zerstören [141].

Kumar *et al.* konnten ebenfalls die Colchizin-induzierte Beeinträchtigung des räumlichen Lernens von Ratten zeigen, ohne dass Ratten nach der Behandlung in ihrer Motorik eingeschränkt waren [109].

Weiterhin zeigten Eijkenboom *et al.*, dass Vincristin, ein alternatives Mikrotubuli-Gift, Mikrotubuli schädigt und so dosis-abhängig räumliches Lernen von Ratten behindert [44]. Für Vincristin ist zudem beschrieben, dass es in Tieren Verhaltensdefizite wie die Beeinträchtigung von motorischen Fertigkeiten und Reflexen sowie kognitive Dysfunktionen hervorruft [153, 175, 185].

Dies steht folglich im Einklang mit den in dieser Arbeit für Biene gezeigten assoziativen Lernbeeinträchtigungen nach Colchizin-Behandlung. Hierbei handelt es sich jedoch nicht um räumliches Lernen, sondern um ein appetitives, olfaktorisches Lernparadigma, was im Zusammenhang mit Colchizin bzw. Taxol bisher in der Literatur nicht beschrieben wurde.

Im Gegensatz zu Colchizin führte die Behandlung mit Taxol zu einem verbesserten assoziativen Lernen in Bienen. Gleiches zeigte sich für Tubacin, einen selektiven HDAC6-Inhibitor, welcher ausschließlich zu einer verstärkten Tubulin-Acetylierung führt. Allerdings ist die Verfügbarkeit des Tubacins stark limitiert. Durch freundliche Unterstützung von Herrn Dr. S. Schreiber (Harvard Universität) konnten in der vorlie-

genden Arbeit dennoch erste Lernversuche an Honigbienen nach Tubacin-Behandlung durchgeführt werden und deuteten auf ein verbessertes Lernen hin (nicht gezeigt).

Diese Verbesserung des Lernens wurde ebenfalls nach chronischer Nicotinamid (NAM) Fütterung in Mäusen beschrieben [62]. NAM ist ein Inhibitor der HDAC Enzyme der Klasse III (Sirtuine) und damit von SIR2, neben HDAC6 die zweite Tubulin-Deacetylase. NAM gleicht im Alzheimer Maus-Modell kognitive Beeinträchtigungen sowie Defekte im räumlichen Lernen aus und verursacht weiterhin eine Reduktion der Phospho-Tau Menge, welche maßgeblich für Alzheimer verantwortlich ist. Normalerweise stabilisiert Tau das Mikrotubuli-Cytoskelett, wohingegen eine Fehlfaltung zum Verlust dieser Funktion und damit zur Destabilisierung sowie zur neuronalen Dysfunktion führt [23]. Weiterhin bewirkt NAM eine Zunahme der MAP2c Menge [62] und erzielt somit insgesamt eine verbesserte Mikrotubuli-Integrität, welche wiederum den neuronalen Transport begünstigt [187].

Auch durch chronische Behandlung von Mäusen mit Epothilon D (EpoD), einer weiteren Mikrotubuli-stabilisierenden Verbindung, konnte eine gesteigerte Mikrotubuli-Dichte und eine verbesserte axonale Mikrotubuli-Integrität im ZNS gezeigt werden [23]. Die positiven Effekte bewirkten ebenfalls eine verbesserte Lernleistung.

Anzumerken ist allerdings, dass die Behandlung mit NAM sowie EpoD jeweils chronisch über einen längeren Zeitraum erfolgten. In der Biene ließ sich bereits durch eine einmalige Injektion von Colchizin bzw. Taxol das olfaktorische Lernen beeinflussen. Dies ist ein großer Vorteil Bienen als Modellorganismus zur Untersuchung der Mikrotubuli-Integrität sowie auch von Lernen und Gedächtnis zu nutzen.

Es stellt sich die Frage, was Ursache der assoziativen Lerneffekte nach Modulation der Mikrotubuli-Integrität ist und ob hierbei der Akquisition eine Schlüsselfunktion zukommt.

5.3 Bedeutung der Mikrotubuli-Integrität für die Akquisition

Die Gedächtnisbildung kann in die Phase der Gedächtnisanlegung, also des Lernens (Akquisition) sowie in die Phase der Gedächtnisfestigung (Konsolidierung) aufgeteilt werden [43]. Das Gedächtnis lässt sich dann wiederum in verschiedene Phasen einteilen und kommt durch ineinandergreifende Signalkaskaden zustande. Es wird durch unterschiedliche Mechanismen induziert und aufrecht erhalten [169].

Zur Überprüfung welche Phase, sprich Akquisition oder Gedächtniskonsolidierung,

eine stabile Mikrotubuli-Integrität benötigt, wurden verschiedene Injektionszeitpunkte von Colchizin vor und nach dem Training der Bienen ausgewählt.

Im Rahmen dieser Dissertation wurde so erstmalig gezeigt, dass Colchizin auf die Akquisition sowie die Ausbildung des LTM in Honigbiene gleichermaßen verschlechternd wirkte. Allerdings war hierbei der Injektionszeitpunkt von Colchizin entscheidend. Frühestens 1.5 h vor dem Training verursachte Colchizin die genannten Beeinträchtigungen. Eine Injektion unmittelbar vor dem Training oder gar erst in der Konsolidierungsphase, was zuvor in der Literatur noch nicht beschrieben wurde, bewirkte keine Veränderung des olfaktorischen Lernens bzw. der Gedächtnisleistung. Andere Studien befassten sich hauptsächlich mit räumlichem Lernen und führten eine Behandlung mit Inhibitoren meist lange vor dem Training durch. So wurde auch in Ratten durch Störung der Mikrotubuli-Integrität eine dosis-abhängige Akquisitionsbeeinträchtigung gezeigt [44, 141]. Durch Verbesserung dieser Integrität wiederum ließ sich die Akquisition von Mäusen bzw. Ratten positiv beeinflussen [23, 62].

5.4 Zusammenhang zwischen Akquisitionseffekt und Langzeitgedächtnis

In dieser Arbeit wurde mit den beiden konträr wirkenden Inhibitoren Colchizin und Taxol eine gegensätzliche Beeinflussung der Mikrotubuli-Integrität im Hinblick auf das assoziative Lernen und Gedächtnis gezeigt.

Im Gegensatz zu Experimenten mit Colchizin, bei denen im schwachen Training der Bienen kein Effekt zu sehen war, ließ sich durch Taxol bereits im 1. Trial Training eine deutliche Gedächtnisverbesserung (MTM) induzieren. Diese Verbesserung zeigte sich auch nach starkem Training (MTM sowie LTM) und war in allen Fällen transkriptionsabhängig. Wurde Taxol zusammen mit dem Transkriptionsblocker Actinomycin D gegeben, kam die Verbesserung der Gedächtnisse nicht mehr zum Vorschein.

Colchizin hingegen wirkte sich negativ auf die Akquisition aus und rief bei starkem Training schwere Lern- sowie Gedächtnisdefizite der Bienen hervor.

Wurde die Integrität der Mikrotubuli demnach positiv oder negativ verändert, beeinflusste dies die Akquisition, also die Anlegung des Gedächtnisses. Die beeinträchtigte Akquisition trat stets gemeinsam mit einem verschlechterten Gedächtnis auf. War die Akquisition nach Störung der Mikrotubuli-Integrität durch Colchizin verschlechtert, ver-

ursachte dies auch eine Beeinträchtigung des LTM. So bewirkte auch eine längere Wirkdauer von Colchizin, welches 18 h vor dem Training injiziert wurde, nicht nur eine starke Beeinträchtigung der Akquisition, sondern wirkte sich sogar bereits verschlechternd auf das MTM aus.

Die Akquisitionsphase besitzt folglich eine Schlüsselfunktion, die bei Modulation der Mikrotubuli-Integrität über die Ausbildung eines stabilen Gedächtnisses entscheidet.

Solche Akquisitions- und Gedächtniseffekte wurden ebenfalls in Nagern gezeigt [23, 50, 62, 109, 141], wobei bisher nicht dargestellt wurde, dass die Gedächtniseffekte abhängig von der Akquisition auftreten. Die Untersuchungen fokussierten größtenteils auf räumliches Lernen und Gedächtnis. Green *et al.* zeigten dennoch eine Verbesserung des 1 d Gedächtnisses nach Kontextlernen, wohingegen die hier durchgeführte NAM Fütterung trotz Stabilisierung der Mikrotubuli keine Gedächtniseffekte bei der Objekterkennung erbrachte [62]. Eine Nocodazol-Behandlung führte indes zur Beeinträchtigung des Gedächtnisses nach Angstkonditionierung [50]. Demnach ist die Mikrotubuli-Integrität für die Ausbildung des Gedächtnisses bei verschiedenen Paradigmen relevant. Dass die Integrität ferner viel bedeutsamer bereits für die Akquisition ist, wurde bislang nicht beachtet.

In dieser Dissertation konnte so auch erstmals gezeigt werden, dass für das Auftreten der Colchizin-induzierten Gedächtnisverschlechterung die Akquisition, insbesondere die Trainingsstärke sowie das angewandte Trainingsprotokoll relevant sind. Ein schwaches Training nach Colchizin-Behandlung zeigte keinerlei Auswirkung der Mikrotubuli-Dysfunktion auf die Gedächtnisbildung. Ein Training mit 2 oder 3 Training Trials verursachte wiederum das beeinträchtigte Lernen sowie damit gekoppelt das beeinträchtigte LTM. Diese Effekte traten jedoch nur auf, wenn ein 2 min Inter-Trial-Intervall im Multipel-Trial Training angewandt wurde. Ein längeres Intervall von 10 min zeigte weder bei 1.5 h noch bei 18 h Colchizin-behandelten Bienen verschlechterende Effekte auf Lernen und Gedächtnis.

Folglich sind die veränderte Akquisition sowie das dadurch beeinflusste Gedächtnis aneinander gekoppelt, so dass geklärt werden muss, welche intrazellulären Auswirkungen die Modulation der Mikrotubuli-Integrität auf die Akquisition besitzt. Hierbei sind besonders Effekte zu berücksichtigen, die sehr schnelle Auswirkungen innerhalb der Zelle besitzen, da die Akquisition im Minutenbereich über die Gedächtnisbildung entscheidet.

5.5 Dem Akquisitionseffekt zugrundeliegende intrazelluläre Prozesse

Ist die Hauptwirkung der Drogen Colchizin und Taxol die Veränderung der Mikrotubuli-Integrität, welche auch im Zentralhirn der Bienen gezeigt wurde, so gibt es aber dennoch weitere molekulare Auswirkungen, die Lernen und die Gedächtnisbildung beeinflussen und folglich Ursache des schnellen, assoziativen Lerneffektes sein könnten (siehe Tabelle 1). Zudem gibt es durch die Behandlung mit den beiden Drogen langfristige Auswirkungen, die zwar während der Akquisition in Gang gesetzt, jedoch als Gedächtniseffekte sichtbar werden könnten.

Tabelle 1: Intrazelluläre Wirkungen der beiden Inhibitoren Colchizin und Taxol

Droge	Wirkung	Referenz
<i>Colchizin</i>	Depolymerisation der Mikrotubuli	[91, 116]
	Reduktion der Tubulin-Acetylierung	[126]
	Inhibition von L-Typ Ca^{2+} -Kanälen,	[56]
	spannungsgesteuerten Na^{+} -Kanälen,	[125]
	ligandengesteuerten, nikotinischen	[70]
	sowie GABA_A rezeptorgesteuerten Iononkanälen	[24, 200]
	Verstärkung der K^{+} -Ströme	[117]
	Minderung der Na^{+} -Ströme	[134]
	Reduktion der Acetylcholin Esterase Aktivität	[108, 109]
	Induktion der Lipidperoxidation	[109]
	Anstieg des Nitritlevels	[109]
	Reduktion der Glutathion Menge	[108, 109]
	Inhibition des Adenylat Cyclase Signalsystems	[41]
	Modulation der Ca^{2+} -Calmodulin Kaskade	[197]
	Erzeugung freier Radikale	[106]
	verstärkte Genexpression von Mapk1 und Mapk3 (p42/44),	[206]
	Caspase 3, Caspase 8, Cyclin D1, cdk2 und cdk5	[206]
sowie von COX-2	[183]	
verminderte Genexpression von Calpain, GSK3 β und Nptx1	[90, 206]	
<i>Taxol</i>	Stabilisierung der Mikrotubuli	[124, 208]
	Erhöhung der Tubulin-Acetylierung	[25, 57, 161]
	Aktivierung von L-Typ Ca^{2+} -Kanälen	[56]
	Beeinflussung von MAPK wie JNK und ERK	[87, 182]
	sowie von Tyrosin Kinasen	[201]
	und NO Synthase	[101]
	Einfluss auf Apoptose	[191]
	Herunterregulation der Glutamat Transporter Expression	[198]
Minderung der Na^{+} -Ströme	[27]	

5.5.1 Bedeutung der Mikrotubuli-Integrität für die Aktivität von Ca^{2+} -Kanälen

Eine Wirkmöglichkeit von Colchizin ist seine Eigenschaft L-Typ Ca^{2+} -Kanäle zu inhibieren, wohingegen Taxol diese Kanäle aktivieren kann und die Wahrscheinlichkeit dafür erhöht, dass sie geöffnet sind (siehe Tabelle 1), ohne dass die Anzahl der Kanäle an sich verändert wird. Die Effekte sind äußerst schnell und werden in Myozyten bereits nach 10-15 min sichtbar [56].

Schon vor 30 Jahren wurde gezeigt, dass die Weiterleitung des Aktionspotentials nach 2 tägiger Colchizin-Behandlung in Säugerneuronen reduziert war [54]. Der Wirkmechanismus dahinter ist jedoch unklar. Colchizin und Taxol könnten über eine veränderte Mikrotubuli-Integrität und der damit einhergehenden veränderten Protein-Interaktion ebenso gegensätzlich auf die Aktivität der L-Typ Ca^{2+} -Kanäle wirken. Ferner wurde diskutiert, dass die beiden Drogen auch direkt auf die Kanäle wirken, indem sie daran binden und möglicherweise die Strom-induzierte Inaktivierung modulieren. Zudem könnten beide Drogen auch die lokale Konzentration an Ionen verändern [56].

Gerade zur LTM Bildung ist das Ca^{2+} -Signal von Bedeutung, da Ca^{2+} ein wichtiger second messenger ist. So wurde kurz nach dem Training ein Anstieg der Ca^{2+} -Antwort in olfaktorischen Hirnstrukturen von Bienen detektiert [49], dessen Blockade besonders bei Training mit mehreren Trials selektiv zur Beeinträchtigung des olfaktorischen LTM führt [2]. Die Blockade der L-Typ Ca^{2+} -Kanäle mit Ca^{2+} -Kanal Antagonisten wie Verapamil, Diltiazem und Nifedipin führte bei Ratten ferner zur Beeinträchtigung des LTM nach Objekterkennungslernen [171] sowie nach Angstkonditionierung [9]. Lernen sowie STM waren nicht betroffen. Die in der vorliegenden Arbeit durchgeführten Experimente, bei denen Bienen vor dem Training mit Verapamil oder Diltiazem injiziert wurden, zeigten ebenfalls keine Veränderung beim Lernen oder im MTM, jedoch auch nicht im LTM.

Weder die Literatur noch die hier durchgeführten Experimente weisen auf eine Colchizin- oder Taxol-induzierte veränderte Ca^{2+} -Kanal Aktivität hin, die Ursache für den Akquisitionseffekt sein könnte. Somit kann durch eine veränderte Ca^{2+} -Kanal Aktivität nach Modulation der Mikrotubuli-Integrität höchstens die Veränderung des LTM erklärt werden; die veränderte Akquisition und das abweichende MTM bedürfen anderer Darlegung.

5.5.2 Einfluss von Colchizin auf die Aktivität der Acetylcholin Esterase

Die Acetylcholin Esterase (AChE) ist nötig für die Spaltung und das Recycling des Neurotransmitters Acetylcholin. Eine Hemmung der AChE Aktivität könnte mit einer verzögerten Signalweiterleitung einhergehen und daher Grundlage für den schnellen Akquisitionseffekt darstellen. So induziert eine Colchizin-Behandlung in Ratten eine Reduktion der AChE Aktivität auf 30-40% [108, 109] (siehe Tabelle 1), jedoch konnte in der vorliegenden Arbeit ausgeschlossen werden, dass Colchizin *in vitro* oder *in vivo* die AChE Aktivität im Bienenhirn vermindert.

Ob die in Tabelle 1 zusätzlich erwähnten Wirkungen von Colchizin und Taxol für die Lern- und damit Gedächtniseffekte der Honigbienen relevant sind, wurde im Rahmen dieser Arbeit nicht weiter untersucht.

5.5.3 Bedeutung der Mikrotubuli-Integrität für intrazellulären Transport

Zentraler Befund dieser Arbeit ist die Tatsache, dass assoziatives Lernen die Integrität der Mikrotubuli erfordert, die ihrerseits Hauptangriffspunkt von Colchizin und Taxol darstellt (hervorgehoben in Tabelle 1).

In unserer Arbeitsgruppe wird gezeigt, dass assoziatives Lernen ferner die Acetylierung von Histonen induziert. Eine solche posttranslationale Modifikation kann eine schnelle Antwort auf Stimuli darstellen und sich regulatorisch auswirken.

So konnte auch im *in vitro*-Modell in Hippocampusneuronen durch 5 Pulse mit Serotonin, einem Neurotransmitter, der während des Lernens ausgeschüttet wird, eine erhöhte Tubulin-Acetylierung festgestellt werden [30]. Auch an Hirnschnitten wurde eine aktivitäts-abhängige Acetylierung des α -Tubulins durch KCl-Depolarisation gezeigt [150]. Neuronale Aktivität wirkt sich so in Hippocampusneuronen über eine verstärkte Tubulin-Acetylierung positiv auf den intrazellulären Transport entlang der Mikrotubuli aus [118]. Daher könnte ebenso assoziatives Lernen die Tubulin-Acetylierung induzieren und für einen verbesserten intrazellulären Transport sorgen.

Solche Transportprozesse sind zielgerichtet. Eine als „Synaptic Tagging“ beschriebene Hypothese besagt [52], dass ein Transport in diejenigen Synapsen erfolgt, die wiederholt aktiviert wurden. Aktive synaptische Stellen werden so schnellstmöglich und effizient beliefert [196]. Des Weiteren sprachen Mitsuyama *et al.* von einer Anpassung des Mikrotubuli-Vorkommens nach hochfrequenter Stimulation zur Langzeit-Potenzierung [135]. Es stellt sich daher die Frage, ob sich Strukturen zu Regionen

ausbilden, wo sie besonders stark benötigt werden.

Da in dieser Arbeit gezeigt wurde, dass Colchizin und Taxol die Acetylierung des α -Tubulins beeinflussen, könnte dem Akquisitionseffekt eine veränderte Effizienz des intrazellulären Transports zugrundeliegen. Zudem können durch Modulation der Mikrotubuli-Integrität Protein-Protein-Interaktionen verändert sein, so dass beispielsweise MAPs (Mikrotubuli-assoziierte Proteine) oder Motorproteine in ihrer Bindung an Mikrotubuli beeinflusst werden [25, 161, 187].

So werden während der Akquisition beim Multipel-Trial-Training Prozesse induziert, die für Lernen und die Gedächtnisbildung notwendig sind und den Transport bestimmter Moleküle in die Prä- oder Postsynapse erfordern (Beispiele siehe Tabelle 2).

Tabelle 2: **Transportgüter, die mit kurz- oder langanhaltenden Auswirkungen entlang der Mikrotubuli befördert werden**

Auswirkung	Transportgut	Referenz
kurzfristig	Mitochondrien	[30]
	IEG (Immediate Early Genes) wie	
	KHC (Kinesin heavy chain),	[160]
	Ubiquitinhydrolase,	[73]
	C/EBP (CCAAT/enhancer binding protein),	[100]
	CPEB (cytoplasmic polyA element binding protein)	[176]
	und Arc	[14, 15]
langfristig	BDNF (Brain-derived neurotrophic factor)	[42]
	spannungsabhängige Na ⁺ - sowie K ⁺ -Kanäle	[27, 117]
	synaptische Proteine wie	
	Neurexin und Neuroligin,	[39, 85, 165]
	Piccolo und Bassoon,	[21, 58, 122, 168, 211]
	Synaptotagmin, Synaptophysin und Rab3A	[76]
	Rezeptoren wie Glycin-,	[118]
	muscarinische Acetylcholin-	[31]
	AMPA- und	[46, 47, 97, 173]
	NMDA-Rezeptoren	[65, 77, 172, 203]
Aktin-modulierende Faktoren	[89]	
PKA	[69]	

Solche Multipel-Trial-Konditionierungen führen zu einer *de novo* Proteinsynthese sowie zu Transkriptionsprozessen [53, 53, 94, 130, 205], so dass die neu gebildeten Proteine und mRNA Moleküle daraufhin an ihren Zielort transportiert werden müssen, um ein LTM zu induzieren. Liegen durch Colchizin depolymerisierte Mikrotubuli vor, könnte so die Bereitstellung benötigter Moleküle während der Akquisition nach einzelnen Trai-

ning Trials erschöpft sein, was sich negativ auf die Lerneffizienz auswirkte und dadurch in einem beeinträchtigten LTM widerspiegelte. Eine 18 h Colchizin-Behandlung führte neben einem beeinträchtigten Lernen sogar zur Beeinträchtigung des MTM, wobei hier die Depots relevanter Moleküle aufgebraucht sein könnten. Wurde in der Akquisitionsphase das kurze Inter-Trial-Intervall von 2 min jedoch auf 10 min verlängert, könnte folglich ausreichend Zeit zum Auffinden noch intakter Strukturen für den Transport benötigter Moleküle zur Verfügung gestanden haben, weshalb keine Beeinträchtigung von Lernen mehr auftrat.

Laut Literatur ist zwar ebenfalls ein veränderter intrazellulärer Transport für solche Lern- und Gedächtniseffekte verantwortlich; dennoch finden sich keine konkreten Kandidaten (vgl. [44, 62, 141]). Nachfolgend werden so einige potentielle Kandidaten aus Tabelle 2, deren jeweiliges Vorhandensein an aktiven Stellen in Neuronen für die Effizienz von Lernen und der Gedächtnisbildung bedeutungsvoll sein kann, näher betrachtet (vgl. Abbildung 57).

5.5.3.1 Gedächtnisbildung erfordert Transport langfristig benötigter Moleküle

Zur LTM Bildung wird u.a. eine Veränderung der molekularen Beschaffenheit der Synapse benötigt.

So werden z.B. Glycin Rezeptoren zu hemmenden Synapsen [118] oder Glutamat Rezeptoren wie α -Amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazol-Propionsäure (AMPA) und N-methyl-D-aspartat- (NMDA) Rezeptoren vom Soma aus in die Dendriten und Synapse entlang der Mikrotubuli transportiert [46, 47, 65, 77, 97, 172, 173, 203] (vgl. Abbildung 57), wo sie einer gesteigerten Glutamataufnahme dienen [33], die mit der synaptischen Wirksamkeit und dem Lernen einhergeht [111, 113, 157]. So führte in Mäusen ein Knock-out der NR2C-Untereinheit des NMDA Rezeptors zu Defiziten in der Akquisition sowie im Gedächtnis nach Angstkonditionierung [75]. Die Überexpression des KIF17 Motorproteins bewirkte hingegen eine Lern- sowie Gedächtnisverbesserung, da mehr NR2B transportiert wurde und in der Synapse zur Verfügung stand [203].

Zur Änderung der Plastizität sind auch strukturelle Veränderungen in Neuronen notwendig, an denen Mikrotubuli beteiligt sind. So wird z.B. Neuroligin, ein transmembranes, postsynaptisches Zelladhäsionsprotein, welches Prä- und Postsynapse miteinander verbindet, entlang intakter Mikrotubuli transportiert und kann bei Langzeitdepression wieder von der Zelloberfläche entfernt werden [164].

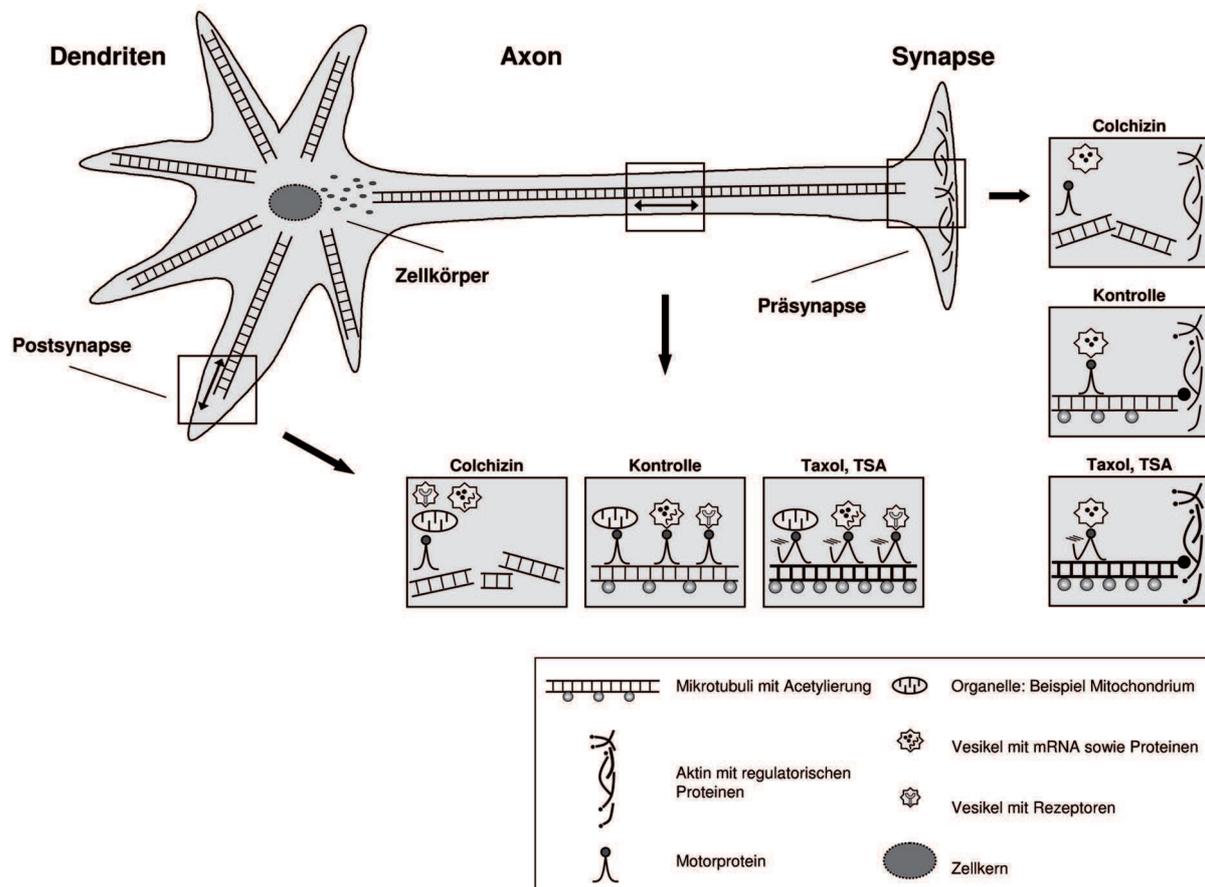


Abbildung 57: **Modell zur Auswirkung einer Modulation der Mikrotubuli-Integrität auf den intrazellulären Transport in einem Neuron.** Zum Lernen und zur Gedächtnisbildung ist der Transport von Organellen (z.B. Mitochondrien), Rezeptoren, mRNA (IEG) und Proteinen vom Zellkörper aus in die Prä- und Postsynapse wichtig. Der Transport erfolgt in Vesikeln und wird von Motorproteinen entlang der Mikrotubuli gesteuert. In den Ausläufern des Neurons befindet sich Aktin, welches über Mikrotubuli reguliert wird. Colchizin stört die Integrität der Mikrotubuli, wodurch der Transport und die Regulation des Aktins negativ beeinflusst sind. Taxol sowie TSA stabilisieren Mikrotubuli, wodurch der Transport begünstigt und die Regulation des Aktins ebenfalls positiv beeinflusst wird.

Auch MAPs wirken auf strukturelle Änderungen, da sie Mikrotubuli stabilisieren [187]. MAPs regulieren indes die Verknüpfung zwischen einzelnen Mikrotubuli sowie die Verbindung zwischen Mikrotubuli und anderen zellulären Strukturen wie es insbesondere für das Tau Protein gezeigt wurde. Dessen Hyperphosphorylierung führt zur Destabilisierung der Mikrotubuli und trägt damit zur Alzheimer Erkrankung bei [3, 23].

Als strukturelle Änderung gilt auch die Dendriten-Elongation, an der MAP2 beteiligt ist. Es bindet PKA in Hippocampusneuronen [69]; jedoch verursacht ein Fehlen von MAP2 die Minderung der PKA in Dendriten und im gesamten Neuron und daher eine verringerte CREB-Phosphorylierung, die für die Transkriptionsaktivierung essentiell ist.

Eine LTM Bildung erfordert Translation sowie Transkription [53, 53, 94, 130, 205], wobei Taxol eine transkriptionsabhängige Gedächtnisverbesserung in Bienen sogar nach einem 1 Trial Training induzierte. Zwar bildet sich normalerweise nach schwachem 1 Trial Training kein transkriptionsabhängiges Gedächtnis aus [53, 205], jedoch könnte mit verbesserter Mikrotubuli-Integrität die PKA erleichtert und schneller in den Zellkern wandern und dort die Genexpression anschalten.

Mikrotubuli wirken ferner bei der Regulation des Aktin-Cytoskeletts und damit bei der synaptischen Transmission mit [89]. Neuronale Aktivität führt neben einer gesteigerten Anzahl zusätzlich zu einem rascheren Einwandern der Mikrotubuli in die Dendriten [82], in denen hauptsächlich das Aktin-Cytoskelett vorkommt [92]. Dendritische Fortsätze sind ein Maß für die synaptische Stärke und gelten als Speicher des LTM [170]. Veränderungen in der Morphologie dieser Struktur sind daher die Schlüsselfunktion im Lernen und in der Gedächtnisbildung [98, 209]. Diese Änderungen beruhen zwar auf der Dynamik des Aktins [48, 186], welches jedoch durch Mikrotubuli reguliert wird (zur Übersicht [79]). Dabei wandern Aktin-regulierende Faktoren und Proteine, die das wachsende Ende der Mikrotubuli markieren, in die Synapse und Dendriten ein und stabilisieren das Aktin-Netzwerk [89]. Nocodazol führt dazu, dass weniger Proteine am wachsenden Ende akkumulieren und somit weniger auf die Aktin-Dynamik einwirken, wodurch es zu Morphologie- sowie Änderungen der synaptischen Transmission kommen kann [89], was folglich Lernen und Gedächtnis beeinflussen könnte (vgl. Abb. 57).

5.5.3.2 Akquisition erfordert einen schnellen Transport

Der Akquisition hingegen müssen sehr schnelle Transportprozesse zugrundeliegen, die durch Lernen induziert werden.

Aktivitäts-reguliert werden so z.B. Mitochondrien transportiert [119], was durch Forcierung der Tubulin-Acetylierung verstärkt abläuft [30, 78]. Die Regulation und Zielgenauigkeit des Transports wird neben HDAC6 von Miro1 (mitochondriale Rho GTPase1) reguliert [30, 119]. Es fungiert als Ca^{2+} -Sensor, da es große Ionenflüsse an ionotropen Glutamat Rezeptoren registriert und Mitochondrien zu aktiven Stellen rekrutiert. Somit besitzt es eine Schlüsselfunktion, wie Energie zeitlich und räumlich passend zu energieverbrauchenden aktiven Regionen geliefert wird und dort der vitalen Funktion von Neuronen dient [96, 115, 194]. Die Dynamik dieses mitochondrialen Transports ist recht hoch, da in Zellkultur Studien bereits nach 2 min eine deutliche Zunahme von Mitochondrien in Dendriten aufgezeichnet wurde [119, 149]. So könnten auch Mitochondrien während der Akquisition entsprechend dorthin transportiert werden, wo ein starker Energieverbrauch stattfindet, damit die Energieversorgung z.B. für die Funktion von Ionenpumpen oder zur Herstellung des second messengers cAMP sichergestellt und die Effizienz des Lernens gewährleistet wäre (vgl. Abbildung 57). Kommt es zu einem abnormalen Mitochondrien-Transport, können neurodegenerative Erkrankungen wie Alzheimer oder Parkinson entstehen [10, 26, 162, 190], was die Notwendigkeit eines funktionierenden mitochondrialen Transports unterstreicht.

Neben den Mitochondrien spielen auch weitere Organelle wie beispielsweise Ribosomen, Endosomen oder Lysosomen eine wichtige Funktion beim Lernen und bei der Gedächtnisbildung, werden jedoch im Rahmen dieser Arbeit nicht weiter diskutiert. Vielmehr stellt sich die Frage, welche weiteren Zielmoleküle während der Akquisition schnell entlang der Mikrotubuli transportiert werden müssen.

So kann neben wichtigen Proteinen auch mRNA in die Dendriten oder Synapse transportiert und erst lokal bei Bedarf translatiert werden [21, 58, 122, 168, 211]. Eine solche Proteinsynthese kann somit schnell und effizient auch langfristige Änderungen der synaptischen Stärke erzielen [84, 95, 196].

Ein schneller Effekt wurde beispielsweise für das IEG (Immediate Early Gene) Arc (aktivitäts-reguliertes Cytoskelett-assoziiertes Protein) gezeigt [140, 181], dessen mRNA in die Dendriten von stimulierten synaptischen Regionen gebracht und dort translatiert wird [14, 15, 180]. Schon 15 min nach Angstkonditionierung von Mäusen ist mehr Arc mRNA exprimiert worden [140]. Arc ist ein aktivitäts-reguliertes Gen [195], das für die Konsolidierung der synaptischen Plastizität sowie für die Bildung des LTM benötigt wird, da es den Transport von AMPA Rezeptoren reguliert [32, 158]. Knock-out Mäuse haben bei verschiedensten Lernparadigmen Beeinträchtigungen in der Akquisition

sowie ein beeinträchtigt LTM aufgezeigt, wohingegen das STM intakt geblieben ist. Diese Effekte erinnern an die Resultate, die hier bei der appetitiven Konditionierung von Colchizin-injizierten Honigbienen hervorgerufen wurden.

Auch spannungsabhängige K^+ -Kanäle, die eine wichtige Funktion bei der zellulären Ionen Homeostase sowie der Erregbarkeit von Nervenzellen ausüben, sind Transportgut entlang der Mikrotubuli [20, 74, 152] (vgl. Tabelle 2). Abhängig von der exzitatorischen Neurotransmission werden die Untereinheiten des K^+ -Kanals auf der Membran exponiert oder wieder entfernt, wobei Mikrotubuli diese Transportprozesse steuern (vgl. [117]). So führt eine Störung des Transports mit Nocodazol oder Colchizin durch Variation der Kanal-Anzahl in der Membran zu einer Änderung der K^+ -Ströme, wodurch sich auch die Dauer des Aktionspotentials verändert. Ebenso wie Colchizin führt die Injektion von Tubulin-RNA in *Xenopus laevis* Oozyten zur Minderung der K^+ -Ströme durch eine verlängerte Aktivierungszeit, was nahe legt, dass freies Tubulin bzw. die gestörte Mikrotubuli-Integrität die Effekte auslöst [20]. Dies kann Auswirkungen für die Weiterleitung des Aktionspotentials sowie die Ausschüttung von Neurotransmittern und folglich für die Lerneffizienz haben. Im Gegensatz zu Colchizin [125] reduziert Taxol ferner die Anzahl von Na^+ -Kanälen und somit der Ströme [27]. Grund hierfür kann ebenfalls die veränderte Mikrotubuli-Integrität sein. So können freie Tubulin-Untereinheiten ihr gebundenes GTP an G-Proteine (Guanin-Nukleotid-Bindeprotein) abgegeben. Insbesondere das G_s -Protein stimuliert hierdurch die Aktivität der Adenylat Cyclase [71], welche cAMP herstellt und dadurch die PKA aktiviert, die die Amplitude der Na^+ -Ströme erhöhen kann, indem sie Na^+ -Kanäle rekrutiert [67].

Letztendlich bildet wohl ein Transportdefizit die Grundlage für den Akquisitionseffekt nach Modulation der Mikrotubuli-Integrität, wobei die entsprechende Fracht unbekannt bleibt. Da nach der Modulation schnelle Effekte auftraten, muss ein rasch induzierbarer, molekularer Mechanismus wie die α -Tubulin Acetylierung verantwortlich sein (siehe Tabelle 1), da andere schnelle Effekte wie die Wirkung auf die Aktivität von Ca^{2+} -Kanälen oder die AChE ausgeschlossen werden konnten. Die Acetylierung des α -Tubulins sowie damit einhergehend die Integrität der Mikrotubuli scheinen daher entscheidend beim olfaktorischen Lernen zu sein, so dass in der vorliegenden Arbeit weiterhin gezeigt wurde, dass die Tubulin-Acetylierung als molekularer Modulator für Lernen und Gedächtnis fungiert.

5.5.4 Acetylierung des α -Tubulins als Modulator von Lernen und Gedächtnis

Es gibt viele posttranslationale Modifikationen (PTM) an Proteinen, die eine Wirkung auf Lernen und Gedächtnis ausüben (zur Übersicht siehe [184]). Eine solche wichtige PTM ist die Acetylierung, welche u.a. einen Einfluss auf die Ausbildung des Angstgedächtnisses [1, 66, 110, 112, 145, 192], auf die Fähigkeit zur Objekterkennung [17, 104, 128, 146, 204] oder auf die Ausbildung eines räumlichen Gedächtnisses [64, 104, 127, 146] besitzt.

Auch wurde in verschiedenen Studien unserer Arbeitsgruppe bereits gezeigt, dass in Bienen Proteine existieren, deren Acetylierung sich auf das olfaktorische Lernen und die Gedächtnisbildung auswirkt. Schließlich verbessert Trichostatin A (TSA), ein HDAC-Hemmstoff, aufgrund seines Einflusses auf die Histonacetylierung die Gedächtnisbildung [81], wohingegen der HAT-Inhibitor Garcinol die Gedächtnisausbildung negativ beeinflusst [132]. Acetylierte Histone besitzen eine schwächere Interaktion mit der DNA, so dass das Chromatin zugänglicher und die Transkription von gedächtnisrelevanten Genen erleichtert wird [80, 104, 121]. Die Modulation der Histonacetylierung führt folglich über eine veränderte Genexpression zu Gedächtniseffekten, die Akquisition ist jedoch nicht betroffen.

Neben den Histonen scheint es zudem noch weitere Zielproteine zu geben, deren Acetylierung regulatorisch auf Lernen und Gedächtnis wirkt. Dies wurde bisher in der Literatur kaum betrachtet (vgl. [174]). Ein Hinweis, dass es weitere sogenannte Nicht-Histon-Substrate gibt, die transkriptions-unabhängig zur Gedächtnisbildung beitragen, zeigte die Arbeit mit TSA bei der assoziativen Konditionierung von Honigbienen [81]. Hier konnte die Gedächtnisverbesserung nicht vollständig durch gleichzeitige Behandlung mit dem Transkriptionsblocker ActD unterdrückt werden.

Ein solches Nicht-Histon-Protein ist das α -Tubulin, welches eine entscheidende Rolle beim olfaktorischen Lernen und Gedächtnis spielt. Schließlich wurde in der vorliegenden Arbeit in TSA-behandelten Bienen eine gesteigerte Acetylierung des Tubulins gezeigt, weshalb es neben den Histonen an der TSA-induzierten Gedächtnisverbesserung beteiligt zu sein scheint (vgl. [81]). TSA wirkt folglich sowohl auf die Histon- als auch auf die Tubulin-Acetylierung. Um solche Gedächtniseffekte eindeutig einem der beiden Proteine zuzuordnen, bedarf es eines spezifischen Inhibitors wie Tubacin, welches ausschließlich auf die Acetylierung des Tubulins wirkt.

Ist durch TSA-Behandlung zwar die Gedächtnisbildung, jedoch nicht die Akquisition

verändert, welche wiederum für diese Arbeit maßgebend ist. Ob die Acetylierung von Tubulin tatsächlich die Akquisition beeinflussen kann, musste folglich mit Bedingungen überprüft werden, die sich bereits auf Lernen auswirken. So verändern beispielsweise physiologische Faktoren wie UV-Stress oder der metabolische Status der Bienen bereits die Akquisition.

UV-Stress bei Bienen führt dabei zur Aktivierung der JNK (Jun-N-terminale Kinase, Stress-aktivierte Proteinkinase), bewirkt eine höhere Responsiveness sowie ein verschlechtertes Lernen und Gedächtnis [86]. Zusätzlich wurde im Rahmen dieser Dissertation die Aktivierung der Histonacetylierung gezeigt. Die Acetylierung des α -Tubulins wurde durch UV-Stress reduziert, scheint also die Mikrotubuli-Integrität zu schädigen.

Weiterhin beeinflusst der metabolische Status der Bienen die Wahrnehmung des US (Zuckerwasser) und damit auch den appetitiven Lernerfolg [53]. In satten Tieren verliert der US an Bedeutung, was sich an der verminderten Responsiveness zeigt [151]. Des Weiteren ist in gesättigten Tieren beim appetitiven Lernparadigma der Lernerfolg gering und die Ausbildung des Gedächtnisses unterdrückt. Auch hierbei wurde in der vorliegenden Arbeit eine Zunahme der Tubulin-Acetylierung nach Füttern der Honigbienen gezeigt.

Die hier untersuchten Parameter (Colchizin- sowie Taxol-Behandlung, UV-Stress und Sättigung) beeinflussen folglich neben der α -Tubulin Acetylierung zugleich auch das olfaktorische Lernen sowie die Gedächtnisbildung, weshalb Tubulin bzw. die Mikrotubuli-Integrität als molekularer Modulator für Lernen und Gedächtnis erscheint.

5.5.5 Fazit

Abschließend lässt sich festhalten, dass die α -Tubulin Acetylierung bedeutsam für das olfaktorische Lernen und Gedächtnis der Honigbienen zu sein scheint. Die damit einhergehende Integrität des Mikrotubuli-Cytoskeletts spielt eine entscheidende Rolle für die Effizienz des Lernens und für die Ausbildung des Gedächtnisses. Die Behandlung der Bienen mit Colchizin führte zu einer destruktiven Mikrotubuli-Integrität, wodurch schwere Lern- und Gedächtniseffekte entstanden. Abhängig waren die Effekte von der Akquisitionsphase, da bei Änderung der Injektionszeit, der Trainingsstärke sowie der Dauer des Inter-Trial-Intervalls keine Beeinträchtigungen auftraten. Nach Ausschluss der Wirkung auf die Aktivität von Ca^{2+} -Kanälen oder der Acetylcholin Esterase wirkt Colchizin vermeintlich auf einen schnellen intrazellulären Transport noch unbekann-

ter Moleküle, die während der Akquisition gebraucht werden. Entsprechendes gilt für Taxol, welches die Mikrotubuli-Integrität sowie Lernen und Gedächtnis verbesserte.

Um die während der Akquisition zu transportierenden Kandidaten zu identifizieren, müssten z.B. „Live Cell Imaging“ Studien an Neuronen, insbesondere an Zellen des Pilzkörpers durchgeführt werden, in denen bestimmte Zielmoleküle markiert werden und so ein veränderter Transport verfolgt werden kann. Ferner könnten in Fruchtfliegen (*Drosophila melanogaster*) genetische Veränderungen eingebracht werden, die den Transport betreffen. So könnte *in vivo* ein lern-induzierter Transport untersucht werden, da die CS/US Paarung die Polymerisation der Mikrotubuli auszulösen scheint. Dabei sollten z.B. Motorproteine, die energieliefernden Mitochondrien, Kanalproteine oder bestimmte IEG berücksichtigt werden, deren Vorhandensein die Lerneffizienz beeinflussen kann. Im Modellorganismus Biene wäre die praktische Umsetzung der Untersuchung nicht möglich.

Molekular betrachtet unterstützt die α -Tubulin Acetylierung die Mikrotubuli-Integrität. Diese Modifikation kann durch einmalige Behandlung der Bienen mit Pharmaka wie Colchizin, Taxol sowie TSA, aber auch mit physiologischen Faktoren wie UV-Stress und dem metabolischen Status der Bienen moduliert werden. Alle Faktoren beeinflussen zudem auch Lernen und Gedächtnis, weshalb Tubulin als molekularer Modulator für Lernen und Gedächtnis fungiert. Um die Effekte jedoch eindeutig der Tubulin-Acetylierung zuzuordnen und von der Histon-Acetylierung trennen zu können, bedarf es Untersuchungen mit spezifischen Inhibitoren wie Tubacin, wodurch ausschließlich die Acetylierung des Tubulins verändert würde und die Auswirkungen auf Lernen und Gedächtnis untersucht werden könnten.

6 Literatur

- [1] Alarcón, J.M., Malleret, G., Touzani, K., Vronskaya, S., Ishii, S., Kandel, E.R., Barco, A. (2004): Chromatin acetylation, memory, and LTP are impaired in CBP+/- mice: a model for the cognitive deficit in Rubinstein-Taybi syndrome and its amelioration. *Neuron* 42(6): 947–959.
- [2] Arenas, A., Giurfa, M., Farina, W.M., Sandoz, J.C. (2009): Early olfactory experience modifies neural activity in the antennal lobe of a social insect at the adult stage. *Eur J Neurosci* 30(8): 1498–1508.
- [3] Avila, J., Lucas, J.J., Perez, M., Hernandez, F. (2004): Role of tau protein in both physiological and pathological conditions. *Physiol Rev* 84(2): 361–384.
- [4] Bacsikai, B.J., Hochner, B., Mahaut-Smith, M., Adams, S.R., Kaang, B.K., Kandel, E.R., Tsien, R.Y. (1993): Spatially resolved dynamics of cAMP and protein kinase A subunits in *Aplysia* sensory neurons. *Science* 260(5105): 222–226.
- [5] Bailey, C.H., Bartsch, D., Kandel, E.R. (1996): Toward a molecular definition of long-term memory storage. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93(24): 13 445–13 452.
- [6] Bailey, C.H., Kandel, E.R. (1993): Structural changes accompanying memory storage. *Annu Rev Physiol* 55: 397–426.
- [7] Balasubramanyam, K., Altaf, M., Varier, R.A., Swaminathan, V., Ravindran, A., Sadhale, P.P., Kundu, T.K. (2004): Polyisoprenylated benzophenone, garcinol, a natural histone acetyltransferase inhibitor, represses chromatin transcription and alters global gene expression. *J Biol Chem* 279(32): 33 716–33 726.
- [8] Balasubramanyam, K., Varier, R.A., Altaf, M., Swaminathan, V., Siddappa, N.B., Ranga, U., Kundu, T.K. (2004): Curcumin, a novel p300/CREB-binding protein-specific inhibitor of acetyltransferase, represses the acetylation of histone/nonhistone proteins and histone acetyltransferase-dependent chromatin transcription. *J Biol Chem* 279(49): 51 163–51 171.
- [9] Bauer, E.P., Schafe, G.E., LeDoux, J.E. (2002): NMDA receptors and L-type voltage-gated calcium channels contribute to long-term potentiation and different components of fear memory formation in the lateral amygdala. *J Neurosci* 22(12): 5239–5249.
- [10] Beal, M.F. (2007): Mitochondria and neurodegeneration. *Novartis Found Symp* 287: 183–92; discussion 192–6.
- [11] Bejar, R., Yasuda, R., Krugers, H., Hood, K., Mayford, M. (2002): Transgenic calmodulin-dependent protein kinase II activation: dose-dependent effects on synaptic plasticity, learning, and memory. *J Neurosci* 22(13): 5719–5726.
- [12] Biel, M., Wascholowski, V., Giannis, A. (2005): Epigenetics—an epicenter of gene

- regulation: histones and histone-modifying enzymes. *Angew Chem Int Ed Engl* 44(21): 3186–3216.
- [13] Bitterman, M.E., Menzel, R., Fietz, A., Schäfer, S. (1983): Classical conditioning of proboscis extension in honeybees (*Apis mellifera*). *J Comp Psychol* 97(2): 107–119.
- [14] Blichenberg, A., Rehbein, M., Müller, R., Garner, C.C., Richter, D., Kindler, S. (2001): Identification of a cis-acting dendritic targeting element in the mRNA encoding the alpha subunit of Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II. *Eur J Neurosci* 13(10): 1881–1888.
- [15] Blichenberg, A., Schwanke, B., Rehbein, M., Garner, C.C., Richter, D., Kindler, S. (1999): Identification of a cis-acting dendritic targeting element in MAP2 mRNAs. *J Neurosci* 19(20): 8818–8829.
- [16] Bolden, J.E., Peart, M.J., Johnstone, R.W. (2006): Anticancer activities of histone deacetylase inhibitors. *Nat Rev Drug Discov* 5(9): 769–784.
- [17] Bourtchouladze, R., Lidge, R., Catapano, R., Stanley, J., Gossweiler, S., Romashko, D., Scott, R., Tully, T. (2003): A mouse model of Rubinstein-Taybi syndrome: defective long-term memory is ameliorated by inhibitors of phosphodiesterase 4. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100(18): 10 518–10 522.
- [18] Bourtchouladze, R., Frenguelli, B., Blendy, J., Cioffi, D., Schutz, G., Silva, A.J. (1994): Deficient long-term memory in mice with a targeted mutation of the cAMP-responsive element-binding protein. *Cell* 79(1): 59–68.
- [19] Boyette-Davis, J.A., Fuchs, P.N. (2009): Differential effects of paclitaxel treatment on cognitive functioning and mechanical sensitivity. *Neurosci Lett* 453(3): 170–174.
- [20] Bracey, K., Ju, M., Tian, C., Stevens, L., Wray, D. (2008): Tubulin as a binding partner of the heag2 voltage-gated potassium channel. *J Membr Biol* 222(3): 115–125.
- [21] Bramham, C.R., Wells, D.G. (2007): Dendritic mRNA: transport, translation and function. *Nat Rev Neurosci* 8(10): 776–789.
- [22] Brandt, R., Rohlfing, T., Rybak, J., Kroficzik, S., Maye, A., Westerhoff, M., Hege, H.C., Menzel, R. (2005): Three-dimensional average-shape atlas of the honeybee brain and its applications. *J Comp Neurol* 492(1): 1–19.
- [23] Brunden, K.R., Zhang, B., Carroll, J., Yao, Y., Potuzak, J.S., Hogan, A.M.L., Iba, M., James, M.J., Xie, S.X., Ballatore, C., Smith, A.B., Lee, V.M.Y., Trojanowski, J.Q. (2010): Epothilone D improves microtubule density, axonal integrity, and cognition in a transgenic mouse model of tauopathy. *J Neurosci* 30(41): 13 861–13 866.
- [24] Bueno, O.F., Leidenheimer, N.J. (1998): Colchicine inhibits GABA(A) receptors independently of microtubule depolymerization. *Neuropharmacology* 37(3):

- 383–390.
- [25] Bulinski, J.C. (2007): Microtubule modification: acetylation speeds anterograde traffic flow. *Curr Biol* 17(1): R18–R20.
- [26] Cartelli, D., Ronchi, C., Maggioni, M.G., Rodighiero, S., Giavini, E., Cappelletti, G. (2010): Microtubule dysfunction precedes transport impairment and mitochondria damage in MPP+ -induced neurodegeneration. *J Neurochem* 115(1): 247–258.
- [27] Casini, S., Tan, H.L., Demirayak, I., Remme, C.A., Amin, A.S., Scicluna, B.P., Chatyan, H., Ruijter, J.M., Bezzina, C.R., van Ginneken, A.C.G., Veldkamp, M.W. (2010): Tubulin polymerization modifies cardiac sodium channel expression and gating. *Cardiovasc Res* 85(4): 691–700.
- [28] Catalano, M.G., Poli, R., Pugliese, M., Fortunati, N., Boccuzzi, G. (2007): Valproic acid enhances tubulin acetylation and apoptotic activity of paclitaxel on anaplastic thyroid cancer cell lines. *Endocr Relat Cancer* 14(3): 839–845.
- [29] Chen, A., Muzzio, I.A., Malleret, G., Bartsch, D., Verbitsky, M., Pavlidis, P., Yonan, A.L., Vronskaya, S., Grody, M.B., Cepeda, I., Gilliam, T.C., Kandel, E.R. (2003): Inducible enhancement of memory storage and synaptic plasticity in transgenic mice expressing an inhibitor of ATF4 (CREB-2) and C/EBP proteins. *Neuron* 39(4): 655–669.
- [30] Chen, S., Owens, G.C., Makarenkova, H., Edelman, D.B. (2010): HDAC6 regulates mitochondrial transport in hippocampal neurons. *PLoS One* 5(5): e10848.
- [31] Cheng, G., Iijima, Y., Ishibashi, Y., Kuppuswamy, D., Cooper, G. (2002): Inhibition of G protein-coupled receptor trafficking in neuroblastoma cells by MAP 4 decoration of microtubules. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 283(6): H2379–H2388.
- [32] Chowdhury, S., Shepherd, J.D., Okuno, H., Lyford, G., Petralia, R.S., Plath, N., Kuhl, D., Huganir, R.L., Worley, P.F. (2006): Arc/Arg3.1 interacts with the endocytic machinery to regulate AMPA receptor trafficking. *Neuron* 52(3): 445–459.
- [33] Collado, M.S., Khabour, O., Fioravante, D., Byrne, J.H., Eskin, A. (2009): Post-translational regulation of an *Aplysia* glutamate transporter during long-term facilitation. *J Neurochem* 108(1): 176–189.
- [34] Consortium, H.G.S. (2006): Insights into social insects from the genome of the honeybee *Apis mellifera*. *Nature* 443(7114): 931–949.
- [35] Corcoran, L.J., Mitchison, T.J., Liu, Q. (2004): A novel action of histone deacetylase inhibitors in a protein aggregates disease model. *Curr Biol* 14(6): 488–492.
- [36] Creppe, C., Malinouskaya, L., Volvert, M.L., Gillard, M., Close, P., Malaise, O., Laguesse, S., Cornez, I., Rahmouni, S., Ormenese, S., Belachew, S., Malgrange, B., Chapelle, J.P., Siebenlist, U., Moonen, G., Chariot, A., Nguyen, L. (2009):

- Elongator controls the migration and differentiation of cortical neurons through acetylation of alpha-tubulin. *Cell* 136(3): 551–564.
- [37] Dash, P.K., Hochner, B., Kandel, E.R. (1990): Injection of the cAMP-responsive element into the nucleus of Aplysia sensory neurons blocks long-term facilitation. *Nature* 345(6277): 718–721.
- [38] de Ruijter, A.J.M., van Gennip, A.H., Caron, H.N., Kemp, S., van Kuilenburg, A.B.P. (2003): Histone deacetylases (HDACs): characterization of the classical HDAC family. *Biochem J* 370(Pt 3): 737–749.
- [39] Dean, C., Scholl, F.G., Chohi, J., DeMaria, S., Berger, J., Isacoff, E., Scheiffele, P. (2003): Neurexin mediates the assembly of presynaptic terminals. *Nat Neurosci* 6(7): 708–716.
- [40] Deisseroth, K., Bito, H., Tsien, R.W. (1996): Signaling from synapse to nucleus: postsynaptic CREB phosphorylation during multiple forms of hippocampal synaptic plasticity. *Neuron* 16(1): 89–101.
- [41] Derkach, K.V., Shpakov, A.O., Uspenskaia, Z.I., Kuznetsova, L.A. (2009): [Inhibition of the adenylyl cyclase signaling system by colchicine and vinblastine in ciliate *Dileptus anser*]. *Tsitologija* 51(12): 1013–1018.
- [42] Dompierre, J.P., Godin, J.D., Charrin, B.C., Cordelières, F.P., King, S.J., Humbert, S., Saudou, F. (2007): Histone deacetylase 6 inhibition compensates for the transport deficit in Huntington’s disease by increasing tubulin acetylation. *J Neurosci* 27(13): 3571–3583.
- [43] Dudai, Y. (2004): The neurobiology of consolidations, or, how stable is the engram? *Annu Rev Psychol* 55: 51–86.
- [44] Eijkenboom, M., Staay, F.J.V.D. (1999): Spatial learning deficits in rats after injection of vincristine into the dorsal hippocampus. *Neuroscience* 91(4): 1299–1313.
- [45] ELLMAN, G.L., COURTNEY, K.D., ANDRES, V., FEATHER-STONE, R.M. (1961): A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochem Pharmacol* 7: 88–95.
- [46] Esteban, J.A. (2008): Intracellular machinery for the transport of AMPA receptors. *Br J Pharmacol* 153 Suppl 1: S35–S43.
- [47] Esteban, J.A. (2003): AMPA receptor trafficking: a road map for synaptic plasticity. *Mol Interv* 3(7): 375–385.
- [48] Ethell, I.M., Pasquale, E.B. (2005): Molecular mechanisms of dendritic spine development and remodeling. *Prog Neurobiol* 75(3): 161–205.
- [49] Faber, T., Joerges, J., Menzel, R. (1999): Associative learning modifies neural representations of odors in the insect brain. *Nat Neurosci* 2(1): 74–78.
- [50] Fanara, P., Husted, K.H., Selle, K., Wong, P.Y.A., Banerjee, J., Brandt, R., Hellerstein, M.K. (2010): Changes in microtubule turnover accompany synaptic pla-

- sticity and memory formation in response to contextual fear conditioning in mice. *Neuroscience* 168(1): 167–178.
- [51] Finkelstein, Y., Aks, S.E., Hutson, J.R., Juurlink, D.N., Nguyen, P., Dubnov-Raz, G., Pollak, U., Koren, G., Bentur, Y. (2010): Colchicine poisoning: the dark side of an ancient drug. *Clin Toxicol (Phila)* 48(5): 407–414.
- [52] Frey, U., Morris, R.G. (1998): Synaptic tagging: implications for late maintenance of hippocampal long-term potentiation. *Trends Neurosci* 21(5): 181–188.
- [53] Friedrich, A., Thomas, U., Müller, U. (2004): Learning at different satiation levels reveals parallel functions for the cAMP-protein kinase A cascade in formation of long-term memory. *J Neurosci* 24(18): 4460–4468.
- [54] Fukuda, J., Kameyama, M., Yamaguchi, K. (1981): Breakdown of cytoskeletal filaments selectively reduces Na and Ca spikes in cultured mammal neurones. *Nature* 294(5836): 82–85.
- [55] Fukushima, N., Furuta, D., Hidaka, Y., Moriyama, R., Tsujiuchi, T. (2009): Post-translational modifications of tubulin in the nervous system. *J Neurochem* 109(3): 683–693.
- [56] Galli, A., DeFelice, L.J. (1994): Inactivation of L-type Ca channels in embryonic chick ventricle cells: dependence on the cytoskeletal agents colchicine and taxol. *Biophys J* 67(6): 2296–2304.
- [57] Gardiner, J., Barton, D., Marc, J., Overall, R. (2007): Potential role of tubulin acetylation and microtubule-based protein trafficking in familial dysautonomia. *Traffic* 8(9): 1145–1149.
- [58] Glanzer, J.G., Eberwine, J.H. (2003): Mechanisms of translational control in dendrites. *Neurobiol Aging* 24(8): 1105–1111.
- [59] Glozak, M.A., Sengupta, N., Zhang, X., Seto, E. (2005): Acetylation and deacetylation of non-histone proteins. *Gene* 363: 15–23.
- [60] GOLDBERG, I.H., RABINOWITZ, M. (1962): Actionmycin D inhibition of deoxyribonucleic acid-dependent synthesis of ribonucleic acid. *Science* 136: 315–316.
- [61] Gordon M. Cragg, D.J.N. (2005): Plants as a source of anti-cancer agents. *Journal of Ethnopharmacology* Volume 100.
- [62] Green, K.N., Steffan, J.S., Martinez-Coria, H., Sun, X., Schreiber, S.S., Thompson, L.M., LaFerla, F.M. (2008): Nicotinamide restores cognition in Alzheimer's disease transgenic mice via a mechanism involving sirtuin inhibition and selective reduction of Thr231-phosphotau. *J Neurosci* 28(45): 11 500–11 510.
- [63] Gregoret, I.V., Lee, Y.M., Goodson, H.V. (2004): Molecular evolution of the histone deacetylase family: functional implications of phylogenetic analysis. *J Mol Biol* 338(1): 17–31.
- [64] Guan, J.S., Haggarty, S.J., Giacometti, E., Dannenberg, J.H., Joseph, N., Gao,

- J., Nieland, T.J.F., Zhou, Y., Wang, X., Mazitschek, R., Bradner, J.E., DePinho, R.A., Jaenisch, R., Tsai, L.H. (2009): HDAC2 negatively regulates memory formation and synaptic plasticity. *Nature* 459(7243): 55–60.
- [65] Guillaud, L., Setou, M., Hirokawa, N. (2003): KIF17 dynamics and regulation of NR2B trafficking in hippocampal neurons. *J Neurosci* 23(1): 131–140.
- [66] Gupta, S., Kim, S.Y., Artis, S., Molfese, D.L., Schumacher, A., Sweatt, J.D., Paylor, R.E., Lubin, F.D. (2010): Histone methylation regulates memory formation. *J Neurosci* 30(10): 3589–3599.
- [67] Hallaq, H., Yang, Z., Viswanathan, P.C., Fukuda, K., Shen, W., Wang, D.W., Wells, K.S., Zhou, J., Yi, J., Murray, K.T. (2006): Quantitation of protein kinase A-mediated trafficking of cardiac sodium channels in living cells. *Cardiovasc Res* 72(2): 250–261.
- [68] Hammond, J.W., Cai, D., Verhey, K.J. (2008): Tubulin modifications and their cellular functions. *Curr Opin Cell Biol* 20(1): 71–76.
- [69] Harada, A., Teng, J., Takei, Y., Oguchi, K., Hirokawa, N. (2002): MAP2 is required for dendrite elongation, PKA anchoring in dendrites, and proper PKA signal transduction. *J Cell Biol* 158(3): 541–549.
- [70] Hardwick, J.C., Parsons, R.L. (1995): Requirement of a colchicine-sensitive component of the cytoskeleton for acetylcholine receptor recovery. *Br J Pharmacol* 114(2): 442–446.
- [71] Hatta, S., Ozawa, H., Saito, T., Amemiya, N., Ohshika, H. (1995): Tubulin stimulates adenylyl cyclase activity in rat striatal membranes via transfer of guanine nucleotide to Gs protein. *Brain Res* 704(1): 23–30.
- [72] Hebb, D. (1949): The organization of behavior: a neuropsychological approach. *Wiley* .
- [73] Hegde, A.N., Inokuchi, K., Pei, W., Casadio, A., Ghirardi, M., Chain, D.G., Martin, K.C., Kandel, E.R., Schwartz, J.H. (1997): Ubiquitin C-terminal hydrolase is an immediate-early gene essential for long-term facilitation in *Aplysia*. *Cell* 89(1): 115–126.
- [74] Heusser, K., Schwappach, B. (2005): Trafficking of potassium channels. *Curr Opin Neurobiol* 15(3): 364–369.
- [75] Hillman, B.G., Gupta, S.C., Stairs, D.J., Buonanno, A., Dravid, S.M. (2011): Behavioral analysis of NR2C knockout mouse reveals deficit in acquisition of conditioned fear and working memory. *Neurobiol Learn Mem* .
- [76] Hirokawa, N. (2006): mRNA transport in dendrites: RNA granules, motors, and tracks. *J Neurosci* 26(27): 7139–7142.
- [77] Hirokawa, N., Noda, Y. (2008): Intracellular transport and kinesin superfamily proteins, KIFs: structure, function, and dynamics. *Physiol Rev* 88(3): 1089–1118.

- [78] Hollenbeck, P.J., Saxton, W.M. (2005): The axonal transport of mitochondria. *J Cell Sci* 118(Pt 23): 5411–5419.
- [79] Hoogenraad, C.C., Akhmanova, A. (2010): Dendritic spine plasticity: new regulatory roles of dynamic microtubules. *Neuroscientist* 16(6): 650–661.
- [80] Howe, L., Brown, C.E., Lechner, T., Workman, J.L. (1999): Histone acetyltransferase complexes and their link to transcription. *Crit Rev Eukaryot Gene Expr* 9(3-4): 231–243.
- [81] Hättig, J. (2009): Einfluss epigenetischer Mechanismen auf das Verhalten der Honigbiene. Ph.D. thesis, Universität des Saarlandes.
- [82] Hu, X., Viesselmann, C., Nam, S., Merriam, E., Dent, E.W. (2008): Activity-dependent dynamic microtubule invasion of dendritic spines. *J Neurosci* 28(49): 13 094–13 105.
- [83] Hubbert, C., Guardiola, A., Shao, R., Kawaguchi, Y., Ito, A., Nixon, A., Yoshida, M., Wang, X.F., Yao, T.P. (2002): HDAC6 is a microtubule-associated deacetylase. *Nature* 417(6887): 455–458.
- [84] Huber, K.M., Kayser, M.S., Bear, M.F. (2000): Role for rapid dendritic protein synthesis in hippocampal mGluR-dependent long-term depression. *Science* 288(5469): 1254–1257.
- [85] Ichtchenko, K., Hata, Y., Nguyen, T., Ullrich, B., Missler, M., Moomaw, C., Südhof, T.C. (1995): Neuroligin 1: a splice site-specific ligand for beta-neurexins. *Cell* 81(3): 435–443.
- [86] Iqbal, J. (2009): Stress activated protein kinase: Central mediator of stress- and infection-induced changes in sensory processing, learning and memory in honeybee (*Apis mellifera*). Ph.D. thesis, Universität des Saarlandes.
- [87] J, O., Rustgi, A.K. (2001): Paclitaxel induces prolonged activation of the Ras/MEK/ERK pathway independently of activating the programmed cell death machinery. *J Biol Chem* 276(22): 19 555–19 564.
- [88] Janke, C., Kneussel, M. (2010): Tubulin post-translational modifications: encoding functions on the neuronal microtubule cytoskeleton. *Trends Neurosci* 33(8): 362–372.
- [89] Jaworski, J., Kapitein, L.C., Gouveia, S.M., Dortland, B.R., Wulf, P.S., Grigoriev, I., Camera, P., Spangler, S.A., Stefano, P.D., Demmers, J., Krugers, H., Defilippi, P., Akhmanova, A., Hoogenraad, C.C. (2009): Dynamic microtubules regulate dendritic spine morphology and synaptic plasticity. *Neuron* 61(1): 85–100.
- [90] Jorda, E.G., Verdaguer, E., Canudas, A.M., Jiménez, A., Bruna, A., Caelles, C., Bravo, R., Escubedo, E., Pubill, D., Camarasa, J., Pallàs, M., Camins, A. (2003): Neuroprotective action of flavopiridol, a cyclin-dependent kinase inhibitor, in colchicine-induced apoptosis. *Neuropharmacology* 45(5): 672–683.
- [91] Jordan, M.A., Wilson, L. (2004): Microtubules as a target for anticancer drugs.

- Nat Rev Cancer* 4(4): 253–265.
- [92] Kaech, S., Parmar, H., Roelandse, M., Bornmann, C., Matus, A. (2001): Cytoskeletal microdifferentiation: a mechanism for organizing morphological plasticity in dendrites. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98(13): 7086–7092.
- [93] Kandel (2000): The Nobel Prize in Physiology or Medicine .
- [94] Kandel, E.R. (2001): The molecular biology of memory storage: a dialogue between genes and synapses. *Science* 294(5544): 1030–1038.
- [95] Kang, H., Schuman, E.M. (1996): A requirement for local protein synthesis in neurotrophin-induced hippocampal synaptic plasticity. *Science* 273(5280): 1402–1406.
- [96] Kang, J.S., Tian, J.H., Pan, P.Y., Zald, P., Li, C., Deng, C., Sheng, Z.H. (2008): Docking of axonal mitochondria by syntaphilin controls their mobility and affects short-term facilitation. *Cell* 132(1): 137–148.
- [97] Kapitein, L.C., Schlager, M.A., Kuijpers, M., Wulf, P.S., van Spronsen, M., MacKintosh, F.C., Hoogenraad, C.C. (2010): Mixed microtubules steer dynein-driven cargo transport into dendrites. *Curr Biol* 20(4): 290–299.
- [98] Kasai, H., Matsuzaki, M., Noguchi, J., Yasumatsu, N., Nakahara, H. (2003): Structure-stability-function relationships of dendritic spines. *Trends Neurosci* 26(7): 360–368.
- [99] Kawaguchi, Y., Kovacs, J.J., McLaurin, A., Vance, J.M., Ito, A., Yao, T.P. (2003): The deacetylase HDAC6 regulates aggresome formation and cell viability in response to misfolded protein stress. *Cell* 115(6): 727–738.
- [100] Kim, H., Lee, S.H., Han, J.H., Lee, J.A., Cheang, Y.H., Chang, D.J., Lee, Y.S., Kaang, B.K. (2006): A nucleolar protein ApLLP induces ApC/EBP expression required for long-term synaptic facilitation in aplysia neurons. *Neuron* 49(5): 707–718.
- [101] Kim, Y.M., Paik, S.G. (2005): Induction of expression of inducible nitric oxide synthase by Taxol in murine macrophage cells. *Biochem Biophys Res Commun* 326(2): 410–416.
- [102] Klein, M., Camardo, J., Kandel, E.R. (1982): Serotonin modulates a specific potassium current in the sensory neurons that show presynaptic facilitation in Aplysia. *Proc Natl Acad Sci U S A* 79(18): 5713–5717.
- [103] Klein, M., Kandel, E.R. (1980): Mechanism of calcium current modulation underlying presynaptic facilitation and behavioral sensitization in Aplysia. *Proc Natl Acad Sci U S A* 77(11): 6912–6916.
- [104] Korzus, E., Rosenfeld, M.G., Mayford, M. (2004): CBP histone acetyltransferase activity is a critical component of memory consolidation. *Neuron* 42(6): 961–972.
- [105] Kouzarides, T. (2000): Acetylation: a regulatory modification to rival phosphoryla-

- tion? *EMBO J* 19(6): 1176–1179.
- [106] Kumar, A., Naidu, P.S., Seghal, N., Padi, S.S.V. (2007): Neuroprotective effects of resveratrol against intracerebroventricular colchicine-induced cognitive impairment and oxidative stress in rats. *Pharmacology* 79(1): 17–26.
- [107] Kumar, A., Dogra, S., Prakash, A. (2009): Neuroprotective Effects of Centella asiatica against Intracerebroventricular Colchicine-Induced Cognitive Impairment and Oxidative Stress. *Int J Alzheimers Dis* 2009.
- [108] Kumar, A., Seghal, N., Naidu, P.S., Padi, S.S., Goyal, R. (2007): Colchicines-induced neurotoxicity as an animal model of sporadic dementia of Alzheimer's type. *Pharmacol Rep* 59(3): 274–283.
- [109] Kumar, A., Sehgal, N., Kumar, P., Padi, S.S.V., Naidu, P.S. (2008): Protective effect of quercetin against ICV colchicine-induced cognitive dysfunctions and oxidative damage in rats. *Phytother Res* 22(12): 1563–1569.
- [110] Lattal, K.M., Barrett, R.M., Wood, M.A. (2007): Systemic or intrahippocampal delivery of histone deacetylase inhibitors facilitates fear extinction. *Behav Neurosci* 121(5): 1125–1131.
- [111] Levenson, J., Weeber, E., Selcher, J.C., Kategaya, L.S., Sweatt, J.D., Eskin, A. (2002): Long-term potentiation and contextual fear conditioning increase neuronal glutamate uptake. *Nat Neurosci* 5(2): 155–161.
- [112] Levenson, J.M., O'Riordan, K.J., Brown, K.D., Trinh, M.A., Molfese, D.L., Sweatt, J.D. (2004): Regulation of histone acetylation during memory formation in the hippocampus. *J Biol Chem* 279(39): 40 545–40 559.
- [113] Levenson, J.M., Weeber, E.J., Sweatt, J.D., Eskin, A. (2002): Glutamate uptake in synaptic plasticity: from mollusc to mammal. *Curr Mol Med* 2(7): 593–603.
- [114] Li, W., Tully, T., Kalderon, D. (1996): Effects of a conditional Drosophila PKA mutant on olfactory learning and memory. *Learn Mem* 2(6): 320–333.
- [115] Li, Z., Okamoto, K.I., Hayashi, Y., Sheng, M. (2004): The importance of dendritic mitochondria in the morphogenesis and plasticity of spines and synapses. *Cell* 119(6): 873–887.
- [116] Lim, A.C.B., Tiu, S.Y., Li, Q., Qi, R.Z. (2004): Direct regulation of microtubule dynamics by protein kinase CK2. *J Biol Chem* 279(6): 4433–4439.
- [117] Loewen, M.E., Wang, Z., Eldstrom, J., Zadeh, A.D., Khurana, A., Steele, D.F., Fedida, D. (2009): Shared requirement for dynein function and intact microtubule cytoskeleton for normal surface expression of cardiac potassium channels. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 296(1): H71–H83.
- [118] Maas, C., Belgardt, D., Lee, H.K., Heisler, F.F., Lappe-Siefke, C., Magiera, M.M., van Dijk, J., Hausrat, T.J., Janke, C., Kneussel, M. (2009): Synaptic activation modifies microtubules underlying transport of postsynaptic cargo. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106(21): 8731–8736.

- [119] Macaskill, A.F., Rinholm, J.E., Twelvetrees, A.E., Arancibia-Carcamo, I.L., Muir, J., Fransson, A., Aspenstrom, P., Attwell, D., Kittler, J.T. (2009): Miro1 is a calcium sensor for glutamate receptor-dependent localization of mitochondria at synapses. *Neuron* 61(4): 541–555.
- [120] Mansuy, I.M., Shenolikar, S. (2006): Protein serine/threonine phosphatases in neuronal plasticity and disorders of learning and memory. *Trends Neurosci* 29(12): 679–686.
- [121] Martin, K.C., Sun, Y.E. (2004): To learn better, keep the HAT on. *Neuron* 42(6): 879–881.
- [122] Martin, K.C., Zukin, R.S. (2006): RNA trafficking and local protein synthesis in dendrites: an overview. *J Neurosci* 26(27): 7131–7134.
- [123] Martin, S.J., Grimwood, P.D., Morris, R.G. (2000): Synaptic plasticity and memory: an evaluation of the hypothesis. *Annu Rev Neurosci* 23: 649–711.
- [124] Marupudi, N.I., Han, J.E., Li, K.W., Renard, V.M., Tyler, B.M., Brem, H. (2007): Paclitaxel: a review of adverse toxicities and novel delivery strategies. *Expert Opin Drug Saf* 6(5): 609–621.
- [125] Matsumoto, G., Ichikawa, M., Tasaki, A., Murofushi, H., Sakai, H. (1984): Axonal microtubules necessary for generation of sodium current in squid giant axons: I. Pharmacological study on sodium current and restoration of sodium current by microtubule proteins and 260K protein. *J Membr Biol* 77(2): 77–91.
- [126] Matsuyama, A., Shimazu, T., Sumida, Y., Saito, A., Yoshimatsu, Y., Seigneurin-Berny, D., Osada, H., Komatsu, Y., Nishino, N., Khochbin, S., Horinouchi, S., Yoshida, M. (2002): In vivo destabilization of dynamic microtubules by HDAC6-mediated deacetylation. *EMBO J* 21(24): 6820–6831.
- [127] Maurice, T., Duclot, F., Meunier, J., Naert, G., Givalois, L., Meffre, J., Célérier, A., Jacquet, C., Copois, V., Mechti, N., Ozato, K., Gongora, C. (2008): Altered memory capacities and response to stress in p300/CBP-associated factor (PCAF) histone acetylase knockout mice. *Neuropsychopharmacology* 33(7): 1584–1602.
- [128] McQuown, S.C., Barrett, R.M., Matheos, D.P., Post, R.J., Rogge, G.A., Alenghat, T., Mullican, S.E., Jones, S., Rusche, J.R., Lazar, M.A., Wood, M.A. (2011): HDAC3 is a critical negative regulator of long-term memory formation. *J Neurosci* 31(2): 764–774.
- [129] Menzel, R. (2001): Searching for the memory trace in a mini-brain, the honeybee. *Learn Mem* 8(2): 53–62.
- [130] Menzel, R., Manz, G., Menzel, R., Greggers, U. (2001): Massed and spaced learning in honeybees: the role of CS, US, the intertrial interval, and the test interval. *Learn Mem* 8(4): 198–208.
- [131] Menzel, R., Muller, U. (1996): Learning and memory in honeybees: from behavior

- to neural substrates. *Annu Rev Neurosci* 19: 379–404.
- [132] Merschbächer, K. (2009): Proteinacetylierung und die Rolle der Histonacetyltransferasen beim Lernen und der Gedächtnisbildung. Diplomarbeit. Universität des Saarlandes .
- [133] Milas, L., Mason, K.A., Hunter, N., Li, C., Wallace, S. (2003): Poly(L-glutamic acid)-paclitaxel conjugate is a potent enhancer of tumor radiocurability. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 55(3): 707–712.
- [134] Mironov, S.L., Richter, D.W. (1999): Cytoskeleton mediates inhibition of the fast Na⁺ current in respiratory brainstem neurons during hypoxia. *Eur J Neurosci* 11(5): 1831–1834.
- [135] Mitsuyama, F., Niimi, G., Kato, K., Hirose, K., Mikoshiba, K., Okuya, M., Karagiozov, K., Kato, Y., Kanno, T., Sanoe, H., Koide, T. (2008): Redistribution of microtubules in dendrites of hippocampal CA1 neurons after tetanic stimulation during long-term potentiation. *Ital J Anat Embryol* 113(1): 17–27.
- [136] Müller, U. (2000): Prolonged activation of cAMP-dependent protein kinase during conditioning induces long-term memory in honeybees. *Neuron* 27(1): 159–168.
- [137] Müller, U. (2002): Learning in honeybees: from molecules to behaviour. *Zoology (Jena)* 105(4): 313–320.
- [138] Mohamed, H.A., Yao, W., Fioravante, D., Smolen, P.D., Byrne, J.H. (2005): cAMP-response elements in *Aplysia* creb1, creb2, and *Ap-uch* promoters: implications for feedback loops modulating long term memory. *J Biol Chem* 280(29): 27 035–27 043.
- [139] Mollinedo, F., Gajate, C. (2003): Microtubules, microtubule-interfering agents and apoptosis. *Apoptosis* 8(5): 413–450.
- [140] Montag-Sallaz, M., Montag, D. (2003): Learning-induced arg 3.1/arc mRNA expression in the mouse brain. *Learn Mem* 10(2): 99–107.
- [141] Nakayama, T., Sawada, T. (2002): Involvement of microtubule integrity in memory impairment caused by colchicine. *Pharmacol Biochem Behav* 71(1-2): 119–138.
- [142] Niel, E., Scherrmann, J.M. (2006): Colchicine today. *Joint Bone Spine* 73(6): 672–678.
- [143] North, B.J., Marshall, B.L., Borra, M.T., Denu, J.M., Verdin, E. (2003): The human Sir2 ortholog, SIRT2, is an NAD⁺-dependent tubulin deacetylase. *Mol Cell* 11(2): 437–444.
- [144] Ohkawa, N., Sugisaki, S., Tokunaga, E., Fujitani, K., Hayasaka, T., Setou, M., Inokuchi, K. (2008): N-acetyltransferase ARD1-NAT1 regulates neuronal dendritic development. *Genes Cells* 13(11): 1171–1183.
- [145] Oike, Y., Hata, A., Mamiya, T., Kaname, T., Noda, Y., Suzuki, M., Yasue, H., Nabeshima, T., Araki, K., Yamamura, K. (1999): Truncated CBP protein leads

- to classical Rubinstein-Taybi syndrome phenotypes in mice: implications for a dominant-negative mechanism. *Hum Mol Genet* 8(3): 387–396.
- [146] Oliveira, A.M.M., Wood, M.A., McDonough, C.B., Abel, T. (2007): Transgenic mice expressing an inhibitory truncated form of p300 exhibit long-term memory deficits. *Learn Mem* 14(9): 564–572.
- [147] Orhan, I., Naz, Q., Kartal, M., Tosun, F., Sener, B., Choudhary, M.I. (2007): In vitro anticholinesterase activity of various alkaloids. *Z Naturforsch C* 62(9-10): 684–688.
- [148] Outeiro, T.F., Kontopoulos, E., Altmann, S.M., Kufareva, I., Strathearn, K.E., Amore, A.M., Volk, C.B., Maxwell, M.M., Rochet, J.C., McLean, P.J., Young, A.B., Abagyan, R., Feany, M.B., Hyman, B.T., Kazantsev, A.G. (2007): Sirtuin 2 inhibitors rescue alpha-synuclein-mediated toxicity in models of Parkinson's disease. *Science* 317(5837): 516–519.
- [149] Overly, C.C., Rieff, H.I., Hollenbeck, P.J. (1996): Organelle motility and metabolism in axons vs dendrites of cultured hippocampal neurons. *J Cell Sci* 109 (Pt 5): 971–980.
- [150] Pandey, K., Sharma, S.K. (2011): Activity-Dependent Acetylation of Alpha Tubulin in the Hippocampus. *J Mol Neurosci* .
- [151] Pankiw, T., Waddington, K.D., Page, R.E. (2001): Modulation of sucrose response thresholds in honey bees (*Apis mellifera* L.): influence of genotype, feeding, and foraging experience. *J Comp Physiol A* 187(4): 293–301.
- [152] Park, S.M., Liu, G., Kubal, A., Fury, M., Cao, L., Marx, S.O. (2004): Direct interaction between BKCa potassium channel and microtubule-associated protein 1A. *FEBS Lett* 570(1-3): 143–148.
- [153] Patre, P.L.D., Abbamondi, A., Bartolini, L., Pepeu, G. (1989): GM1 ganglioside counteracts cholinergic and behavioral deficits induced in the rat by intracerebral injection of vincristine. *Eur J Pharmacol* 162(1): 43–50.
- [154] Pavlov, I.P. (1927): CONDITIONED REFLEXES: AN INVESTIGATION OF THE PHYSIOLOGICAL ACTIVITY OF THE CEREBRAL CORTEX. *Annals of Neuroscience* 17.
- [155] Perdiz, D., Mackeh, R., Poüs, C., Baillet, A. (2010): The ins and outs of tubulin acetylation: More than just a post-translational modification? *Cell Signal* .
- [156] Perez, M., Santa-Maria, I., de Barreda, E.G., Zhu, X., Cuadros, R., Cabrero, J.R., Sanchez-Madrid, F., Dawson, H.N., Vitek, M.P., Perry, G., Smith, M.A., Avila, J. (2009): Tau—an inhibitor of deacetylase HDAC6 function. *J Neurochem* 109(6): 1756–1766.
- [157] Pita-Almenar, J.D., Collado, M.S., Colbert, C.M., Eskin, A. (2006): Different mechanisms exist for the plasticity of glutamate reuptake during early long-term potentiation (LTP) and late LTP. *J Neurosci* 26(41): 10461–10471.

- [158] Plath, N., Ohana, O., Dammermann, B., Errington, M.L., Schmitz, D., Gross, C., Mao, X., Engelsberg, A., Mahlke, C., Welzl, H., Kobalz, U., Stawrakakis, A., Fernandez, E., Waltereit, R., Bick-Sander, A., Therstappen, E., Cooke, S.F., Blanquet, V., Wurst, W., Salmen, B., Bösl, M.R., Lipp, H.P., Grant, S.G.N., Bliss, T.V.P., Wolfer, D.P., Kuhl, D. (2006): Arc/Arg3.1 is essential for the consolidation of synaptic plasticity and memories. *Neuron* 52(3): 437–444.
- [159] Polevoda, B., Sherman, F. (2002): The diversity of acetylated proteins. *Genome Biol* 3(5): review.
- [160] Puthanveetil, S.V., Monje, F.J., Miniaci, M.C., Choi, Y.B., Karl, K.A., Khandros, E., Gawinowicz, M.A., Sheetz, M.P., Kandel, E.R. (2008): A new component in synaptic plasticity: upregulation of kinesin in the neurons of the gill-withdrawal reflex. *Cell* 135(5): 960–973.
- [161] Reed, N.A., Cai, D., Blasius, T.L., Jih, G.T., Meyhofer, E., Gaertig, J., Verhey, K.J. (2006): Microtubule acetylation promotes kinesin-1 binding and transport. *Curr Biol* 16(21): 2166–2172.
- [162] Reynolds, I.J., Malaiyandi, L.M., Coash, M., Rintoul, G.L. (2004): Mitochondrial trafficking in neurons: a key variable in neurodegeneration? *J Bioenerg Biomembr* 36(4): 283–286.
- [163] Roth, S.Y., Denu, J.M., Allis, C.D. (2001): Histone acetyltransferases. *Annu Rev Biochem* 70: 81–120.
- [164] Schapitz, I.U., Behrend, B., Pechmann, Y., Lappe-Siefke, C., Kneussel, S.J., Wallace, K.E., Stempel, A.V., Buck, F., Grant, S.G.N., Schweizer, M., Schmitz, D., Schwarz, J.R., Holzbaur, E.L.F., Kneussel, M. (2010): Neuroligin 1 is dynamically exchanged at postsynaptic sites. *J Neurosci* 30(38): 12 733–12 744.
- [165] Scheiffele, P., Fan, J., Choih, J., Fetter, R., Serafini, T. (2000): Neuroligin expressed in nonneuronal cells triggers presynaptic development in contacting axons. *Cell* 101(6): 657–669.
- [166] Scheiner, R., Page, R.E., Erber, J. (2001): Responsiveness to sucrose affects tactile and olfactory learning in preforaging honey bees of two genetic strains. *Behav Brain Res* 120(1): 67–73.
- [167] Schiff, P.B., Horwitz, S.B. (1980): Taxol stabilizes microtubules in mouse fibroblast cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 77(3): 1561–1565.
- [168] Schuman, E.M., Dynes, J.L., Steward, O. (2006): Synaptic regulation of translation of dendritic mRNAs. *J Neurosci* 26(27): 7143–7146.
- [169] Schwärzel, M., Müller, U. (2006): Dynamic memory networks: dissecting molecular mechanisms underlying associative memory in the temporal domain. *Cell Mol Life Sci* 63(9): 989–998.
- [170] Segal, M. (2002): Changing views of Cajal's neuron: the case of the dendritic spine. *Prog Brain Res* 136: 101–107.

- [171] Seoane, A., Massey, P.V., Keen, H., Bashir, Z.I., Brown, M.W. (2009): L-type voltage-dependent calcium channel antagonists impair perirhinal long-term recognition memory and plasticity processes. *J Neurosci* 29(30): 9534–9544.
- [172] Setou, M., Nakagawa, T., Seog, D.H., Hirokawa, N. (2000): Kinesin superfamily motor protein KIF17 and mLin-10 in NMDA receptor-containing vesicle transport. *Science* 288(5472): 1796–1802.
- [173] Setou, M., Seog, D.H., Tanaka, Y., Kanai, Y., Takei, Y., Kawagishi, M., Hirokawa, N. (2002): Glutamate-receptor-interacting protein GRIP1 directly steers kinesin to dendrites. *Nature* 417(6884): 83–87.
- [174] Sharma, S.K. (2010): Protein acetylation in synaptic plasticity and memory. *Neurosci Biobehav Rev* .
- [175] Shiraishi, S., Quesne, P.M.L., Gajree, T. (1985): The effect of vincristine on nerve regeneration in the rat. An electrophysiological study. *J Neurol Sci* 71(1): 9–17.
- [176] Si, K., Giustetto, M., Etkin, A., Hsu, R., Janisiewicz, A.M., Miniaci, M.C., Kim, J.H., Zhu, H., Kandel, E.R. (2003): A neuronal isoform of CPEB regulates local protein synthesis and stabilizes synapse-specific long-term facilitation in aplysia. *Cell* 115(7): 893–904.
- [177] Silva, A.J., Kogan, J.H., Frankland, P.W., Kida, S. (1998): CREB and memory. *Annu Rev Neurosci* 21: 127–148.
- [178] Singh, N., Lorbeck, M.T., Zervos, A., Zimmerman, J., Elefant, F. (2010): The histone acetyltransferase Elp3 plays an active role in the control of synaptic bouton expansion and sleep in *Drosophila*. *J Neurochem* .
- [179] Sterner, D.E., Berger, S.L. (2000): Acetylation of histones and transcription-related factors. *Microbiol Mol Biol Rev* 64(2): 435–459.
- [180] Steward, O., Wallace, C.S., Lyford, G.L., Worley, P.F. (1998): Synaptic activation causes the mRNA for the IEG Arc to localize selectively near activated postsynaptic sites on dendrites. *Neuron* 21(4): 741–751.
- [181] Steward, O., Worley, P.F. (2001): A cellular mechanism for targeting newly synthesized mRNAs to synaptic sites on dendrites. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98(13): 7062–7068.
- [182] Stone, A.A., Chambers, T.C. (2000): Microtubule inhibitors elicit differential effects on MAP kinase (JNK, ERK, and p38) signaling pathways in human KB-3 carcinoma cells. *Exp Cell Res* 254(1): 110–119.
- [183] Subbaramaiah, K., Hart, J.C., Norton, L., Dannenberg, A.J. (2000): Microtubule-interfering agents stimulate the transcription of cyclooxygenase-2. Evidence for involvement of ERK1/2 AND p38 mitogen-activated protein kinase pathways. *J Biol Chem* 275(20): 14 838–14 845.
- [184] Sunyer, B., Diao, W., Lubec, G. (2008): The role of post-translational modifications for learning and memory formation. *Electrophoresis* 29(12): 2593–2602.

- [185] Szczech, J. (1985): Morphometric, karyometric and cytophotometric studies on spinal cord neurons and glia cells after vincristine administration. *J Hirnforsch* 26(5): 565–572.
- [186] Tada, T., Sheng, M. (2006): Molecular mechanisms of dendritic spine morphogenesis. *Curr Opin Neurobiol* 16(1): 95–101.
- [187] Takemura, R., Okabe, S., Umeyama, T., Kanai, Y., Cowan, N.J., Hirokawa, N. (1992): Increased microtubule stability and alpha tubulin acetylation in cells transfected with microtubule-associated proteins MAP1B, MAP2 or tau. *J Cell Sci* 103 (Pt 4): 953–964.
- [188] Terkeltaub, R.A. (2009): Colchicine update: 2008. *Semin Arthritis Rheum* 38(6): 411–419.
- [189] Tran, A.D.A., Marmo, T.P., Salam, A.A., Che, S., Finkelstein, E., Kabarriti, R., Xenias, H.S., Mazitschek, R., Hubbert, C., Kawaguchi, Y., Sheetz, M.P., Yao, T.P., Bulinski, J.C. (2007): HDAC6 deacetylation of tubulin modulates dynamics of cellular adhesions. *J Cell Sci* 120(Pt 8): 1469–1479.
- [190] Trimmer, P.A., Borland, M.K. (2005): Differentiated Alzheimer's disease trans-mitochondrial cybrid cell lines exhibit reduced organelle movement. *Antioxid Redox Signal* 7(9-10): 1101–1109.
- [191] Tudor, G., Aguilera, A., Halverson, D.O., Laing, N.D., Sausville, E.A. (2000): Susceptibility to drug-induced apoptosis correlates with differential modulation of Bad, Bcl-2 and Bcl-xL protein levels. *Cell Death Differ* 7(6): 574–586.
- [192] Vecsey, C.G., Hawk, J.D., Lattal, K.M., Stein, J.M., Fabian, S.A., Attner, M.A., Cabrera, S.M., McDonough, C.B., Brindle, P.K., Abel, T., Wood, M.A. (2007): Histone deacetylase inhibitors enhance memory and synaptic plasticity via CREB:CBP-dependent transcriptional activation. *J Neurosci* 27(23): 6128–6140.
- [193] Verhey, K.J., Gaertig, J. (2007): The tubulin code. *Cell Cycle* 6(17): 2152–2160.
- [194] Verstreken, P., Ly, C.V., Venken, K.J.T., Koh, T.W., Zhou, Y., Bellen, H.J. (2005): Synaptic mitochondria are critical for mobilization of reserve pool vesicles at *Drosophila* neuromuscular junctions. *Neuron* 47(3): 365–378.
- [195] Waltereit, R., Dammermann, B., Wulff, P., Scafidi, J., Staubli, U., Kauselmann, G., Bundman, M., Kuhl, D. (2001): Arg3.1/Arc mRNA induction by Ca²⁺ and cAMP requires protein kinase A and mitogen-activated protein kinase/extracellular regulated kinase activation. *J Neurosci* 21(15): 5484–5493.
- [196] Wang, D.O., Martin, K.C., Zukin, R.S. (2010): Spatially restricting gene expression by local translation at synapses. *Trends Neurosci* 33(4): 173–182.
- [197] Wei, J., Zhang, M., Zhu, Y., Wang, J.H. (2004): Ca(2+)-calmodulin signalling pathway up-regulates GABA synaptic transmission through cytoskeleton-mediated mechanisms. *Neuroscience* 127(3): 637–647.
- [198] Weng, H.R., Aravindan, N., Cata, J.P., Chen, J.H., Shaw, A.D.S., Dougherty,

- P.M. (2005): Spinal glial glutamate transporters downregulate in rats with taxol-induced hyperalgesia. *Neurosci Lett* 386(1): 18–22.
- [199] Westermann, S., Weber, K. (2003): Post-translational modifications regulate microtubule function. *Nat Rev Mol Cell Biol* 4(12): 938–947.
- [200] Whatley, V.J., Mihic, S.J., Allan, A.M., McQuilkin, S.J., Harris, R.A. (1994): Gamma-aminobutyric acidA receptor function is inhibited by microtubule depolymerization. *J Biol Chem* 269(30): 19 546–19 552.
- [201] Wolfson, M., Yang, C.P., Horwitz, S.B. (1997): Taxol induces tyrosine phosphorylation of Shc and its association with Grb2 in murine RAW 264.7 cells. *Int J Cancer* 70(2): 248–252.
- [202] Won, J., Silva, A.J. (2008): Molecular and cellular mechanisms of memory allocation in neuronetworks. *Neurobiol Learn Mem* 89(3): 285–292.
- [203] Wong, R.W.C., Setou, M., Teng, J., Takei, Y., Hirokawa, N. (2002): Overexpression of motor protein KIF17 enhances spatial and working memory in transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99(22): 14 500–14 505.
- [204] Wood, M.A., Attner, M.A., Oliveira, A.M.M., Brindle, P.K., Abel, T. (2006): A transcription factor-binding domain of the coactivator CBP is essential for long-term memory and the expression of specific target genes. *Learn Mem* 13(5): 609–617.
- [205] Wüstenberg, D., Gerber, B., Menzel, R. (1998): Short communication: long- but not medium-term retention of olfactory memories in honeybees is impaired by actinomycin D and anisomycin. *Eur J Neurosci* 10(8): 2742–2745.
- [206] Yeste-Velasco, M., Alvira, D., Sureda, F.X., Rimbau, V., Forsby, A., Pallàs, M., Camins, A., Folch, J. (2008): DNA low-density array analysis of colchicine neurotoxicity in rat cerebellar granular neurons. *Neurotoxicology* 29(2): 309–317.
- [207] Yin, J.C., Wallach, J.S., Vecchio, M.D., Wilder, E.L., Zhou, H., Quinn, W.G., Tully, T. (1994): Induction of a dominant negative CREB transgene specifically blocks long-term memory in *Drosophila*. *Cell* 79(1): 49–58.
- [208] Yue, Q.X., Liu, X., Guo, D.A. (2010): Microtubule-binding natural products for cancer therapy. *Planta Med* 76(11): 1037–1043.
- [209] Yuste, R., Bonhoeffer, T. (2001): Morphological changes in dendritic spines associated with long-term synaptic plasticity. *Annu Rev Neurosci* 24: 1071–1089.
- [210] Zilberman, Y., Ballestrom, C., Carramusa, L., Mazitschek, R., Khochbin, S., Bershadsky, A. (2009): Regulation of microtubule dynamics by inhibition of the tubulin deacetylase HDAC6. *J Cell Sci* 122(Pt 19): 3531–3541.
- [211] Zukin, R.S., Richter, J.D., Bagni, C. (2009): Signals, synapses, and synthesis: how new proteins control plasticity. *Front Neural Circuits* 3: 14.

7 Danksagung

Ich bedanke mich ganz herzlich bei Herrn Prof. Dr. Uli Müller, dass sich mir ein so spannendes Thema bot und ich meine Dissertation an seinem Lehrstuhl anfertigen konnte. Danke auch für die stete Unterstützung sowie Gesprächsbereitschaft und dafür, dass ich die Möglichkeit hatte mich an der Lehre und Betreuung von Studenten zu beteiligen.

Ich danke auch Herrn Prof. Dr. Mathias Montenarh herzlich, dass er mich bereits bei meinen ersten Schritten während meiner Diplomarbeit unterstützt hat und er nun die Zweitkorrektur meiner Doktorarbeit übernimmt.

Besten Dank auch an Herrn Dr. Helmut Kallenborn für die Mitwirkung als Akademischer Mittelbau.

Bei Herrn Dr. Stuart Schreiber von der Harvard Universität möchte ich mich für das zur Verfügung gestellte Tubacin bedanken.

Ein großes Dankeschön geht an die gesamte Arbeitsgruppe Müller, an derzeitige sowie ehemalige Mitarbeiter, für das außerordentlich gute Arbeitsklima. So hat es jeden Tag Spaß gemacht zur Arbeit zu kommen.

Vielen lieben Dank auch an unsere TA Angelika Gardezi, die sich unermüdlich um die Pflege der Bienen kümmert und wunderbare histologische Untersuchungen für mich durchgeführt hat.

Ganz herzlich möchte ich auch unserer TA Iris Fuchs meinen Dank für ihre tatkräftige Unterstützung bei Laborarbeiten sowie für ihre emotionale Stütze auf Durststrecken aussprechen.

Recht vielen lieben Dank auch an unseren Techniker und Bastler Michael Glander für die kleinen Reparaturen und Hilfeleistungen zwischendurch.

Ein besonderes Dankeschön richtet sich an Kathy Rether für den allwöchentlichen sportlichen Ausgleich und das Igeln danach.

Bedanken möchte ich mich natürlich auch bei den fließigen HiWis, die mich bei meiner Doktorarbeit unterstützt haben. Dazu zählen v.a. Jennifer Folz, Caroline Wern, Anna-Maria Miederer, Ewa Slowik sowie Sven Kappel.

Die gelungene F-Arbeit von Christine Sauerland möchte ich nochmals würdigen, da sich daraus eine hervorragende Basis für meine weiterführende Untersuchung zur Mikrotubuli-Stabilität ergab. Auch bei meinen F-Praktikanten Gino Micheli und Daria Chernyak möchte ich mich bedanken. Es hat mir sehr viel Freude bereitet euch zu betreuen.

Dr. Susanne Meuser, Dr. Olivia Barton, Katja Merschbächer, Adam Zawada, Christine Sauerland sowie Christoph Pütz danke ich ganz herzlich für ihren Einsatz beim Korrekturlesen meiner Arbeit. Besten Dank für das Auffinden der Fehler, die ich irgendwann selbst nicht mehr gesehen habe sowie für die kritischen Anmerkungen.

Lieben Dank auch an Jennifer Folz, die sich gelegentlich einfach mal neben mich gestellt und mich dadurch kreativ inspiriert hat.

Meinem Freund Adam Zawada möchte ich von ganzem Herzen danken, dass er soviel Geduld und Ausdauer gezeigt und mich stets bemerkenswert unterstützt hat.

Vielen Dank auch an die weit mehr als 3500 Bienen, die maßgeblich zum Erfolg dieser Arbeit beigetragen haben.