

Die Wirkung von Gelée royale auf Histonmodifikationen
und seine Rolle in Lern- und Gedächtnisprozessen am
Modellorganismus der Honigbiene

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

von
Bärbel Heidtmann
Saarbrücken 2010

Tag des Kolloquiums:

Dekan:

Berichterstatter:

.....

Vorsitz:

Akad. Mitarbeiter:

Inhaltsverzeichnis.....Seite

1. Einleitung

1.1	Gelée royale (GR)	1
1.1.1	GR und seine Bedeutung für die Kastendifferenzierung im Bienenvolk	1
1.1.2	Biologische Wirkung und Inhaltsstoffe des Gelée royale	2
1.2	Histonmodifikationen und Histoncode	4
1.2.2	Histonacetylierung	5
1.2.2.1	Histonacetyltransferasen (HATs)	6
1.2.2.2	Histondeacetylasen (HDACs)	6
1.2.3	Histonmethylierung	7
1.2.3.1	Histonmethyltransferasen	7
1.2.3.2	Histondemethylasen	8
1.2.4	Histonmodifikationen und ihre Auswirkungen auf biologische Prozesse	9
1.3	Lernen und Gedächtnisbildung	9
1.3.1	Molekulare und chromatinmodifizierende Mechanismen in Lernprozessen und Gedächtnisbildung	9
1.3.2	Lernparadigmen	12
1.3.2.1	Lernparadigmen an der Honigbiene	12
1.3.2.2	Nicht-assoziative Lernparadigmen (Habituation und Sensibilisierung) und Zuckerwasserempfindlichkeit	12
1.3.2.3	Assoziatives Lernparadigma	13

2. Zielsetzung 15

3. Material und Methoden 16

3.1	Material	16
3.1.1	Chemikalien	16
3.1.2	Verbrauchsmaterial	17
3.1.3	Geräte	17
3.1.4	Puffer und Lösungen	18
3.1.5	Injektions- und Futterlösungen	20
3.1.6	Antikörper	21
3.2	Methoden	22
3.2.1	Haltung der Honigbienen	22
3.2.2	Zuckerwasserempfindlichkeit (Responsiveness)	22

3.2.3	Nicht-assoziative Lernparadigmen (Sensitisierung und Habituation)	23
3.2.3.1	Sensitisierung	23
3.2.3.2	Habituation	23
3.2.4	Assoziative appetitive olfaktorische Konditionierung	24
3.2.5	Präparation eines Bienehirns	24
3.2.6	Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA)	24
3.2.7	Fraktionierung des Gelée royale	25
3.2.7.1	Trennung der Lipid- und Proteinfraction	25
3.2.7.2	Trypsinierung des Gelée royale	25
3.2.8	HDAC-Assay	26
3.2.8.1	Bestimmung der einzusetzenden Substratmenge	27
3.2.8.2	Bestimmung der einzusetzenden Gehirnmenge (Enzymmenge)	28
4.	Ergebnisse	29
4.1	Die Wirkung von Gelée royale (GR) auf Histondeacetylasen, Histonmodifikationen, sowie assoziative und nicht-assoziative Lernparadigmen	29
4.1.1.	Bestimmung der zu verfütternden Menge an Gelée royale	29
4.1.1.1	Bestimmung der Testzeitpunkte	29
4.1.2	GR verringert die Deacetylaseaktivität	30
4.1.3	Wirkung von GR auf Histonmodifikationen im Gehirn der Honigbiene	31
4.1.3.1	Einmalige Fütterung mit GR verändert die Histonacetylierung und -methylierung	32
4.1.3.2	Mehrmalige Fütterung mit GR verändert die Histonacetylierung und -methylierung	33
4.1.3.3	Wirkung von GR auf Histonmodifikationen im Gehirn frisch geschlüpfter Bienen	35
4.1.4	Einfluss von GR auf das Verhalten der Honigbiene	35
4.1.4.1	GR hat keinen Einfluss auf die Zuckerwasserempfindlichkeit der Honigbiene	36
4.1.4.2	GR hat keinen Einfluss auf nicht-assoziative Lernparadigmen (Habituation und Sensitisierung)	37
4.1.4.3	Einfluss von GR auf assoziatives Lernen und Gedächtnisbildung	38
4.2	GR-Fractionen	42
4.2.1	Effekte nach Trypsinierung des GR	42
4.2.1.1	Trypsiniertes GR hat keinen Einfluß auf die Histonacetylierung oder Histonmethylierung des Bienehirns	42
4.2.1.2	Effekte von trypsiniertem GR auf Lernen und Gedächtnis	43

	der Honigbiene	
4.2.2.	Effekte nach Chloroformextraktion des GR	44
4.2.2.1	Die Lipid-Fraktion des GR verringert die HDAC-Aktivität	44
4.2.2.2	Einfluss von Lipid- und Protein-Fraktion des GR auf Histonmodifikationen	46
4.2.2.3	Einfluss der GR-Fraktionen auf Lernen und Gedächtnis der Honigbiene	48
4.3.	Die Wirkung von Einzelsubstanzen aus dem Gelée royale auf Histondeacetylasen, Histonmodifikationen, sowie assoziative und nicht-assoziative Lernparadigmen	51
4.3.1	Nikotinamid (NAM)	51
4.3.1.1	NAM vermindert die HDAC-Aktivität <i>in vitro</i>	52
4.3.1.2	Einmalige Fütterung von NAM erhöht die Histonacetylierung und Histonmethylierung	53
4.3.1.3	Einfluss von NAM auf Lernen und Gedächtnis der Honigbiene	55
4.3.1.3.1	NAM hat keinen Einfluss auf die Zuckerwasserempfindlichkeit der Honigbiene	55
4.3.1.3.2	Einfluss von NAM auf nicht-assoziatives Lernen (Habituation und Sensitisierung)	56
4.3.1.3.3	NAM verbessert das Gedächtnis nach schwachem und starkem Training	57
4.3.2	10-Hydroxy-2-Decensäure (10-HDA, Royal Jelly Acid)	60
4.3.2.1	Einfluss von 10-HDA auf Zuckerwasserempfindlichkeit, nicht-assoziative und assoziative Lernparadigmen	
4.3.2.1.1	Hohe Konzentrationen an 10-HDA erhöhen die Zuckerwasserempfindlichkeit	60
4.3.2.1.2	10-HDA hat keinen Einfluss auf nicht-assoziative Lernformen	61
4.3.2.1.3	10-HDA verbessert das Gedächtnis der Honigbiene nach schwachem Training	62
4.3.2.1.4	Eingrenzung des Wirkmechanismus: Der 10-HDA Effekt ist transkriptionsabhängig	64
4.3.2.1.5	Einfluss der 10- HDA auf die HDAC-Aktivität und Histonmodifikationen	65
4.3.2.1.6	10-HDA vermindert die HDAC-Aktivität <i>in vitro</i>	65
4.3.2.1.7	Die 10-HDA verändert die Histonmethylierung, aber nicht die Histonacetylierung	66
5.	Diskussion	68
5.1	Gelée royale in der Kastendifferenzierung der Bienen	68

5.1.1	Gelée royale und Chromatinmodifikationen	68
5.2	Gelée Royale und Verhalten	69
5.2.1	Gelée royale in Lern- und Gedächtnisprozessen	69
5.3	Die Bedeutung von Fettsäuren für die Histonacetylierung und -methylierung	71
5.4	Die Bedeutung von Fettsäuren in Lernen und Gedächtnisbildung	72
5.5	Der Fettmetabolismus in Insekten	73
5.6	Hormonelle Wirkung der 10-HDA	74
5.7	Nikotinamid in Reizwahrnehmung, Reizprozessierung und nicht- assoziativen Lernen	76
5.8	Nikotinamid im assoziativen Lernen	76
5.9	Transkriptionsabhängigkeit des Nikotinamid induzierten Gedächtnisses	78
5.10	Fazit	80
6. Zusammenfassung		82
7. Summary (Zusammenfassung in englischer Sprache)		83
8. Verzeichnisse		84
8.1	Abbildungsverzeichnis	84
8.2	Tabellenverzeichnis	85
8.3	Literaturverzeichnis	86
8.4	Abkürzungsverzeichnis	105
9. Danksagung		107

1. Einleitung

1.1 Gelée royale (GR)

1.1.1 GR und seine Bedeutung für die Kastendifferenzierung im Bienenvolk

Das Bienenvolk besteht aus drei unterschiedlichen Kasten, die sich physiologisch, morphologisch und anhand ihrer Arbeitsteilung unterscheiden. Die haploiden männlichen Drohnen entwickeln sich aus unbefruchteten Eiern und ihre einzige Aufgabe ist die Begattung der Königin. Arbeiterinnen und Königinnen entstehen beide aus befruchteten Eiern, entwickeln sich aber unterschiedlich und erfüllen verschiedene Aufgaben im Stock. Die Königin verlässt den Stock nur ein einziges Mal um begattet zu werden und ist im Gegensatz zur Arbeiterin reproduktiv aktiv, alle anderen Aufgaben im Bienenstock werden von den Arbeiterinnen der verschiedenen Altersstufen übernommen. Die jüngsten Arbeiterinnen übernehmen Säuberungsarbeiten und das Füttern der Larven, gefolgt von Bau- und Wachtätigkeiten in der zweiten und dritten Woche. Erst nach ca. drei Wochen verlassen die Bienen den Stock um Nektar, Wasser und Pollen zu sammeln.



Abb. 1.1: In GR eingebettete Königinnenlarven in verschiedenen Larvalstadien (Quelle: Wikipedia)

Gelée royale, auch Weiselfuttersaft oder Apilak genannt, ist ein weißlich gelbes Gemisch aus den Sekreten der Hypopharynxdrüsen (Futtersaftdrüsen) und der Mandibeldrüsen (Oberkieferdrüsen) sechs bis zwölf Tage alter Ammenbienen. Es dient der Ernährung der Bienenköniginnennlarven (Abb. 1.1) und der adulten Königin. Königinnenlarven werden im Gegensatz zu künftigen Arbeiterinnen während ihrer gesamten Larvalentwicklung mit hohen Mengen an Gelée royale gefüttert. Man gewann daraus die Erkenntnis, dass eine Fütterung mit Gelée royale darüber entscheidet, ob sich eine diploide Bienenlarve zu einer unfruchtbaren kurzlebigen Arbeiterin oder einer langlebigen fruchtbaren Königin entwickelt.

Anfänglich gab es verschiedene Theorien dazu, wie eine derartige, durch unterschiedliche Ernährung evozierte, Kastendifferenzierung möglich ist. Da die Zellen der Königinnenlarven etwa die hundertfache Futtermenge (200-400 mg GR) enthalten wie die Zellen der

Arbeiterinnen (2-4 mg Arbeiterinnenfutter), wurde zunächst angenommen, dass dieser quantitative Unterschied auch die Differenzierung der Larven verursacht (Haydak, 1943). Später wurden qualitative Unterschiede in der Zusammensetzung der Arbeiter- und Königinnennahrung und somit eine Art Differenzierungswirkstoff vermutet (Rembold et al. 1964, Weaver 1955), der zur Königinnenentwicklung führen soll. Ein solcher Wirkstoff ist jedoch bis heute noch nicht identifiziert worden. Andere Theorien besagen, dass das Juvenilhormon eine wichtige Rolle für die Kastendifferenzierung habe (Ascenot und Lensky, 1976) oder dass lediglich der unterschiedliche Glukose-Fruktose-Gehalt von Arbeiter- und Königinnennahrung verantwortlich für die Kastendifferenzierung sei (Ascenot und Lensky, 1988). Im Laborversuch wurde durch Beimischung dieser Zucker zum Arbeiterinnenlarvenfutter eine erhöhte Anzahl an Königinnen erzeugt. Allerdings konnte dabei außer eines phagostimulierenden Effektes keine direkte Wirkung von Glukose oder Fruktose gezeigt werden.

1.1.2 Biologische Wirkung und Inhaltsstoffe des GR

Seit den ersten wissenschaftlichen Erwähnungen durch die Naturwissenschaftler Jan Swammerdam im 17. Jahrhundert und François Huber im 18. Jahrhundert werden dem Gelée royale und seinen Inhaltsstoffen die verschiedenartigsten Wirkungen zugeschrieben, die man seit etwa Mitte des 19. Jahrhunderts bis heute *in vitro* und *in vivo* an verschiedenen Organismen genauer erforscht. Die Zusammensetzung des GR ist leicht variabel und abhängig von geographischen, botanischen und klimatischen Faktoren sowie vom Alter der Ammenbienen und der Bienenart (Bonomi et al., 1986; Li et al., 2007; Stocker, 2003).

Die Hauptbestandteile des GR sind Wasser (60-70%), verschiedene Saccharide (ca. 11-23%), Proteine und Peptide (9-18%) und Lipide (4-8%) (siehe Tab.1.1). Dabei besteht der Saccharidanteil hauptsächlich aus Fruktose, Glukose und Saccharose (Sesta, 2006) in unterschiedlichen Mischverhältnissen.

Die Proteine des GR haben einen hohen Anteil an essentiellen Aminosäuren (Lercker et al., 1993). Der überwiegende Anteil (90%) besteht aus den so genannten Major Royal Jelly Proteinen (MRJP), auch Apalbumine genannt, deren Gene teilweise im Kopf der Arbeiterinnen exprimiert (Peixoto et al., 2009) und mit dem Sozialverhalten der Bienen in Verbindung gebracht werden. Gelée royale besitzt antibakterielle, antivirale und fungizide Eigenschaften, die überwiegend auf die in GR enthaltenen Peptide, die Jelleine und das Royalisin zurückzuführen sind (Fontana et al., 2004; Fujiwara et al., 1990).

Ebenfalls antibakteriell und fungizid wirkt die so genannte Royal Jelly Acid, die 10-Hydroxy-2-decensäure (10-HDA) (Blum et al., 1959), die natürlicherweise nur in GR vorkommt und den Hauptbestandteil seiner Lipidfraktion bildet. Die 10-HDA ist für den sauren Charakter (pH=3,8-4,2) des GR verantwortlich und ihr Gehalt gilt als internationaler Qualitätsstandard für GR (Antinelli et al., 2003; Bloodworth et al., 1995). Neben ihren antibiotischen Eigenschaften konnten weitere Wirkungen der 10-HDA gezeigt werden. So fördert sie die Kollagenproduktion (Koya-Miyata et al., 2004) und neuronales Wachstum *in vitro* (Hattori et al., 2007) und schon in den 1960er Jahren konnte eine anticancerogene Wirkung *in vivo* nachgewiesen werden (Townsend et al., 1960).

Tab. 1.1: Hauptkomponenten des Gelée royale (Bogdanov et al. 2003)

Komponente	Min. – Max. g/100g
Wasser	60-70
Lipide	4-8
10-HDA	1,4- 6
Proteine	9-18
Zucker	11-23
Fruktose	6-13
Glukose	4-8
Saccharose	0,5-2
	Min. – Max. mg/kg
B1; Thiamin	1-17
B2; Riboflavin	5-25
B3; Niacin	45-190
Folsäure	0,1-0,6
B5; Pantothenensäure	36-230
H; Biotin	1,5-5
B6; Pyridoxin	2-55

GR hat einen hohen Vitamingehalt. Den größten Anteil daran haben die Vitamine der B-Gruppe, vor allem Pantothenensäure (Vitamin B5) und Niacin (Haydak et al, 1942; Serra-Bonhevi, 1991). Niacin ist bekannt als Vitamin B3 und stellt eine Mischung aus Nikotinsäure und dem Nikotinsäureamid (NAM) dar. NAM besitzt große biochemische Bedeutung als ein wichtiger Bestandteil der Coenzyme, NAD^+ und $NADP^+$ und als Histondeacetylaseinhibitor.

Zudem lassen sich verschiedene Spurenelemente (K^+ , Na^+ , Mg^{2+} , Ca^{2+} , Zn^{2+} , Fe^{2+} , Cu^{2+}) (Serra-Bonhevi, 1991) und weitere biologisch aktive Substanzen im GR finden.

Dazu gehören u.a. die Pterine Neopterin und Biopterin, Stoffwechselfaktoren wie Folsäure, sowie der Neurotransmitter Acetylcholin (Wei et al, 2008).

Möglicherweise lassen sich mit diesen bereits bekannten oder noch zu findenden Inhaltsstoffen weitere Effekte des GR erklären, für die es bisher keine hinreichende Erklärung gibt. So hat GR hormonähnliche Wirkungen, wie z.B eine insulinähnliche Funktion auf den Serumglukosespiegel gesunder Menschen *in vivo* (Münstedt et al., 2009) und eine östrogenähnliche Wirkung auf Brustkrebszellen *in vitro* (Nakaya et al., 2007). Zudem sind weitere physiologische und neurophysiologische Wirkungen von GR bekannt. Es wirkt gefäßerweiternd, blutdrucksenkend und kann bei oraler Gabe an Mäuse Ermüdungserscheinungen mindern (Kamakura et al., 2001).

Seit einiger Zeit weiß man, dass Bienenarbeiterinnen und Bienenköniginnen im Larvalstadium und als adulte Tiere unterschiedliche Transkriptionsmuster aufweisen (Brito et al., 2010, Evans et al., 1999 und 2001). Da Bienenkönigin und Bienenarbeiterin genetisch gleich sind und die Entwicklung einer Bienenlarve zur Königin ursächlich von ihrer Fütterung mit Gelée royale abhängt, liegt der Schluss nahe, dass in Gelée royale Substanzen enthalten sind, die sich auf die Genexpression auswirken. Es gibt zudem erste Hinweise darauf, dass epigenetische Effekte, nämlich die Hemmung der *de novo* DNA-Methyltransferase DNMT3, an der Königinnenentwicklung beteiligt sind (Kucharski et al., 2008), was auf einen epigenetischen Effekt des Gelée royale hinweisen könnte.

Zu den möglichen epigenetischen Modifikationen könnten neben der DNA-Methylierung auch Histonmodifikationen wie die Acetylierung und die Methylierung gehören, da DNA-Methylierung und Histonmodifikationen sich gegenseitig beeinflussen (Fuks, 2005, Jones et al., 1998). Dafür sprechen einige Studien in Vertebraten, die zeigen, dass Umweltfaktoren, wie z.B. die Ernährung, Einfluss auf DNA-Methylierung und Histonacetylierung nehmen und damit kurzfristig den epigenetischen Status eines Genoms verändern können (Davis et al., 2004). Da nicht nur die Königinnenlarve, sondern auch die adulte Königin regelmäßig mit GR gefüttert wird, sind diese Effekte vermutlich reversibel und könnten nicht nur der Induktion, sondern auch der Aufrechterhaltung der unterschiedlichen Genexpression der Königin im Vergleich zur Arbeiterin dienen. Wenn dies der Fall ist, könnte sich eine mögliche Wirkung von GR auf Histonmodifikationen an der adulten Arbeiterin als Modellorganismus bzw. auch in anderen Organismen zeigen lassen.

1.2 Histonmodifikationen und Histoncode

Zu den wichtigsten Chromatinmodifikationen gehören, neben der direkten Beeinflussung der DNA durch Methylierung der DNA-Base Cytidin, die Modifikation von Aminosäureres-

ten an Histonseitenarmen durch z.B. Phosphorylierung, Acetylierung und Methylierung (Imhof et al., 2001). Diese Histonmodifikationen können an ganz unterschiedlichen Stellen in unterschiedlicher Kombination, und im Falle der Histonmethylierung auch als Mono-, Di- oder Trimethylierung (Klose et al., 2007; Tian und Fang, 2007) auftreten und sind daher so komplex und in ihrer Wirkung auf die Genexpression so unterschiedlich, dass man von einem Histoncode spricht. Die Modifikationen lassen sich aufgrund ihrer Wirkung auf die Chromatinstruktur unterscheiden. So können sowohl die Histonacetylierung, als auch die Histonphosphorylierung die Chromatinstruktur durch eine Ladungsveränderung an den Histonen und damit einer geringeren Histon-DNA-Bindung direkt beeinflussen. Die Histonmethylierung verursacht keine Ladungsveränderung am Histon. Um Einfluss auf die Genexpression zu nehmen, müssen Cofaktoren rekrutiert werden (Banister et al., 2001; Kouzarides et al., 2007).

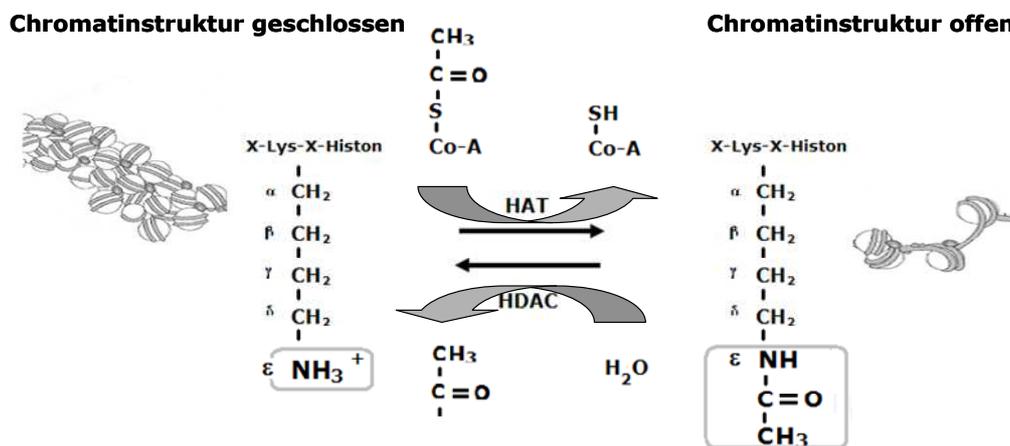


Abb. 1.2: Histonacetylierung und Chromatinstruktur

Histonacetyltransferasen (HATs) acetylieren Lysinreste an Histonen und begünstigen dadurch eine Öffnung der Chromatinstruktur. Histondeacetylasen (HDACs) reduzieren die Histonacetylierung, was zu einer geschlossenen Chromatinstruktur führt.

1.2.2 Histonacetylierung

Die Histonacetylierung wird maßgeblich durch zwei verschiedene Enzymgruppen beeinflusst, den Histonacetyltransferasen (HATs), die Acetylgruppen auf Lysinreste an Histonen übertragen und den Histondeacetylasen (HDACs), die diese Acetylgruppen wieder entfernen. Die Interaktion zwischen den beiden Enzymgruppen gewährleistet eine schnelle Modulation der Histonacetylierung, die daher zu einem Schlüsselmechanismus für die Regulation der Transkription werden kann (siehe Abb. 1.2). Dies geschieht auf mehrere Arten. Zum einen werden an Histonarmen die ϵ -Aminogruppen von Lysinresten acetyliert. Dies führt zu einer veränderten Ladung der Histone und damit zu einer geringeren

DNA-Histon-Bindung. Diese offene Chromatinstruktur ermöglicht es Transkriptionsfaktoren an die DNA zu binden. Zum anderen vermittelt die Histonacetylierung eine Bindung von Proteinen mit einer Bromodomäne an die Histone selbst. Diese Bromodomänproteine sind oftmals Transkriptionsaktivatoren, die nach ihrer Bindung an Histone die Expression eines Gens veranlassen können.

1.2.2.1 Histonacetyltransferasen (HATs)

Die Histonacetyltransferasen sind evolutionär stark konserviert. Sie acetylieren Lysinreste an verschiedenen Proteinen, vor allem an neu synthetisierten Histonen und Histonen, die bereits im Nucleosomenkomplex vorliegen. Sie wurden ursprünglich aufgrund ihrer Lokalisation in Typ A oder B HATs unterteilt:

Typ A-HATs: Sie befinden sich im Nucleus und acetylieren bevorzugt Histone in Nucleosomen; sie sind an Transkriptionsereignissen beteiligt

Typ B-HATs: Sie sind überwiegend im Cytoplasma lokalisiert und acetylieren dort verschiedene Proteine, u.a. auch neu synthetisierte Histone

Da die HATs jedoch in Funktion und Aufbau sehr heterogen sind und mittlerweile Proteinkomplexe gefunden wurden, die sowohl im Cytoplasma, als auch im Nucleus Funktionen erfüllen, geht man heute dazu über die HATs aufgrund von Sequenzähnlichkeiten in die fünf Familien MYST, GNAT, p300/CBP, Coaktivatoren der nukleären Rezeptoren und TAF II 250 einzuordnen (Sternier et al., 2000).

Eine Hemmung der HAT-Aktivität ist durch die HAT-Inhibitoren Curcumin, Garcinol und Anacardinsäure möglich (Balasubramanyam et al, 2003, 2004 a+b).

1.2.2.2 Histondeacetylasen (HDACs)

Die Histondeacetylasen deacetylieren Lysinreste an Histonen, was über die veränderte Ladung am Histon zu einer verstärkten Bindung der DNA an die Histone und damit zu einer „geschlossenen“ Chromatinstruktur führt. HDACs sind stark konserviert, evolutionär vor den Histonen entstanden (Leipe et al., 1997) und in der Lage nicht nur Histone, sondern auch andere Proteine zu deacetylieren.

Man teilt sie nach ihren Hefeorthologen in vier Gruppen ein:

Klasse I: Die Enzyme werden ubiquitär exprimiert und sind hauptsächlich im Nucleus lokalisiert

Klasse II: Die Enzyme werden gewebespezifisch exprimiert und befinden sich hauptsächlich im Cytosol, bzw. wechseln zwischen Cytosol und Nucleus.

Bei diesen beiden Klassen I und II handelt es sich um Enzyme, die Zink im aktiven Zentrum tragen. Ihre Deacetylaseaktivität kann z.B. durch die HDAC-Inhibitoren Valproat,

SAHA (auch Vorinostat, N-hydroxy-N-phenyloctandiamid) oder Trichostatin A (TSA) gehemmt werden (Monneret, 2005).

Klasse III: Diese Enzyme werden nach ihrem Hefe-Homolog SIR2 auch Sirtuine genannt. Sie sind ubiquitär exprimiert und deacetylieren Histone in einem Nikotinamidadenindinukleotid (NAD⁺) -abhängigen Mechanismus; sie unterscheiden sich daher funktionell deutlich von HDACs der Klassen I und II. Sie können durch Nikotinamid (NAM) inhibiert werden (Produkthemmung, [Avalos et al., 2005]).

Klasse IV: Diese Klasse besteht nur aus der humanen HDAC 11 und bildet aufgrund ihrer Sequenzunterschiede zu den Enzymen der anderen Klassen eine eigenständige Klasse

1.2.3 Histonmethylierung

Die Histonmethylierung unterscheidet sich in mehreren Punkten von der Histonacetylierung. So findet sie nicht nur an Lysinen, sondern auch an Argininen statt. Sie verändert nicht die Ladung an den Histonen und hat somit auch keinen direkten Einfluss auf die Histon-DNA-Bindung und damit auch nicht auf die Chromatinstruktur. Zur Änderung der Genexpression werden Cofaktoren benötigt. Zudem kann es zu Monomethylierungen und symmetrischen oder asymmetrischen Dimethylierungen an Argininen und Mono-, Di- und Trimethylierungen (siehe Abb. 1.3) an Lysinen kommen (Klose et al., 2007; Tian und Fang, 2007), was dazu führt, dass spezifisch unterschiedliche Proteine oder Proteinkomplexe rekrutiert werden können. So sind z.B. drei Proteinmotive bekannt, die mit methylierten Lysinresten von Histonen interagieren: die Chromodomäne (Bannister et al., 2001), die Tudor-Domäne und die WD40-repeat-Domäne (Kouzarides et al., 2007).

Histonmethylierungen können daher abhängig von ihrer Position, der methylierten Aminosäure und ihrer Häufigkeit sowohl expressionsaktivierend, als auch -reprimierend wirken.

1.2.3.1 Histonmethyltransferasen

Histonmethyltransferasen lassen sich in Histon-Lysin-Methyl-Transferasen (HKMTs) und Protein-Arginin-Methyl-Transferasen (PRMTs) einteilen. Die Funktion dieser Enzyme ist die Übertragung einer Methylgruppe von S-adenosyl-L-methionin (Ado-met) auf die Aminogruppe eines Lysinrestes oder die Guanidinogruppe von Arginin. Ihre enzymatische Aktivität kann daher durch Analoga von S-adenosyl-L-methionin, wie z.B. Methylthioadenosin, gehemmt werden.

Die lysinmethylierenden Histonmethyltransferasen werden danach unterschieden, ob sie eine so genannte SET Domäne enthalten oder nicht. Diese SET Domäne wurde nach ihrer Entdeckung in drei *Drosophila melanogaster* Proteinen, Suppressor of variegation, Enhancer of zeste (z) und Trithorax benannt (Jenuwein et al., 1998).

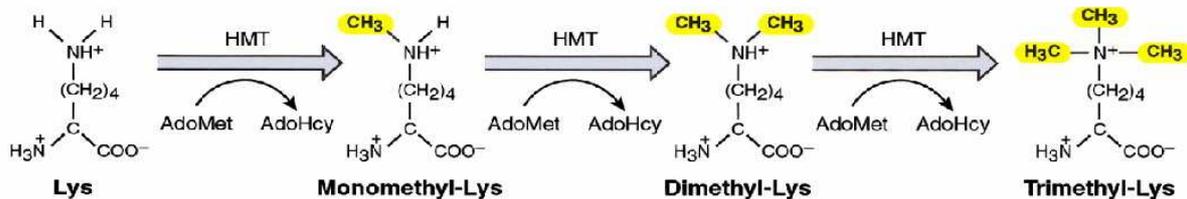


Abb. 1.3: Lysinmethylierung (Zhang et al., 2001)

Lysinmethyltransferasen übertragen Methylgruppen von S-adenosyl-L-methionin (Ado-met) auf die ε-Aminogruppe von Lysinresten. Diese können dadurch mono-, di- oder trimethyliert werden.

Bei den PRMTs unterscheidet man zwei Enzymgruppen aufgrund ihres Methylierungsmechanismus. Beide Typen katalysieren die Übertragung der Methylgruppe von S-adenosyl-L-methionin (AdoMet) auf die Guanidinogruppe von Arginin, wodurch in einem ersten Schritt monomethyliertes Arginin entsteht. In der nachfolgenden Reaktion, die zur Bildung von zweifach methyliertem Arginin führt, unterscheiden sie sich jedoch:

- **Typ-I-PRMTs:** Übertragen zwei Methylreste auf den gleichen Stickstoff der Guanidinogruppe, wobei ein "asymmetrisches" Dimethylarginin entsteht
- **Typ-II-PRMTs:** Übertragen je eine Methylgruppe auf jeden Stickstoff, so dass ein "symmetrisches" Dimethylarginin entsteht

1.2.3.2 Histondemethylasen

Lysin- und Arginindemethylasen lassen sich in unterschiedliche Enzymklassen unterteilen (Kim et al., 2009), die verschiedene Mechanismen haben, die bisher nur teilweise aufgeklärt worden sind.

Lysindemethylasen:

- JmjC – Familie: Der Demethylierungsmechanismus beruht auf einer Hydroxylase-Reaktion (Klose et al., 2007; Tian und Fang, 2007).
- LSD1-Domän- Familie: Der Demethylierungsmechanismus beruht auf einer Aminooxidasereaktion (Klose et al., 2007; Tian und Fang, 2007).

Arginindemethylase:

- PAD4: Der Demethylierungsmechanismus dieser Peptidylarginin Deiminase beruht auf der Konvertierung von Arginin zu Citrullin (Cuthbert et al., 2004).

1.2.4 Histonmodifikationen und ihre Auswirkungen auf biologische Prozesse

Histonmodifikationen und die daran beteiligten Enzyme können Transkriptionsereignisse beeinflussen und haben einen großen Einfluss auf verschiedenste zellbiologische und (neuro-) physiologische Prozesse. Sie sind beteiligt an der Krebsentstehung (Lane et al., 2009), an metabolischen Prozessen und an der Entwicklung und der Alterung von Lebewesen (Eissenberg et al., 2010; Imai et al., 2010). Zunehmend wird auch ihre Relevanz in der Entwicklung und Funktion des Nervensystems erfasst (Akbarian et al., 2009; Hsieh et al., 2010). Seit einiger Zeit werden daher Inhibitoren verschiedener Histon modifizierender Enzyme als Behandlung für neurologische und psychiatrische Erkrankungen eingesetzt (D'Mello, 2009; Monti et al., 2009; Thomas, 2009). Zudem werden die Effekte Histon modifizierender Enzyme und ihrer Inhibitoren auf das Lernen und die Gedächtnisbildung (Harting et al., 2010; Kilgore et al., 2010; Vecsey et al., 2007) untersucht. So gibt es verschiedene Hinweise zur Wirkung von TSA, Valproat und Natriumbutyrat auf die Akquisition, die Langzeitpotenzierung, die Konditionierung (Angst- und Wimpernschlagkonditionierung) und die Objekterkennung (Bredy et al., 2008; Fontan-Lozano, 2008; Lattal et al., 2007; Levenson et al., 2004; Vecsey et al., 2004).

Falls Gelée royale eine Wirkung auf Histonmodifikationen oder Histon modifizierende Enzyme hat, könnten sich daher vermutlich auch Gelée royale induzierte Effekte in Lern- und Gedächtnisprozessen zeigen lassen.

1.3 Lernen und Gedächtnisbildung

Unter Lernen versteht man einen Prozess der Lebewesen die Fähigkeit verleiht sich neues Wissen und Verhaltensweisen anzueignen, die sie dazu befähigen sich den Anforderungen einer sich ständig verändernden Umwelt anzupassen. Der Lernprozess, also die Fähigkeit zu Lernen, das Erlernte zu behalten und in eine stabile Veränderung des Verhaltens umzuwandeln ist bei allen Tieren vorhanden und lässt sich in verschiedene Phasen einteilen. Dabei kommt es zunächst zum Lernen selbst, also zum Erwerb (Akquisition) des Gedächtnisses, das danach in verschiedenen Konsolidierungsphasen gefestigt werden kann und letztlich dem Organismus je nach Stabilität sehr kurze Zeit, mittelfristig oder lebenslang als Bewertungs- und Handlungsgrundlage zur Verfügung steht.

1.3.1 Molekulare und chromatinmodifizierende Mechanismen in Lernprozessen und Gedächtnisbildung

Das Lernen und die Gedächtnisbildung sowie die zugrunde liegenden molekularbiologischen und neurophysiologischen Prozesse sind sehr dynamisch und unterliegen einer andauernden Veränderung. Die neurophysiologische Grundlage dieser Modulationsfähigkeit im Gehirn jeden höheren Lebewesens ist die synaptische Plastizität. Darunter versteht

man die aktivitätsabhängige Änderung der Stärke der synaptischen Übertragung von Neuronen. Eine Hypothese dazu, wie die synaptische Plastizität zustande kommt wurde erstmals 1949 von dem Psychologen Hebb aufgestellt und mit der Aussage "Neurons that fire together, wire together" (Hebb, 1949) beschrieben. Dies bedeutet, dass je häufiger ein Neuron gleichzeitig mit einem zweiten Neuron aktiv ist, desto wahrscheinlicher werden die Neuronen auch weiterhin aufeinander reagieren (Koinzidenz, siehe Abb. 1.4). Später wurde an der Meeresschnecke *Aplysia californica* gezeigt, dass zwei verschaltete Neuronen nicht unbedingt gleichzeitig aktiv sein müssen um eine Verstärkung der dazwischen geschalteten Synapse zu erreichen, falls ein drittes, modulatorisches Neuron gleichzeitig mit dem präsynaptischen Neuron aktiv ist (Kandel und Tauck, 1963).

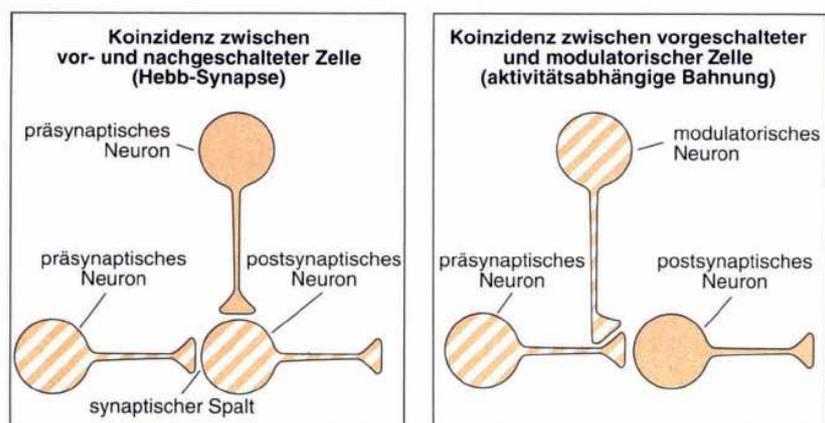


Abb. 1.4: Modelle zur synaptischen Plastizität (Spektrum der Wissenschaft, Nov.1992)

Links: Nach der Hebb'schen Regel müssen zur Verstärkung der Synapse prä- und postsynaptisches Neuron gleichzeitig aktiv sein (Koinzidenz, Hebb 1949). Rechts: Nach einem Modell von Kandel und Tauck (1963) müssen prä- und postsynaptisches Neuron nicht koinzident sein, um die Synapse zu verstärken, sofern ein weiteres, modulatorisches Neuron zusammen mit dem präsynaptischen Neuron aktiv ist und auf die selbe Synapse feuert. Aktive Neuronen sind gestreift dargestellt.

Die molekularen Grundlagen der synaptischen Plastizität wurden in vielen Organismen untersucht. Untersuchungen an der Maus (*Mus musculus*), an der Meeresschnecke (*Aplysia californica*) an der Taufliege (*Drosophila melanogaster*) und an der Honigbiene (*Apis mellifera*) haben gezeigt, dass die molekularen Mechanismen des Lernens sich stark ähneln und evolutionär stark konserviert sind (Bourtchuladze et al., 1994; Dudai et al., 1976; Friedrich et al., 2004; Menzel und Müller, 1996), es jedoch grundlegende Unterschiede in der Konsolidierung von Kurz- und Langzeitgedächtnis gibt. Während für die Etablierung eines Kurzzeitgedächtnisses vorhandene Proteine nur modifiziert werden, z.B. durch eine Phosphorylierung, müssen für die Ausbildung eines Langzeitgedächtnisses Proteine neu synthetisiert werden. Es hat sich z.B. gezeigt, dass in diesen Modellorganismen die Ca^{2+} -abhängige Adenylylzyklase und damit die Proteinkinase A (PKA) eine wichtige Rolle bei der Etablierung von Gedächtnissen spielen (Abel et al., 1998; Dubnau und Tully, 1998; Müller 2000). Die Adenylylzyklase dient als Koinzidenzdetektor, sie wird

nach Transmitter-Ausschüttung und Depolarisation aktiviert und kann ihrerseits durch die Spaltung von ATP in cyclisches AMP die Proteinkinase A (PKA) aktivieren. Wird die PKA dabei mehrmals aktiviert, wie beispielsweise mit wiederholten CS-US-Paarungen (siehe Kap. 1.3.2.3) in Lernexperimenten oder andauernd durch Stimulation mit cAMP-Analoga, so kommt es zu einer Phosphorylierung und Aktivierung des Transkriptionsfaktors CREB (Silva et al., 1998), der letztlich die Genexpression und Proteinsynthese verschiedener gedächtnisrelevanter Proteine initiiert. Dadurch kann es zu einer langfristig veränderten Signalweiterleitung der Nervenzelle kommen, was zur Ausbildung eines lang andauernden Gedächtnisses führt. Ist die PKA Aktivierung nur transient oder schwach, so kann sie zwar lernrelevante Zielproteine phosphorylieren, dies ist aber nur eine kurzfristige, stör anfällige Modifikation, die durch Phosphatasen (Mansuy et al., 2006) rückgängig gemacht werden kann. Es kommt in der Regel nicht zur Ausbildung eines langfristigen Gedächtnisses.

Dies macht deutlich, dass die Transkription von Genen einen entscheidenden Einfluss auf das Lernen und die Gedächtnisbildung hat und sich die Konsolidierung von Gedächtnissen spezifisch beeinflussen lässt (Wüstenberg et al. 1998). Seit einigen Jahren weiß man, dass die Transkription von Genen auch durch epigenetische Faktoren wie DNA-Methylierungen und Histonmodifikationen, wie z.B. der Histonacetylierung beeinflusst wird. Daher werden zunehmend auch epigenetische Einflüsse auf das Lernen und die Gedächtnisbildung untersucht. Dabei zeigte sich, dass die DNA-Methylierung die synaptische Plastizität im Hippocampus reguliert (Levenson et al., 2006) und Einfluss auf die Gedächtnisbildung hat (Lockett et al., 2010; Miller 2007). Es wurde entdeckt, dass ein bereits bekannter Cofaktor der Transkription, der an Lernprozessen beteiligt ist, das CREB Binding Protein (CBP) eine Histonacetyltransferasefunktion (HAT) hat (Alarcon et al., 2004; Korzus et al., 2004), mit der es das Chromatin öffnet und so Transkriptionsfaktoren ermöglicht an die DNA zu binden. Wenig später konnte die HAT-Funktion auch für den transkriptionellen Cofactor p300 gezeigt und eine Beteiligung an der Konsolidierung des Langzeitgedächtnisses von Mäusen nachgewiesen werden (Oliveira et al. 2007). Verschiedene Lernversuche mit Histondeacetylaseinhibitoren, wie Valproat haben gezeigt, dass das Langzeitgedächtnis beeinflusst wird und sich das assoziative Angstgedächtnis von Mäusen verbessern lässt (Bredy et al., 2008). Eine Lernverbesserung konnte nicht nur für Valproat, sondern auch für andere Inhibitoren der Histondeacetylase-Klassen I und II, Trichostatin A (TSA), Vorinostat und Natriumbutyrat gezeigt werden (Federman et al., 2009; Kilgore et al., 2010; Vecsey et al., 2007). Ebenfalls in Lernexperimenten untersucht wurde Nikotinamid, ein Inhibitor der HDAC Klasse III. Nikotinamid konnte in Alzheimer Maus Modellen deren kognitive Fähigkeiten erhalten (Green et al., 2008) und das Gedächtnis von Ratten verbessern (Hoane et al., 2006). Nicht nur Histonacetylierungen, sondern auch Histonmethylierungen haben einen Einfluss auf Lernen und Gedäch-

nis. So verbessert z.B. die Methylierung von Histonen das Angstgedächtnis von Mäusen (Gupta et al., 2010). Die meisten Versuche zu epigenetischen Mechanismen im Verhalten von Tieren wurden mit aversiven Lernparadigmen an Vertebraten durchgeführt. Es gibt nur sehr wenige Untersuchungen an Insekten und kaum Untersuchungen, in denen appetitive Lernparadigmen durchgeführt wurden. Es bleibt daher die Frage offen, ob die epigenetischen Einflüsse auf das Lernen und die Konsolidierung von Gedächtnissen ebenso konserviert sind wie die beteiligten Signalkaskaden und ob es grundlegende Unterschiede zwischen appetitiven und aversiven Lernparadigmen gibt.

1.3.2 Lernparadigmen

Um Lernprozesse in verschiedenen Tiermodellen, vor allem in Tieren niederer Ordnung objektiv untersuchen und vergleichen zu können, mussten das Lernen und die Lernparadigmen funktionell und begrifflich definiert werden. Lernen wird hier als erfahrungsbedingte Reaktionssänderung beschrieben und das Gedächtnis als beobachtbares zeitliches Andauern dieser Reaktionssänderung. Beobachten kann man solche Verhaltensänderungen nach Durchführung verschiedener Lernparadigmen, wobei man grundsätzlich zwischen assoziativen und nicht-assoziativen Lernparadigmen unterscheidet.

1.3.2.1 Lernparadigmen an der Honigbiene

Lernparadigmen an der Honigbiene sind überwiegend appetitiv. Man macht sich dabei zunutze, dass die Biene bei Berührung der Antennen mit einer Zuckerlösung reflexartig den Rüssel (PER, Proboscis Extension Response) herausstreckt um den Zucker aufzusaugen (Kuwabara, 1957). Zuckerwasser stellt für Bienen einen wichtigen (Belohnungs-) Reiz dar. Der Blütennektar besteht hauptsächlich aus den Sacchariden Glukose, Fruktose und Saccharose, wobei letztere von den Bienen bevorzugt wird (von Frisch, 1934). Daher wird in allen appetitiven Lernparadigmen mit Honigbienen Saccharose eingesetzt.

1.3.2.2 Nicht-assoziative Lernparadigmen (Habituation und Sensitisierung) und Zuckerwasserempfindlichkeit

Zu den nicht-assoziativen Lernparadigmen gehören die Sensitisierung und die Habituation. In beiden Lernparadigmen lernt das Tier über einen einzelnen Stimulus einen Reiz je nach Kontext und Bedeutung unterschiedlich zu bewerten.

Unter Sensitisierung versteht man die Zunahme der Reaktionsbereitschaft eines Tieres auf einen Reiz. Wird das Tier einem einmaligen starken Reiz ausgesetzt, so kann dies zu einer verstärkten Reflexantwort auf einen nachfolgenden viel schwächeren Reiz führen.

Bei der Honigbiene geschieht dies z.B. durch Sensibilisierung auf einen Duftreiz durch vorherige Stimulation mit einer stark konzentrierten Saccharoselösung (Erber, 1981).

Unter Habituation versteht man die Gewöhnung an einen Reiz, der längere Zeit andauert, aber weder positive, noch nachteilige Folgen für das Tier hat und somit bedeutungslos wird. Das Tier wird auf einen solchen Reiz anfänglich noch reagieren, nach erfolgter Habituation jedoch keine Reaktion mehr zeigen. Wichtig bei der Durchführung des Lernparadigmas ist es die Habituation klar gegen eine reine Ermüdungserscheinung oder eine sensorische Adaptation abzugrenzen.

Bei der Honigbiene kann dieses Lernparadigma durch wiederholte Stimulation einer Antenne mit hochkonzentrierter Saccharoselösung durchgeführt werden. Mit einem Dishabituationstest, einer einmaligen Berührung der kontralateralen Antenne mit hochkonzentrierter Saccharoselösung, können anschließend Ermüdung und sensorische Adaptation des Versuchstieres getestet werden.

Vorraussetzung für die Durchführung des nachfolgend beschriebenen assoziativen Lernparadigmas ist die korrekte Wahrnehmung, Prozessierung und sensorische Integration der Zucker- und Duftreize. Da in nicht-assoziativen Lernparadigmen eine Reaktion nach einem einzelnen Reiz erfolgt, kann die Wahrnehmung und Prozessierung des Duft- und Zuckerreizes überprüft werden, die in assoziativen Lernparadigmen eingesetzt werden.

Bei Experimenten mit der Honigbiene gibt es zusätzlich noch die Möglichkeit die Wahrnehmung des Zuckerreizes mit einem Test auf Zuckerwasserempfindlichkeit (Responsiveness) zu überprüfen. Dabei werden die Antennen der Biene mit unterschiedlichen Saccharosekonzentrationen in aufsteigender Konzentration berührt und die Reaktion der Bienen darauf mit dem PER getestet. Die Zuckerwasserempfindlichkeit der Honigbiene ist abhängig von Sättigungszustand, Alter, Genotyp und Aufgabe der Bienen (Page et al., 1998; Pankiw & Page, 1999). Je stärker ein Versuchstier den Zuckerreiz wahrnimmt, desto höher ist im Allgemeinen die Belohnungsstärke in assoziativen Lernparadigmen. Mit einem Test auf die Zuckerwasserempfindlichkeit kann ein möglicher Einfluss einer Behandlung auf die Belohnungsstärke von vorneherein ausgeschlossen werden.

1.3.2.3 Assoziatives Lernparadigma

Assoziative Lernparadigmen stellen ein Erlernen von Zusammenhängen unabhängiger Ereignisse dar. Die wohl bekannteste Form des assoziativen Lernens ist die klassische Konditionierung nach Pawlow (Pavlov, 1927). In diesem Lernparadigma wird ein neutraler Reiz, auch konditionierter Stimulus (CS) genannt, mit einem belohnenden oder be-

strafenden Reiz (unkonditionierter Stimulus, US) gepaart. Erfolgt diese CS-US-Paarung zuverlässig innerhalb eines definierten Zeitfensters in der richtigen Reihenfolge (Kontiguität), so lernt das Tier die beiden Zusammenhänge zu verknüpfen und wird auf den ursprünglich neutralen CS allein die gleiche Reizreaktion wie auf den US zeigen.

In der Honigbiene wird als assoziatives Lernparadigma oft die appetitive olfaktorische Konditionierung genutzt (Abb. 1.5). Zur Konditionierung wird ein naiver Duft (CS) mit einem starken Zuckerreiz (US) als Belohnung gepaart. Hat die Biene gelernt diese beiden Ereignisse zu verbinden, so wird sie bei erneuter, alleiniger Präsentation des Duftes in Erwartung der Belohnung den Rüssel herausstrecken. Bei einer einmaligen CS-US Präsentation bildet sich ein, eine kurze Zeit andauerndes, Gedächtnis aus, das unabhängig von Transkriptions- und Translationsereignissen ist. Wird die CS-US-Paarung mehrfach wiederholt, so wird ein länger andauerndes, stabiles Gedächtnis induziert (Menzel und Müller, 1996).

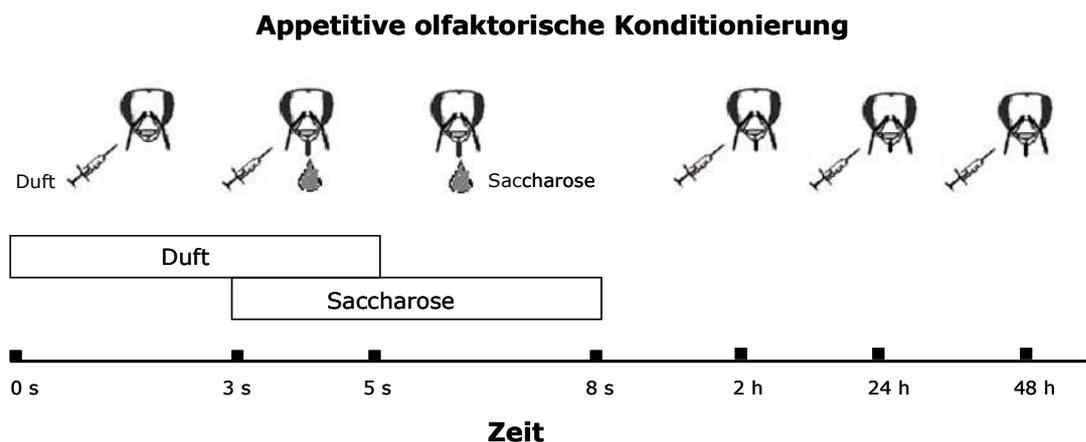


Abb. 1.5: Appetitive olfaktorische Konditionierung der Honigbiene

Die Honigbiene wird durch die zeitlich gepaarte Präsentation eines naiven Duftreizes und einer Zuckerbelohnung konditioniert. Hat die Biene gelernt diese beiden Ereignisse zu verbinden, so streckt sie, in Erwartung einer Belohnung, den Rüssel auch nach alleiniger Präsentation des Duftreizes heraus.

2. Zielsetzung

Ziel dieser Arbeit ist es einen möglichen Einfluss von Gelée royale auf Histonmodifikationen im Gehirn der adulten Bienenarbeiterin zu zeigen. Da histonmodifizierende Prozesse in engem Zusammenhang mit dem Lernen und der Gedächtnisbildung stehen, wird desweiteren überprüft ob Gelée royale eine Wirkung auf die Reizprozessierung und die Gedächtnisbildung der Honigbiene ausübt. Dabei stehen zwei zentrale Fragen im Vordergrund. Zum einen ob es Unterschiede zwischen einmaliger und mehrmaliger Fütterung von Gelée royale gibt und zum anderen welche Substanzen in Gelée royale für dessen Wirkung verantwortlich sind. Daher werden in dieser Arbeit neben Gelée royale, Teilfraktionen des Gelée royale und zwei seiner Bestandteile, die 10-Hydroxy-2-decensäure und der Histondeacetylaseinhibitor Nikotinamid in Hinblick auf Histonmodifikationen untersucht, sowie eine Beteiligung der genannten Substanzen in der Reizprozessierung und Gedächtnisbildung der Honigbiene überprüft.

3. Material und Methoden

3.1 Material

3.1.1 Chemikalien

Name	Firma
▪ 10-HDA (10-Hydroxy-2-decensäure)	Nacalaiusa (San Diego)
▪ 1-Butanol (wassergesättigt)	Z-Chem (Saarbrücken)
▪ 2-Mercaptoethanol	Merck (Darmstadt)
▪ Aceton	Z-Chem (Saarbrücken)
▪ Actinomycin-D	AppliChem (Darmstadt)
▪ APS (Ammoniumperoxodisulfat)	Z-Chem (Saarbrücken)
▪ Bis-Acrylamid (Acrylamid (30 % w/v) & Bisacrylamid (0,8 % w/v))	Roth (Karlsruhe)
▪ Bromphenolblau (3',3'',5',5''-Tetra-bromphenolsulfonphtalein-Na-Salz)	AppliChem (Darmstadt)
▪ BSA (Rinder Albumin Fraktion V)	Roth (Karlsruhe)
▪ Calciumchlorid	Z-Chem (Saarbrücken)
▪ Chloroform	Z-Chem (Saarbrücken)
▪ Dikaliumhydrogenphosphat	Z-Chem (Saarbrücken)
▪ Dinatriumhydrogenphosphat-2-Hydrat	Z-Chem (Saarbrücken)
▪ DMSO (Dimethylsulfoxid)	Z-Chem (Saarbrücken)
▪ EDTA (Dinatriumsalz-Dihydrat)	Z-Chem (Saarbrücken)
▪ Ethanol	Z-Chem (Saarbrücken)
▪ Gelée royale	Imkerei Fa. Wienold (Lauterbach)
▪ Glycerin	Z-Chem (Saarbrücken)
▪ Harnstoff	Z-Chem (Saarbrücken)
▪ Isopropanol	Z-Chem (Saarbrücken)
▪ Kaliumchlorid	Z-Chem (Saarbrücken)
▪ Kaliumdihydrogenphosphat	Merck (Darmstadt)
▪ Methanol	Z-Chem (Saarbrücken)
▪ Magnesiumchlorid	Merck (Darmstadt)
▪ Natriumchlorid	Z-Chem (Saarbrücken)
▪ Natriumdihydrogenphosphat	Z-Chem (Saarbrücken)
▪ Natriumhydrogencarbonat	Z-Chem (Saarbrücken)
▪ Natriumhydroxid	Z-Chem (Saarbrücken)
▪ Natriumazid	Acros Organics (Nidderau)
▪ Nelkenöl	Apotheke (Saarbrücken)
▪ Nikotinamid	Appli Chem (Darmstadt)
▪ NP-40	Appli Chem (Darmstadt)
▪ Para-Nitrophenylphosphat-	Appli Chem (Darmstadt)

Dinatriumsalz-Hexahydrat (p-NPP)	
▪ Saccharose	Lebensmittelhandel (Saarbrücken)
▪ SDS (Natriumdodecylsulfat)	Roth (Karlsruhe)
▪ TEMED (N,N,N',N'-Tetramethyl-ethylenediamine)	Appli Chem (Darmstadt)
▪ Tris (Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan)	Sigma-Aldrich (Hamburg)
▪ Trypsin (Rinderpankreas 2500 U/ mg)	Appli Chem (Darmstadt)
▪ TSA (Trichostatin A)	Sigma-Aldrich (Hamburg)

3.1.2 Verbrauchsmaterial

Name	Firma
▪ 96-well-Platten (schwarz)	Nunc (Langenselbold)
▪ 96-well-ELISA-Platten	Nunc (Langenselbold)
▪ Capilettor Tip Glaskapillare (1-5 µl)	Selzer (Frankfurt)
▪ Dentalwachs (medium)	Ubert (Lohfelden)
▪ Fangröhrchen PS-Röhrchen 68 mL	Greiner (Essen)
▪ Falcons 15 ml und 50 ml	Sarstedt(Nümbrecht)
▪ Glaskapillare Capilettor Tip (1-5 µl)	Selzer (Frankfurt)
▪ Kanülen R 0,80 x 40 mm 21G	Braun (Petzold)
▪ Metallstößel für die Glaskapillaren	Selzer (Frankfurt)
▪ Capilettor Stick (1 - 5 µl)	Selzer (Frankfurt)
▪ Pasteurpipetten	Roth (Karlsruhe)
▪ Plastik-Fang-Röhrchen	Greiner (Essen)
▪ Reaktionsgefäße (1,5 ml)	Sarstedt (Nümbrecht)
▪ Silikon (Baysilone-Paste mittelviskos)	Bayer (Leverkusen)
▪ Spritzen (2 mL)	Braun (Petzold)
▪ Tafelzucker (Saccharose)	Lebensmittelgeschäft (Saarbrücken)
▪ Textilklebeband	Baumarkt (Saarbrücken)
▪ Zahnstocher	Drogeriemarkt (Saarbrücken)
▪ Zellkulturplatten (96-well)	Sarstedt (Nümbrecht)

3.1.3 Geräte

▪ 1 mL-Glashomogenisator mit Glas-S-Stößel	Braun (Petzold)
▪ Bienenracks eigene Herstellung	Material aus Baumarkt (Saarbrücken)
▪ Bienenröhrchen (Kupfer, Plastik) eigene Herstellung	Material aus Baumarkt (Saarbrücken)

- Binokular S6D Leica (Solms)
- Block-Heizgerät (Accu Block) Labnet (Berlin)
- ELISA-Reader safire2 Tecan (Mainz)
- Folienschweißgerät Severin (Sundern)
- Gelelektrophoreseapparatur C.B.S. (Darmstadt)
- Kaltlichtquelle KL 1500 LCD Schott (Mainz)
- LötKolben eigene Herstellung Baumarkt, Conrad (Saarbrücken)
- Mikropipetten Puller Model P-87 Sutter Instrument Co. (Lambrecht)
- Mikroskop Leitz DMRB Leica (Solms)
- pH-Meter (inoLab pH 730) WTW (Weilheim)
- Operation Manual Xenon Flashlamp System JML-C2 RappPtoElectron (Hamburg)
- Pinzetten Dumont (Schweiz)
- Powerstation 300 PLUS Labnet (Berlin)
- Rührheizgerät IKA RCT basic IKA-Labortechnik (Staufen)
- Schüttler KS501 digital IKA-Labortechnik (Staufen)
- Switching Power DPS-4005 PFC Voltkraft (Conrad, Hirschau)
- Taunus-Begattungskasten Seipp (Butzbach)
- Ultraschallgerät HTU Soni 130 Heinemann (Schwäbisch Gmünd)
- Vortex VX 100 Labnet (Berlin)
- Waage CP3202S und CP225D Sartorius (Göttingen)
- Zentrifuge (Spectrafuge 24D) Labnet (Berlin)

3.1.4 Puffer und Lösungen

Alle Puffer wurden in Aqua_{bidest} angesetzt

10xPBS

27 mM KCl

18 mM KH₂PO₄

1,37 M NaCl

101 mM Na₂HPO₄

Vor Verwendung 1:10 verdünnt mit Aqua_{bidest}

HDAC-Assay

HDAC-Assay-Puffer

50 mM Tris/Cl, pH 8,0

137 mM NaCl

2,7 mM KCl

1 mM MgCl₂

HDAC-Zell-Lyse-Puffer

1% NP-40 in HDAC-Assay-Puffer

HDAC-Substratlösung

Verdünnung des Substratkonzentrates in HDAC-Assay Puffer

HDAC-Entwicklerlösung

0,25% Entwicklerkonzentrat in HDAC-Zell-Lyse-Puffer

ELISA

Histon-Homogenisierungspuffer ohne Harnstoff

1x PBS

1 mM EDTA

5 mM Natriumbutyrat

Histon-Homogenisierungspuffer mit Harnstoff

1x PBS

1 mM EDTA

5 mM Natriumbutyrat

8 M Harnstoff

Blocklösung

0,5% (w/v) BSA in 1x PBS

RxN-Puffer

0,1 M Tris/HCl, pH 8,7

1 mM MgCl₂ • 6H₂O

Färbelösung

1x RxN

1 mM p-NPP (Para-Nitrophenylphosphat Dinatriumsalz-Hexahydrat)

SDS-PAGE

5x Probenpufferpuffer (SDS-PAGE)

0,2 M Tris/HCl pH 6,8

10 mM 2-Mercaptoethanol

10% (w/v) SDS

20% (v/v) Glycerin

0,05% (w/v) Bromphenolblau

Sammelgelpuffer

0,5 M Tris/HCl pH 6,8

Trenngelpuffer

1,5 M Tris/HCl pH 8,8

10x Laufpuffer

0,25 M Tris

2 M Glycin

1% (w/v) SDS (Vor Verwendung 1:10 verdünnt mit H₂O)

3.1.5 Injektions- und Futterlösungen

Name der Lösung

Gelée royale Futterteig

Zusammensetzung

GR und Puderzucker im Verhältnis 1:3, verfüttert wurden ca. 20-30 mg/ Biene/ Tag

Gelée royale Futterlösung

3 g, bzw. 1,5 g GR in 10 ml 1 M Saccharose, pH-Wert Einstellung mit Natriumhydrogenphosphat und Dinatriumhydrogenphosphat auf pH = 7

Lösung a: 3 mg GR/ 10 ml 1 M Saccharose, gefüttert wurden neun Tropfen/ Tag/ Biene, das entspricht ca. 27 mg GR/ Biene/ Tag

Lösung b: 1,5 mg GR pro 10 ml 1 M Saccharose, gefüttert wurden einmalig drei Tropfen/ Biene, das entspricht ca. 4,5 mg GR/ Biene.

Gelée royale Fraktionen

1:100 (verdünnt)

Nikotinamid Futterlösung

60 µg Nikotinamid/ ml 1 M Saccharose

Actinomycin-D Injektionslösung

2 µg/ µl Act-D in DMSO, bzw. DMSO: Methanol 1:1

10-HDA Stammlösung	100 mg/ ml 10-HDA in Methanol
10-HDA Injektionslösung	20 µg, 2 µg, 0,2 µg 10-HDA/ Biene, entweder in Methanol-PBS oder Methanol-DMSO, pH-Wert Einstellung der 2 µg und 20 µg Lösungen auf pH = 7 mit Natriumhydrogenphosphat und Dinatriumhydrogenphosphat
10-HDA Futterlösung	10-HDA Stammlösung in 1 M Saccharose gelöst und mit Natriumhydrogenphosphat und Dinatriumhydrogenphosphat auf pH = 7 eingestellt. Verfüttert wurden je nach Versuch 2 Tropfen, entsprechend 20 µg oder 0,2 µg 10-HDA/ Biene

3.1.6 Antikörper

Bei allen Antikörpern handelt es sich um polyklonale Antikörper.

Antikörper	Herkunft	Firma	Konzentration
<u>Primäre Antikörper</u>			
H3	Kaninchen	Sigma-Aldrich	1:5000
H3: AC-18	Kaninchen	Cellsignaling	1:1000
H3: Met-4.1	Kaninchen	Abcam	1:1000
H3: Met-27.3	Kaninchen	Upstate	1:1000
<u>Sekundäre Antikörper</u>			
Anti-Rabbit IgG Alkalische Phosphatase gekoppelt	Ziege	Sigma-Aldrich	1:4.000
Anti-Maus IgG – Alkalische Phosphatase gekoppelt	Ziege	Sigma-Aldrich	1:4.000

Alle Antikörper wurden in 0,5 % BSA und 0,02% Natriumazid in PBS angesetzt und maximal dreimal wieder verwendet.

Spezifikation der Histonantikörper besteht aus:

- Bezeichnung des Histons (H3)
- Art der Modifikation (Ac- Acetylierung, Met- Methylierung)
- Position der Modifikation (Zahl nach dem Bindestrich)
- Anzahl der Modifizierungen (Zahl nach dem Punkt)

3.2 Methoden

3.2.1 Haltung der Honigbienen

Alle Untersuchungen wurden ganzjährig an Sammlerinnen der Honigbiene *Apis mellifera carnica* durchgeführt. Im Sommer befanden sich die Tiere im Freien in gewöhnlichen Bienenstöcken, konnten frei ausfliegen und sich mit natürlichen Futterquellen ernähren. Im Winter wurden die Bienen im Winterflughaus mit UV-durchlässigem Glasdach bei einer Temperatur von 21-27°C mit Nachtabsenkung um 10-15°C und 50% Luftfeuchtigkeit gehalten und mit Zuckerwasser (30% Saccharose [w/v]) und Pollen gefüttert. Die Bienen wurden entweder einen Tag vor oder am Versuchstag gefangen. Im Sommer wurden sie mittels einer Plexiglaspyramide beim Ausfliegen aus dem Stock gefangen und in Fangröhrchen überführt, im Winter wurden die Bienen direkt mit den Fangröhrchen gefangen. Anschließend wurden die Bienen in den Fangröhrchen auf Eis betäubt und so mit Textilklebeband in Metall- bzw. Plastikröhrchen eingeklebt, dass die Antennen und Mundwerkzeuge frei beweglich waren. Zusätzlich wurde der Kopf der Biene mit Dentalwachs am Textilklebeband fixiert. Die Bienen wurden bis 30 min vor und zwischen den Experimenten und Testphasen in einer abgedunkelten feuchten Kammer gehalten und wenn nicht anders angegeben drei Mal täglich mit 1 M Saccharoselösung gefüttert; morgens zwei bis vier Tropfen, mittags zwei Tropfen, abends drei Tropfen.

3.2.2 Zuckerwasserempfindlichkeit (Responsiveness)

Wenn nicht anders beschrieben erfolgte der Test auf Zuckerwasserempfindlichkeit mit am Versuchstag gefangenen und eingespannten Bienen. Die Versuchstiere wurden mit zwei bis vier Tropfen der jeweiligen Futterlösung oder 1 M Saccharose gefüttert und nach zwei Stunden mit Saccharoselösungen in aufsteigenden Konzentrationen (0 mM, 30 mM, 100 mM, 300 mM und 1000 mM) auf den Rüsselrausstreckreflex (Proboscis Extension Response- PER= reflexartiges Herausstrecken des Rüssels nach Berührung der Antenne mit Zuckerwasser) getestet. Dabei wurde ein Zahnstocher mit der jeweiligen Lösung benetzt und an eine Antenne gehalten. Der Zeitpunkt der Behandlung, sowie die Zusammensetzung der Injektions- oder Futterlösungen ist der jeweiligen Bildunterschrift des Experiments zu entnehmen.

3.2.3 Nichtassoziative Lernparadigmen (Sensitisierung und Habituation)

Wenn nicht anders beschrieben wurden die nicht-assoziativen Lernparadigmen nacheinander an denselben Tieren durchgeführt. Dabei wurden die am gleichen Tag gefangenen und eingespannten Bienen zunächst mit der jeweiligen Futterlösung gefüttert oder hungrig sensitisiert, nach der Sensitisierung mit zwei bis vier Tropfen 1 M Saccharose gefüttert und eine Stunde später habituiert und dishabituiert. Der Zeitpunkt der Behandlung, sowie die Zusammensetzung der Injektions- oder Futterlösungen ist der jeweiligen Bildunterschrift des Experiments zu entnehmen.

3.2.3.1 Sensitisierung

Unter Sensitisierung versteht man die Zunahme der Reaktionsbereitschaft eines Tieres auf einen Reiz. Wird das Tier einem einmaligen starken Reiz ausgesetzt, so kann dies zu einer verstärkten Reaktion auf einen nachfolgenden viel schwächeren Reiz führen. Bei diesem Test wird zunächst mit einer Spritze Nelkenduft an beide Antennen des Versuchstieres geblasen und direkt abgesaugt. Dabei wird der PER aufgeschrieben. Nach zwei Minuten berührt man mit einem mit 1 M Saccharose benetztem Zahnstocher eine Antenne (Sensitisierung) und testet nach 20 Sekunden erneut den PER nach Präsentation des Nelkenduftes.

3.2.3.2 Habituation

Unter Habituation versteht man die Gewöhnung an einen Reiz, der längere Zeit andauert, aber keine Folgen für das Tier hat und somit bedeutungslos wird. Die Tiere werden mit einem mit 1 M Saccharose benetztem Zahnstocher solange an einer Antenne stimuliert, bis entweder eine Toleranzgrenze von 50 Stimuli erreicht wird, oder die Tiere auf fünf aufeinander folgende Stimuli nicht mehr mit einem Herausstrecken des Rüssels reagieren. Gezählt werden die Stimuli, bis zum Ausbleiben des PER. Um zu zeigen, dass es sich um eine echte Habituation und nicht um eine Ermüdungsreaktion oder sensorische Adaption des Versuchstieres handelt, werden die Tiere an der anderen Antenne mit 1 M Saccharoselösung stimuliert, was man als Dishabituation bezeichnet. Aus dem Versuch, bzw. der Auswertung wurden alle Tiere herausgenommen, die nicht auf 1 M Saccharose reagiert haben oder nicht habituiert (mehr als 50 Stimuli) oder dishabituiert (kein PER an der zweiten Antenne) werden konnten (nicht mehr als 10% der Gesamttiere; dabei gab es keine Unterschiede in der Anzahl der nicht verwendeten Tiere in den unterschiedlichen Gruppen).

3.2.4 Assoziative appetitive olfaktorische Konditionierung

Wenn nicht anders beschrieben erfolgte die assoziative olfaktorische Konditionierung mit am Vortag gefangenen und über Nacht (mind. 16 Stunden) gehungerten Versuchstieren. Bei diesem Lernparadigma wird ein konditionierter Stimulus (CS- Nelkenduft) mit einem unkonditioniertem Stimulus (US- 1 M Saccharoselösung) gepaart. Dabei wurde der Nelkenduft (CS) mittels einer Spritze für etwa vier Sekunden an beide Antennen geblasen und direkt von einem Abzug abgesaugt. Nach zwei Sekunden Duftpräsentation wurde gleichzeitig mit dem Duftreiz ein mit 1 M Saccharoselösung (US) benetzter Zahnstocher zuerst an eine Antenne und nach Herausstrecken des Rüssels an diesen gehalten. Die Biene durfte fünf Sekunden am Zahnstocher saugen. Je nach Versuch wurde dieses Training einmal (Ein-Trial-Training, schwaches Training) oder dreimal (Drei-Trial-Training, starkes Training) mit einem Inter-Trial-Intervall von zwei Minuten durchgeführt. Der Abruf des Gedächtnisses erfolgte durch Anblasen mit Nelkenduft 2, 24 und 48 Stunden nach dem Training. Eine Fütterung erfolgte, wenn nicht anders beschrieben, frühestens 30 Minuten nach dem Abruf. Der Zeitpunkt der Behandlung, sowie die Zusammensetzung der Injektions- oder Futterlösungen ist der jeweiligen Bildunterschrift des Experiments zu entnehmen.

3.2.5 Präparation eines Bienengehirns

Die Biene wird auf Eis immobilisiert, der Kopf mit einem Skalpell abgetrennt und in Wachs eingebettet. Das Eröffnen der Kopfkapsel erfolgt durch einen waagerechten Schnitt von den Antennen bis zur obersten Ozelle. Mit einer feinen Pinzette werden die Drüsen oberhalb und unterhalb des Gehirns entfernt. Anschließend wird das Zentralhirn mit einem feinen Skalpell abgetrennt und mit einer Pinzette entnommen.

3.2.6 Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA)

Ein Zentralhirn wurde mittels Pistill in 250 μ l (oder 400 μ l) Histon-Homogenisierungspuffer (1x PBS; 1 mM EDTA; 5 mM Natriumbutyrat) in einem Glashomogenisator homogenisiert. Die Proben wurden anschließend mit Ultraschall behandelt (30 Watt, 10x 1 s). Der Teil der Proben, die mit den Antikörpern anti-Histon H3 untersucht werden sollten, wurden jetzt 1:1 mit dem Histon-Homogenisierungspuffer mit Harnstoff (1x PBS; 1 mM EDTA; 5 mM Natriumbutyrat; 8 M Harnstoff) verdünnt und bei -40°C üN eingefroren. Der andere Teil der Proben wurde 1:1 mit dem Histon-Homogenisierungspuffer ohne Harnstoff (1x PBS; 1 mM EDTA; 5 mM Natriumbutyrat) verdünnt und ebenfalls bei -40°C üN eingefroren. Die Proben wurden in einer fünfstufigen Verdünnungsreihe (1:1) mit dem jeweiligen Puffer aufgetragen und eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden für eine Stunde bei 4°C mit einer Blocklösung (1x PBS; 0,5% BSA (w/v)

unspezifische Bindungsstellen abblockt. Die Primärantikörper wurden entweder für Ein- einhalb bis zwei Stunden bei Raumtemperatur oder bei 4°C über Nacht inkubiert. Nach dreimaligem Waschen mit 1x PBS für jeweils fünf Minuten wurde der sekundäre Antikörper zugegeben und für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Nach dreimaligem Waschen mit 1x PBS für jeweils fünf Minuten wurde die Färbelösung (1x RxN-Puffer; 1 mM p-NPP) aufpipettiert und die Proben mehrere Stunden oder ü.N bis zur Gelbfärbung bei 37°C inkubiert.

3.2.7 Fraktionierung des Gelée royale

3.2.7.1 Trennung der Lipid- und Proteinfraktion

Zur Trennung der Lipid- und Proteinfraktion des Gelée royale wurde eine Chloroform-Extraktion durchgeführt. Dazu wurden 1 g GR mit 1 ml destilliertem Wasser gemischt, mit 3,6 ml Chloroform versetzt und auf dem Vortex gemischt. Nach Zugabe von weiteren 2 ml Wasser und weiterem Mischen wurde das Gemisch in Zentrifugenröhrchen überführt und fünf Minuten bei 6000 G zentrifugiert. Durch die Zentrifugation bilden sich drei Phasen aus. Eine wässrige Phase, die wasserlösliche Substanzen und Proteine enthält, eine organische Phase mit den darin gelösten Lipiden und eine Zwischenschicht mit ausgefallenen Proteinen. Die Zentrifugenröhrchen wurden mit einer Spritze durchstoßen und die einzelnen Fraktionen ohne Vermischen entnommen. Nach Verdampfen des Chloroforms wurden die Fraktionen mit 300 µl Methanol aufgenommen und mit 1 ml Wasser versetzt. Anschließend wurde der pH-Wert mit Natriumdihydrogenphosphat und Dinatriumhydrogenphosphat auf pH = 7 eingestellt und mit Wasser auf 2 ml aufgefüllt, aliquotiert und bis zur Verwendung bei -20°C eingefroren.

3.2.7.2 Trypsinierung des Gelée royale

Zur Trypsinierung des GR wurden verschiedene GR und Trypsinkonzentrationen getestet. Dabei wurde Trypsin in verschiedenen Konzentrationen in destilliertem Wasser gelöst und mit Natriumhydrogenphosphat und Dinatriumhydrogenphosphat auf einen pH-Wert von 7-8 eingestellt. Das trypsinierte GR wurde vor der Fütterung an die Versuchstiere auf vollständige Trypsinierung seiner Proteine mittels SDS-Page und anschließendem Coomassie Gel überprüft. Unten stehende Abb. 3.1 zeigt ein Beispiel für einen solchen Test.

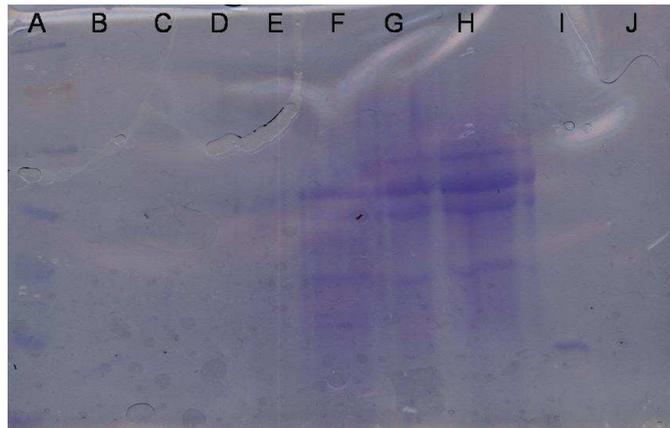


Abb. 3.1: Coomassie-Gel zur Kontrolle der GR Trypsinierung

A: Marker

B, C, D, E: 20 µg Gelée royale, Trypsin B: 1 mg, C: 100 µg, D: 10 µg, E: 1 µg

F, G, H: 20 µg Gelée royale

I: Negativkontrolle: Trypsin und Wasser

J: Negativkontrolle: Wasser

3.2.8 HDAC-Assay

Hierbei handelt es sich um einen fluorimetrischen Assay der Firma Biomol mit dem die Enzymaktivität von Histondeacetylasen in Zellkulturen gemessen werden kann. Das Prinzip beruht auf der Zugabe eines membrangängigen, acetylierten Substrates (Fluor de Lys), das von zelleigenen Histondeacetylasen deacetyliert wird (siehe Abb.3.2). Durch die Zugabe eines Entwicklers, der auch HDAC-Inhibitoren enthält, wird die Reaktion gestoppt und die relative Histondeacetylaseaktivität kann fluorimetrisch bestimmt werden. Um diesen Assay, der für die Durchführung in Vertebraten Zellkulturen entwickelt wurde, auch mit Bienehirnhomogenat anzuwenden wurden zunächst einige Tests durchgeführt, um herauszufinden, ob sich Substrat und Entwickler auch im Gewebehomogenat gleichmäßig verteilen und welche Mengen an Gehirnhomogenat (Enzym), Substrat und Entwickler gebraucht werden, um ein reproduzierbares lineares Fluoreszenzsignal zu erreichen. Dazu wurden die Bienehirne wie in 3.2.5 beschrieben herauspräpariert und in HDAC-Assaypuffer mittels Pistill in einem Glashomogenisator homogenisiert. Die Proben wurden anschließend mit Ultraschall (30 Watt, 10x 1 s) sonifiziert und auf schwarze 96 well Platten aufgetragen. Verdünnungsreihen wurden mit dem HDAC-Assay-Puffer angelegt.

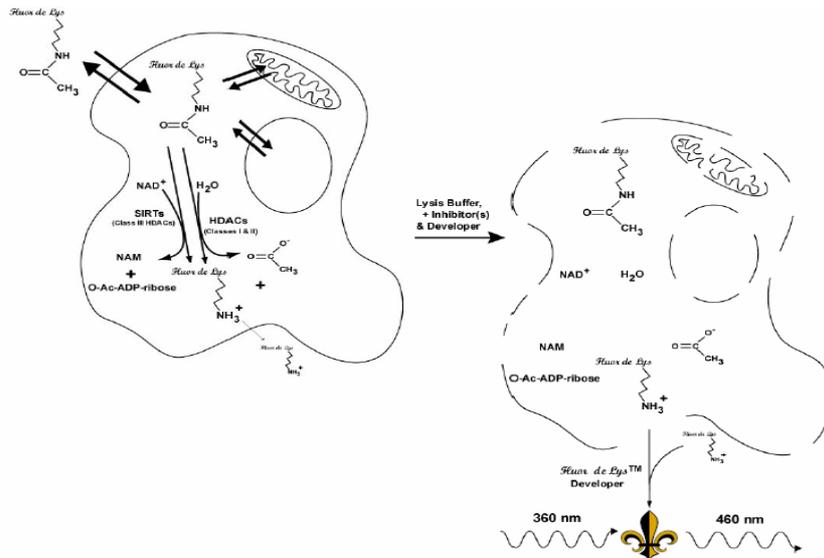


Abb. 3.2: Funktionsweise des HDAC-Assay (Bildquelle: Assay Beschreibung der Firma Biomol)

Das acetylierte Substrat Fluor de Lys ist membranpermeabel und kann daher in Zellen und Zellorganellen eindringen und durch zelluläre Histondeacetylasen aller Klassen deacetyliert werden. Nach Zugabe einer Entwicklerröschung, die den Entwickler, ein Detergenz und HDAC-Inhibitoren enthält, wird die Deacetylierungsreaktion gestoppt. Es entsteht ein Fluoreszenzsignal, das gemessen werden kann.

3.2.8.1 Bestimmung der einzusetzenden Substratmenge

Um die geeignete Menge an Substrat zu bestimmen wurden zunächst die Extinktions- und Emissionswellenlängen des Substrates gemessen (Anregung bei 330 nm, Emissionsmaximum bei 400 nm) und anschließend vier Verdünnungsreihen (1:1 Verdünnung) mit unterschiedlichen Anfangskonzentrationen an Substrat getestet.

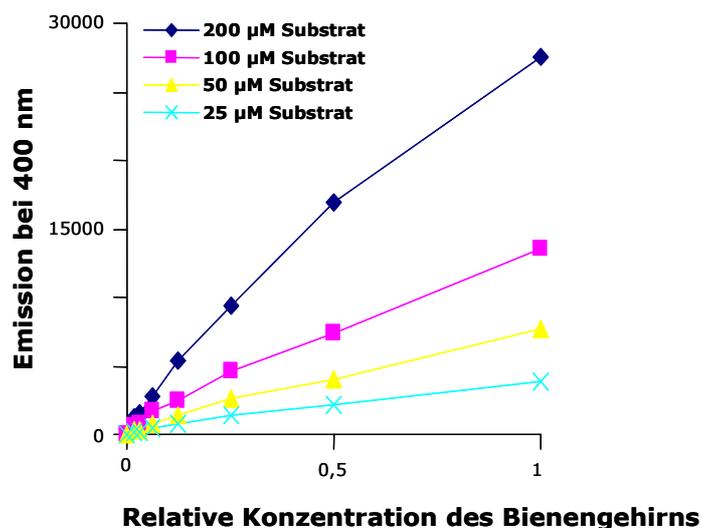


Abb. 3.3: Bestimmung der einzusetzenden Menge an Substrat

Dargestellt ist die Emission des Substrates bei 400 nm. Dazu wurden Verdünnungsreihen verschiedener Substratkonzentrationen erstellt und mit Gehirnhomogenat entsprechend 0,5 Gehirn 15 min inkubiert. Anschließend erfolgte eine Anregung bei 330 nm und eine Emissionsmessung bei 400 nm.

Die Messung zeigt (Abb.3.3), dass es bei allen vier getesteten Anfangskonzentrationen eine lineare Abnahme des Substratsignales gibt. Daher können Messungen bis zu einer minimalen Konzentration von 6,25 μM Substrat durchgeführt werden.

3.2.8.2 Bestimmung der einzusetzenden Gehirnmenge (Enzymmenge)

Um die geeignete Enzymmenge herauszufinden wurde eine Verdünnungsreihe aus Gehirnhomogenat erstellt, mit 25 μM Substrat versetzt und die Reaktion mit Entwicklerlösung (0,25x Entwickler) gestoppt. Anschließend wurde bei 360 nm angeregt und die Emission bei 460 nm (relative HDAC-Aktivität) gemessen. Wie man der Abb. 3.4 entnehmen kann nimmt die relative HDAC-Aktivität linear im Vergleich zur Menge an Enzym ab. Man kann daher Messungen im HDAC-Assay mit verschiedenen Mengen an Bienenhirn vornehmen, braucht aber bei der eingesetzten Substratkonzentration minimal die Enzymmenge 1/ 16 Bienenhirns. Für die Experimente in dieser Arbeit wurde eine Menge Homogenat entsprechend 1/5 Gehirn verwendet

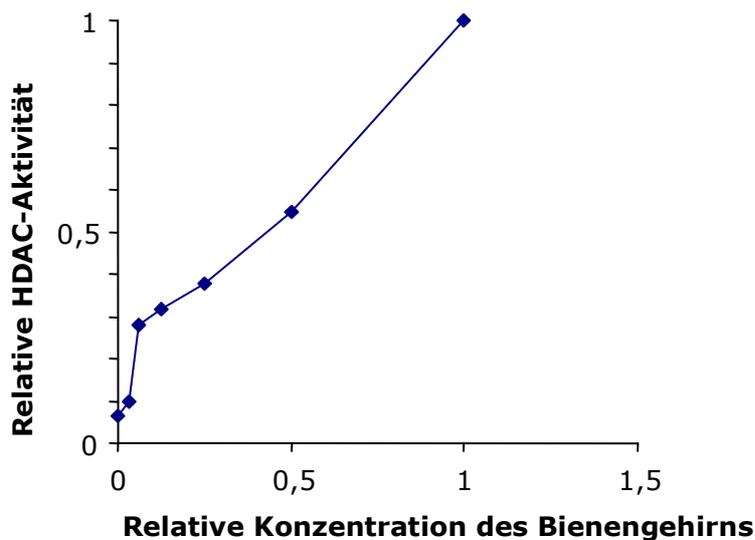


Abb. 3.4: Die HDAC-Aktivität nimmt linear mit der Enzymmenge ab

Dargestellt ist die relative HDAC-Aktivität unterschiedlicher Mengen an Bienenhirn. Dazu wurde eine Verdünnungsreihe erstellt, mit 25 μM Substrat 15 min inkubiert und die Reaktion mit Entwicklerlösung (0,25x) gestoppt. Anschließend erfolgte eine Anregung bei 360 nm und eine Emissionsmessung bei 460 nm. Die Emissionswerte bei 460 nm wurden auf den höchsten Wert (für ein ganzes Gehirn) normalisiert und so die relative HDAC-Aktivität bestimmt.

4. Ergebnisse

In dieser Arbeit sollen mögliche histonmodifizierende Effekte von Gelée royale (GR) und zwei seiner Bestandteile, der 10-Hydroxy-2-decensäure und Nikotinamid im Gehirn der adulten Honigbiene untersucht werden. Eine Beteiligung der genannten Substanzen in der Reizprozessierung und Gedächtnisbildung der Honigbiene soll überprüft werden.

4.1 Die Wirkung von Gelée royale (GR) auf Histondeacetylasen, Histonmodifikationen, sowie assoziative und nicht-assoziative Lernparadigmen

4.1.1. Bestimmung der zu verfütternden Menge an GR

GR wird natürlicherweise nur an Bienenköniginnenlarven und die Bienenkönigin verfüttert. Es gibt demnach keinerlei Daten oder Erfahrungswerte mit denen man eine Fütterungsmenge für adulte Arbeiterinnen abschätzen könnte. Daher wurden zunächst mehrere Fütterungsmengen und Futterzusammensetzungen getestet. Reines GR wurde von den adulten Bienen nicht gefressen und eine stark konzentrierte Lösung von 5 g GR in 10 ml 1 M Saccharoselösung wurde zwar toleriert, aber die Bienen starben vermehrt. Erst eine Fütterung mit einem Futterteig aus GR und Puderzucker im Verhältnis 1:3 wurde angenommen und konnte ohne einen signifikanten Unterschied in der Überlebensrate gegenüber der Kontrolle (Honig und Puderzucker im Verhältnis 1:3) verfüttert werden. Diese Art der Fütterung kann jedoch nur durchgeführt werden, wenn die Bienen, frei in einem Käfig, nach Bedarf fressen und Wasser trinken können, für die übliche Laborhaltung der Bienen in kleinen Metall- oder Plastikröhrchen ist diese Futtermischung ungeeignet. Daher wurde berechnet welche Menge an GR die Tiere zu sich genommen hatten, diese Menge von durchschnittlich 20-30 mg GR pro Biene wurde dann in Lösung an die Bienen verfüttert. Daraufhin wurde für die GR Experimente zunächst diese Lösung a (siehe unten) verwendet. Später hat sich herausgestellt, dass auch mit einer niedrigeren Menge an GR gearbeitet werden kann, da keine signifikanten Unterschiede in den Versuchsergebnissen nach Fütterung der beiden Lösungen festgestellt werden konnten. In weiteren Experimenten wurde daher entweder die Lösung a oder b verwendet.

Lösung a: 3 g GR pro 10 ml 1 M Saccharose, gefüttert wurden neun Tropfen pro Tag pro Biene, das entspricht ca. 27 mg GR pro Biene pro Tag

Lösung b: 1,5 g GR pro 10 ml 1 M Saccharose, gefüttert wurden einmalig drei Tropfen pro Biene, das entspricht ca. 4,5 mg GR pro Biene.

4.1.1.1 Bestimmung der Testzeitpunkte

Da Königinnenlarven GR ad libitum fressen können und die adulte Bienenkönigin mehrmals am Tag gefüttert wird, kann man die Wirkdauer von GR nicht vorhersagen. Daher wurden für die Experimente kürzere (2 h, 24 h) und längere Zeitpunkte (36 h, 48 h und

96 h) gewählt, um GR induzierte Langzeit- und/oder Kurzzeiteffekte untersuchen zu können.

4.1.2 GR verringert die Deacetylaseaktivität

Da im GR Substanzen vermutet werden, die sich auf histonmodifizierende Enzyme, bzw. Histonmodifikationen auswirken, wurden zunächst geeignete Assays gesucht, mit denen sich ein Einfluss auf histonmodifizierende Enzyme nachweisen lässt. Zu Beginn dieser Arbeit war über spezifische Inhibitoren für Histonacetyltransferasen, bzw. Histonde-methylasen so wenig bekannt, dass keine geeigneten Assays käuflich zu erwerben waren. Fluorimetrische Methyltransferase- und Histondeacetylase-Assays hingegen gab es und wurden zur Verwendung mit Bienenhirnhomogenat getestet. Dabei stellte sich heraus, dass nach Etablierung mit Bienenhirnhomogenat nur der Histondeacetylase-Assay zu-verlässige Messergebnisse lieferte.

Da es keine Untersuchungen zur HDAC-Aktivität des Bienenhirns gibt, wurde zunächst die Histondeacetylaseaktivität des Bienenhirnhomogenates *in vitro* gemessen. Dazu wurden Gehirne herauspräpariert, GR hinzugefügt und die relative Deacetylaseaktivität des Bienenhirnhomogenates im Vergleich zum unbehandelten Homogenat bestimmt. Hitzeinhibiertes (10 min gekocht) und TSA (1 μ M) behandeltes Homogenat dienten als Kontrolle zur Funktionalität des Assays.

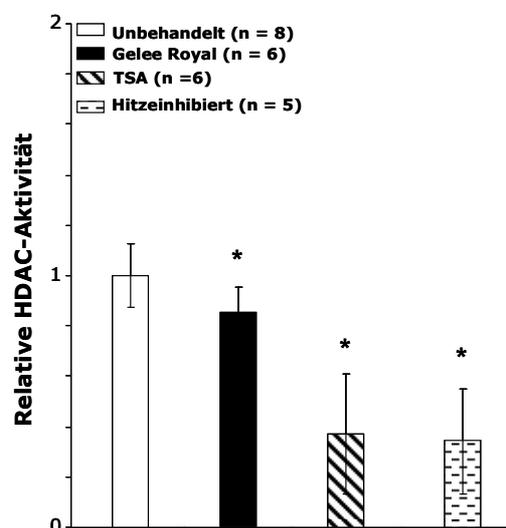


Abb. 4.1: Gelée royale verringert die Deacetylaseaktivität *in vitro*

Dargestellt ist die relative Histondeacetylaseaktivität eines Bienenhirnhomogenates nach Zugabe von 10 μ g GR. Als Kontrollen dienten unbehandeltes Homogenat, sowie TSA behandeltes (1 μ M) und hitzeinhibiertes Homogenat. Zu sehen sind die auf die unbehandelte Kontrolle normierten Mittelwerte, die Standardabweichungen, sowie die Anzahl der Tiere (in Klammern). Werte, die sich signifikant von der unbehandelten Kontrolle (t-Test, $p < 0,05$) unterscheiden, sind mit * gekennzeichnet.

Da GR behandeltes Homogenat eine signifikant niedrigere HDAC-Aktivität aufweist als unbehandeltes Homogenat (Abb. 4.1), deutet das Ergebnis daraufhin, dass GR eine direkte Wirkung auf deacetylierende Enzyme *in vitro* hat.

Um zu überprüfen ob sich diese Wirkung auch nach Fütterung zeigen lässt, wurden die Versuchstiere einmalig mit Gelée royale gefüttert und die relative Deacetylaseaktivität zu verschiedenen Zeitpunkten bestimmt. Nach 2 h gab es keinen signifikanten Aktivitätsunterschied, nach 24 h zeigte sich eine signifikante Minderung der Deacetylaseaktivität. Demnach mindert die Fütterung von GR die Histondeacetylaseaktivität *in vitro* und nach Fütterung von GR.

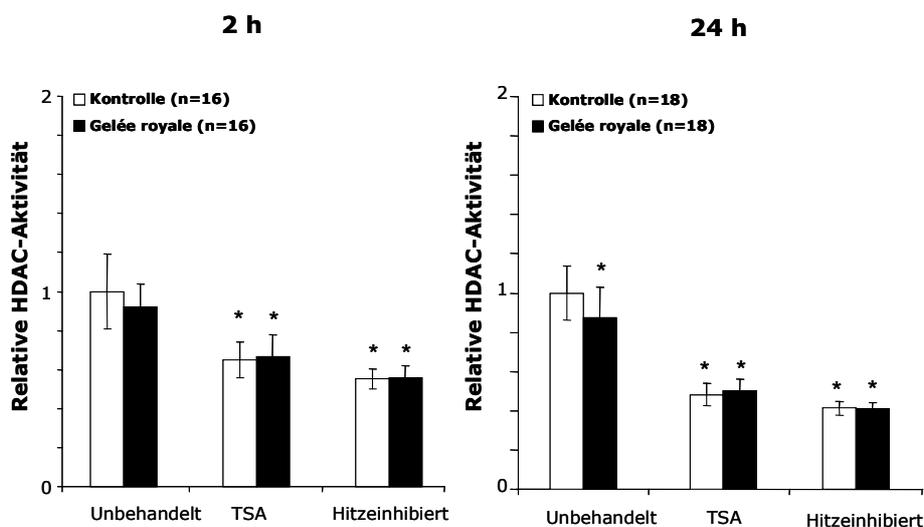


Abb. 4.2: Histondeacetylaseaktivität nach Fütterung von Gelée royale

Dargestellt ist die relative Histondeacetylaseaktivität eines Gehirnhomogenates nach Fütterung von drei Tropfen Gelée royale (Lösung b), bzw. 1 M Saccharose-Lösung. Alle weiteren Fütterungen wurden mit 1 M Saccharose vorgenommen. Die Gehirne wurden nach 2 h und 24 h präpariert und die Deacetylaseaktivität mittels *in vitro* HDAC-Assays bestimmt. Gezeigt sind die auf die unbehandelte Kontrolle normierten Mittelwerte, die Standardabweichungen, sowie die Anzahl der Tiere (in Klammern). Als Kontrollen dienten unbehandeltes Homogenat, sowie TSA behandeltes (1 μ M) und hitzeinhibiertes Homogenat. Werte, die sich signifikant von der unbehandelten Kontrolle (t-Test, $p < 0,05$) unterscheiden, sind mit * gekennzeichnet.

4.1.3 Wirkung von GR auf Histonmodifikationen im Gehirn der Honigbiene

In den vorangegangenen Experimenten ließ sich zeigen, dass GR die Histondeacetylaseaktivität des Bienenhirnhomogenates vermindert. Da Histondeacetylasen neben Histonen andere Zielproteine deacetylieren können, wird in den nächsten Versuchen mittels ELISA untersucht, ob eine Fütterung von GR zu einer veränderten Histonacetylierung führt. Da GR ad libitum in hohen Mengen an Königinnenlarven und die Bienenkönigin verfüttert wird, kann man den Wirkzeitraum und die notwendige Dosis des GR nicht eingrenzen. Um nachzuprüfen, ob es Unterschiede zwischen einer einmaligen und einer mehrmaligen Fütterung der adulten Arbeiterin mit GR gibt, werden daher Untersuchungen zur

Histonacetylierung nach einmaliger und mehrmaliger Fütterung durchgeführt. Da bekannt ist, dass sich Histonacetylierung und -methylierung gegenseitig beeinflussen können, wird zusätzlich zur Histonacetylierung (AC-18) auch der Methylierungszustand des Histons drei (H3) an zwei Stellen (Met-27.3 und Met-4.1) überprüft. Diese drei Stellen wurden aufgrund der eingehenden Ausschlussuntersuchungen mehrerer Antikörper durch einen ehemaligen Labormitarbeiter, Dr. Jakob Hättig, ausgewählt (Hättig 2009).

4.1.3.1 Einmalige Fütterung mit GR verändert die Histonacetylierung und -methylierung

Um Veränderungen der Histonmodifikation zu zeigen wurden Bienen einmalig mit GR gefüttert (weitere Fütterungen im Versuchsverlauf mit 1 M Saccharose), ihre Gehirne zu verschiedenen Zeitpunkten präpariert und die relative Acetylierung und Methylierung mittels ELISA bestimmt.

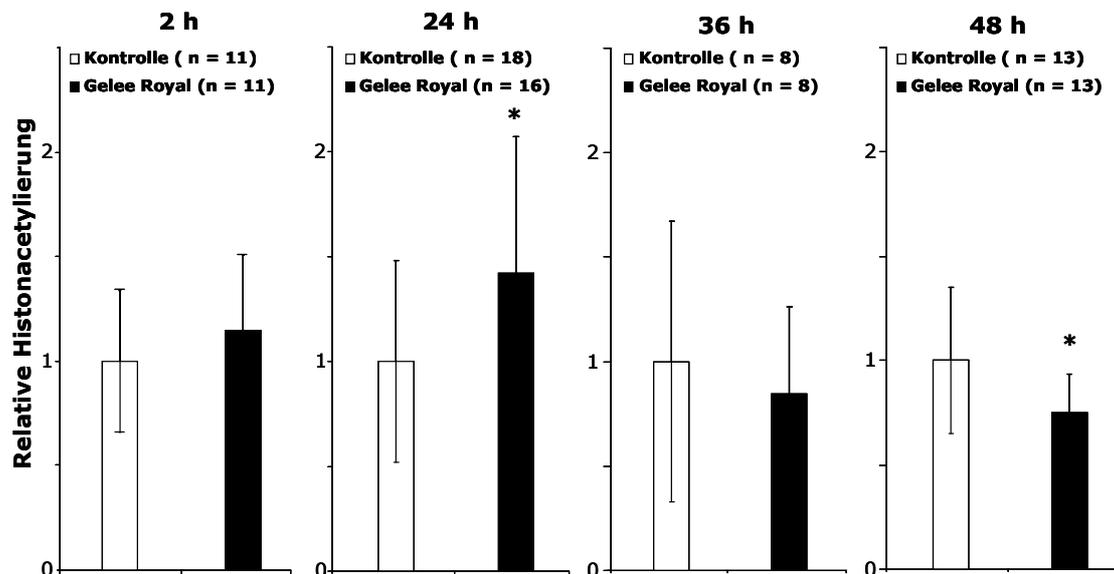


Abb. 4.3: Einmalige Fütterung mit GR verändert die Histonacetylierung

Dargestellt ist die relative Histonacetylierung (AC-18/ H3), nach einmaliger GR- Fütterung (Lösung b). Alle weiteren Fütterungen wurden in beiden Gruppen mit 1 M Saccharose vorgenommen. Die Gehirne wurden nach 2 h, 24 h, 36 h und 48 h präpariert und die relative Acetylierung mittels ELISA bestimmt. Gezeigt sind die auf die Kontrolle normierten Mittelwerte, sowie die Standardabweichungen. Die Anzahl der Tiere ist in Klammern in der Legende hinter der jeweiligen Gruppenbezeichnung vermerkt. Werte, die sich signifikant voneinander (t-Test, $p < 0,05$) unterscheiden, sind mit * gekennzeichnet.

Dabei zeigt sich (Abb. 4.3), dass die GR behandelten Tiere im Vergleich zur Kontrollgruppe nach 24 h eine signifikant höhere und nach 48 h eine signifikant niedrigere relative Acetylierung (AC-18/ H3) aufweisen. 2 h und 36 h nach der Fütterung lässt sich kein signifikanter Unterschied ausmachen. Zudem lässt sich feststellen, dass es neben diesen Unterschieden in der Histonacetylierung auch zu Unterschieden in der Histonmethylierung kommt, was sich an einer signifikant höheren Methylierung (Met-4.1/ H3) nach 24 h und

einer signifikant niedrigeren Methylierung (Met-4.1/ H3 und Met-27.3/ H3) nach 48 h zeigen lässt. (Tab. 4.1).

Tab. 4.1: Einmalige Fütterung mit GR verändert die Histonmethylierung

Dargestellt sind die relativen Histonmethylierungen (Met-4.1/ H3, Met-27.3/ H3) nach einmaliger GR Fütterung (Lösung b). Alle weiteren Fütterungen wurden in beiden Gruppen mit 1 M Saccharose vorgenommen Die Gehirne wurden nach 2 h, 24 h, 36 h und 48 h präpariert und die relativen Histonmethylierungen mittels ELISA bestimmt. Gezeigt sind die auf die Kontrolle normierten Mittelwerte, sowie die Standardabweichungen und die Anzahl der Tiere (in Klammern). Werte, die sich signifikant von der jeweiligen Kontrolle (t-Test, p < 0,05) unterscheiden, sind mit * gekennzeichnet.

		2h	24 h	36 h	48 h
Met-27.3/ H3	Kontrolle	1,00 ± 0,39 (12)	1,00 ± 0,47 (29)	1,00 ± 0,62 (12)	1,00 ± 0,33 (17)
	GR	1,02 ± 0,28 (17)	1,09 ± 0,51 (25)	0,97 ± 0,42 (13)	0,73 ± 0,29 (17) *
Met-4.1/ H3	Kontrolle	1,00 ± 0,39 (11)	1,00 ± 0,37 (26)	1,00 ± 0,49 (12)	1,00 ± 0,34 (17)
	GR	0,95 ± 0,31 (10)	1,33 ± 0,73 (24) *	0,98 ± 0,31 (13)	0,75 ± 0,23 (17)*

4.1.3.2 Mehrmalige Fütterung mit GR verändert die Histonacetylierung und -methylierung

Um nachzuprüfen, ob es Unterschiede zu einer einmaligen Fütterung mit GR gibt, wurden zusätzlich noch Untersuchungen zur Histonacetylierung und -methylierung durchgeführt, in denen dreimal täglich GR (Lösung a) verfüttert wurde. Nach 24 h und 48 h wurden die Gehirne präpariert und die relative Histonacetylierung und Histonmethylierung mittels ELISA bestimmt. Wie in Abb. 4.4 ersichtlich, kommt es auch nach mehrmaliger Fütterung mit GR im Vergleich zur Kontrollgruppe nach 24 h zu einer signifikant höheren und nach 48 h zu einer signifikant niedrigeren Acetylierung (Ac-18 / H3). Auch in der Histonmethylierung gibt es keine Unterschiede zu einer einmaligen Fütterung, hier ist in der GR gefütterten Gruppe die Methylierung (Met-4.1/ H3) nach 24 h signifikant erhöht und nach 48 h, ebenso wie die Methylierung (Met-27.1/ H3) signifikant erniedrigt (Siehe Tab. 4.2).

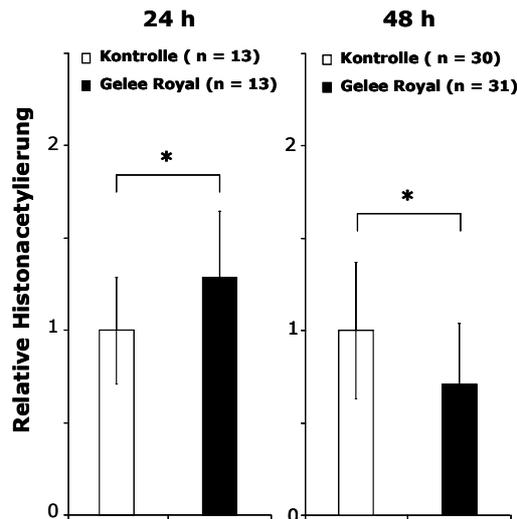


Abb. 4.4: Mehrmalige Fütterung mit GR verändert die Histoneacetylierung

Dargestellt ist die relative Histoneacetylierung (Ac-18/ H3), nach mehrmaliger Fütterung von GR, bzw. 1 M Saccharose-Lösung. Die Futterlösungen (GR: Lösung a) wurden dreimal täglich mit insgesamt neun Tropfen gegeben. Die Gehirne wurden nach 24 h und 48 h präpariert und die relative Histoneacetylierung (Ac-18/ H3) mittels ELISA bestimmt. Gezeigt sind die auf die Kontrolle normierten Mittelwerte, sowie die Standardabweichungen. Die Anzahl der Tiere ist in Klammern in der Legende hinter der jeweiligen Gruppenbezeichnung vermerkt. Werte, die sich signifikant von der jeweiligen Kontrolle (t-Test, $p < 0,05$) unterscheiden, sind mit * gekennzeichnet.

Tab. 4.2: Mehrmalige Fütterung mit GR verändert die Histone-methylierung

Dargestellt sind die relativen Histone-methylierung (Met-4.1/ H3, Met-27.3/ H3) nach Fütterung von GR, bzw. 1 M Saccharose-Lösung. Die Futterlösungen wurden dreimal täglich mit insgesamt neun Tropfen gegeben. Die Gehirne wurden nach 24 h und 48 h präpariert und die relativen Histone-methylierungen mittels ELISA bestimmt. Die auf die Kontrolle normierten Mittelwerte, sowie die Standardabweichungen und die Anzahl der Tiere (in Klammern) sind in der Tabelle angegeben. Werte, die sich signifikant (t-Test, $p < 0,05$) von der jeweiligen Kontrolle unterscheiden, sind mit * gekennzeichnet.

		24 h	48 h
Met-27.3/ H3	Kontrolle	1,00 ± 0,19 (12)	1,00 ± 0,36 (31)
	GR	1,05 ± 0,27 (11)	0,89 ± 0,36 (30) *
Met-4.1/ H3	Kontrolle	1,00 ± 0,18 (13)	1,00 ± 0,34 (31)
	GR	1,20 ± 0,29 (12) *	0,78 ± 0,35 (31) *

Die Ergebnisse zeigen, dass eine Fütterung von GR mengenunabhängig zu einer erhöhten Histoneacetylierung und -methylierung nach 24 h und einer verminderten Histoneacetylierung und -methylierung nach 48 h führt. Eigentlich würde man erwarten, dass sich unterschiedliche Mengen und die erhöhte Fütterungsfrequenz bei mehrmaliger Fütterung auch unterschiedlich auf Histone-modifikationen auswirken, es wurden jedoch nur Messungen innerhalb von 48 h durchgeführt. Man kann daher nicht sicher sagen, ob es nicht zu einem späteren Zeitpunkt unterschiedliche Wirkungen der beiden Fütterungsmethoden gäbe.

4.1.3.3 Wirkung von GR auf Histonmodifikationen im Gehirn frisch geschlüpfter Bienen

Untersuchungen in der Arbeitsgruppe haben gezeigt, dass eine Behandlung mit Trichostatin A, einem Histondeacetylasehemmstoff die relative Histonacetylierung (Ac-18/ H3) im Gehirn von Sammlerbienen erhöhen kann. Bei frisch geschlüpften Ammenbienen hat dies jedoch nicht funktioniert (Hättig, 2009). Dies deutet daraufhin, dass junge Bienen nicht auf Substanzen ansprechen, die die Histonacetylierung künstlich erhöhen. Es ist daher interessant, die bisher beobachteten Effekte einer GR Fütterung an Sammlerinnen mit einer Fütterung an frisch geschlüpfte Ammenbienen zu vergleichen. Daher wurde im Folgenden eine mehrmalige Fütterung von GR an frisch geschlüpfte Ammenbienen vorgenommen und die relative Histonacetylierung und Histonmethylierung mittels ELISA bestimmt. Wie in Tab. 4.3 zu sehen gibt es nach 48 h keinen signifikanten Unterschied in der Histonacetylierung oder- methylierung der beiden Gruppen. Um zu überprüfen ob es bei jungen Bienen nicht nur zu einem verzögerten Wirkeintritt von GR auf Histonmodifikationen kommt, wurde zusätzlich noch zu einem weiteren Zeitpunkt, nach 96 h gemessen. Hier gab es ebenfalls keine signifikante Veränderung der Histonacetylierung oder – methylierung, was ein weiteres Indiz dafür sein könnte, dass frisch geschlüpfte Bienen nicht auf Substanzen ansprechen, die die Histonacetylierung oder Histonmethylierung künstlich erhöhen oder mindern.

Tab. 4.3: Einfluss von mehrmaliger GR Fütterung auf die Histonacetylierung und -methylierung frisch geschlüpfter Bienen

Dargestellt ist die relative Histonacetylierung (Ac-18/ H3) und die relative Histonmethylierung (Met-27.3/ H3, Met-4.1/ H3) nach Fütterung von GR- bzw. Honig-Puderzucker-Futtermischung an frisch geschlüpfte Bienen (zu Beginn des Experimentes jünger als 24 h). Die Futtermischungen (GR: GR: Puderzucker 1:3, Kontrolle: Honig: Puderzucker 1:3) wurden ad libitum gegeben. Nach 48 h und 96 h wurden die Gehirne präpariert und die relative Histonacetylierung und Histonmethylierung mittels ELISA bestimmt. Die auf die Kontrolle normierten Mittelwerte, sowie die Standardabweichungen und die Anzahl der Tiere (in Klammern) sind in der Tabelle angegeben.

		48 h	96 h
Ac-18/ H3	Kontrolle	1,00 ± 0,39 (14)	1,00 ± 0,46 (17)
	GR	1,29 ± 1,11 (11)	1,06 ± 0,48 (19)
Met-27.3/ H3	Kontrolle	1,00 ± 0,45 (15)	1,00 ± 0,45 (19)
	GR	1,34 ± 0,74 (15)	0,80 ± 0,33 (19)
Met-4.1/ H3	Kontrolle	1,00 ± 0,23 (8)	1,00 ± 0,51 (19)
	GR	1,27 ± 0,71 (8)	1,02 ± 0,47 (19)

4.1.4 Einfluss von GR auf das Verhalten der Honigbiene

Die vorangegangenen Experimente haben gezeigt, dass die Fütterung von GR zu einer Veränderung des Histonacetylierungs- und Histonmethylierungsstatus im Gehirn der Honigbiene führt. Dabei gibt es keine Unterschiede zwischen einmaliger und mehrmaliger

Fütterung von GR an Sammlerinnen, es ließ sich jedoch keine Wirkung auf frisch geschlüpfte Bienen zeigen. Dies lässt darauf schließen, dass es eine oder mehrere Substanzen im GR gibt die kurz- und langfristig Histonmodifikationen verändern. Veränderungen von Histonmodifikationen im Gehirn können die Expression von Genen verändern, die am Lernen und der Gedächtnisbildung und -konsolidierung beteiligt sind. Daher wird im Folgenden untersucht, ob GR eine Form des Belohnungslernens, die appetitive olfaktorische Konditionierung der Honigbiene beeinflusst. Bei dieser Form des Trainings wird ein naiver Duftreiz (CS, konditionierter Stimulus, hier: Nelkenöl) mit einem Zuckerreiz (US, unconditionierter Stimulus, hier: 1 M Saccharose) gepaart. Aus diesem Grund muss vor der eigentlichen Konditionierung überprüft werden, ob GR einen Einfluss auf die Wahrnehmung und die Prozessierung von Duft- und Zuckerreiz hat. Dies kann man experimentell mit den nicht-assoziativen Lernformen, Habituation und Sensitisierung, und der Zuckerwasserempfindlichkeit der Bienen testen. Daher wird im Folgenden neben der Wirkung von GR auf die appetitive olfaktorische Konditionierung auch die Wirkung von GR auf die Zuckerwasserempfindlichkeit und die nicht-assoziativen Lernformen (Sensitisierung und Habituation) untersucht.

4.1.4.1 GR hat keinen Einfluss auf die Zuckerwasserempfindlichkeit der Honigbiene

In den nächsten Experimenten wird die Wirkung von Gelée royale auf die Zuckerwasserempfindlichkeit der Honigbiene untersucht. Dabei wird getestet, ob es nach einmaliger oder mehrmaliger Gabe von GR Unterschiede in der Wahrnehmung des Zuckerreizes gibt. Aus Abb. 4.5 wird ersichtlich, dass sich weder nach einmaliger Fütterung, noch nach mehrmaliger Fütterung von GR signifikante Unterschiede zu den Kontrolltieren feststellen lassen. Daher kann man davon ausgehen, dass GR keinen Einfluss auf die Wahrnehmung des Zuckerreizes hat.

A: Einmalige GR Fütterung

B: Mehrmalige GR Fütterung

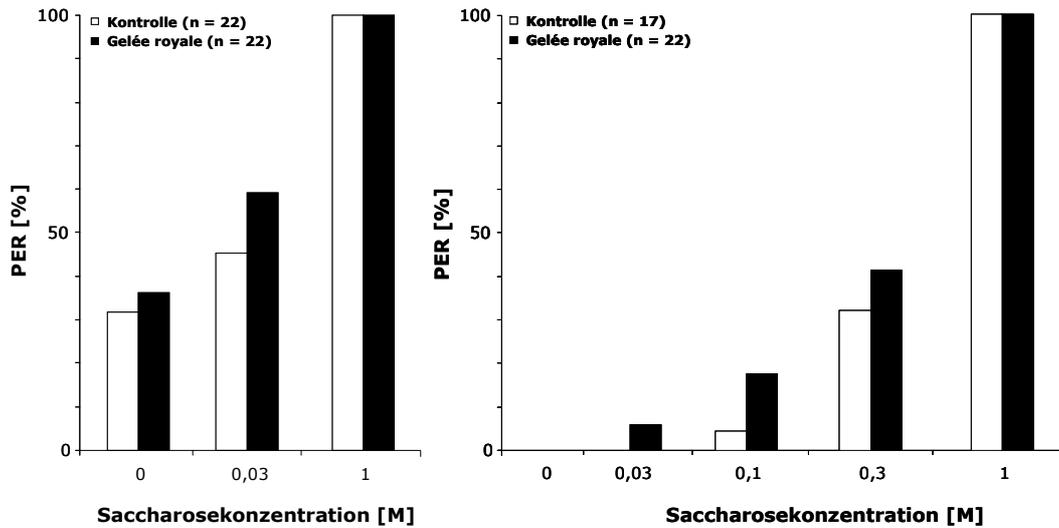


Abb. 4.5: Einfluss von GR auf die Zuckerwasserempfindlichkeit der Honigbiene

Dargestellt ist die Anzahl der Tiere in Prozent, die nach Berührung einer Antenne mit einem Tropfen 0 M, 0,03 M (0,1 M 0,3 M) und 1 M Saccharose-Lösung in aufsteigender Konzentration mit dem PER reagiert haben. Die Tiere wurden entweder 2 h vor dem Test mit drei Tropfen GR (Lösung b) oder 1 M Saccharose-Lösung gefüttert (Abb. 4.5 A) oder am Vorabend und 2 h vor dem Test mit drei Tropfen GR (Lösung a) oder 1 M Saccharose-Lösung gefüttert (Abb. 4.5 B). Die Anzahl der Tiere ist in Klammern in der Legende hinter der jeweiligen Gruppenbezeichnung vermerkt.

4.1.4.2 GR hat keinen Einfluss auf nicht-assoziative Lernparadigmen (Habituation und Sensitisierung)

Im Folgenden wird zunächst die Wirkung von GR auf die Prozessierung von Duft- und Zuckerreizen untersucht, da die korrekte Verarbeitung dieser Reize eine Grundlage für die appetitive olfaktorische Konditionierung darstellt. Dies geschieht mittels zweier assoziativer Lernparadigmen, der Sensitisierung und der Habituation. Dabei wurden die Bienen zunächst mit GR gefüttert und anschließend entweder eine Stunde später sensitisiert und eine weitere Stunde später habituiert und dishabituiert oder nach zwei Stunden nur habituiert und dishabituiert (siehe Schema 4.6). Wie in Tab. 4.4 zu erkennen ist, gibt es keinen signifikanten Unterschied in der Sensitisierung zwischen GR behandelten Tieren und Kontrolltieren.

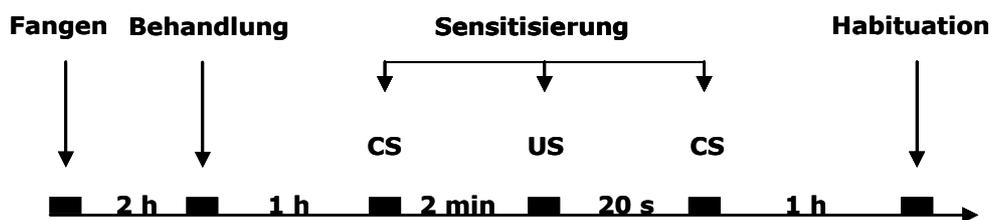


Abb. 4.6: Zeitliche Abfolge der Tests auf Sensitisierung und Habituation der Honigbiene

Tab. 4.4: GR hat keinen Einfluss auf Habituation und Sensibilisierung der Honigbiene

Dargestellt sind die auf die Kontrolle normierten Mittelwerte der Stimulationen bis zur Habituation, bzw. die Anzahl der Tiere in Prozent, die sich sensibilisieren ließen. Dafür wurden die Tiere 1 h (Sensibilisierung), bzw. 2 h (Habituation) vor dem jeweiligen Test mit drei Tropfen GR (Lösung b) oder 1 M Saccharose-Lösung gefüttert. Die Werte sind nicht signifikant unterschiedlich.

	Kontrolle	GR
Sensibilisierung	18,18 % PER (22)	22,7 % PER (22)
Habituation	1 ± 0,50 (24)	0,99 ± 0,51 (28)

Da weder Habituations- noch Sensibilisierungsexperimente signifikante Unterschiede in den GR oder Saccharose gefütterten Gruppen aufweisen, kann man davon ausgehen, dass GR keinen Effekt auf nicht-assoziative Lernparadigmen hat. Dies zeigt, dass es nach Fütterung von GR nicht zu einer veränderten CS- oder US- Prozessierung kommt.

4.1.4.3 Einfluss von GR auf assoziatives Lernen und Gedächtnisbildung

Die vorangegangenen Untersuchungen haben gezeigt, dass GR weder die Wahrnehmung von Zuckerreizen, noch die Verarbeitung von Duft- und Zuckerreiz beeinflusst. Dies sind wichtige Voraussetzungen für die folgenden Lernexperimente, da hier die Wirkung von GR auf die appetitive olfaktorische Konditionierung untersucht wird. Dazu wird in diesen Experimenten ein naiver Duftreiz (CS- Nelkenduft) mit einer Futterbelohnung (US- 1 M Saccharose) gepaart. Bei der Biene bildet sich ein transkriptionsunabhängiges Kurzzeitgedächtnis schon nach einer CS-US Paarung, also einem Ein-Trial-Training (schwaches Training) aus. Zur Konsolidierung eines Langzeitgedächtnisses benötigt man gewöhnlich mehrere CS-US-Paarungen, wie z.B. in einem Drei-Trial-Training (starkes Training) (Menzel, 2001). Zunächst wird überprüft, ob es nach Fütterung von GR zu einer Veränderung des Gedächtnisses nach einem schwachen Training kommt und ob es dabei Unterschiede zwischen einer einmaligen und einer mehrmaligen Fütterung von GR gibt. Dazu wurden die Bienen entweder einmalig 2 h vor dem Training (Abb. 4.7 A) mit GR (Lösung b) oder mehrmals vor und nach dem Training mit GR (Lösung a) (Abb. 4.7 B) gefüttert. Beide Behandlungen führen zu einem signifikant besseren 24 h Gedächtnis der mit GR gefütterten Tiere. Zwei Stunden nach dem Training gibt es keinen signifikanten Unterschied der mit GR gefütterten Bienen und den Kontrolltieren.

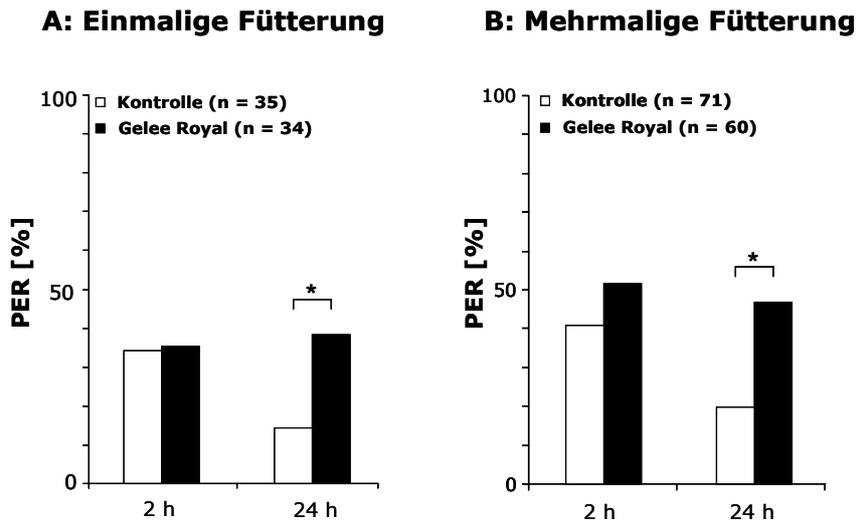


Abb. 4.7: Einmalige und mehrmalige GR Fütterung verbessern das Gedächtnis der Honigbiene nach schwachem Training

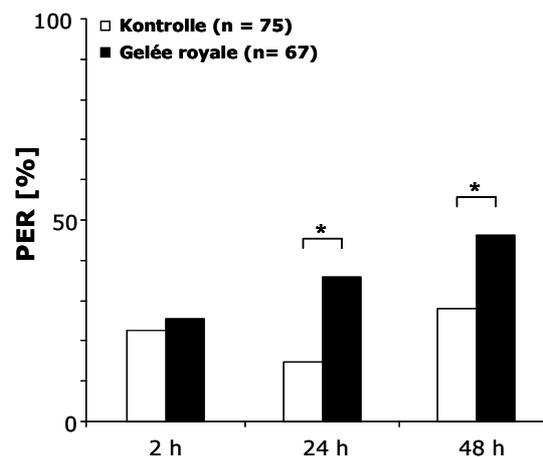
Dargestellt ist die Anzahl der Tiere in Prozent, die auf den CS (Nelkenduft) mit dem PER reagiert haben. Die Tiere wurden entweder 2 h vor dem Training mit drei Tropfen GR (Lösung b) (A) oder mit insgesamt neun Tropfen GR (Lösung a) oder 1 M Saccharose-Lösung pro Tag vor und nach dem Training gefüttert (B) und mit einer CS-US (Nelkenduft- 1 M Saccharose) Paarung konditioniert. Die Anzahl der Tiere ist in Klammern in der Legende hinter der jeweiligen Gruppenbezeichnung vermerkt. Mit einem Stern gekennzeichnet sind Werte, die sich signifikant voneinander unterscheiden (Chi-Quadrat-Test, $p < 0,05$).

Die Ausbildung eines Gedächtnisses erfolgt in mehreren Phasen, die man u.a. in eine Lernphase und in eine Konsolidierungsphase, in der das in der Lernphase gebildete Gedächtnis gefestigt wird, unterteilen kann. Füttert man GR in hohen Konzentrationen vor und nach dem Training, so ist es nicht möglich zu unterscheiden in welcher Phase GR wirkt, oder ob es einen Einfluss auf die Bildung oder die Konsolidierung des Gedächtnisses hat. Da es keine Unterschiede in der Wirkung einmaliger oder mehrmaliger GR Fütterung auf das Gedächtnis der Honigbiene gibt, wird daher in den folgenden Experimenten GR nur einmal 30 min nach dem Training, also in der Konsolidierungsphase gefüttert. Zusätzlich wird durch einen weiteren Gedächtnisabruf nach 48 h überprüft ob es sich bei der Lernverbesserung nach Fütterung von GR um einen länger andauernden oder nur um einen kurzfristigen Effekt handelt. Wie aus Abb. 4.8 A ersichtlich wird, ist auch bei einer Fütterung von GR in der Konsolidierungsphase beim 2 h Abruf kein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Gruppen zu erkennen. Nach 24 h kommt es jedoch zu einem signifikant verbesserten Gedächtnis in der mit GR gefütterten Gruppe, welches bis zum 48 h Abruf andauert. Diese Ergebnisse zeigen, dass die Gabe von GR in der Konsolidierungsphase zu einem verbesserten Gedächtnis führt und dass diese von GR induzierte Wirkung über 48 h andauert.

Durch ein schwaches Training wird gewöhnlicherweise nur ein kurzfristiges Gedächtnis erzeugt, welches transkriptionsunabhängig ist. In den vorangegangenen Experimenten konnte jedoch gezeigt werden, dass GR chromatinmodifizierende Effekte aufweist und

daher Transkriptionsereignisse beeinflussen könnte. Um den Wirkmechanismus des GR weiter eingrenzen zu können, werden die Bienen eine Stunde vor dem Training mit dem Transkriptionsblocker Actinomycin D injiziert um zu überprüfen, ob die von GR induzierte Gedächtnisverbesserung nach einem Ein-Trial-Training transkriptionsabhängig ist.

A:



B:

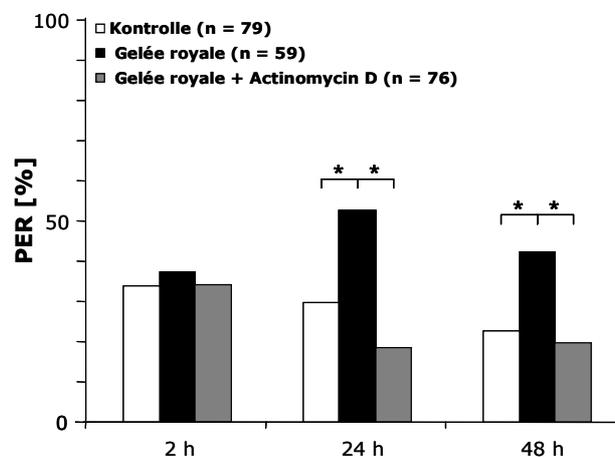


Abb. 4.8: Die Fütterung mit GR in der Konsolidierungsphase führt zur Konsolidierung eines transkriptionsabhängigen Gedächtnisses nach schwachem Training

Dargestellt ist die Anzahl der Tiere in Prozent, die auf den CS (Nelkenduft) mit dem PER reagiert haben. **A:** Die Tiere wurden durch eine CS-US (Nelkenduft- 1 M Saccharose) Paarung konditioniert (schwaches Training) und 0,5 h nach dem Training mit drei Tropfen GR (Lösung b)- oder 1 M Saccharose-Lösung gefüttert. **B.:** Die Tiere wurden zusätzlich 1 h vor dem Training mit 1 µl der folgenden Lösungen injiziert (Kontrolle und GR: 100% DMSO, Act-D: 2 µg/ µl Actinomycin D). Die Anzahl der Tiere ist in Klammern in der Legende hinter der jeweiligen Gruppenbezeichnung vermerkt. Mit einem Stern gekennzeichnet sind Werte, die sich signifikant voneinander unterscheiden (Chi-Quadrat-Test, $p < 0,05$).

Wird vor dem Training Actinomycin D injiziert, so kann dieser von GR induzierte Effekt nicht beobachtet werden (Abb. 4.8 B). Dies bedeutet, dass nach Fütterung mit GR ein transkriptionsabhängiges Gedächtnis erzeugt wird. Da durch eine Fütterung mit GR das Gedächtnis nach 24 h und nach 48 h transkriptionsabhängig verbessert wird und man aus früheren Versuchen weiß, dass ein transkriptionsabhängiges Gedächtnis der Honigbiene nur nach einem starken Training mit mehreren CS-US-Paarungen entsteht (Wüstenberg et al, 1998), wird im Folgenden der Einfluss von GR auch nach einem starken Training untersucht. Dazu wurden die Versuchstiere mit drei CS-US Paarungen konditioniert und in der Konsolidierungsphase mit GR gefüttert (siehe Schema Abb. 4.9). Wie der Abb. 4.9 zu entnehmen ist, gibt es weder während der Lernphase (1.-3. Trial), noch beim 2 h Abruf signifikante Unterschiede zwischen den beiden Gruppen. Nach 24 h ist das Gedächtnis der GR-Gruppe zwar geringfügig, aber nicht signifikant besser als das Gedächtnis der Kontrollgruppe. Erst nach 48 h zeigt sich eine signifikante von GR induzierte Verbesserung des Gedächtnisses.

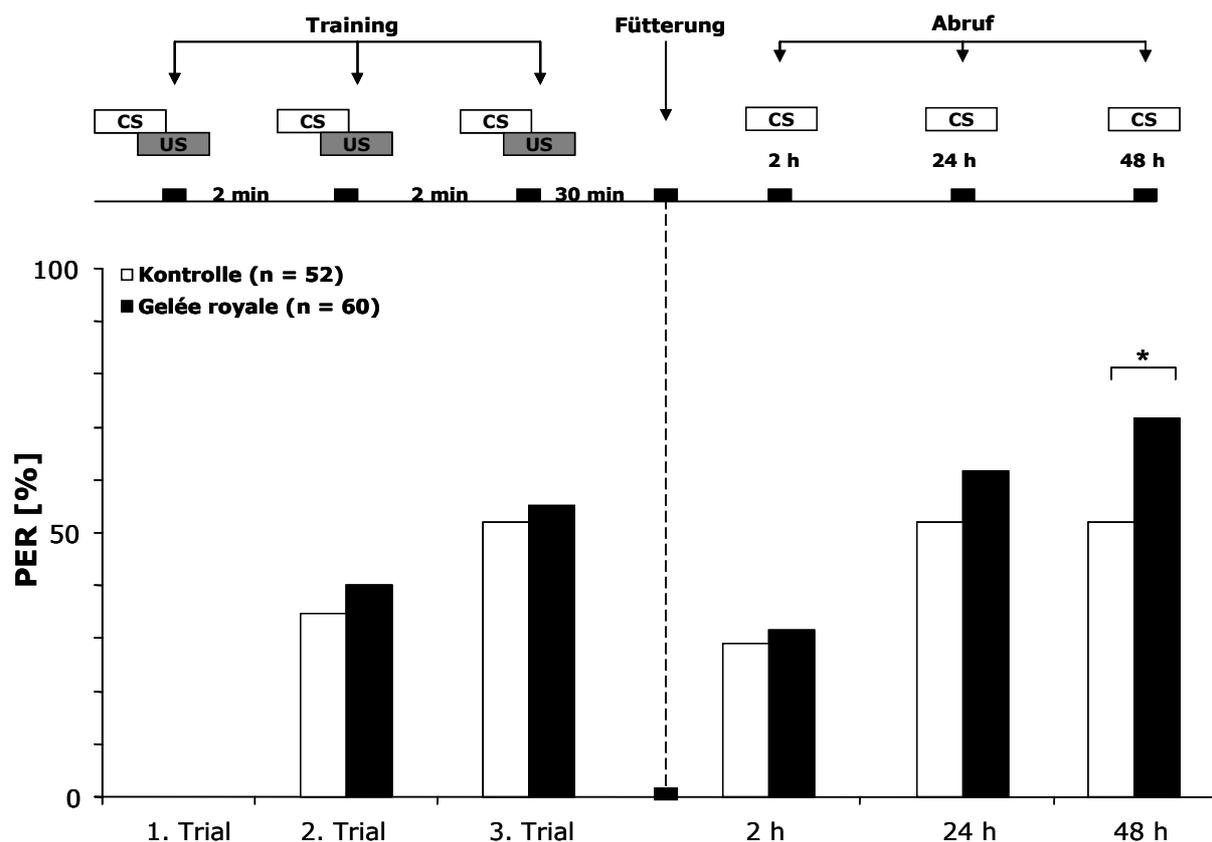


Abb. 4.9: GR verbessert das Gedächtnis der Honigbiene nach starkem Training

Dargestellt ist die Anzahl der Tiere in Prozent, die auf den CS (Nelkenduft) mit dem PER reagiert haben. Die Tiere wurden durch drei CS-US Paarungen (drei Trials) konditioniert und 0,5 h nach dem Training mit drei Tropfen Gelée royale (Lösung b) oder 1 M Saccharose-Lösung gefüttert. Die Anzahl der Tiere ist in Klammern in der Legende hinter der jeweiligen Gruppenbezeichnung vermerkt. Mit einem Stern gekennzeichnet sind Werte, die sich signifikant voneinander unterscheiden (Chi-Quadrat-Test, $p < 0,05$).

4.2 GR-Fraktionen

Im vorangegangenen Kapitel wurde gezeigt, dass die Verfütterung von Gelée royale verschiedene Auswirkungen hat, so führt sie sowohl zu einer reduzierten HDAC-Aktivität und Veränderungen der Histonacetylierung und -methylierung im Gehirn der Honigbiene, als auch zu einer transkriptionsabhängigen Verbesserung des 24 h und 48 h Gedächtnisses. Da Gelée royale ein Gemisch unterschiedlichster Substanzen ist, in der Hauptsache Lipide und Proteine (Peptide), stellt sich die Frage ob es möglich ist Einzelkomponenten zu bestimmen, die für diese Wirkungen verantwortlich sind. Aufschluss darüber soll zunächst eine grobe Zuordnung der Wirkungen zum Protein- oder Lipidanteil des GR geben. Experimentell werden daher durch Trypsinierung des GR Protein- und Peptidwirkungen inhibiert und des weiteren wird durch Chloroformextraktion eine Trennung des GR in einen chloroformlöslichen und einen wasserlöslichen Teil vorgenommen. Die Chloroformfraktion enthält überwiegend Lipide, die Wasserfraktion überwiegend Proteine. Daher werden diese Fraktionen der Einfachheit halber zukünftig „Lipid“- und „Protein“- Fraktion genannt.

4.2.1 Effekte nach Trypsinierung des GR

4.2.1.1 Trypsiniertes GR hat keinen Einfluss auf die Histonacetylierung oder Histonmethylierung

Da im vorangegangenen Kapitel eine Wirkung von GR auf Histonmodifikationen gezeigt werden konnte, wird zunächst untersucht, ob nach einer Trypsinierung des GR die gleiche Wirkung auf die Histonacetylierung und Histonmethylierung (AC-18, Met-4.1, Met-27.3) gezeigt werden kann. Dazu wurden die Bienen mehrmals mit GR bzw. trypsinisiertem GR gefüttert und die relativen Histonacetylierung und Histonmethylierung mittels ELISA bestimmt. Wie anhand der Abb. 4.10 deutlich wird, ist die relative Histonacetylierung nach Fütterung mit GR nach 24 h erhöht (nicht signifikant) und nach 48 h signifikant niedriger als in der Kontrolle. Eine Trypsinierung des GR scheint diesen Effekt aufzuheben, da hier weder eine signifikante Erhöhung nach 24 h, noch eine signifikante Reduktion der Histonacetylierung nach 48 h zu vermerken ist. Die Histonmethylierung der GR Gruppen unterscheidet sich zu keinem Zeitpunkt signifikant von der Kontrolle. Man muss jedoch anmerken, dass die Anzahl der Tiere deutlich geringer ist als in den vorhergehenden GR-Versuchen (Kap. 4.1.3.2).

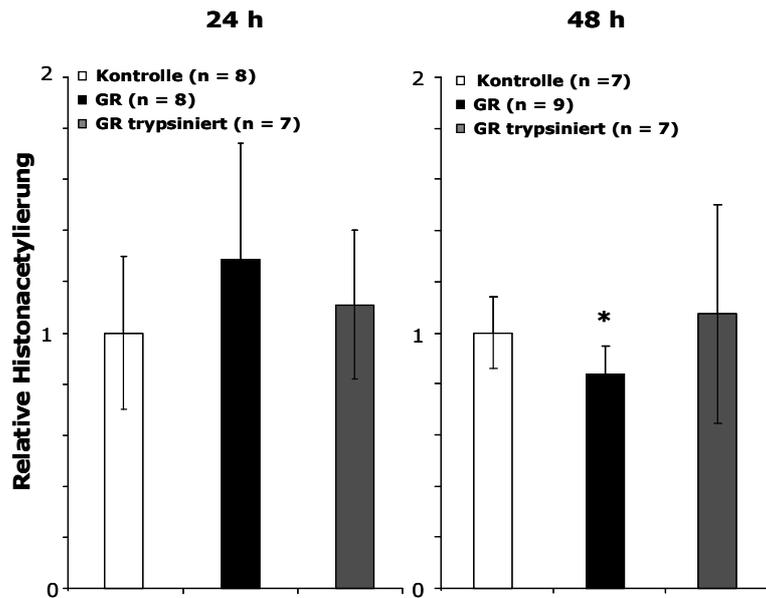


Abb. 4.10: Einfluss von trypsinisiertem Gelée royale auf die Histoneacetylierung

Dargestellt ist die relative Histoneacetylierung (Ac-18/ H3) nach Fütterung von Gelée royale (Lösung a), trypsinisiertem Gelée royale, bzw. 1 M Saccharose-Lösung. Die Futterlösungen wurden dreimal täglich mit insgesamt neun Tropfen pro Tag gegeben. Die Gehirne wurden nach 24 h und 48 h präpariert und die relative Histoneacetylierung mittels ELISA bestimmt. Werte, die sich signifikant von der Kontrolle (t-Test, $p < 0,05$) unterscheiden, sind mit * gekennzeichnet.

Tab. 4.5: Einfluss von trypsinisiertem Gelée royale auf die Histone-methylierung

Dargestellt sind die relativen Histone-methylierungen (Met-4.1/ H3, Met-27.3/ H3) nach Fütterung von Gelée royale (Lösung a), trypsinisiertem Gelée royale, bzw. 1 M Saccharose-Lösung. Die Futterlösungen wurden dreimal täglich mit insgesamt neun Tropfen pro Tag gegeben. Die Gehirne wurden nach 24 h und 48 h präpariert und die relativen Proteinmengen mittels ELISA bestimmt. Die auf die Kontrolle normierten Mittelwerte, sowie die Standardabweichungen und die Anzahl der Tiere (in Klammern) sind in der Tabelle angegeben. Werte, die sich signifikant von der Kontrolle (t-Test, $p < 0,05$) unterscheiden, sind mit * gekennzeichnet.

		24 h	48 h
Met-27.3/ H3	Kontrolle	1,00 ± 0,37 (8)	1,00 ± 0,55 (8)
	GR	1,37 ± 0,51 (8)	0,97 ± 0,38 (9)
	GR trypsinisiert	1,07 ± 0,27 (7)	1,51 ± 0,89 (7)
Met-4.1/ H3	Kontrolle	1,00 ± 0,43 (8)	1,00 ± 0,44 (8)
	GR	1,00 ± 0,42 (7)	0,89 ± 0,29 (8)
	GR trypsinisiert	0,93 ± 0,49 (7)	1,28 ± 0,30 (7)

4.2.1.2 Effekte von trypsinisiertem GR auf Lernen und Gedächtnis der Honigbiene

Da sich durch eine mehrmalige Fütterung mit GR eine Verbesserung des 24 h Gedächtnisses der Honigbiene nach einem schwachen Training zeigen ließ, wird im Folgenden überprüft, ob dieser positive Effekt auf das Gedächtnis auch nach Trypsinierung des GR vorhanden ist. Dazu wurden die Bienen mehrmals vor und nach dem Training mit Gelée

royale (Lösung a), trypsiniertem Gelée royale, bzw. 1 M Saccharose-Lösung gefüttert und mit einer CS-US-Paarung (Nelkenduft- 1 M Saccharose) konditioniert.

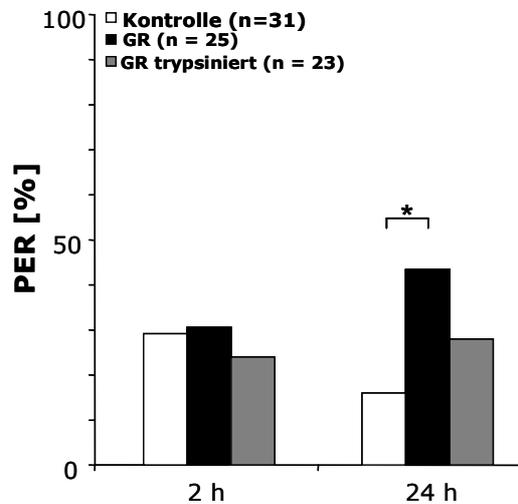


Abb. 4.11: Die Wirkung von trypsinisiertem GR auf das Gedächtnis nach schwachem Training

Dargestellt ist die Anzahl der Tiere in Prozent, die auf den CS (Nelkenduft) mit dem PER reagiert haben. Die Tiere wurden mit insgesamt neun Tropfen Gelée royale (Lösung a), trypsiniertes Gelée royale-, bzw. 1 M Saccharose-Lösung pro Tag gefüttert und mit einer CS-US (Nelkenduft- 1 M Saccharose) Paarung konditioniert. Die Anzahl der Tiere ist in Klammern in der Legende hinter der jeweiligen Gruppenbezeichnung vermerkt. Mit einem Stern gekennzeichnet sind Werte, die sich signifikant von der Kontrolle unterscheiden (Chi-Quadrat-Test, $p < 0,05$).

Wie man in Abb. 4.11 deutlich erkennen kann, lässt sich die Verbesserung des 24 h Gedächtnisses nach mehrmaliger Fütterung mit GR bestätigen. Werden Protein- und Peptidwirkung durch Trypsinierung inhibiert, lässt sich zwar eine Verbesserung des Gedächtnisses gegenüber der Kontrolle feststellen, diese Änderung ist jedoch nicht signifikant.

4.2.2 Effekte nach Chloroformextraktion des Gelée royale

4.2.2.1 Die Lipid-Fraktion des GR verringert die HDAC-Aktivität

Ausgehend von der inhibierenden Wirkung des Gelée royale auf die HDAC-Aktivität des Bienehirns wird in den nächsten Experimenten überprüft, ob es nach Zugabe von GR und seinen Fraktionen zu einer Verminderung der HDAC-Aktivität *in vitro* kommt. Dazu wurden die Gehirne der Versuchstiere herauspräpariert und in Assaypuffer homogenisiert. Anschließend wurden 2 μ l der 1:100 verdünnten Fraktionen (genaue Zusammensetzung siehe Material und Methoden) zugegeben und die relative Deacetylaseaktivität bestimmt.

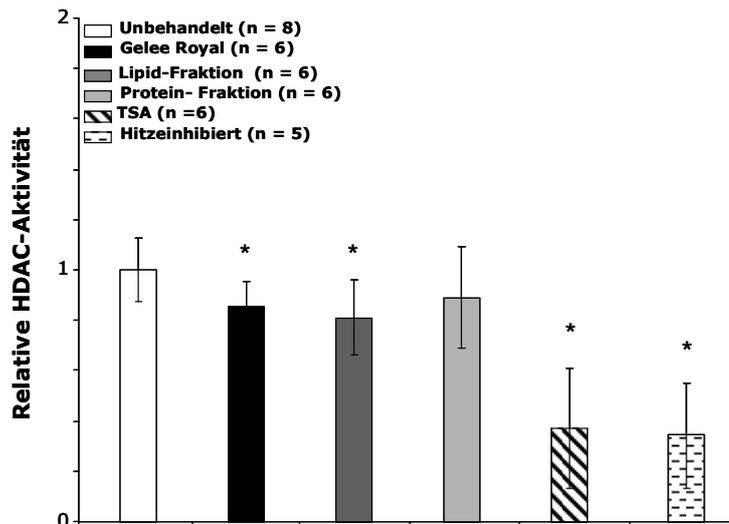


Abb. 4.12: GR und seine Lipid-Fraktion mindern die Deacetylaseaktivität *in vitro*

Dargestellt ist die relative Histondeacetylaseaktivität eines Bienenhirnhomogenates nach Zugabe von 2 µl der 1:100 verdünnten Fraktionen. Dazu wurden die Gehirne herauspräpariert, in Assaypuffer homogenisiert und die relative Deacetylaseaktivität im Vergleich zur unbehandelten Homogenatkontrolle mittels *in vitro* HDAC-Assays bestimmt. Als Kontrolle zur Funktionalität des Assays dienten hitzeinhibiertes und TSA (1 µM) behandeltes Homogenat. Werte, die sich signifikant von der unbehandelten Kontrolle (t-Test, $p < 0,05$) unterscheiden, sind mit * gekennzeichnet.

Wie der Abb. 4.12 zu entnehmen ist, hat die Protein-Fraktion keinen Einfluss auf die HDAC-Aktivität, GR und seine Lipid-Fraktion zeigen eine signifikant reduzierte HDAC-Aktivität *in vitro*. Um herauszufinden, ob es auch nach Verfütterung der Fraktionen zu einer Veränderung der HDAC-Aktivität kommt, werden die Versuchstiere einmalig mit den jeweiligen Fraktionen gefüttert und die relative Deacetylaseaktivität des Bienenhirns zwei Stunden nach der Fütterung bestimmt.

Nach Fütterung der verschiedenen Fraktionen kann man nur eine Reduktion der HDAC-Aktivität in der Lipidgruppe sehen, dieser Unterschied ist jedoch nicht signifikant, was daran liegen kann, dass die Anzahl der Tiere zu gering ist, oder dass es erst zu einem späteren Zeitpunkt (GR 24 h, siehe Kapitel 4.1.2) nach Verfütterung der Fraktionen zu einer signifikanten Reduktion der HDAC-Aktivität kommt. Die Ergebnisse deuten daraufhin, dass nicht nur GR, sondern auch seine Lipidfraktion deacetylierende Enzyme *in vitro* direkt beeinflussen.

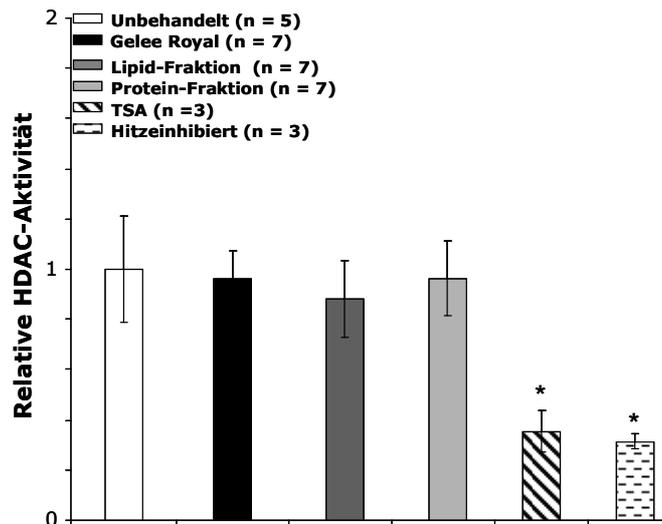


Abb. 4.13: Histondeacetylaseaktivität im Bienengehirnhomogenat nach Fütterung mit GR und seinen Fraktionen

Dargestellt ist die relative Histondeacetylaseaktivität eines Bienengehirnhomogenates nach einmaliger Fütterung von drei Tropfen GR und seinen Fraktionen (genaue Zusammensetzung siehe Material und Methoden). Dazu wurden die Gehirne herauspräpariert, in Assaypuffer homogenisiert und die relative Deacetylaseaktivität im Vergleich zur unbehandelten Homogenatkontrolle mittels *in vitro* HDAC-Assays bestimmt. Als Kontrolle zur Funktionalität des Assays dienten hitzeinhibiertes und TSA (1 μ M) behandeltes Homogenat. Werte, die sich signifikant von der unbehandelten Kontrolle (t-Test, $p \leq 0,05$) unterscheiden, sind mit * gekennzeichnet.

4.2.2.2 Einfluss von Lipid- und Protein-Fraktion des GR auf Histonmodifikationen

Da die Verfütterung von GR und seiner Lipid-Fraktion die Deacetylaseaktivität *in vitro* inhibiert und in früheren Experimenten schon ein Einfluss von GR auf die Histonacetylierung und -methylierung gezeigt werden konnte (Kap.4.1.3.1), werden jetzt die gleichen Histonmodifikationen (AC-18, Met-27.3, Met-4.1) nach Fütterung der GR-Fraktionen untersucht. Dazu wurden Bienen einmalig mit den jeweiligen Fraktionen gefüttert und die relative Histonacetylierung, bzw. Histonmethylierung mittels ELISA bestimmt. Wie man anhand Abb. 4.14 erkennen kann, führt die Fütterung von GR wie erwartet nach 24 h zu einer signifikanten Erhöhung und nach 48 h zu einer signifikanten Erniedrigung der Histonacetylierung (AC-18/ H3). Die beiden GR Fraktionen sind nach 24 h gegenüber der Kontrolle erhöht, es handelt sich jedoch nicht um eine signifikante Änderung. Nach 48 h zeigt die mit der Lipid-Fraktion gefütterte Gruppe eine signifikant niedrigere Acetylierung als die Kontrolle. Die Histonacetylierung der mit der Protein-Fraktion gefütterte Gruppe bleibt erhöht (nicht signifikant).

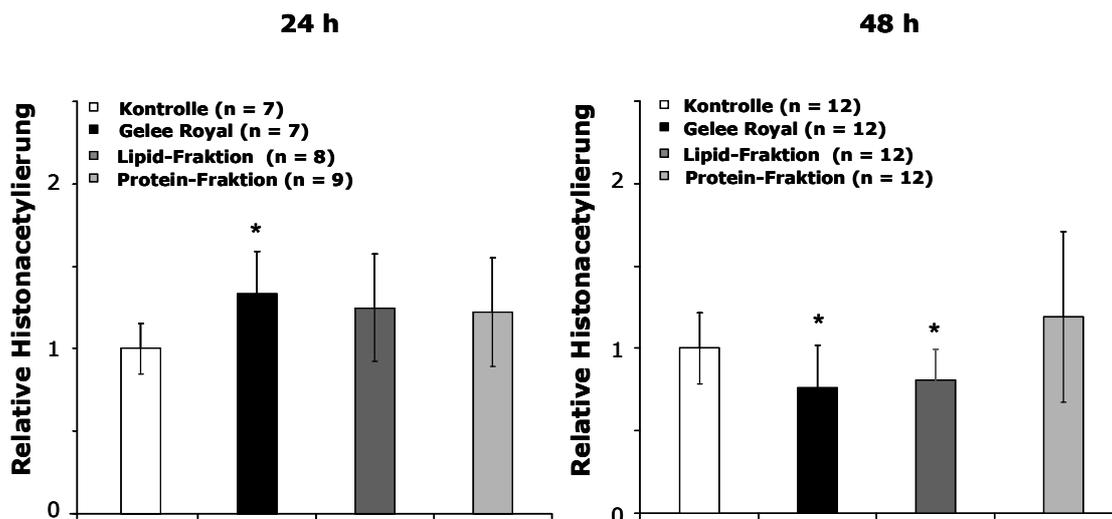


Abb. 4.14: Einfluss der Gelée royale Fraktionen auf die Histoneacetylierung

Dargestellt ist die relative Histoneacetylierung (Ac-18/ H3), nach einmaliger Fütterung von drei Tropfen GR-, Lipid-, Protein-, bzw. 1 M Saccharose-Lösung. Die Gehirne wurden nach 24 h und 48 h präpariert und die relative Histoneacetylierung mittels ELISA bestimmt. Alle Werte wurden auf den Mittelwert der jeweiligen Kontrolle normiert. Die Anzahl der Tiere ist in Klammern in der Legende hinter der jeweiligen Gruppenbezeichnung vermerkt. Werte, die sich signifikant voneinander (t-Test, $p \leq 0,05$) unterscheiden, sind mit * gekennzeichnet.

Die Fütterung von GR führt nach 24 h zu einer signifikant erhöhten relativen Methylierung (Met-27.3/ H3), die nach 48 h, ebenso wie die relative Methylierung (Met-4.1/ H3) signifikant erniedrigt ist. Signifikante Effekte der Lipid-Fraktion lassen sich erst 48 h nach der Fütterung zeigen. Hier ist die relative Methylierung (Met-4.1/ H3) ebenfalls niedriger als in der Kontrolle. Eine Fütterung mit der Protein-Fraktion zeigt weder nach 24 h, noch nach 48 h signifikante Unterschiede zur Kontrolle (Siehe Tab. 4.6). Diese Ergebnisse lassen vermuten, dass sich ein Teil der GR Wirkung auf Histoneacetylierung und Histone-methylierung auf Inhaltsstoffe der Lipidfraktion zurückführen lässt. Die Proteinfraktion scheint entweder keine Wirkung auf die Histone-modifikationen zu haben, oder sie enthält z.B. antagonistisch wirkende Komponenten.

Tab. 4.6: Einfluss einmaliger Fütterung von GR und seiner Fraktionen auf die Histone-methylierung

Dargestellt sind die relativen Histone-methylierungen (Met-4.1/ H3, Met-27.3/ H3) nach einmaliger Fütterung von drei Tropfen GR-, Lipid-, Protein-, bzw. 1 M Saccharose-Lösung. Alle weiteren Fütterungen wurden mit 1 M Saccharose vorgenommen. Die Gehirne wurden nach 24 h und 48 h präpariert und die relativen Proteinhinhalte mittels ELISA bestimmt. Die auf die Kontrolle normierten Mittelwerte, sowie die Standardabweichungen und die Anzahl der Tiere (in Klammern) sind in der Tabelle angegeben. Werte, die sich signifikant von der jeweiligen Kontrolle (t-Test, $p < 0,05$) unterscheiden, sind mit * gekennzeichnet.

		24 h	48 h
Met-27.3/ H3	Kontrolle	1,00 ± 0,15 (6)	1,00 ± 0,24 (12)
	GR	1,30 ± 0,33 (7)*	0,75 ± 0,19 (13)*
	Lipid	1,36 ± 0,39 (8)	0,83 ± 0,19 (13)
	Protein	1,35 ± 0,23 (9)	1,04 ± 0,38 (12)
Met-4.1/ H3	Kontrolle	1,00 ± 0,65 (7)	1,00 ± 0,25 (13)
	GR	1,42 ± 0,80 (7)	0,63 ± 0,29 (12)*
	Lipid	1,27 ± 0,40 (8)	0,75 ± 0,30 (12)*
	Protein	1,04 ± 0,41 (9)	1,16 ± 0,54 (12)

4.2.2.3 Einfluss der GR-Fraktionen auf Lernen und Gedächtnis der Honigbiene

Bisher konnte gezeigt werden, dass die Fütterung von GR und speziell der Lipid-Fraktion von GR, Veränderungen der Histonmodifikationen des Bienenhirns bewirkt. Veränderte Histonacetylierung und/oder Histonmethylierung können sich auf Lernen und Gedächtnisbildung auswirken. Daher wird nachfolgend getestet, ob die Fütterung mit GR-Fraktionen, ebenso wie die Fütterung mit GR selbst, Einfluss auf das Lernen und die Gedächtnisbildung der Honigbiene hat. Vor der eigentlichen Konditionierung muss mit einem Test auf Zuckerwasserempfindlichkeit untersucht werden, ob der eingesetzte Zuckerreiz in der appetitiven olfaktorischen Konditionierung nach Fütterung mit den Fraktionen unterschiedlich wahrgenommen wird

Dazu wurden die Tiere 2 h vor dem Test mit drei Tropfen der jeweiligen Fraktionen gefüttert und durch Berührung einer Antenne mit verschiedenen konzentrierten Saccharose-Lösungen in aufsteigender Reihenfolge die Zuckerwasserempfindlichkeit bestimmt. Man kann in Abb. 4.15 deutlich erkennen, dass die Zuckerwasserempfindlichkeit bei 30 mM in der Lipidgruppe signifikant erhöht zur Kontrolle ist. Die anderen Gruppen unterscheiden sich nicht von der Kontrolle. Dies bedeutet, dass eine Fütterung mit der Lipid-Fraktion die Wahrnehmung des Zuckerreizes bei einer niedrig konzentrierten Saccharoselösung verändert. Da sich die Zuckerwasserempfindlichkeit der verschiedenen Gruppen bei der Trainingskonzentration von 1 M Saccharose aber nicht unterscheidet, kann dennoch eine appetitive olfaktorische Konditionierung durchgeführt werden.

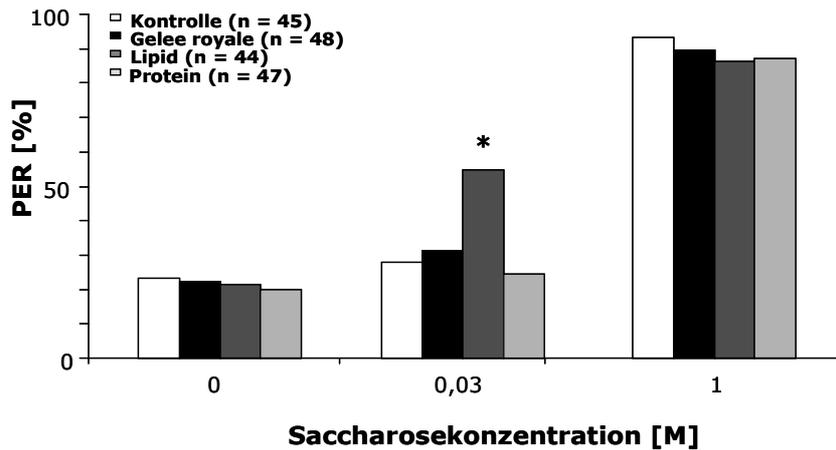


Abb. 4.15: Die Lipid-Fraktion erhöht die Zuckerwasserempfindlichkeit bei niedriger Saccharosekonzentration

Dargestellt ist die Anzahl der Tiere in Prozent, die nach Berührung einer Antenne mit einem Tropfen 0 M, 0,03 M und 1 M Saccharose-Lösung in aufsteigender Konzentration mit dem PER reagiert haben. Die Tiere wurden 2 h vor dem Test mit drei Tropfen GR-, Lipid, Protein-, bzw. 1 M Saccharose-Lösung gefüttert. Werte, die sich signifikant von der jeweiligen Kontrolle (Chi-Quadrat-Test, $p < 0,05$) unterscheiden, sind mit * gekennzeichnet

Für die olfaktorische Konditionierung wurden die Tiere 2 h vor dem Training mit drei Tropfen Gelée royale-, Lipid-, Protein- oder 1 M Saccharose-Lösung gefüttert und durch eine CS-US (Nelkenduft- 1 M Saccharose) Paarung konditioniert. Alle weiteren Fütterungen wurden nur mit 1 M Saccharose vorgenommen. Beim Abruf nach 2 h und 24 h wurde nur der CS präsentiert..

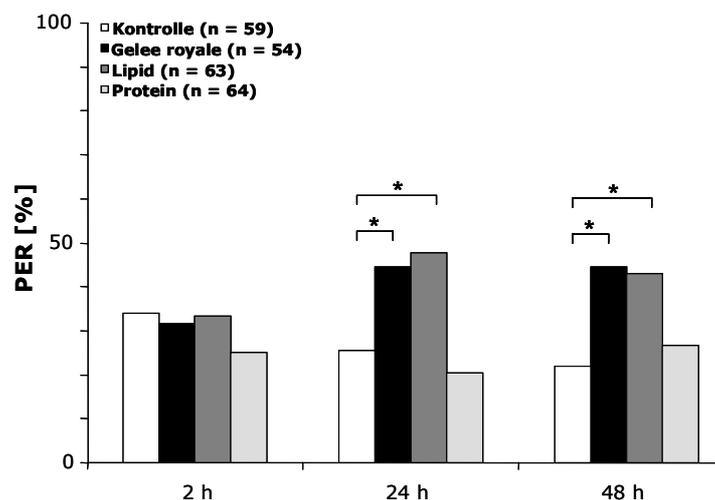


Abb. 4.16: Einfluss der Gelée royale Fraktionen auf Lernen und Gedächtnis der Honigbiene nach schwachem Training

Dargestellt ist die Anzahl der Tiere in Prozent, die auf den CS (Nelkenduft) mit dem PER reagiert haben. Die Tiere wurden 2 h vor dem Training mit drei Tropfen Gelée royale-, Lipid-, Protein- oder 1 M Saccharose-Lösung gefüttert und durch eine CS-US (Nelkenduft- 1 M Saccharose) Paarung konditioniert. Alle weiteren Fütterungen wurden mit 1 M Saccharose vorgenommen. Die Anzahl der Tiere ist in Klammern in der Legende hinter der jeweiligen Gruppenbezeichnung vermerkt. Mit einem Stern gekennzeichnet sind Werte, die sich signifikant voneinander unterscheiden (Chi-Quadrat-Test, $p < 0,05$).

Wie man der Abb. 4.16 entnehmen kann, führt sowohl die Verfütterung von GR, als auch seiner Lipid-Fraktion zu einer signifikanten Verbesserung des 24 h und des 48 h Gedächtnisses der Versuchstiere. Die Protein-Fraktion scheint keinen Einfluss auf die Gedächtnisbildung der Versuchstiere zu haben.

Man kann aus den bisherigen Versuchen schließen, dass die in GR vermuteten Substanzen, die sich auf Histonmodifikationen und das Gedächtnis der Honigbiene auswirken, in der Lipid-Fraktion, vermutlich aber auch in der Protein-Fraktion zu finden sind. Weitergehende Fraktionierungen des GR in verschiedenen Lösemitteln wurden mir von der Arbeitsgruppe Rolf Müller (Biopharmazie, Uni Saarbrücken) zur Verfügung gestellt und teilweise in Verhaltensversuchen und HDAC-Assay getestet. Der Arbeitsaufwand war jedoch sehr hoch und stand in keinem Verhältnis zum Nutzen der Ergebnisse, da auch diese Fraktionen bis zu den Einzelsubstanzen weiter fraktioniert werden müssten. Weitergehende Fraktionierungsversuche sind daher nicht sinnvoll. Aus diesem Grund werden im Folgenden je eine Einzelsubstanz aus der Lipid- und Protein-Fraktion getestet.

4.3. Die Wirkung von Einzelsubstanzen aus dem Gelée royale auf Histondeacetylasen, Histonmodifikationen, sowie assoziative und nicht-assoziative Lernparadigmen

Die Ergebnisse der Gelée royale Fraktionierung haben deutlich gemacht, dass sowohl in der Lipid- als vermutlich auch in der Proteinfraction Inhaltsstoffe enthalten sein müssen, die sich sehr unterschiedlich auf Histonmodifikationen, Reizprozessierung und appetitive olfaktorische Konditionierung der Biene auswirken. Daher habe ich je eine Einzelsubstanz aus den beiden Fraktionen zur näheren Charakterisierung ausgewählt. Aus der Proteinfraction ist dies Nikotinamid, da sowohl seine inhibitorische Wirkung auf eine Klasse von Deacetylasen, als auch seine Beteiligung an Lern- und Gedächtnisprozessen bekannt ist, es aber bisher nur in wenigen Versuchen an Vertebraten untersucht wurde. Als Wirkstoff aus dem Lipidanteil habe ich mich für die *Royal Jelly Acid* (10-Hydroxy-2-decensäure, 10-HDA) entschieden, da diese Fettsäure den größten Part des Lipidanteils ausmacht und wie ihr Name schon sagt, natürlicherweise nur im GR vorkommt und allein deshalb schon einen aussichtsreichen Kandidaten darstellt. Die 10-HDA fördert neuronales Wachstum (Hattori et al., 2007) und könnte, ebenso wie andere Fettsäuren, an Lern- und Gedächtnisprozessen beteiligt sein (Heinrichs, 2010; Pinilla, 2006; Yurko-Mauro, 2010). Da die 10-HDA auch eine anticancerogene Wirkung *in vivo* hat (Townsend, 1960) und in der Krebsentstehung oftmals veränderte Histonmodifikationen eine Rolle spielen, könnte sie auch auf Histonacetylierungs- und Histonmethylierungsprozesse einwirken.

4.3.1 Nikotinamid (NAM)

In vorangegangenen Experimenten konnte gezeigt werden, dass die Fütterung von Gelée royale zu einer verminderten Deacetylaseaktivität im Bienenhirnhomogenat, zu Chromatinmodifikationen im Bienenhirn und einem verbesserten Gedächtnis der Honigbiene führt, ohne die Wahrnehmung und Prozessierung von Duft- und Zuckerreizen zu beeinflussen. Um zu überprüfen, ob das in relativ hohen Mengen in Gelée royale enthaltene NAM (45-180 µg/ g Niacin, ein Gemisch aus NAM und Nikotinsäure) für einen Teil der genannten GR induzierten Effekte verantwortlich ist, wird im Folgenden untersucht, ob eine Fütterung mit NAM die gleiche Wirkung wie eine Fütterung mit GR zeigt. Für die Experimente werden daher sowohl die gleiche Konzentration an NAM (aus dem NAM-Gehalt in Gelée royale rechnerisch ermittelt), als auch die gleichen Zeitpunkte wie in den Gelée royale Experimenten gewählt.

4.3.1.1 NAM vermindert die HDAC-Aktivität *in vitro*

Da NAM ein bereits bekannter Hemmstoff einer Klasse von Histondeacetylasen, den so genannten Sirtuinen (HDAC-Klasse III) ist, aber in der Biene dahingehend noch nicht untersucht wurde, wird im Folgenden zunächst die Wirkung von NAM auf die Histondeacetylaseaktivität des Bienenhirns mittels HDAC-Assay *in vitro* gezeigt. Dazu wurden die Bienenhirne herauspräpariert und mit NAM in verschiedenen Konzentrationen (0,4 mM, 0,04 mM und 0,004 mM) versetzt. Dabei ist die höchste Konzentration von 0,4 mM etwas höher als die für Zellkulturexperimente empfohlene Konzentration an NAM 0,05-0,15 mM (Schemies et al., 2009). Die Konzentration von 0,04 mM NAM entspricht dem Mittel der rechnerisch ermittelten Menge an NAM im GR, welches in den vorangegangenen Experimenten verfüttert wurde. Zusätzlich wurde noch eine deutlich niedrigere Konzentration von 0,004 mM NAM gewählt, die ausgehend von bisher veröffentlichten Zellkulturexperimenten keine hemmende Wirkung haben sollte und daher als Kontrolle für eine spezifische dosisabhängige Wirkung von NAM dienen kann. Anschließend wurde die relative Deacetylaseaktivität des Bienenhirnhomogenates bestimmt. Wie man der Abb. 4.17 entnehmen kann, führt die Zugabe von 0,4 mM und 0,04 mM NAM wie erwartet zu einer signifikanten Abnahme der Histondeacetylaseaktivität *in vitro*, bei einer Konzentration von 0,004 mM NAM lässt sich kein Unterschied zur unbehandelten Homogenatkontrolle feststellen.

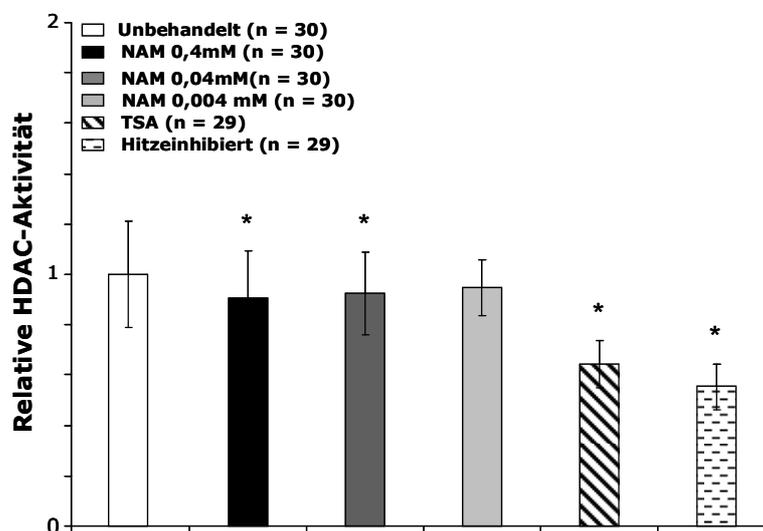


Abb. 4.17: Nikotinamid vermindert die HDAC-Aktivität *in vitro*

Dargestellt ist die relative Histondeacetylaseaktivität eines Gehirnhomogenates nach Zugabe von NAM in verschiedenen Konzentrationen. Dazu wurden die Gehirne herauspräpariert, in Assaypuffer homogenisiert und die relative Deacetylaseaktivität im Vergleich zur unbehandelten Homogenatkontrolle mittels *in vitro* HDAC-Assays bestimmt. Als Kontrolle zur Funktionalität des Assays dienten hitzeinhibiertes und TSA (1 μ M) behandeltes Homogenat. Werte, die sich signifikant von der unbehandelten Homogenatkontrolle (t-Test, $p \leq 0,05$) unterscheiden, sind mit * gekennzeichnet.

Da sich eine hemmende Wirkung von NAM auf die HDAC-Aktivität des Bienenhirns *in vitro* zeigen lässt, stellt sich die Frage, ob sich auch nach Verfütterung von NAM ein Einfluss auf die HDAC-Aktivität zeigt und ob dieser der Wirkung einer GR Verfütterung entspricht (niedrigere HDAC-Aktivität nach 24 h in der GR gefütterten Gruppe). Daher wurden hier die gleichen Zeitpunkte (2 h, 24 h und 48 h) und die gleiche, errechnete Menge an NAM gewählt, die man auch bei den Gelée royale Versuchen verwendet hat, was einer Aufnahme von ca. 1,2 µg NAM/ Biene entspricht. Wie aus Tab. 4.7 ersichtlich wird, führt die einmalige Verfütterung von NAM zu keinem Versuchszeitpunkt zu einer Hemmung der Deacetylaseaktivität des Bienehirns. Dies deutet daraufhin, dass Nikotinamid eine direkte Wirkung auf deacetylierende Enzyme *in vitro* hat. Nach Fütterung konnte eine solche enzymhemmende Wirkung zu den untersuchten Zeitpunkten jedoch nicht gezeigt werden.

Tab. 4.7: Histondeacetylaseaktivität des Bienenhirnhomogenates nach Fütterung von NAM

Dargestellt ist die relative Histondeacetylaseaktivität eines Gehirnhomogenates nach Fütterung der Versuchstiere mit zwei Tropfen der folgenden Lösungen: Kontrolle: 1 M Saccharose, NAM: 60 µg NAM/ ml 1 M Saccharose, entspricht ca. 1,2 µg NAM/ Biene. Die Gehirne wurden nach 2 h, 24 h und 48 h präpariert und die Deacetylaseaktivität mittels *in vitro* HDAC-Assays bestimmt. In der Tabelle sind die auf die unbehandelte Kontrolle normierten Mittelwerte, die Standardabweichungen, sowie die Anzahl der Tiere (in Klammern) angegeben. Als Kontrolle zur Funktionalität des Assays dienten hitzeinhibiertes und TSA (1 µM) behandeltes Homogenat. Mit einem Stern gekennzeichnet sind Werte, die sich signifikant von ihrer jeweiligen unbehandelten Kontrolle unterscheiden (t-Test, $p < 0,05$).

		2 h	24 h	48 h
Unbehandelt	Kontrolle	1,00 ± 0,13 (16)	1,00 ± 0,12 (12)	1,00 ± 0,22 (8)
	NAM	1,02 ± 0,11 (17)	1,02 ± 0,17 (12)	1,15 ± 0,18 (8)
TSA	Kontrolle	0,68 ± 0,13 (16)*	0,73 ± 0,14 (12)*	0,54 ± 0,02 (8)*
	NAM	0,69 ± 0,15 (17)*	0,70 ± 0,14 (12)*	0,60 ± 0,10 (8)*
Hitzeinhibiert	Kontrolle	0,64 ± 0,18 (17)*	0,69 ± 0,19 (12)*	0,49 ± 0,01 (8)*
	NAM	0,65 ± 0,15 (17)*	0,65 ± 0,12 (12)*	0,50 ± 0,01 (8)*

4.3.1.2 Einmalige Fütterung von NAM erhöht die Histonacetylierung und Histonmethylierung

In den vorangegangenen Experimenten ließ sich eine hemmende Wirkung von NAM auf die HDAC-Aktivität *in vitro* zeigen. Daher wird in den nächsten Versuchen überprüft, ob die Behandlung mit NAM auch zu einer Änderung der Histonacetylierung führt. Dazu wurden die Bienen einmalig mit NAM gefüttert. Wie in Abb. 4.18 zu erkennen, führt die Fütterung von NAM nach 2 h zu einer signifikant erhöhten Histonacetylierung in der NAM behandelten Gruppe. Weder 24 h, noch 48 h nach Fütterung von NAM lässt sich ein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Gruppen feststellen. Da sich Histonmodifikationen gegenseitig beeinflussen können und sich in den Gelée royale Experimenten nicht nur eine Wirkung auf die Histonacetylierung, sondern auch ein Einfluss auf die Histon-

methylierung zeigen ließ, stellt sich jetzt die Frage, ob auch eine Fütterung von NAM zu Unterschieden in der Histonmethylierung führt. Um die Ergebnisse mit den Gelée royale Experimenten vergleichen zu können, wurden wiederum die gleichen Zeitpunkte und die gleiche (aus dem NAM-Gehalt in Gelée royale errechnete) Konzentration an NAM verwendet.

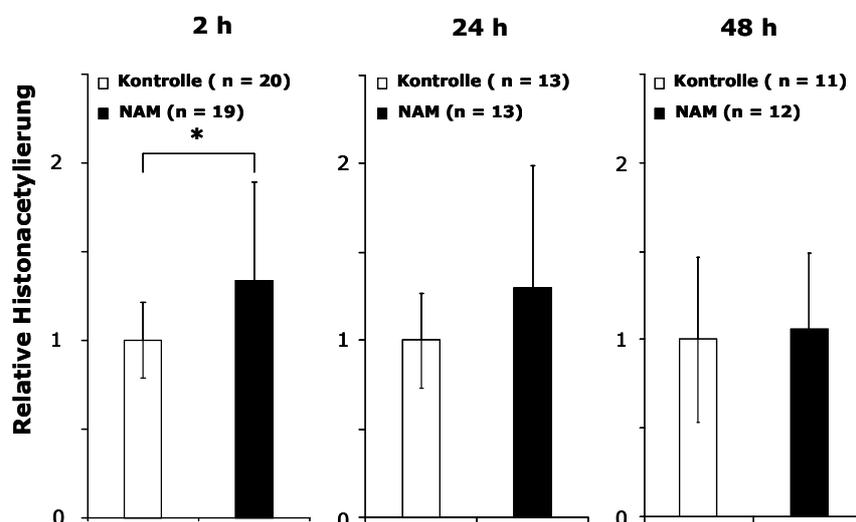


Abb. 4.18: Einfluss von NAM auf die Histonacetylierung

Dargestellt ist die relative Histonacetylierung AC-18/ H3 nach Fütterung von zwei Tropfen der folgenden Lösungen: Kontrolle: 1 M Saccharose, NAM: 60 µg NAM/ ml 1 M Saccharose, entspricht ca. 1,2 µg NAM/ Biene. Alle weiteren Fütterungen in beiden Gruppen wurden mit 1 M Saccharose durchgeführt. Die Gehirne wurden nach 2 h, 24 h und 48 h präpariert und die relative Histonacetylierung AC-18/ H3 mittels ELISA bestimmt. Alle Werte wurden auf die jeweilige Kontrolle normiert. Die Anzahl der Tiere ist in Klammern in der Legende hinter der jeweiligen Gruppenbezeichnung vermerkt. Werte, die sich signifikant von der Kontrolle (t-Test, $p \leq 0,05$) unterscheiden, sind mit * gekennzeichnet.

Tab.4.8: Einfluss von NAM auf die Histonmethylierung

Dargestellt sind die relativen Histonmethylierungen (Met-4.1/ H3, Met-27.3/H3) nach Fütterung von 2 Tropfen NAM-, bzw. 1 M Saccharose-Lösung, entsprechend ca. 1,2 µg NAM/ Biene Die Gehirne wurden nach 2 h, 24 h und 48 h präpariert und die relativen Histonmethylierungen (Met-4.1/ H3, Met-27.3/H3) mittels ELISA bestimmt. Die auf die Kontrolle normierten Mittelwerte, sowie die Standardabweichungen und die Anzahl der Tiere (in Klammern) sind in der Tabelle angegeben. Werte, die sich signifikant von der jeweiligen Kontrolle (t-Test, $p \leq 0,05$) unterscheiden, sind mit * gekennzeichnet.

		2 h	24 h	48 h
Met-27.3/ H3	Kontrolle	1,00 ± 0,36 (22)	1,00 ± 0,25 (13)	1,00 ± 0,23 (11)
	NAM	1,31 ± 0,60 (20)	1,44 ± 0,71 (13) *	0,87 ± 0,29 (12)
Met-4.1/ H3	Kontrolle	1,00 ± 0,23 (22)	1,00 ± 0,25 (10)	1,00 ± 0,39 (11)
	NAM	1,47 ± 0,68 (20) *	1,34 ± 0,36 (10) *	1,05 ± 0,41 (12)

Zwei Stunden nach Fütterung von NAM ist eine signifikant höhere Methylierung (Met-4.1/ H3) in der NAM-Gruppe festzustellen, die sich auch nach 24 h, aber nicht mehr nach 48 h zeigen lässt (Tab. 4.8). Die Methylierung (Met-27.3/ H3) ist ebenfalls nach 24 h signifi-

kant erhöht. Nach 2 h und 48 h ist keine Wirkung von NAM auf die Histonmethylierung zu erkennen. Aus den Ergebnissen lässt sich demnach ableiten, dass Nikotinamid eine spezifische, transiente Wirkung auf Histonacetylierung und -methylierung ausübt.

4.3.1.3 Einfluss von NAM auf Lernen und Gedächtnis der Honigbiene

Die vorangegangenen Experimente haben gezeigt, dass NAM zu einer Änderung der Histonacetylierung und Histonmethylierung im Gehirn der Honigbiene führt. Derartige Chromatinmodifikationen können eine Auswirkung auf die Expression von Genen haben, die mit dem Lernen und der Gedächtnisbildung in Verbindung stehen. Zudem konnte in Vertebraten bereits eine Wirkung von NAM in verschiedenen Gehirnarealen, sowie auf das Lernen und das Gedächtnis gezeigt werden (siehe Einleitung). Daher wird in den folgenden Experimenten die Wirkung einer Fütterung von NAM auf die nicht-assoziativen Lernparadigmen und die appetitive olfaktorische Konditionierung der Honigbiene untersucht.

4.3.1.3.1 NAM hat keinen Einfluss auf die Zuckerwasserempfindlichkeit der Honigbiene

In diesem Experiment wird die Wirkung von NAM auf die Zuckerwasserempfindlichkeit der Honigbiene untersucht. Dabei wird überprüft, ob die Versuchstiere nach einer einmaligen Fütterung von NAM unterschiedlich auf verschieden starke Zuckerreize (US) reagieren.

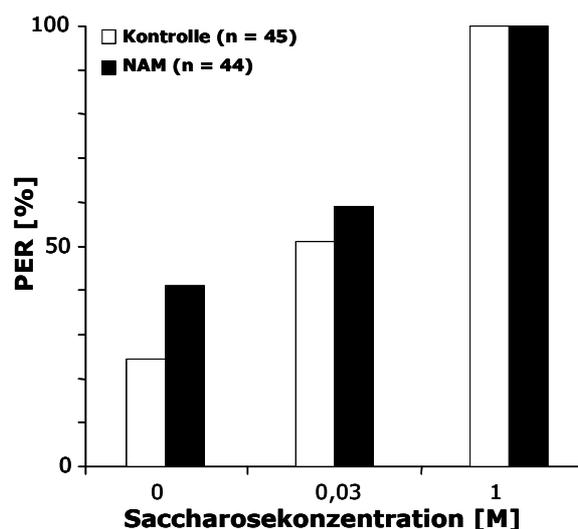


Abb. 4.19: Einfluss von NAM auf die Zuckerwasserempfindlichkeit der Honigbiene

Dargestellt ist die Anzahl der Tiere in Prozent, die nach Berührung einer Antenne mit einem Tropfen 0 M, 0,03 M und 1 M Saccharose-Lösung in aufsteigender Konzentration mit dem PER reagiert haben. Die Tiere wurden 2 h vor dem Test mit zwei Tropfen der folgenden Lösungen gefüttert: Kontrolle: 1 M Saccharose, NAM: 60 µg NAM/ ml 1 M Saccharose. entsprechend ca. 1,2 µg NAM/ Biene. Die Anzahl der Tiere ist in Klammern in der Legende hinter der jeweiligen Gruppenbezeichnung vermerkt.

Wie in Abb. 4.19 zu erkennen gibt es keine signifikanten Unterschiede zwischen der NAM- und der Kontrollgruppe. Dies lässt darauf schließen, dass die einmalige Fütterung von NAM nicht zu einer veränderten Wahrnehmung des Zuckerreizes führt.

4.3.1.3.2 Einfluss von NAM auf nicht-assoziatives Lernen (Habituation und Sensitisierung)

In den nächsten Experimenten wird die Wirkung von NAM auf die nicht assoziativen Lernparadigmen, die Sensitisierung und die Habituation untersucht. Dabei wurden die Bienen einmalig mit NAM gefüttert und nach zwei Stunden entweder sensitisiert oder habituiert und dishabituiert. Wie der Tab. 4.9 zu entnehmen ist, führt die Fütterung von NAM weder zu einer Änderung der Habituation, noch zu einer Änderung der Sensitisierung der Honigbiene. Diese Daten zeigen klar, dass es nach Fütterung von NAM nicht zu einer veränderten Prozessierung von Duft- und Zuckerreizen kommt und man die gefütterte Menge an NAM in der appetitiven olfaktorischen Konditionierung einsetzen kann.

Tab. 4.9: NAM hat keinen Einfluss auf Habituation und Sensitisierung der Honigbiene

Dargestellt sind die auf die Kontrolle normierten Mittelwerte der Stimulationen bis zur Habituation, bzw. die Anzahl der Tiere in Prozent, die sich sensitisieren ließen. Dafür wurden die Tiere 2 h vor dem Test mit zwei Tropfen der folgenden Lösungen gefüttert: Kontrolle: 1 M Saccharose, NAM: 60 µg NAM/ ml 1 M Saccharose, entsprechend ca. 1,2 µg NAM/ Biene. Anschließend erfolgte entweder eine Sensitisierung oder Habituation der Tiere. Die Anzahl der Tiere ist in Klammern in der Legende hinter der jeweiligen Gruppenbezeichnung vermerkt.

	Kontrolle	NAM
Habituation	1 ± 0,54 (25)	0,96 ± 0,49 (28)
Sensitisierung	10,5% PER (19)	15% PER (20)

4.3.1.3.3 NAM verbessert das Gedächtnis nach schwachem und starkem Training

Aus den vorangegangenen Experimenten geht hervor, dass NAM weder zu einer veränderten Wahrnehmung, noch zu einer veränderten Prozessierung von Duft (CS)- und Zuckerreiz (US) führt. In den nächsten Experimenten soll die Wirkung von NAM auf das Lernen und die Gedächtnisbildung der Honigbiene untersucht werden. In den vorangegangenen Gelée royale Lernexperimenten (siehe Kap. 4.1.4.3) konnte gezeigt werden, dass eine Lernverbesserung durch eine Fütterung von GR 30 min nach dem Training, also in der Konsolidierungsphase, erzielt werden kann. Um herauszufinden, ob das in GR enthaltene NAM für diese Lernverbesserung verantwortlich ist, wird NAM ebenfalls in der

Konsolidierungsphase gefüttert und die gleiche Menge an NAM genutzt, die (rechnerisch aus dem NAM-Gehalt in GR ermittelt) in den vorangegangenen GR-Experimenten eingesetzt wurde.

Zunächst wird die Wirkung von NAM in einem schwachen Training (eine CS-US-Paarung, Ein-Trial-Training) untersucht. Dazu wurden die Tiere 30 min nach einer CS-US-Paarung einmalig mit NAM gefüttert, was zu einem signifikant verbesserten 48 h Gedächtnis führt. Weder 2 h noch 24 h nach dem Training gibt es einen signifikanten Unterschied zwischen NAM gefütterter Gruppe und Kontrollgruppe.

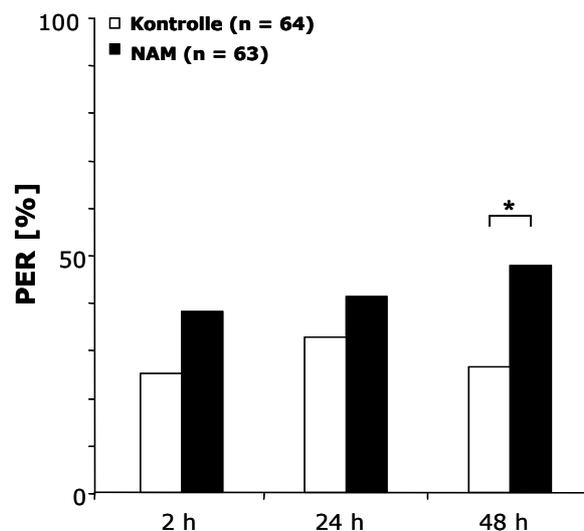


Abb. 4.20: NAM verbessert das 48 h Gedächtnis der Honigbiene nach einem schwachen Training

Dargestellt ist die Anzahl der Tiere in Prozent, die auf den CS (Nelkenduft) mit dem PER reagiert haben. Die Tiere wurden durch eine CS-US (Nelkenduft- 1 M Saccharose) Paarung konditioniert und 0,5 h nach dem Training mit zwei Tropfen der folgenden Lösungen gefüttert: Kontrolle: 1 M Saccharose, NAM: 60 µg NAM/ ml 1 M Saccharose. Entspricht ca. 1,2 µg NAM/ Biene. Alle nachfolgenden Fütterungen wurden nur mit 1 M Saccharose-Lösung in beiden Gruppen durchgeführt. Die Anzahl der Tiere ist in Klammern in der Legende hinter der jeweiligen Gruppenbezeichnung vermerkt. Mit einem Stern gekennzeichnet sind Werte, die sich signifikant voneinander unterscheiden (Chi-Quadrat-Test, $p < 0,05$).

Durch eine CS-US-Paarung (Ein-Trial-Training) kommt es normalerweise nur zur Ausbildung eines kurzfristigen, transkriptionsunabhängigen Gedächtnisses. Nach Fütterung von NAM lassen sich jedoch, ähnlich wie nach einer Gelée royale Fütterung, histonmodifizierende Effekte zeigen, die sich auf Transkriptionsereignisse auswirken könnten. Daher wird im Folgenden durch Injektion mit dem Transkriptionsblocker Actinomycin D überprüft, ob es sich hier, wie bei der Verbesserung des Gedächtnisses nach Fütterung von GR, um einen transkriptionsabhängigen Effekt handeln könnte. Dazu wurden die Versuchstiere eine Stunde vor dem Training mit Actinomycin D injiziert, in einem Ein-Trial-Training (schwaches Training) konditioniert und eine halbe Stunde nach dem Training einmalig mit NAM gefüttert. Wie man in Abb. 4.21 sieht, gibt es 2 h und 24 h nach dem

Training keine signifikanten Unterschiede zwischen den drei Gruppen. Nach 48 h hat die NAM gefütterte Gruppe wie erwartet ein signifikant verbessertes Gedächtnis, die Actinomycin D injizierte NAM- Gruppe weist weder ein solch verbessertes Gedächtnis auf, noch unterscheidet sie sich von der Kontroll-Gruppe.

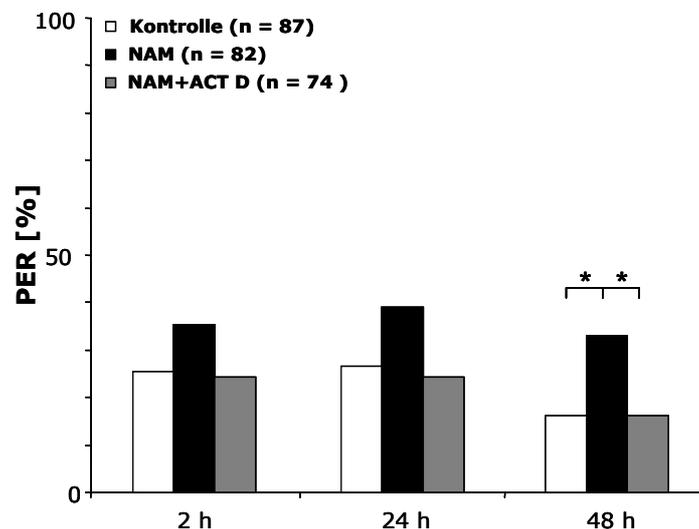


Abb. 4.21: Transkriptionsabhängigkeit des NAM Effektes nach einem schwachen Training

Dargestellt ist die Anzahl der Tiere in Prozent, die auf den CS (Nelkenduft) mit dem PER reagiert haben. Die Tiere wurden 1 h vor dem Training mit 1 μ l der jeweiligen Lösung injiziert (2 μ g/ μ l Actinomycin in DMSO, 100% DMSO als Kontrolle), durch eine CS-US (Nelkenduft- 1 M Saccharose) Paarung konditioniert und 0,5 h nach dem Training mit zwei Tropfen NAM- oder 1 M Saccharose-Lösung gefüttert. Entspricht ca. 1,2 μ g NAM/ Biene. Die Anzahl der Tiere ist in Klammern in der Legende hinter der jeweiligen Gruppenbezeichnung vermerkt. Mit einem Stern gekennzeichnet sind Werte, die sich signifikant voneinander unterscheiden (Chi-Quadrat-Test, $p < 0,05$).

Dies bedeutet, dass durch eine Fütterung mit NAM das Gedächtnis der Honigbiene 48 h nach einem schwachen Training transkriptionsabhängig verbessert wird. Aus früheren Versuchen mit Actinomycin weiß man jedoch, dass ein transkriptionsabhängiges Gedächtnis erst nach einem starken Training mit mehreren CS-US-Paarungen entsteht (Wüstenberg et al, 1998). Wenn sich die Fütterung von NAM auf das transkriptionsabhängige Gedächtnis auswirkt, so sollten sich diese Effekte auch nach einem Drei-Trial-Training zeigen. Aus diesem Grund wird in den folgenden Experimenten der Einfluss von NAM auf das Gedächtnis der Honigbiene nach einem starken Training untersucht. Dazu werden die Versuchstiere einem starken Training (Drei-Trial-Training) unterzogen und eine halbe Stunde nach dem Training mit NAM gefüttert (Siehe Schema Abb. 4.22). Wie erwartet führt die Fütterung von NAM auch nach einem Drei-Trial-Training zu einem signifikant verbesserten 48 h Gedächtnis. Dieser Effekt ist nach 24 h nicht zu beobachten, zeigt sich aber deutlich 2 h nach dem Training. Man muss jedoch anmerken, dass das 2 h Gedächtnis der Kontrolle sehr niedrig ist, was damit zusammenhängen könnte, dass die

Tiere durch die Zuckergabe während des Trainings und der darauf folgenden Fütterung sehr satt waren und ihre Reaktion auf den Duft dementsprechend sehr niedrig ausfiel.

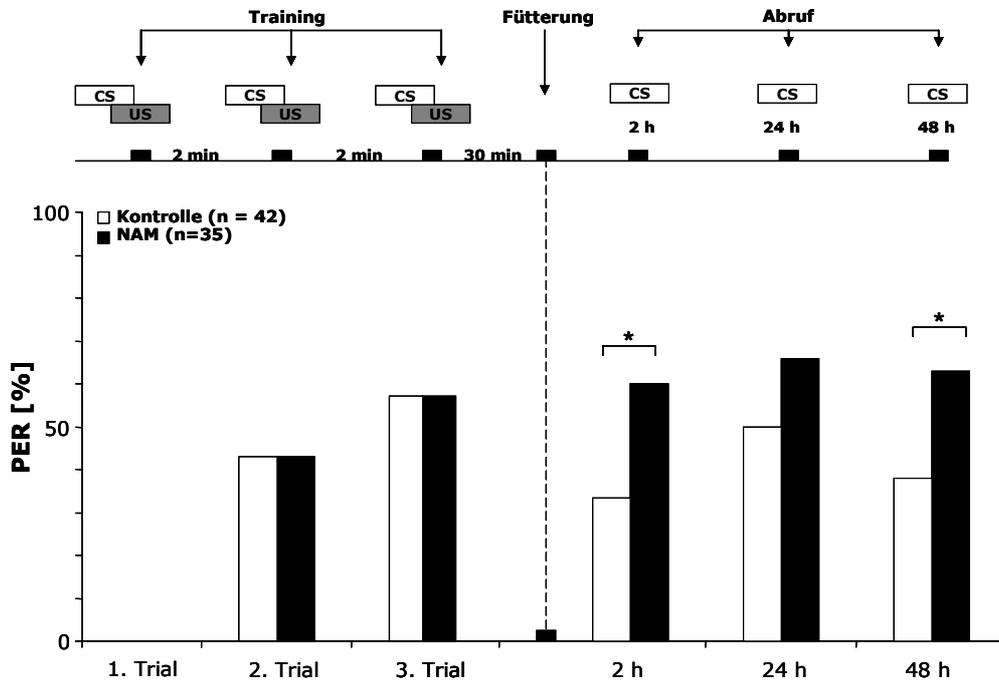


Abb. 4.22: NAM verbessert das Gedächtnis der Honigbiene nach starkem Training

Dargestellt ist die Anzahl der Tiere in Prozent, die auf den CS (Nelkenduft) mit dem PER reagiert haben. Die Tiere wurden durch drei CS-US (Nelkenduft- 1 M Saccharose) Paarungen- drei Trials konditioniert und 0,5 h nach dem Training mit zwei Tropfen der folgenden Lösungen gefüttert: Kontrolle: 1 M Saccharose, NAM: 60 µg NAM/ ml 1 M Saccharose. Dies entspricht ca. 1,2 µg NAM/ Biene. Die weiteren Fütterungen erfolgten nur mit 1 M Saccharose. Die Anzahl der Tiere ist in Klammern in der Legende hinter der jeweiligen Gruppenbezeichnung vermerkt. Mit einem Stern gekennzeichnet sind Werte, die sich signifikant voneinander unterscheiden (Chi-Quadrat-Test, $p < 0,05$).

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass eine Fütterung mit NAM die HDAC-Aktivität *in vitro* mindert und die Histonacetylierung und Histonmethylierung erhöht. Desweiteren verbessert es das Gedächtnis der Honigbiene ohne Einfluss auf die Reizwahrnehmung und Prozessierung zu nehmen.

4.3.2 10-Hydroxy-2-Decensäure (10-HDA, Royal Jelly Acid)

In den vorangegangenen Experimenten konnte gezeigt werden, dass eine Fütterung von Gelée royale und seinem Lipidanteil zu einer Verminderung der HDAC-Aktivität des Bienenhirns führt, die Histonacetylierung und -methylierung verändert und das Gedächtnis der Honigbiene verbessert. Der größte Anteil der Lipidfraktion wird von der 10-Hydroxy-2-Decensäure gebildet, die natürlicherweise nur im Gelée royale vorkommt. Um herauszufinden, ob die 10-HDA für die o.g. Wirkungen des Gelée royale und seiner Lipidfraktion verantwortlich ist, wird in den folgenden Experimenten die Wirkung von 10-HDA auf die HDAC-Aktivität, die Histonacetylierung und -methylierung und auf assoziative und nicht-assoziative Lernparadigmen der Honigbiene untersucht. Aus Kostengründen und um eine genauere Dosierung zu gewährleisten wird die 10-HDA in diesen Experimenten nicht verfüttert, sondern in den Thorax der Bienen injiziert. Da anhand der Lernexperimente (Kap.4.2.2.3) deutlich wurde, dass die Lipidfraktion des GR die Zuckerwasserempfindlichkeit der Bienen signifikant verändert, müssen im Vorfeld weiterer Lernversuche zunächst ein geeigneter Injektionszeitpunkt und eine geeignete Injektionskonzentration an 10-HDA ermittelt werden, mit welcher eventuelle physiologische Effekte auf das Lernen und/oder Gedächtnis gezeigt werden können, die aber weder die Perzeption, noch Verarbeitung von Duft- und Zuckerreiz (CS und US der Konditionierung) beeinflusst. Dazu werden die Tiere mit 10-HDA in drei unterschiedlichen Konzentrationen injiziert. Die höchste Konzentration von 20 µg 10-HDA/ Biene entspricht dabei der durchschnittlich verfütterten Menge an 10-HDA im Gelée royale (errechnet). Da davon ausgegangen werden kann, dass man bei Injektion eines Stoffes nicht mehr, sondern eher weniger braucht, als bei Verfütterung desselben, wurden keine höheren Konzentrationen, sondern noch zwei niedrigere Konzentrationen (2 µg 10-HDA/ Biene und 0,2 µg 10-HDA/ Biene) eingesetzt. In den vorangegangenen Experimenten wurde ein Zeitraum von 2 h von der Fütterung der jeweiligen Substanzen, bis zur Durchführung der einzelnen Lernparadigmen gewählt. Da eine Injektion von 10-HDA direkt in die Hämolymphe des Versuchstieres zu einer schnelleren Verteilung des Wirkstoffs führen sollte, wird dieser Zeitraum von 2 h auf 1 h verkürzt.

4.3.2.1 Einfluss von 10-HDA auf Zuckerwasserempfindlichkeit, nicht-assoziative und assoziative Lernparadigmen

4.3.2.1.1 Hohe Konzentrationen an 10-HDA erhöhen die Zuckerwasserempfindlichkeit

Da eine Fütterung mit dem Lipidanteil des GR nicht nur zu einem verbesserten Gedächtnis, sondern auch zu einer erhöhten Zuckerwasserempfindlichkeit der Biene führt (Kapitel 4.2.2.3) und sich ein Test auf die Zuckerwasserempfindlichkeit im Vergleich zum assoziativen Lernparadigma schnell durchführen lässt, wurde damit überprüft, ob und wie sich

unterschiedliche Konzentrationen an 10-HDA auf die Wahrnehmung des Zuckerreizes auswirken. Dabei stellte sich heraus, dass die Injektion von höheren Mengen, 20 µg 10-HDA/ Biene und 2 µg 10-HDA/ Biene, eine signifikant erhöhte Zuckerwasserempfindlichkeit bei 0,03 M Saccharose bewirken (Abb. 4.23). Injiziert man die Bienen mit einer niedriger konzentrierten 10-HDA-Lösung von 0,2 µg/ Biene, so ist die Zuckerwasserempfindlichkeit der 10-HDA behandelten und der Kontrollgruppe gleich. Dies bedeutet, dass hohe Konzentrationen an 10-HDA Unterschiede in der Perzeption von Zuckerreizen verursachen, eine niedrige Konzentration von 10-HDA hat diese Wirkung nicht, daher wird die Menge von 0,2 µg 10-HDA/ Biene für die folgenden Lernparadigmen beibehalten.

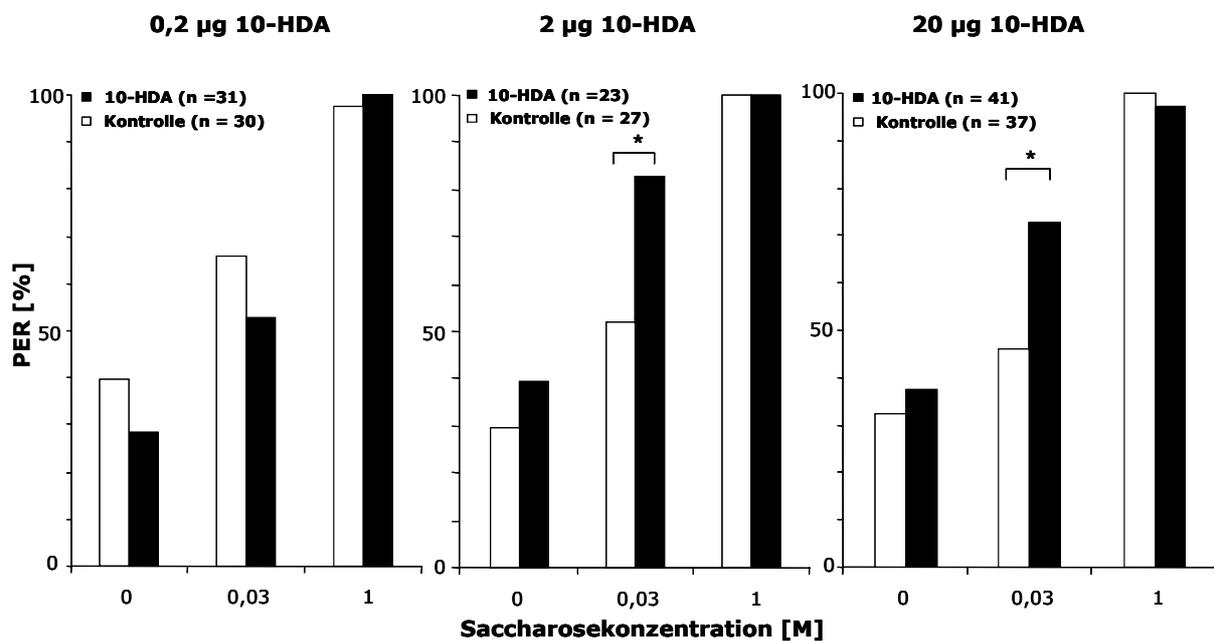


Abb. 4.23: 10-HDA erhöht konzentrationsabhängig die Zuckerwasserempfindlichkeit der Honigbiene
 Dargestellt ist die Anzahl der Tiere in Prozent, die nach Berührung einer Antenne mit einem Tropfen 0 M, 0,03 M und 1 M Saccharose-Lösung in aufsteigender Konzentration mit dem PER reagiert haben. Die Tiere wurden 2 h vor dem Test mit drei Tropfen 1 M Saccharose gefüttert und 1 h vor dem Test mit 1 µl der jeweiligen Lösung in den Thorax injiziert (von links nach rechts: 0,2 µg, 2 µg, 20 µg 10-HDA/ µl in PBS, Kontrolle: Methanol: PBS). Die Anzahl der Tiere ist in Klammern in der Legende hinter der jeweiligen Gruppenbezeichnung vermerkt. Mit einem Stern gekennzeichnet sind Werte, die sich signifikant von der Kontrolle unterscheiden (Fischer-exakt-Test, Chi-Quadrat-Test, $p < 0,05$).

4.3.2.1.2 10-HDA hat keinen Einfluss auf nicht-assoziative Lernformen

Im vorhergehenden Experiment konnte gezeigt werden, dass 0,2 µg 10-HDA/ Biene keinen Einfluss auf die Zuckerwasserempfindlichkeit der Versuchstiere hat. Die 10-HDA könnte jedoch Effekte auf die Prozessierung von Duft- und Zuckerreiz haben. Um dies zu überprüfen wird im Folgenden die Wirkung von 10-HDA auf die nicht nicht-assoziativen Lernparadigmen Sensitisation und Habituation untersucht. Dazu wurden die Tiere mit 1 µl der jeweiligen Injektionslösung (0,2 µg 10-HDA in PBS, Kontrolle: Methanol: PBS

1:1000) in den Thorax injiziert und eine Stunde später sensitisiert oder habituiert und dishabituiert. Wie der Tab. 4.10 zu entnehmen ist, zeigt sich nach Injektion von 0,2 µg 10-HDA weder ein signifikanter Unterschied in der Habituation, noch in der Sensitisierung zwischen 10-HDA injizierter Gruppe und Kontrollgruppe, daher kann man davon ausgehen, dass sowohl Duft-, als auch Zuckerreiz in beiden Gruppen gleichermaßen prozessiert werden.

Tab. 4.10: Die Injektion von 10-HDA verändert weder Habituation noch Sensitisierung der Honigbiene

Dargestellt sind die auf die Kontrolle normierten Mittelwerte der Stimulationen bis zur Habituation, bzw. die Anzahl der Tiere in Prozent, die sich sensitisieren ließen. Dafür wurden die Tiere 1 h vor dem jeweiligen Test mit 1 µl der jeweiligen Lösung (10-HDA: 0,2 µg 10-HDA in PBS, Kontrolle: Methanol: PBS 1:1000) in den Thorax injiziert und anschließend entweder habituiert oder sensitisiert.

	Kontrolle	10-HDA
Habituation	1 ± 0,52 (29)	0,90 ± 0,48 (28)
Sensitisierung	16% PER (25)	20% PER (25)

4.3.2.1.3 10-HDA verbessert das Gedächtnis der Honigbiene nach schwachem Training

Die vorangegangenen Experimente haben gezeigt, dass die Injektion einer niedrig konzentrierten 10-HDA-Lösung (0,2 µg pro Biene) weder zu einer veränderten Wahrnehmung, noch zu einer veränderten Prozessierung von Duft- (CS) und Zuckerreiz (US) führt. Somit sind die Grundvoraussetzungen zur Durchführung der appetitiven olfaktorischen Konditionierung (CS-US-Paarung) erfüllt und dieses Lernparadigma kann daher in den nächsten Experimenten genutzt werden, um die Wirkung von 10-HDA auf das Lernen und die Gedächtnisbildung der Honigbiene zu untersuchen.

Zunächst wird die Wirkung von 10-HDA in einem schwachen Training untersucht. Dazu wurde die 10-HDA in den Thorax der Bienen injiziert und diese eine Stunde später mit einer CS-US-Paarung konditioniert. Wie in Abb. 4.24 ersichtlich gibt es 2 h nach dem Training keinen signifikanten Unterschied in der Gedächtnisbildung der beiden Gruppen. Erst 24 h nach dem Training zeigt die 10-HDA injizierte Gruppe ein signifikant besseres Gedächtnis. Da in allen vorangegangenen Experimenten mit Gelée royale und seinen Fraktionen die verschiedenen Substanzen immer gefüttert wurden, stellt sich jetzt die Frage, ob es Unterschiede zwischen einer Injektion und einer Fütterung von 10-HDA gibt, daher wurde zusätzlich ein schwaches Training 2 h nach Fütterung von 10-HDA durchgeführt. Gefüttert wurden zwei unterschiedliche Mengen an 10-HDA, 0,2 µg/ Biene und 20 µg/ Biene. Erstere ist die bisher genutzte Injektionsmenge, letztere die Menge an 10-

HDA in Gelée royale (errechnet), die in den GR Versuchen verwendet wurde. Auch nach einer Fütterung von 10-HDA zeigt sich nach 2 h kein Unterschied zwischen den Gruppen. Nach 24 h kommt es zu einem verbesserten Gedächtnis der 10-HDA behandelten Gruppen, der Unterschied zur Kontrolle ist jedoch wahrscheinlich wegen der geringeren Anzahl der Versuchstiere nicht signifikant (siehe Abb. 4.24).

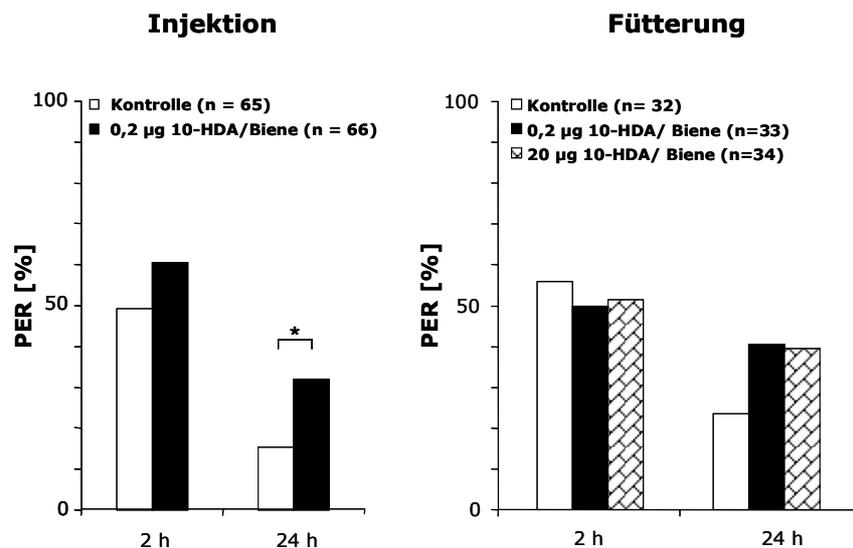


Abb. 4.24: 10-HDA verbessert das Gedächtnis der Honigbiene nach einem schwachen Training

Dargestellt ist die Anzahl der Tiere in Prozent, die auf den CS (Nelkenduft) mit dem PER reagiert haben. Die Tiere wurden durch eine CS-US (Nelkenduft- 1 M Saccharose) Paarung konditioniert und entweder 1 h vor dem Training mit 1 µl der jeweiligen Lösung in den Thorax injiziert (10-HDA: 0,2 µg 10-HDA/ µl in PBS, Kontrolle: Methanol-PBS) oder 2 h vor dem Training mit 0,2 µg oder 20 µg 10-HDA/ Biene in 1 M Saccharose gefüttert. Als Kontrolle diente 1 M Saccharose mit 1% Methanol. Die Anzahl der Tiere ist in Klammern in der Legende hinter der jeweiligen Gruppenbezeichnung vermerkt. Mit einem Stern gekennzeichnet sind Werte, die sich signifikant von der Kontrolle unterscheiden (Chi-Quadrat-Test, $p < 0,05$).

Die 10-HDA verbessert demnach das 24 h Gedächtnis der Honigbiene und es gibt vermutlich weder einen Unterschied zwischen der Fütterung einer hohen und einer niedrigen Konzentrationen an 10-HDA, noch einen Unterschied zu einer Injektion in die Hämolymphe. Dies lässt darauf schließen, dass die Wirkung von 10-HDA auf das Gedächtnis der Biene, im Gegensatz zum Test auf die Zuckerwasserempfindlichkeit, keine stark konzentrationsabhängigen Unterschiede aufweist. Zudem könnten die Ergebnisse darauf hindeuten, dass die 10-HDA Wirkung nicht auf metabolischen Prozessen beruht, da nach einer Fütterung und damit einer Passage des Verdauungstraktes die 10-HDA Wirkung die gleiche ist, wie nach Injektion in die Hämolymphe.

4.3.2.1.4 Eingrenzung des Wirkmechanismus: Der 10-HDA Effekt ist transkriptionsabhängig

Da bereits gezeigt werden konnte, dass die GR induzierte Verbesserung des 24 h und 48 h Gedächtnis der Honigbiene nach einem schwachen Training transkriptionsabhängig ist, wird um erste Hinweise auf den Wirkmechanismus der 10-HDA zu bekommen, dieser Test auch mit 10-HDA durchgeführt. Dazu wird durch Injektion mit dem Transkriptionsblocker Actinomycin D überprüft, ob auch die Injektion von 10-HDA zu einer transkriptionsabhängigen Verbesserung des 24 h Gedächtnisses nach einem schwachen Training führt. Wie man anhand der Abb. 4.25 erkennen kann, zeigt sich weder nach 2 h, noch nach 48 h ein signifikanter Unterschied im Gedächtnis der Versuchstiere. Der bereits oben gezeigte Einfluss einer 10-HDA Injektion auf das 24 h Gedächtnis der Honigbiene lässt sich bestätigen. Nach 24 h unterscheiden sich die Kontrolle und die Actinomycin-D injizierten Gruppen nicht, beide sind jedoch signifikant verschieden zur 10-HDA behandelten Gruppe. Nach 48 h gibt es keinen signifikanten Unterschied zwischen den drei Gruppen. Dies bedeutet, dass es sich bei der 10-HDA induzierten Lernverbesserung nach 24 h um einen transienten transkriptionsabhängigen Effekt handelt, was insofern ungewöhnlich ist, da ein transkriptionsabhängiges Gedächtnis der Honigbiene normalerweise erst nach drei Tagen und nur nach einem starken Training zu beobachten ist. Anzunehmen ist daher, dass die Injektion von 10-HDA Transkriptionsprozesse beeinflusst.

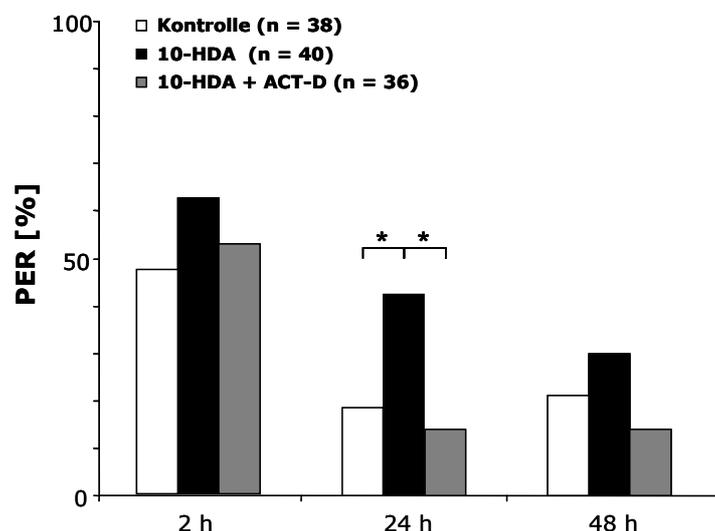


Abb. 4.25: Transkriptionsabhängigkeit der 10-HDA induzierten Gedächtnisverbesserung nach einem schwachem Training

Dargestellt ist die Anzahl der Tiere in Prozent, die auf den CS (Nelkenduft) mit dem PER reagiert haben. Die Tiere wurden durch eine CS-US Paarung konditioniert und 1 h vor dem Training mit 1 µl der jeweiligen Lösung in den Thorax injiziert (10-HDA: 0,2 µg 10-HDA in DMSO, Kontrolle: Methanol-DMSO, Actinomycin D: 2 µg/ µl Actinomycin D in Methanol-DMSO). Die Anzahl der Tiere ist in Klammern in der Legende hinter der jeweiligen Gruppenbezeichnung vermerkt. Mit einem Stern gekennzeichnet sind Werte, die sich signifikant voneinander unterscheiden (Chi-Quadrat-Test, $p < 0,05$).

4.3.2.1.5 Einfluss der 10-HDA auf die HDAC-Aktivität und Histonmodifikationen

Nach Verfütterung von GR und seiner Lipidfraktion kam es zu einer Reduktion der Histondeacetylaseaktivität, sowie zu einer Änderung der Histonacetylierung und Histonmethylierung im Bienenhirn. Zudem hat sich gezeigt, dass 10-HDA eine Lernverbesserung induziert, die transient und transkriptionsabhängig ist. Zusammengenommen deutet dies darauf hin, dass die 10-HDA, genau wie GR eine transkriptionsverändernde Wirkung hat. Da sowohl eine veränderte Histonacetylierung, als auch eine veränderte Histonmethylierung eine solche Wirkung haben können, werden im Folgenden die Histondeacetylaseaktivität und die Histonacetylierung und -methylierung (Ac-18/ H3, Met-4.1/ H3, Met-27.3/ H3) nach Injektion von 10-HDA untersucht.

4.3.2.1.6 10-HDA vermindert die HDAC-Aktivität *in vitro*

Da es keinerlei Untersuchungen zur 10-HDA im Zusammenhang mit chromatinmodifizierenden Enzymen gibt, wird die Wirkung von 10-HDA auf die Histondeacetylaseaktivität des Bienenhirns zunächst mittels HDAC-Assay *in vitro* untersucht. Dazu wurden Bienenhirne herauspräpariert und mit 10-HDA versetzt. Anschließend wurde die relative Deacetylaseaktivität des Bienenhirnhomogenates gemessen. Wie in Abb. 4.26 zu erkennen ist, führt die 10-HDA zu einer signifikanten Reduktion der Histondeacetylaseaktivität *in vitro*.

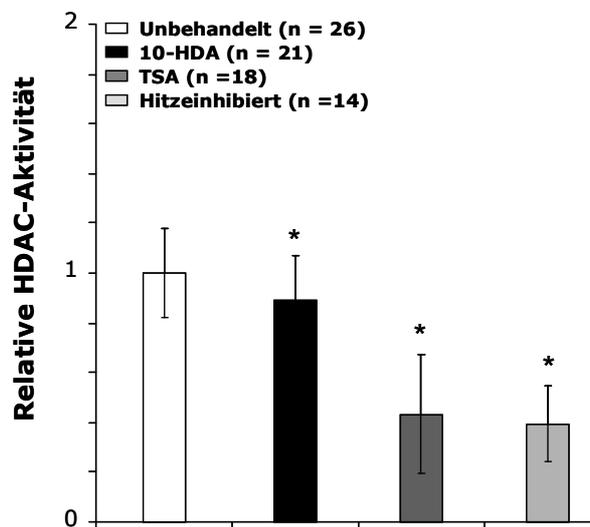


Abb. 4.26: 10-HDA vermindert die Histondeacetylaseaktivität *in vitro*

Dargestellt ist die relative Histondeacetylaseaktivität eines Gehirnhomogenates entsprechend 1/5 Bienenhirn nach Zugabe von 8 μM 10-HDA. Dazu wurden die Gehirne herauspräpariert, in Assaypuffer homogenisiert und die relative Deacetylaseaktivität im Vergleich zur unbehandelten Homogenatkontrolle mittels *in vitro* HDAC-Assays bestimmt. Als Kontrolle zur Funktionalität des Assays dienten hitzeinhibiertes und TSA (1 μM) behandeltes Homogenat. Werte, die sich signifikant von der unbehandelten Homogenatkontrolle (t-Test, $p \leq 0,05$) unterscheiden, sind mit * gekennzeichnet.

Da sich ein Effekt von 10-HDA auf die HDAC-Aktivität *in vitro* zeigen lässt, wird im Folgenden zusätzlich untersucht, ob sich diese Wirkung auch nach Injektion von 10-HDA in die Biene vermerken lässt. Dazu wurden die Bienen mit 0,2 µg 10-HDA/ Biene injiziert. Diese Konzentration entspricht der eingesetzten Menge an 10-HDA in den vorangegangenen Verhaltensversuchen. Die Bienenhirne wurden zu verschiedenen Zeitpunkten (1 h, 24 h und 48 h) herauspräpariert und die relative Deacetylaseaktivität des Bienenhirnhomogenates bestimmt. Aus Tab. 4.11 wird ersichtlich, dass es zu keinem Zeitpunkt nach Injektion von 10-HDA zu einer veränderten HDAC-Aktivität des Bienenhirnhomogenates kommt. Dies lässt darauf schließen, dass 10-HDA eine direkte Wirkung auf die Histondeacetylasen *in vitro* hat, diese Wirkung nach Injektion aber entweder nicht vorhanden ist, oder nur zu anderen Zeitpunkten, einer höheren Anzahl an Versuchstieren oder mit anderen Konzentrationen an 10-HDA messbar wäre.

Tab. 4.11: die Injektion von 10-HDA hat keinen Einfluss auf die HDAC-Aktivität

Dargestellt ist die relative Histondeacetylaseaktivität eines Gehirnhomogenates nach Injektion der Versuchstiere mit 0,2 µg 10-HDA/ Biene. Die Gehirne wurden nach 1 h, 24 h und 48 h präpariert und die Deacetylaseaktivität mittels *in vitro* HDAC-Assays bestimmt. In der Tabelle sind die auf die unbehandelte Kontrolle normierten Mittelwerte, die Standardabweichungen, sowie die Anzahl der Tiere (in Klammern) angegeben. Als Kontrollen zur Funktionalität des Assays dienten hitzeinhibiertes und TSA (1 µM) behandeltes Homogenat. Mit einem Stern gekennzeichnet sind Werte, die sich signifikant von der jeweiligen unbehandelten Kontrolle unterscheiden (t-Test, $p < 0,05$).

		1 h	24 h	48 h
Unbehandelt	Kontrolle	1,00 ± 0,19 (14)	1,00 ± 0,14 (8)	1,00 ± 0,27 (8)
	10-HDA	0,92 ± 0,13 (13)	0,98 ± 0,16 (7)	0,99 ± 0,15 (8)
TSA	Kontrolle	0,72 ± 0,02 (14) *	0,40 ± 0,01 (8)*	0,49 ± 0,05 (8)*
	10-HDA	0,71 ± 0,03 (13) *	0,40 ± 0,02 (7)*	0,52 ± 0,03 (8)*
Hitzeinhibiert	Kontrolle	0,73 ± 0,13 (14) *	0,40 ± 0,02 (8)*	0,48 ± 0,06 (8)*
	10-HDA	0,72 ± 0,07 (13) *	0,33 ± 0,09 (7)*	0,49 ± 0,03 (8)*

4.3.2.1.7 Die 10-HDA verändert die Histonmethylierung, aber nicht die Histonacetylierung

Nachdem sich ein Einfluss von 10-HDA auf die HDAC-Aktivität zumindest *in vitro* zeigen ließ und die GR Experimente Einflüsse sowohl auf die Histonacetylierung, als auch auf die Histonmethylierung gezeigt haben, wird jetzt im folgenden überprüft, ob es auch nach Behandlung der Versuchstiere mit 10-HDA zu einer veränderten relativen Histonacetylierung (AC-18/ H3) oder -methylierung (Met-4.1/ H3, Met-27.3/ H3) im Gehirn der Biene kommt. Wie in Tab. 4.12 zu erkennen führt die Injektion mit 0,2 µg 10-HDA zu keinem Zeitpunkt zu einer signifikant erhöhten Histonacetylierung (AC-18/ H3). Zudem ist weder

nach 1 h, noch nach 48 h ein Unterschied in der relativen Histonmethylierung der beiden Gruppen zu erkennen. Nach 24 h ist eine Reduktion der relativen Histonmethylierung (Met-4.1/ H3, Met-27.3/ H3) in der 10-HDA injizierten Gruppe zu vermerken. Diese ist jedoch nur für die Histontrimethylierung (Met-27.3/ H3) signifikant.

Tab. 4.12: Einfluss von 10-HDA auf die Histonacetylierung und -methylierung

Dargestellt ist die relative Histonacetylierung (AC-18/ H3) und die relativen Histonmethylierungen (Met-4.1/ H3, Met-27.3/ H3) nach Injektion von 0,2 µg 10-HDA/ Biene. Die Gehirne wurden nach 1 h, 24 h und 48 h präpariert und die relative Histonmethylierung/ acetylierung mittels ELISA bestimmt. Die auf die Kontrolle normierten Mittelwerte, sowie die Standardabweichungen und die Anzahl der Tiere (in Klammern) sind in der Tabelle angegeben. Werte, die sich signifikant von der Kontrolle (t-Test, $p \leq 0,05$) unterscheiden, sind mit * gekennzeichnet.

		1 h	24 h	48 h
AC-18/ H3	Kontrolle	1,00 + 0,27 (12)	1,00 + 0,30 (10)	1,00 + 0,42(12)
	10-HDA	1,09 + 0,25 (15)	0,95 + 0,24(10)	0,97 + 0,32 (12)
Met-27.3/ H3	Kontrolle	1,00 ± 0,34 (10)	1,00 ± 0,21 (10)	1,00 ± 0,41 (12)
	10-HDA	1,16 ± 0,36 (12)	0,84 ± 0,10 (10)*	1,00 ± 0,27 (12)
Met-4.1/ H3	Kontrolle	1,00 ± 0,25 (10)	1,00 ± 0,41 (10)	1,00 ± 0,33 (12)
	10-HDA	1,23 ± 0,39 (12)	0,81 ± 0,21 (10)	1,01 ± 0,32 (12)

Zusammenfassend lässt sich aus diesen Daten ableiten, dass die 10-HDA eine spezifische Wirkung auf Histondeacetylasen *in vitro* hat und die Histonmethylierung, aber nicht die Histonacetylierung verändert. Es ist also wahrscheinlich, dass andere Zielproteine als Histone acetyliert werden. Zudem hat die 10-HDA eine Dosis abhängige Wirkung auf die Wahrnehmung niedriger Zuckerkonzentrationen und verbessert das Gedächtnis nach einem schwachen Training transient in einem transkriptionsabhängigen Mechanismus.

5. Diskussion

5.1 Gelée royale in der Kastendifferenzierung der Bienen

Die Fütterung von Gelée royale an genetisch identische Bienenlarven führt entweder zur Entwicklung einer Bienenarbeiterin oder einer Bienenkönigin. Diese beiden Kasten unterscheiden sich nicht nur hinsichtlich ihrer Morphologie und Physiologie, sondern haben zudem in den verschiedenen Larval- und Puppenstadien sowie als adulte Lebewesen sehr unterschiedliche Genexpressionsmuster (Evans und Wheeler, 2001+1999; Grozinger et al., 2007;). Die unterschiedliche Transkription von Genen kann durch verschiedene molekulare Mechanismen verursacht werden. Zum einen sind dies epigenetische Prozesse, wie z.B. die Methylierung der DNA und die Modifikation von Histonen. Zum anderen ist eine direkte Regulation der Transkription durch Transkriptionsfaktoren möglich, wobei diese meist über komplexe Signalkaskaden aktiviert oder inhibiert werden. Da die genannten Expressionsunterschiede allein im Gehirn der Arbeiterin und Königin über 2000 Gene betreffen (Grozinger et al., 2007) ist es eher unwahrscheinlich, dass allein die Hoch- oder Runterregulierung eines einzelnen Transkriptionsfaktors oder einer Signalkaskade solch drastische Effekte haben sollte. Es scheint sich daher eher um einen globalen, z.B. chromatinmodifizierenden Mechanismus, zu handeln.

5.1.1 Gelée royale und Chromatinmodifikationen

Erste Hinweise auf einen solch globalen Effekt des GR liefert eine australische Studie; hier wurde durch eine siRNA die *de novo* Methyltransferase DNMT3 in Bienenlarven reduziert, was dazu führte, dass sich aus den Larven überwiegend Königinnen entwickelt haben (Kucharski et al., 2008). Dies könnte bedeuten, dass GR eine Wirkung auf die DNA-Methyltransferase ausübt. Eine Rolle dabei könnten die in GR enthaltene Folsäure und das Vitamin B12 spielen, die über biochemische Zwischenschritte für die Bereitstellung von Methylgruppen aus dem Methylgruppendonor S-Adenosylmethionin sorgen. Eine Beteiligung der beiden Substanzen an epigenetischen Prozessen ist bei Vertebraten bekannt (Cooney et al., 2002; Wolff et al., 1998). Demnach hätten chromatinverändernde Prozesse einen Anteil an der unterschiedlichen Expression der kastenspezifischen Gene. Meine eigenen Ergebnisse bestätigen eine chromatinmodifizierende Wirkung des GR insofern, dass die Fütterung von GR einen Einfluss auf die Modifikation von Histonen hat. GR reduziert die HDAC-Aktivität *in vitro* und 24 h nach Fütterung. Zudem ist die Histonacetylierung H3: Ac-18 nach 24 h gegenüber der Kontrollgruppe erhöht und nach 48 h reduziert. Für die Histonmethylierung H3:Met-4.1 und H3:Met-27.3 ergeben sich ähnliche Effekte. Die Modifikation der Histone ist unabhängig davon, ob GR mehrmals oder nur einmal gegeben wurde. Allerdings habe ich keine längeren Zeiträume untersucht, so dass ich keine

Aussagen über eventuelle spätere Unterschiede dieser beiden Fütterungsformen treffen kann. Interessant ist, dass sich GR nur bei adulten Fliegern, nicht aber bei frisch geschlüpften Bienen auswirkt. Ein ähnlicher Effekt wurde bereits für den HDAC-Inhibitor TSA gezeigt (Hättig, 2009), was nicht nur bestätigt, dass GR und TSA ähnliche Wirkungen haben, sondern auch darauf hindeutet, dass junge Bienen nicht auf Substanzen ansprechen, die die Histonacetylierung künstlich erhöhen.

5.2 Gelée royale und Verhalten

Es ist bekannt, dass die verschiedenen Bienenkasten unterschiedliche Aufgaben haben und damit verschiedene Verhaltensweisen einhergehen. Selbst unter Bienenköniginnen gibt es erhebliche Unterschiede in der Physiologie, der Morphologie und dem Verhalten zwischen jungfräulicher und begatteter Königin, die auf eine unterschiedliche Genexpression zurückgeführt werden können (Kocher et al., 2008). Dabei sind direkt nach der Begattung zunächst erhebliche Veränderungen in den Ovarien zu bemerken. Später kommt es auch zu Veränderungen im Gehirn; so vermindert sich die Anzahl der Kenyon-Zellen in den Pilzkörpern um ca. 30%, während sich das Neuropil in den Pilzkörpern nahezu verdoppelt. Es scheint dabei einen Zusammenhang mit dem Juvenilhormonspiegel zu geben, da die Königinnen, die eine morphologische Änderung im Gehirn aufwiesen auch einen niedrigeren Juvenilhormonstatus in der Hämolymphe hatten (Fahrbach et al., 1995). Da dieses Hormon auch eine Rolle in der Entwicklung der Larven zur Königin spielt (Asencot et al., 1976; Rachinsky et al., 1990), kann ein Zusammenhang zwischen der Verfütterung von GR und dem Juvenilhormon angenommen werden. Die adulte Bienenkönigin wird normalerweise mit Gelée royale gefüttert (Haydak, 1970), sie kann sich jedoch während kürzerer Phasen, bei künstlicher Isolation oder vor ihrer Begattung selbst mit Honig und Pollen ernähren (Crailsheim, 1998). Man kann daher vermuten, dass die Fütterung mit GR der Regulation und Aufrechterhaltung der Transkription königinnenspezifischer Gene dient, die eventuell auch eine Wirkung auf den Hormonstatus, die Veränderungen im Gehirn und damit auf das Verhalten haben. GR hätte somit nicht nur eine wichtige Funktion für die Entwicklung der Larve, sondern auch für die adulte, begattete Königin.

5.2.1 Gelée royale in Lern- und Gedächtnisprozessen

Meinen Recherchen nach wurde GR bisher weder in Vertebraten, noch in Invertebraten in Hinblick auf Reizwahrnehmung und -prozessierung, noch in Lernexperimenten untersucht. Daher habe ich zunächst untersucht und gezeigt, dass die Fütterung mit GR sich weder auf die Zuckerwasserempfindlichkeit, noch auf das nicht-assoziative Lernen auswirkt. Dahingegen zeigte sich eine starke Wirkung von GR auf das Gedächtnis nach assoziativen Lernen. Eine Fütterung mit GR nach einem starkem Training induziert ein signifi-

kant verbessertes Gedächtnis nach 48 Stunden. Wird Gelée royale nach einem schwachen Training gefüttert, so ist sowohl das Gedächtnis nach 24 h, sowie nach 48 h signifikant verbessert. Zudem konnte ich durch die Injektion mit dem Transkriptionsblocker Actinomycin D zeigen, dass diese Gedächtnisverbesserung abhängig von Transkriptionsprozessen ist; solche transkriptionsabhängigen Konsolidierungsprozesse kommen normalerweise nach einem schwachen Training nicht vor. Dies spricht dafür, dass die Wirkung von GR nicht auf einer schnellen Modulation von Signalkaskaden beruht, vielmehr scheint GR Einfluss auf Mechanismen auszuüben, die die Genexpression steuern. Dafür spricht auch die oben genannte Änderung der Histonacetylierung und -methylierung, sowie die GR induzierte Minderung der Histondeacetylaseaktivität.

GR besteht jedoch aus sehr unterschiedlichen Komponenten, die verschiedenste Wirkungen auf die Transkription von Genen haben könnten. Daher kann man nicht mit Sicherheit sagen, dass nur die chromatinmodifizierende Wirkung von GR für die unerwartete Konsolidierung des Gedächtnisses nach schwachem Training verantwortlich ist. So verändert GR z.B. *in vitro* das Transkriptom von Leberzellen, wobei die Expression mehrerer Gene verändert wird, die an der Signaltransduktion, dem Energiemetabolismus und dem Zellwachstum beteiligt sind (Kamakura et al., 2005). Desweiteren hat GR eine estrogenähnliche Wirkung *in vivo* und *in vitro*, wobei durch Reporteragen-Assays vier Komponenten identifiziert wurden, die estrogenähnlich wirken, u.a. die 10-Hydroxy-2-decensäure (Suzuki et al., 2008). Estrogen und die Bindung an seine Rezeptoren haben verschiedene Einflüsse auf die Transkription und das Verhalten. So wirken sich Estrogen und seine Derivate in Vertebraten auf die Sensorik und das assoziative Lernen aus (Barha et al., 2010; Leuner et al., 2004), was unter Punkt 5.6 näher erläutert wird. Zudem sind weitere hormonelle Eigenschaften des GR bekannt. GR wirkt insulinähnlich bei Vertebraten und Invertebraten (Kramer et al., 1977; Münstedt et al., 2009 ; Zamami et al., 2008). Insulin spielt u.a. eine Rolle in der Kastendifferenzierung der Biene (Wheeler et al., 2006). Es initiiert über seine Beteiligung an metabolischen und hormonellen Prozessen Transkriptionsprozesse und wirkt sich bei Vertebraten und Invertebraten auf das Lernen, die synaptische Plastizität und das Gedächtnis aus (Huang et al., 2010; Lin et al., 2010). Zusätzlich enthält GR die Pteridine Biopterin und Neopterin. Ersteres dient in Form des Tetrahydrobiopterins (BH4) als Cofactor der Stickstoff-Synthasen, letzteres kann die induzierbare Stickstoff-Synthase iNOS aktivieren. Bisher ist in der Biene nur eine Stickstoff-Synthase bekannt, von der man nicht mit Sicherheit sagen kann, ob sie ebenso wie die humane iNOS induzierbar ist. Dennoch könnten sowohl Biopterin, als auch Neopterin über Stickstoff-vermittelte Signalkaskaden Transkriptionsprozesse aktivieren, die sich auf das Lernen und die Gedächtnisbildung auswirken. Eine Beteiligung der Stickstoff-Synthasen an Gedächtnisprozessen, vor allem an Langzeitpotenzierung und Langzeitgedächtnis ist hinreichend in der Biene und in Vertebraten untersucht worden (Boultadakis et al., 2009; Dacher et al., 2008; Jüch et al., 2009 ; Mueller, 1996; Mutlu et al., 2010).

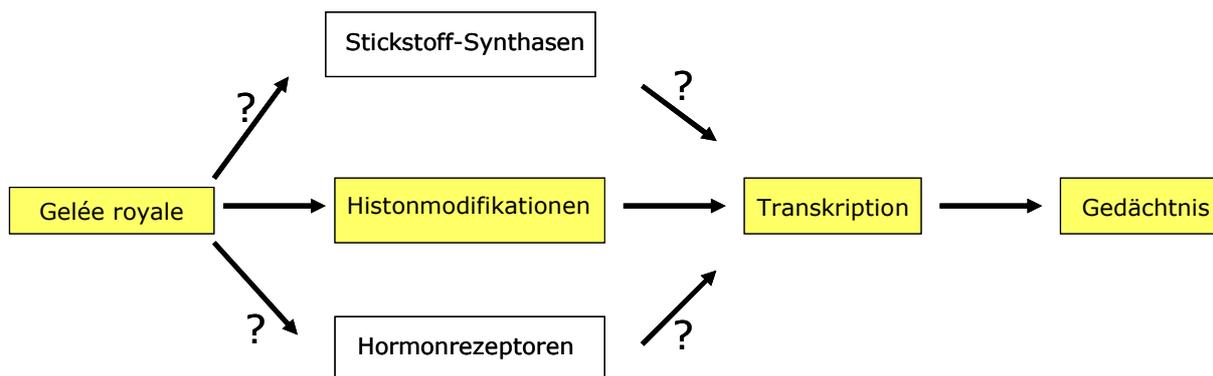


Abb. 5.1: Schema der GR Wirkung auf das Gedächtnis der Honigbiene

GR verändert Histonmodifikationen, was über einen transkriptionsabhängigen Mechanismus zu einem verbesserten Gedächtnis führen könnte. Weitere mögliche GR Effekte wären die Aktivierung von Stickstoff-Synthasen und hormonähnliche Wirkungen des GR, welche ebenfalls Transkriptionsprozesse beeinflussen könnten und daher in der Lage wären, ein transkriptionsabhängiges Gedächtnis zu induzieren.

5.3. Die Bedeutung von Fettsäuren für die Histonacetylierung und -methylierung

In zahlreichen *in vitro* und *in vivo* Studien sind einige kurzkettige Fettsäuren auf ihre Wirkung als Histondeacetylaseinhibitoren untersucht worden. Eine HDAC inhibierende Wirkung wurde für die Valproinsäure, eine kurzkettige verzweigte Fettsäure, Butyrat, 4-Phenylbutyrat und deren neu entwickelten Derivate, das AN-9 und (S)-HDAC-42, sowie die α -Liponsäure (Bolden et al., 2006; Göttlicher et al., 2001; Lu et al., 2004) gezeigt. Bisher ist jedoch nichts darüber bekannt, ob auch mittelkettige oder langkettige Fettsäuren als HDAC-Inhibitoren dienen können. Da eine Zugabe von 10-HDA die Histondeacetylaseaktivität im Bienenhirnhomogenat *in vitro* signifikant gemindert hat, könnte dies einer der ersten Hinweise auf die HDAC inhibierende Wirkung mittelkettiger Fettsäuren sein. *In vivo* konnte dieser Effekt jedoch nicht bestätigt werden, da eine Injektion der Bienen mit 10-HDA, vermutlich wegen der geringen Anzahl an Versuchen, nicht zu einer signifikanten Änderung der HDAC-Aktivität geführt hat. Da die Injektion von 10-HDA zwar zu den gemessenen Zeitpunkten zu einer erhöhten Histonmethylierung (Met-27.3/ H3), aber nicht zu einer erhöhten Histonacetylierung (Ac-18/ H3) geführt hat, deutet dies daraufhin, dass eine Acetylierung entweder zu anderen Zeitpunkten oder an anderen Lysin- oder Argininresten stattgefunden hat, oder andere Zielproteine als das Histon drei (H3) acetyliert werden. Zu den Auswirkungen von Fettsäuren auf die Histonmethylierung oder den an der Histonmethylierung beteiligten Enzymen, den Histonmethyltransferasen oder Histondemethylasen, ist kaum etwas bekannt. Eine der wenigen Studien stellt eine verminderte Transkription des Polycomb group Proteins „enhancer of zeste homologue 2“ (EZH2) nach Aufnahme einer mehrfach ungesättigten Fettsäure fest (Dimri et al., 2009).

EZH2 ist eine Histonmethyltransferase, die spezifisch H3:Met-9 und H3:Met-27 methyliert, was meist mit einer Transkriptionsinaktivierung einhergeht. Da nach Injektion von 10-HDA die Histontrimethylierung an Lysin 27 signifikant niedriger als in der Kontrolle war, könnte 10-HDA ebenfalls eine inhibierende Wirkung auf Histonmethyltransferasen ausüben. Um eine solche Wirkung eindeutig zu zeigen, müssten jedoch weiterführende Tests auf Enzymebene durchgeführt werden.

5.4 Die Bedeutung von Fettsäuren in Lernen und Gedächtnisbildung

Seit einigen Jahren wird die Bedeutung von Fettsäuren in Lern- und Gedächtnisprozessen diskutiert. Die Publikationen konzentrieren sich dabei meist entweder auf die Wirkung von einigen kurzkettigen Fettsäuren, wie Butyrat, α -Liponsäure und Valproat, die als Histondeacetylaseinhibitoren bekannt sind (Federman et al., 2009, Kilgore et al., 2010; Lattal et al., 2007; Liu et al., 2001; Milgram et al., 2007) und auf die Wirkung von langkettigen, ungesättigten Fettsäuren, wobei besonders der Zusammenhang zwischen der Aufnahme von Omega-3-Fettsäuren und Gedächtnis untersucht wird (Fronte et al., 2008; Morley et al., 2010; Su et al., 2010). Zum Einfluss mittelkettiger Fettsäuren auf das Lernen und die Gedächtnisbildung liegen bisher keine Studien vor. Die einzigen Hinweise auf eine mögliche Beteiligung von mittelkettigen Fettsäuren an Gedächtnisprozessen sind wenige Studien, in denen der positive Einfluss von MCT-Fetten, künstlich hergestellten Triglyceriden aus mittelkettigen Fettsäuren, auf das Langzeitgedächtnis untersucht wurde (Pan et al., 2010).

Ein weiterer Hinweis könnten meine eigenen Experimente sein, in denen 24 h nach Behandlung der Bienen mit der mittelkettigen Fettsäure 10-HDA eine Gedächtnisverbesserung erzielt wurde. Da die Gabe von 10-HDA Histondeacetylasen hemmt und zu einer veränderten Histonmethylierung führt und diese Prozesse eine Wirkung auf Lernen und Gedächtnisbildung ausüben (Gupta et al., 2010; Kilgore et al., 2010; Lattal et al., 2007), könnte die 10-HDA Wirkung darauf zurückzuführen sein, dass sie Chromatin modifizierende Enzyme beeinflusst und somit Transkriptionsprozesse beeinflussen kann, die sich auf Lern- und Gedächtnisprozesse auswirken.

Da sich der Fettmetabolismus der Insekten von dem der Vertebraten in einigen Punkten unterscheidet, sind jedoch auch andere Wirkmechanismen der 10-HDA denkbar.

5.5 Der Fettmetabolismus in Insekten

In Insekten werden durch die Ernährung aufgenommene Fette oder Fettsäuren gewöhnlich in Form von Diacylglycerol (DAG) aus dem Lumen des Mitteldarms zum Fettkörper transportiert und dort gespeichert. An den Transportmechanismen sind Lipophorine beteiligt; dies sind Lipoproteine, die als eine Art Shuttlesystem in der Hämolymphe fungieren und nicht internalisiert werden (Canavaso et al., 2001). Diese Lipophorine können jedoch auch Triacylglycerine, Sterole, Carotinoide und freie Fettsäuren transportieren. Eine Freisetzung der Fettsäuren aus dem Fettkörper wird hormonell, z.B. durch das Adipokinetische Hormon, einem Hormon, das in seiner Funktion dem Glucagon der Vertebraten entspricht (Wicher et al., 2007), reguliert und erfolgt wiederum, im Gegensatz zu Vertebraten, meist nicht als freie Fettsäure, sondern in Form von Diacylglycerin. Nach der Freisetzung aus dem Fettkörper werden DAG, Carotinoide und Fettsäuren von Lipophorinen vermutlich spezifisch zu verschiedenen Organen transportiert und dort von speziellen Lipophorin-Lipasen abgespalten und in den Zellen aufgenommen, so werden z.B. Carotinoide zur Kutikula oder DAG in hohen Mengen zu den Flugmuskeln von Heuschrecken (*Locusta migratoria*) (van Heusden et al., 1987) transportiert.

Die assoziativen Lernexperimente zeigen, dass sowohl die Fütterung, als auch die Injektion der 10-HDA zu einem verbesserten Gedächtnis nach 24 h führt, wobei das Ergebnis für die Fütterung von 10-HDA vermutlich wegen der geringen Anzahl an Experimenten nicht signifikant ist. Geht man jedoch davon aus, dass es keinen Unterschied zwischen den beiden Verabreichungsformen gibt, so sind mehrere Transportformen und Wirkmechanismen der 10-HDA in Betracht zu ziehen. Zum einen könnte nach Fütterung von 10-HDA ein Umbau zu Diacylglycerin im Darm stattfinden, die Fettsäure könnte aber auch in ihrer ursprünglichen Form weitertransportiert werden. Dabei wäre ein Transport zu verschiedenen Organen ebenso wie ein Transport zum Fettkörper möglich. Die injizierte 10-HDA könnte ebenfalls als freie Fettsäure aus der Hämolymphe zum Fettkörper transportiert und zu DAG umgewandelt oder zu verschiedenen Organen transportiert werden. Da die Bienen aber sowohl zum Zeitpunkt der Fütterung, als auch zum Injektionszeitpunkt schon mindestens 16 h gehungert haben und auf eine Energiequelle angewiesen sind, ist eine Speicherung der leicht zugänglichen Fettsäure im Fettkörper eher unwahrscheinlich; zumal eine Verteilung der, in die Hämolymphe injizierten 10-HDA, sehr schnell gehen sollte. Es spricht daher vieles dafür, dass ein direkter Transport zu Zielorganen stattgefunden hat. In dieser Arbeit habe ich weder untersucht in welche Gewebe die 10-HDA transportiert wird, noch in welcher Form dieser Transport verlief. Da Lipophorine die Blut-Hirn-Schranke in Insekten passieren können (Brankatschk et al., 2010), kann man aber davon ausgehen, dass die 10-HDA oder eventuell entstehendes DAG in alle Organe und daher auch in Zellen des Gehirns transportiert wird.

Somit eröffnen sich verschiedene Möglichkeiten, wie die 10-HDA, oder aus 10-HDA entstehendes DAG die gezeigte Gedächtnisverbesserung induzieren könnte. DAG ist ein bekannter second messenger, der die Proteinkinase C aktiviert, deren Beteiligung an Gedächtnisprozessen bereits bekannt ist (Grünbaum et al., 1998).

5.6 Hormonelle Wirkung der 10-Hydroxy-2-decensäure

Falls die 10-HDA als intakte Fettsäure durch die Hämolymphe transportiert wird, so könnten ihre Effekte auf einer Bindung an Hormonrezeptoren beruhen, da für die 10-HDA bereits gezeigt wurde, dass sie hormonelle Wirkungen besitzt. So hat sie z.B. eine estrogenähnliche Wirkung und kann an Estrogenrezeptoren binden (Suzuki et al., 2008). Derzeit ist nicht bekannt ob Bienen Estrogenrezeptoren besitzen, für andere Insektenpezies, z.B. Termiten, die Seidenspinnerraupe (*Bombyx mori L*) und die Gemüseeulenraupe (*Lacanobia oleracea*) wurde dies jedoch gezeigt (Kirkbride-Smith et al., 2001; Roy et al., 2007; Su et al., 2007). Zudem sind sowohl in *D. melanogaster*, als auch in *Anopheles gambiae*, sowie in *Apis mellifera estrogen-related receptors* (Err) bekannt (Maglich et al., 2001; Pubmed gene), die in verschiedenen Geweben, u.a. Muskelzellen und Gehirn zu finden sind. Die Funktion dieser Rezeptoren vom orphan nuclear receptor Typ wurde noch nicht vollständig aufgeklärt, da aber gezeigt werden konnte, dass diese den Estrogenrezeptoren strukturell ähneln und Estrogene binden können (Bardet et al., 2006), könnten sie auch eine mögliche Bindestelle für die 10-HDA darstellen. Seit einiger Zeit wird die Bedeutung von Estrogenrezeptoren in Lern- und Gedächtnisprozessen immer deutlicher. Die Gabe von Estrogenen oder seinen Derivaten beeinflusst in Vertebraten sowohl die Sensorik, das Sozial- und Aggressionsverhalten (Spiteri et al., 2010), als auch das assoziative Lernen, wobei es konzentrationsabhängige Effekte der Estrogenwirkung im assoziativen Lernen zu geben scheint (Barha et al., 2010; Leuner et al., 2004). Es gibt wenige Untersuchungen zu einer dosisabhängigen Estrogenwirkung auf die Sensorik, die wenigen Studien beschäftigen sich mit dem Schmerzempfinden, wobei die Autoren postulieren, dass ein erhöhter Estrogenspiegel die Wahrnehmung von Schmerz verbessert (Kowalczyk et al., 2010). Daher könnten die von mir gezeigten dosisabhängigen Unterschiede in der Zuckerwasserempfindlichkeit der Honigbienen nach 10-HDA Injektion ein weiteres Indiz für die estrogenähnliche Wirkung der 10-HDA sein. In Untersuchungen zur Signalweiterleitung an Estrogenrezeptoren in Vertebraten hat man herausgefunden, dass durch eine Phospholipase C vermittelte Signalweiterleitung eine Ca^{2+} -Freisetzung in Zellen des Nervensystems veranlasst werden kann (Chaban et al., 2004). Zudem können Estrogene die Menge an cAMP erhöhen und so über den Transkriptionsfaktor CREB eine Aktivierung von Genen mit Cre-Element (Aronica et al., 1994; Zhou et al., 1996) bewirken. Beide Signalwege sind für ihre Beteiligung in Lern- und Gedächtnisprozessen be-

kannt. So beeinflusst z.B. der PKA/CREB Signalweg sowohl über die Phosphorylierung von Proteinen das Kurzzeitgedächtnis (Klein et al., 1980; Siegelbaum et al., 1982) als auch über Transkriptionsprozesse das Langzeitgedächtnis (Silva et al., 1998), sowie die Zuckerwasserempfindlichkeit der Biene (Müller, 2006). Eine erhöhte Ca^{2+} -Freisetzung über den PLC-Signalweg kann CamKinasen, die Proteinkinase C oder Stickstoff-Synthasen aktivieren, die ebenfalls an Lern- und Gedächtnisprozessen beteiligt sein können (Grünbaum und Müller, 1998; Müller, 1996; Peters et al., 2003; Wüstenberg et al., 1998).

Wie oben bereits erwähnt, verbessert die 10-HDA das Gedächtnis 24 h nach einem schwachen assoziativen Training. Eine solche Trainingsform induziert normalerweise nur ein kurzfristiges, transkriptionsunabhängiges Gedächtnis. Da es demnach sehr wahrscheinlich ist, dass sich die 10-HDA auf Transkriptionsprozesse auswirkt, habe ich durch Injektion mit dem Transkriptionsblocker Actinomycin D überprüft und auch zeigen können, dass die Gedächtnisverbesserung 24 h nach 10-HDA Injektion transkriptionsabhängig ist.

Da die 10-HDA Einfluss auf die Histonmethylierung und auf die HDAC-Aktivität *in vitro* nimmt und über eine DAG induzierte Aktivierung von Zielproteinen, z.B. der Proteinkinase C, oder über eine Bindung von 10-HDA an Rezeptoren, z.B. Estrogenrezeptoren Einfluss auf die Transkription und damit auf die transkriptionsabhängige Verbesserung des Gedächtnisses haben könnte, kann keiner dieser Wirkmechanismen ausgeschlossen werden. In dieser Arbeit konnte daher nicht eindeutig geklärt werden, auf welchen Wirkmechanismen die Effekte der 10-HDA auf die Histonmethylierung, die HDAC-Inhibition, die Reizwahrnehmung und das assoziative Lernen beruhen. Wahrscheinlich ist es aber ein Zusammenspiel unterschiedlicher Wirkungen (Abb. 5.2).

Leider gibt es bisher nur eine Studie, die untersucht, ob es eine Verbindung zwischen *Estrogen related receptors* und Acetylierung gibt. In ihr wurde gezeigt, dass ein ERR direkt acetyliert und deacetyliert werden kann, wobei eine Deacetylierung durch die Histondeacetylasen HDAC 8 und Sirt1 zur Erhöhung der ERR vermittelten Transkription führen (Wilson et al., 2010). Dabei könnte die 10-HDA nicht nur durch die gezeigte niedrigere Histonmethylierung H3:Met-27.3, sondern genauso durch eine HDAC-Inhibition eine eher inhibierende Wirkung auf die Transkription haben. Gleichzeitig wäre durch eine Aktivierung von Transkriptionsfaktoren, wie z.B. CREB, auch eine Transkriptionsaktivierung möglich. Um eine eindeutige Aussage treffen zu können, müssen daher weitere Untersuchungen vorgenommen werden.

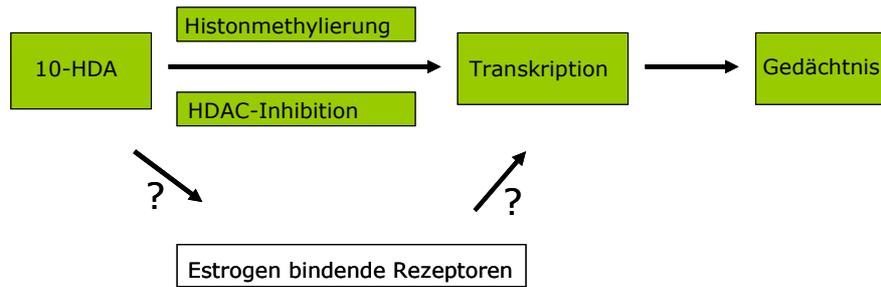


Abb. 5.2: Schema der 10-HDA Wirkung auf das Gedächtnis der Honigbiene

10-HDA mindert die Histondeacetylaseaktivität und die Histonmethylierung, was über einen transkriptionsabhängigen Mechanismus zu einem verbesserten Gedächtnis führen könnte. Ein weiterer möglicher 10-HDA Effekt wäre die Bindung an Estrogen bindende Rezeptoren, die als Transkriptionsfaktoren ebenfalls ein transkriptionsabhängiges Gedächtnis induzieren könnten.

5.7 Nikotinamid in Reizwahrnehmung, Reizprozessierung und nicht-assoziativem Lernen

Es gibt meinen Recherchen nach bisher keine Veröffentlichungen zum Einfluss von Sirtuininhibitoren, also auch nicht von Nikotinamid auf Reizwahrnehmung oder -prozessierung. Daher habe ich zunächst selbst gezeigt, dass nach einer einmaligen Fütterung mit Nikotinamid die Zuckerwasserempfindlichkeit bei verschiedenen Saccharosekonzentrationen und vor allem bei der späteren Trainingskonzentration von 1 M Saccharose unbeeinflusst bleibt. Zudem habe ich mit den nicht-assoziativen Lernparadigmen der Habituation mit anschließender Dishabituation und der Sensitisierung überprüft, ob es Unterschiede in der Reizprozessierung zwischen Nikotinamid behandelten und unbehandelten Kontrolltieren gibt. Dies war nicht der Fall. Es kann jedoch nicht ausgeschlossen werden, dass eine mehrmalige oder höher dosierte Gabe von Nikotinamid Auswirkungen auf die Zuckerwasserempfindlichkeit, oder nicht-assoziative Lernparadigmen hat.

5.8 Nikotinamid in assoziativem Lernen

Bisherige Veröffentlichungen zum Einfluss von Histondeacetylaseinhibitoren auf Lernen und Gedächtnisbildung haben sich in erster Linie mit Hemmstoffen der HDAC-Klassen I und II beschäftigt. So gibt es verschiedene Hinweise zur Wirkung von TSA, Valproat und Natriumbutyrat auf die Akquisition, die Langzeitpotenzierung, die Konditionierung (Angst- und Wimpernschlagkonditionierung) und die Objekterkennung (Bredy et al, 2008; Fontan-Lozano, 2008; Lattal et al., 2007; Levenson et al. 2004; Vecsey et al., 2004). Untersuchungen zu Sirtuinen (HDAC-Klasse III) und deren Inhibitoren auf das Lernen und die Gedächtnisbildung gibt es kaum. Die wenigen Untersuchungen, die an Vertebraten durchgeführt wurden, beschränkten sich zumeist darauf, das Vorhandensein beteiligter Enzyme in verschiedenen Gehirnstrukturen nachzuweisen, eine neuroprotektive Wirkung

zu zeigen oder den Einfluss verschiedener Sirtuin Inhibitoren oder Aktivatoren auf den Erhalt kognitiver Leistungsfähigkeit in neurodegenerativen Erkrankungen zu untersuchen (Abraham et al., 2009; Kumar et al., 2007; Sönmez et al., 2007). Zudem wird in den meisten Studien im Gegensatz zu meiner eigenen Arbeit Nikotinamid nicht einmalig, sondern mehrmalig verfüttert oder injiziert.

Eine einmalige Nikotinamidgabe hat keinen Effekt auf das Gedächtnis nach nicht-assoziativem Lernen ausgeübt, daher ist es möglich, dass NAM sich nicht auf das Lernen selbst, also auch nicht auf das assoziative Lernen, sondern nur auf die Konsolidierung des Gedächtnisses auswirkt. Aus diesem Grund habe ich Nikotinamid nach einem starken Training (Drei-Trial-Training), also nur in der Konsolidierungsphase, gefüttert. Diese Form des Trainings induziert ein lang anhaltendes, starkes Gedächtnis, das bei Honigbienen abhängig von Translations- und Transkriptionsprozessen ist (Wüstenberg et al., 1998; Grünbaum und Müller, 1998). Es zeigte sich, dass eine einmalige Fütterung mit Nikotinamid in der Konsolidierungsphase zu einem signifikant verbesserten Gedächtnis nach 2 h und nach 48 h führt.

Normalerweise würde man erwarten, dass nach einem starken Training das 2 h Gedächtnis sich nicht wesentlich vom dritten Trial und dem 24 h Gedächtnis unterscheidet. Betrachtet man dieses Experiment genauer, so lässt sich erkennen, dass die Nikotinamidgruppe nach 2 h tatsächlich nur ein unwesentlich besseres Gedächtnis als nach dem dritten Trial hat, die Kontrollgruppe hingegen weist ein signifikant niedrigeres Gedächtnis als im dritten Trial und nach 24 h auf. Eine solch niedrige Gedächtnisleistung der Kontrolltiere kann man häufiger beobachten, wenn die Tiere beim Training zu satt sind. Da in einem starken Training drei CS-US-Paarungen durchgeführt werden und die Bienen zudem zusätzlich mit Nikotinamid in 1 M Saccharose gefüttert werden und ich bereits gezeigt habe, dass die Wahrnehmung des Zuckerreizes durch Nikotinamid nicht beeinflusst wird, wäre eine mögliche Erklärung, dass Nikotinamid Einfluss auf den Sättigungszustand der Tiere nimmt. Ich habe zwar keine Unterschiede in der Zuckerwasserempfindlichkeit der Bienen bemerken können, diese haben jedoch weder über Nacht gehungert, noch wurden sie so stark gefüttert wie die Versuchstiere in einem starken assoziativen Training, so dass eventuelle geringfügige Unterschiede im Sättigungszustand zwischen den beiden Gruppen hier unbemerkt hätten bleiben können. Nikotinamid beeinflusst im Gegensatz zu anderen HDAC-Inhibitoren oder -Aktivatoren nicht nur Histondeacetylasen, sondern besitzt darüber hinaus als Bestandteil der Coenzyme NAD und NADP eine große physiologische Bedeutung und hat somit eine direkte Wirkung auf den Energiehaushalt der Zellen. Vorstellbar wären dabei in erster Linie Mechanismen, die auf der Regulation des Glukosespiegels beruhen, da eine enge Beziehung zwischen Sirtuinen und Blutzuckerspiegel in Säugetieren bereits bekannt ist. So konnte gezeigt werden, dass nach einer verminderten Kalorienzufuhr in Mäusen die Proteinexpression der Histondeacetylase

SIRT1 im Hypothalamus und in einzelnen Neuronen, die für das Blutzuckergleichgewicht wichtig sind, stark erhöht war (Ramadori et al., 2008). Aktivatoren der Sirt1 werden daher aktuell auf ihre Wirksamkeit als Mittel zur Bekämpfung von Insulinresistenz getestet (Liang et al., 2009), da schon länger eine Beteiligung der SIRT1 im Lipid- und Glukosestoffwechsel (Rogers et al., 2007) vermutet wird, was sich teilweise zeigen ließ. So kann z.B. die Sirt1 bei erhöhtem Glukosespiegel die Freisetzung von Insulin aus den Pankreaszellen und die Aufnahme von Glukose in insulinsensitive Gewebe fördern, sowie die Glukoneogenese steuern (Liang et al., 2009; Rodgers et al., 2005). Bisher sind in der Biene jedoch nur die Sirtuinhomologe Sirt4,5 und 7 bekannt und ihre Funktion in der Biene nicht aufgeklärt. Die humanen Sirt5 und 7 sind Histondeacetylasen, die humane Sirt4 ist eine mitochondriale ADP-Ribosyltransferase, ohne HDAC-Funktion, die hauptsächlich in den Langerhansschen Inseln vorkommt und eine Rolle in der Insulinsekretion zu haben scheint (Ahuja et al., 2007). Ob die genannten Enzyme der Biene die gleichen Funktionen haben, ist unklar und einer näheren Untersuchung wert.

5.9 Transkriptionsabhängigkeit des Nikotinamid induzierten Gedächtnisses

Es ist nicht anzunehmen, dass sich ein Effekt auf den Glukosespiegel der Versuchstiere auch auf das 48 h Gedächtnis der Bienen ausgewirkt hat, da man einen solch lang anhaltenden Effekt auch nach 24 h beobachten müsste. Hier gab es jedoch keinen signifikanten Unterschied zwischen den Gruppen. Man kann daher annehmen, dass Nikotinamid das 48 h Gedächtnis über einen anderen Wirkmechanismus beeinflusst als das 2 h Gedächtnis. Normalerweise ist das Gedächtnis der Biene 48 h nach einem starken Training translationsabhängig und nach drei Tagen transkriptionsabhängig konsolidiert. Die Gabe von Substanzen, die sich auf die Genexpression auswirken, könnte dazu führen, dass ein verfrühtes transkriptionsabhängiges Gedächtnis sichtbar wird. Da Nikotinamid in seiner Funktion als HDAC-Inhibitor die Histonacetylierung erhöht und damit Transkriptionsprozesse initiieren kann, könnte das verbesserte Gedächtnis 48 h nach Nikotinamid Behandlung auf transkriptionsabhängigen Mechanismen beruhen.

Nach einem schwachen Training, welches normalerweise nur ein kurzfristiges transkriptionsunabhängiges Gedächtnis induziert, zeigte sich keine Veränderung des 2 h Gedächtnisses, aber unerwartet ebenfalls ein verbessertes Gedächtnis nach 48 h. Eine Studie zur Wirkung der HDAC- Inhibitoren Natriumbutyrat und TSA (Federman et al., 2009) hat gezeigt, dass ein starkes Training in Invertebraten zu einer transient erhöhten Acetylierung und damit verbunden zu einem verbesserten Gedächtnis führt. Ein schwaches Training nach Behandlung mit TSA und Natriumbutyrat hatte denselben Effekt. Obwohl Nikotinamid eine andere Klasse von Histondeacetylasen hemmt, könnte der Wirkmechanismus der gleiche sein. Somit könnte Nikotinamid durch seine Fähigkeit HDACs zu hemmen, die

Acetylierung von Histonen in der Konsolidierungsphase verändern, was in der Regel zu einer offenen Chromatinstruktur und einer erhöhten Transkription führt (Abb. 5.3). Über diese erleichterte Transkription könnte auch nach einem schwachen Training ein transkriptionsabhängiges Gedächtnis erzeugt werden, was sich auch durch die von mir gezeigte erhöhte Histonacetylierung 2 h nach Nikotinamid Fütterung erhärten ließe. Daher habe ich durch Injektion mit dem Transkriptionsblocker Actinomycin D bestätigt, dass ein schwaches Training, verbunden mit einer NAM Behandlung, zu einer transkriptionsabhängigen Gedächtnisverbesserung nach 48 h führt.

Dies könnte bedeuten, dass allein die durch Nikotinamid verursachte Histonacetylierung für die transkriptionsabhängige Konsolidierung eines ansonsten transienten Gedächtnisses (nach schwachem Training) sorgt, bzw. zu einer früheren Konsolidierung eines transkriptionsabhängigen Gedächtnisses (nach starkem Training) führt. Man darf dabei jedoch zwei Punkte nicht vergessen, zum einen können Histondeacetylasen auch andere Nicht-Histon-Proteine deacetylieren und Nikotinamid inhibiert nicht nur Histondeacetylasen, sondern auch andere Enzyme, z.B. Poly [ADP-ribose] Polymerasen. Letztere sind für ihre Beteiligung in der Bildung von Langzeitgedächtnissen bekannt (Goldberg et al., 2009; Sung et al., 2004). Es ist daher anzunehmen, dass die Behandlung mit Nikotinamid weitere Signalwege anschaltet, die zu einer erhöhten Transkription führen können und/oder sich auf das Lernen und die Konsolidierung des Gelernten auswirken (Abb. 5.3). Gestützt wird diese Annahme z.B. durch die Entdeckung, dass die durch Nikotinamid hemmbaren Sirtuine Sirt1 und Sirt2 nicht nur über ihre Histondeacetylaseaktivität Einfluss auf die Transkription nehmen, sondern zusätzlich direkt die Aktivität verschiedener Transkriptionsfaktoren steuern können. Zu ihnen gehören z.B. HOXA10 (Bae et al., 2004), die RelA/p65 Untereinheit des Transkriptionsfaktors NFκB (Yeung et al., 2004) und der transkriptionelle Coaktivator p300, der von Sirt2 deacetyliert und damit deaktiviert wird (Black et al., 2008; Bouras et al., 2005). Sowohl der NFκB Signalweg, als auch die p300 sind an Lern- und Gedächtnisprozessen beteiligt (Kaltschmidt et al., 2009; Oliveira et al., 2007; van der Kooij et al., 2010). Sirtuine sind in der Lage Hormonrezeptoren zu regulieren (Fu et al., 2006; Wilson et al., 2010). Zudem gibt es Hinweise darauf, dass bestimmte Histondeacetylasen, u.a. auch die Sirt2, Tubulin deacetylieren können (North et al., 2003), was letztlich zu einem schnelleren Transport neu synthetisierter Proteine in Neuronen und damit zu einer verbesserten Konsolidierung führen könnte. Man kann daher nicht mit Bestimmtheit sagen, dass die Konsolidierung des Gedächtnisses nach Behandlung mit Nikotinamid allein von histonmodifizierenden Prozessen abhängt.

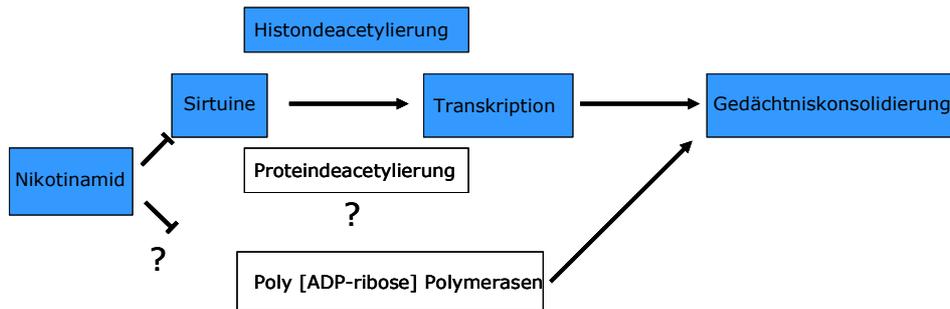


Abb. 5.3: Schema der NAM Wirkung auf die Gedächtniskonsolidierung

Nikotinamid hemmt Sirtuine und könnte über eine verminderte Histondeacetylierung Transkriptionsprozesse erleichtern, was zu einer Gedächtniskonsolidierung führen könnte. Weitere mögliche NAM Effekte wären eine verminderte Deacetylierung von Nicht-Histon-Proteinen und die Hemmung von Poly[ADP-ribose] Polymerasen.

5.10 Fazit

In dieser Arbeit sollte untersucht werden, ob Gelée royale die Aktivität von Histondeacetylase verändert, Einfluss auf Histonmodifikationen nimmt und ob es sich auf die Reizwahrnehmung und das assoziative und nicht-assoziative Lernen der Honigbiene auswirkt. Da Gelée royale eine Mischung unterschiedlichster Substanzen darstellt, stellte sich des Weiteren die Frage, ob sich Einzelsubstanzen identifizieren lassen, die für diese Wirkungen verantwortlich sind.

Weder Gelée royale, noch Nikotinamid, noch 10-HDA wirken sich in den verwendeten Konzentrationen auf die Zuckerwasserempfindlichkeit oder das nicht-assoziative Lernen aus. Nach assoziativem Lernen verbessert Gelée royale das Gedächtnis 24 h und 48 h nach schwachem Training in einem transkriptionsabhängigen Mechanismus. Die beiden untersuchten Substanzen 10-HDA und Nikotinamid verbessern das Gedächtnis nach schwachem Training ebenfalls transkriptionsabhängig, 10-HDA wirkt sich nach 24 h, Nikotinamid nach 48 h aus. Nach einem starken Training zeigen sich nur nach 48 h Effekte bei GR behandelten Tieren und NAM behandelten Tieren. In der mit NAM behandelten Gruppe zusätzlich noch nach 2 h. Ein Drei-Trial Training mit 10-HDA wurde nicht durchgeführt. Daher könnte es sein, dass sich die (chromatinmodifizierenden) Wirkungen von 10-HDA und Nikotinamid auf das transkriptionsabhängige assoziative Lernen im GR addieren (Abb. 5.4). Um dies zweifelsfrei bestätigen zu können, müssten jedoch noch weitere Versuche durchgeführt werden, in denen Versuchstiere mit 10-HDA und NAM zusammen behandelt werden, bzw. eine Gelée royale Fraktion ohne Nikotinamid und 10-HDA verfüttert wird.



Abb. 5.4: Schema zur Wirkung von Gelée royale, NAM und 10-HDA auf das assoziative Lernen

Obiges Schema zeigt die Gedächtnisverbesserung der untersuchten Substanzen GR, NAM und 10-HDA nach assoziativem Lernen. Die farbigen Pfeile stellen die erzielte Gedächtnisverbesserung im Vergleich zu den jeweiligen Kontrollgruppen dar und veranschaulichen eine mögliche additive Wirkung von 10-HDA und NAM.

Sowohl GR, als auch NAM und 10-HDA haben eine chromatinmodifizierende Wirkung und mindern die Deacetylaseaktivität *in vitro*. Dabei sind die jeweiligen Modifikationen an den untersuchten Aminosäureresten, AC-18/ H3, Met-4.1/ H3 und Met-27.3/ H3 nach Behandlung mit den genannten Substanzen sehr unterschiedlich und können nicht allein mit einer additiven oder konkurrierenden Wirkung von NAM und 10-HDA erklärt werden. Daher kann man die Gesamtwirkung von Gelée royale auf Histonmodifikationen nicht gänzlich auf die untersuchten Einzelsubstanzen Nikotinamid und 10-HDA zurückführen. Dies bedeutet, dass es weitere Substanzen in Gelée royale geben muss, die eine Wirkung auf Histonmodifikationen, bzw. histonmodifizierende Enzyme haben. Dabei könnten sowohl Folsäure, als auch Vitamin B12 als wichtige Faktoren zur Bereitstellung von Methylgruppen eine Rolle spielen. Zudem wurde kürzlich ein weiterer HDAC-Inhibitor in Gelée royale entdeckt, das Phenylbutyrat. Es gibt dazu aber bisher keine Publikation, sondern lediglich einen Posterabstract (Burzynski et al., 2008). In Anbetracht der Tatsache, dass bis heute weder die Funktionsweise des GR, noch seine Gesamtzusammensetzung vollständig aufgeklärt sind, könnte es außerdem bisher noch nicht untersuchte, bzw. unbekannte Substanzen geben, die chromatinmodifizierend wirken.

6. Zusammenfassung

Arbeiterbienen und Königinnen haben unterschiedliche Transkriptionsmuster und physiologische Eigenschaften. Da dies durch chromatinmodifizierende Prozesse verursacht werden könnte und die Königinnenentwicklung von einer Fütterung mit Gelée royale (GR) abhängt, habe ich in meiner Dissertation die Frage bearbeitet, ob GR Effekte auf die Chromatinstruktur hat.

Mit biochemischen, immunologischen und verhaltensanalytischen Techniken habe ich an der Honigbiene gezeigt, dass GR die Aktivität von Histondeacetylasen (HDACs) *in vitro* beeinflusst und Histonacetylierungs- und Histonmethylierungsmuster im Gehirn verändert. Da solche Histonmodifikationen auch Lern- und Gedächtnisprozesse beeinflussen, habe ich die Wirkung von GR in Verhaltensexperimenten untersucht. Dabei zeigte sich, dass GR spezifisch und transkriptionsabhängig die Konsolidierung des appetitiven Gedächtnisses nach 24 h und 48 h verbessert. Diese Wirkung kann durch Nikotinamid (NAM) und die 10-Hydroxy-2-decensäure (10-HDA), zwei in GR enthaltenen Substanzen, erklärt werden. Während 10-HDA spezifisch das Gedächtnis nach 24 h verbessert, erhöht NAM spezifisch das Gedächtnis nach 48 h. Sowohl NAM als auch 10-HDA inhibieren HDACs *in vitro* und führen zu veränderten Histonmodifikationen im Gehirn. Im Vergleich zu GR führen NAM und 10-HDA jedoch zu unterschiedlichen Acetylierungs- und Methylierungsmustern. Deshalb ist anzunehmen, dass es weitere Inhaltsstoffe in GR gibt, die sich auf Enzyme auswirken, die für Histonmodifikationen verantwortlich sind. Zusammenfassend zeigen meine Ergebnisse erstmals, dass GR selbst und einzelne Substanzen in GR auf Enzyme wirken, die an der Modifikation der Chromatinstruktur beteiligt sind und dabei physiologische Prozesse wie die Gedächtnisbildung beeinflussen.

7.Summary (Zusammenfassung in englischer Sprache)

Workerbees and queens exhibit different transcription pattern and physiology. Since this is may caused by chromatin modifying processes and due to the fact that queen development is induced by feeding of royal jelly (RJ), I addressed the question whether RJ impacts chromatin structure. Using biochemical, immunological, and behavioural techniques I demonstrated that RJ affects the activity of histon deacetylases (HDACs) *in vitro* and changes the acetylation and methylation pattern of histones in the brain of honeybees. Since such changes affect learning and memory, I tested the effects of RJ on behaviour. The results show that RJ specifically facilitates consolidation of associative appetitive memory at 24 h and 48 h in a transcription dependent manner. The latter effect can be explained by the additive action of nicotinamide (NAM) and 10-hydroxy-2-decenoic acid (10-HDA), two ingredients of RJ. While 10-HDA specifically improves memory tested at 24 h, NAM enhances memory at 48 h in a transcription dependent manner. Both, NAM and 10-HDA inhibit HDACs *in vitro* and influence histone modifications in the brain. As compared to RJ however, NAM and 10-HDA have different effects on the histone acetylation and methylation pattern in the brain. This argues for the existence of additional substances able to act on the machinery that modifies the chromatin structure. Taken together, my results provide first evidence that RJ and distinct substances in RJ act on enzymes involved in the modification of chromatin structure and thus affect physiological processes like memory formation.

8. Verzeichnisse

8.1 Abbildungsverzeichnis

	Seite	
Abb. 1.1 :	In GR eingebettete Königinnenlarven in verschiedenen Larvalstadien	1
Abb. 1.2:	Histonacetylierung und Chromatinstruktur	5
Abb. 1.3:	Lysinmethylierung	8
Abb. 1.4:	Modelle zur synaptischen Plastizität	10
Abb. 1.5:	Appetitive olfaktorische Konditionierung der Honigbiene	14
Abb. 3.1:	Coomassie-Gel zur Kontrolle der GR Trypsinierung	26
Abb. 3.2:	Funktionsweise des HDAC-Assay	27
Abb. 3.3:	Bestimmung der einzusetzenden Menge an Substrat	27
Abb. 3.4:	Die HDAC-Aktivität nimmt linear mit der Enzymmenge ab	28
Abb. 4.1:	Gelée royale verringert die Deacetylaseaktivität <i>in vitro</i>	30
Abb. 4.2:	Histondeacetylaseaktivität nach Fütterung von Gelée royale	31
Abb. 4.3:	Einmalige Fütterung mit GR verändert die Histonacetylierung	32
Abb. 4.4:	Mehrmalige Fütterung mit GR verändert die Histonacetylierung	34
Abb. 4.5:	Einfluss von GR auf die Zuckerwasserempfindlichkeit der Honigbiene	37
Abb. 4.6:	Zeitliche Abfolge der Tests auf Sensitisierung und Habituation der Honigbiene	37
Abb. 4.7:	Einmalige und mehrmalige GR Fütterung verbessern das Gedächtnis der Honigbiene nach schwachem Training	39 40
Abb. 4.8:	Fütterung mit GR in der Konsolidierungsphase führt zur Konsolidierung eines transkriptionsabhängigen Gedächtnisses	40
Abb. 4.9:	GR verbessert das Gedächtnis der Honigbiene nach starkem Training	41
Abb. 4.10:	Einfluss von trypsiniertem Gelée royale auf die Histonacetylierung	43
Abb. 4.11:	Die Wirkung von trypsiniertem GR auf das Gedächtnis nach schwachem Training	44
Abb. 4.12:	GR und seine Lipid-Fraktion mindern die Deacetylaseaktivität <i>in vitro</i>	45
Abb. 4.13:	Histondeacetylaseaktivität im Bienenhirnhomogenat nach Fütterung mit GR und seinen Fraktionen	46
Abb. 4.14:	Einfluss der Gelée royale Fraktionen auf die Histonacetylierung	47
Abb. 4.15:	Die Lipid-Fraktion erhöht die Zuckerwasserempfindlichkeit bei niedriger Saccharosekonzentration	49
Abb. 4.16:	Einfluss der Gelée royale Fraktionen auf Lernen und Gedächtnis der Honigbiene nach schwachem Training	49
Abb. 4.17:	Nikotinamid vermindert die HDAC-Aktivität <i>in vitro</i>	52
Abb. 4.18:	Einfluss von NAM auf die Histonacetylierung	54
Abb. 4.19:	Einfluss von NAM auf die Zuckerwasserempfindlichkeit der Honigbiene	55

Abb. 4.20:	NAM verbessert das 48 h Gedächtnis der Honigbiene nach einem schwachen Training	57
Abb. 4.21:	Transkriptionsabhängigkeit des NAM Effektes nach einem schwachen Training	58
Abb. 4.22:	NAM verbessert das Gedächtnis der Honigbiene nach starkem Training	59
Abb. 4.23:	10-HDA erhöht konzentrationsabhängig die Zuckerwasserempfindlichkeit der Honigbiene	61
Abb. 4.24:	10-HDA verbessert das Gedächtnis der Honigbiene nach einem schwachen Training	63
Abb. 4.25:	Transkriptionsabhängigkeit der 10-HDA induzierten Gedächtnisverbesserung nach einem schwachem Training	64
Abb. 4.26:	10-HDA vermindert die Histondeacetylaseaktivität <i>in vitro</i>	65
Abb. 5.1:	Schema der GR Wirkung auf das Gedächtnis der Honigbiene	71
Abb. 5.2:	Schema der 10-HDA Wirkung auf das Gedächtnis der Honigbiene	76
Abb. 5.3:	Schema der NAM Wirkung auf die Gedächtniskonsolidierung	80
Abb. 5.4:	Schema zur Wirkung von Gelée royale, NAM und 10-HDA auf das assoziative Lernen	81

8.2 Tabellenverzeichnis

Tab. 1.1:	Hauptkomponenten des Gelée royale (Bogdanov et al. 2003)	3
Tab. 4.1:	Eine einmalige Fütterung mit GR verändert die Histonmethylierung	33
Tab. 4.2:	Eine mehrmalige Fütterung mit GR verändert die Histonmethylierung	34
Tab. 4.3:	Einfluss von mehrmaliger GR Fütterung auf die Histonacetylierung und -methylierung frisch geschlüpfter Bienen	35
Tab. 4.4:	GR hat keinen Einfluss auf Habituation und Sensitisierung der Honigbiene	38
Tab. 4.5:	Einfluss von trypsiniertem Gelée royale auf die Histonmethylierung	43
Tab. 4.6:	Einfluss einmaliger Fütterung von GR und seiner Fraktionen auf die Histonmethylierung	48
Tab. 4.7:	Histondeacetylaseaktivität des Bienenhirnhomogenates nach Fütterung von NAM	53
Tab. 4.8:	Einfluss von NAM auf die Histonmethylierung	54
Tab. 4.9:	NAM hat keinen Einfluss auf Habituation und Sensitisierung der Honigbiene	56
Tab. 4.10:	Die Injektion von 10-HDA verändert weder Habituation noch Sensitisierung der Honigbiene	62

Tab. 4.11:	Die Injektion von 10-HDA hat keinen Einfluss auf die HDAC-Aktivität	66
Tab. 4.12:	Einfluss von 10-HDA auf die Histonacetylierung und -methylierung	67

8.3 Literaturverzeichnis

- **Abel T, Kandel E.:** " Positive and negative regulatory mechanisms that mediate long-term memory storage 1." Brain Research Reviews 26 _1998. 360–378
- **Abel, T., Martin, K.C., Bartsch, D., Kandel, E.R.:** "Memory suppressor genes: inhibitory constraints on the storage of long-term memory." Science (1998) 279(5349): 338-341
- **Abraham J, Johnson RW.:** "Consuming a diet supplemented with resveratrol reduced infection-related neuroinflammation and deficits in working memory in aged mice." Rejuvenation Res. 2009 Dec;12(6):445-53.
- **Akbarian S, Huang:** "HS Epigenetic regulation in human brain-focus on histone lysine methylation." Biol Psychiatry.2009 Feb 1;65(3):198-203. Epub 2008 Sep 24.
- **Alarcon, J.M., Malleret G., Touzani K., Vronskaya S., Ishii S., Kandel E.R. and A. Barco:** "Chromatin acetylation, memory, and LTP are impaired in CBP+/- mice: a model for the cognitive deficit in Rubinstein-Taybi syndrome and its amelioration." Neuron, (2004). 42(6): p. 947-59.
- **Angelo M, Plattner F, Irvine EE, Giese KP.:** "Improved reversal learning and altered fear conditioning in transgenic mice with regionally restricted p25 expression." Eur J Neurosci. 2003 Jul;18(2):423-31.
- **Antinelli J.F., Zeggane S., Davic R., Rogone C., Faucon J.P., Lizzani L.:** "Evaluation of (E)-10-hydroxydec-2-enoic acid as a freshness parameter for royal jelly."(2003) Food Chemistry 80(1): 85-89.
- **ARONICA SUSAN M., W. LEE KRAUS, AND BENITA S. KATZENELLENBOGEN:** „Estrogen action via the cAMP signaling pathway: Stimulation of Adenylyle cyclase and cAMP-regulated gene transcription."Proc. Nati. Acad. Sci. USA Vol. 91, pp. 8517-8521, August 1994 Cell Biology

- **Asencot M., Lensky Y.:** "The effect of soluble sugars in stored royal jelly on the differentiation of the female honeybee larvae (*Apis mellifera* L.) to queens." *Life Sciences* (1988), 18(7): 693-700.
- **Asencot M., Lensky Y.:** " The effect of sugars and juvenile hormone on the differentiation of the female honeybee larvae (*Apis mellifera* L.) to queens." *Life Sciences* (1976), 18(7): 693-700.
- **Avalos JL, Bever KM, Wolberger C.:** " Mechanism of sirtuin inhibition by nicotinamide: altering the NAD(+) cosubstrate specificity of a Sir2 enzyme. *Mol Cell*.2005 Mar 18;17(6):855-68.
- **Bacskai, B.J., B. Hochner, M. Mahaut-Smith, S.R. Adams, B.K. Kaang, E.R. Kandel, and R.Y. Tsien:** " Spatially resolved dynamics of cAMP and protein kinase A subunits in *Aplysia* sensory neurons." *Science*, (1993). 260(5105): p. 222-6.
- **Bae NS, Swanson MJ, Vassilev A, Howard BH.:** "Human histone deacetylase SIRT2 interacts with the homeobox transcription factor HOXA10." *J Biochem*. 2004 Jun;135(6):695-700.
- **Bailey, C.H. and E.R. Kandel:** *Structural changes accompanying memory storage*. *Annu Rev Physiol*, (1993). 55: p. 397-426.
- **Balasubramanyam K, Altaf M, Varier RA, Swaminathan V, Ravindran A, Sadhale PP, Kundu TK.:** " Polyisoprenylated benzophenone, garcinol, a natural histone acetyltransferase inhibitor, represses chromatin transcription and alters global gene expression. *J Biol Chem*. 2004a Aug 6;279(32):33716-26.
- **Balasubramanyam K, Varier RA, Altaf M, Swaminathan V, Siddappa NB, Ranga U, Kundu TK.:** "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*. 2004b Dec3; 279(49):51163-71.
- **Balasubramanyam K, Swaminathan V, Ranganathan A, Kundu TK.:** " Small molecule modulators of histone acetyltransferase p300." *J Biol Chem*. 2003 May 23;278(21):19134-40.

- **Bannister, A. J., R. Schneider, et al.** "Histone methylation: dynamic or static?" (2002)Cell 109(7): 801-6.

- **Bardet PL, Laudet V, Vanacker JM.:** "Studying non-mammalian models? Not a fool's ERRand!" Trends Endocrinol Metab. 2006 May-Jun;17(4):166-71. Epub 2006 Mar 31.

- **Barha CK, Dalton GL, Galea LA.:** "Low doses of 17alpha-estradiol and 17beta-estradiol facilitate, whereas higher doses of estrone and 17alpha- and 17beta-estradiol impair, contextual fear conditioning in adult female rats." Neuropsychopharmacology.2010 Jan;35(2):547-59.

- **Bicker, G. and I. Hahnlein:** "Long-term habituation of an appetitive reflex in the honeybee." Neuroreport, (1994). 6(1): p. 54-6.

- **Black JC, Mosley A, Kitada T, Washburn M, Carey M.:** "The SIRT2 deacetylase regulates autoacetylation of p300." Mol Cell. 2008 Nov 7;32(3):449-55.

- **Bloodworth BC, Harn CS, Hock CT, Boon YO.:** "Liquid chromatographic determination of trans-10-hydroxy-2-decenoic acid content of commercial products containing royal jelly." J AOAC Int. 1995 Jul-Aug;78(4):1019-23.

- **BLUM MS, NOVAK AF, TABER S 3rd.:** "10-Hydroxy-delta 2-decenoic acid, an antibiotic found in royal jelly." Science. 1959 Aug 21;130(3373):452-3

- **Bonomi A., Marletto F. Luccelli L., Anghinetti A., Bonomi A., Sabbioni A.** "Composizione chimico-bromatologica della gelatina reale in rapporto alla flora-nettarifera e pollinifera." (1986) Riv. Ital. Sc. Alim. 15: 53-62.

- **Bogdanov, S., Matzke, A.:** „Gelée Royale - ein Futtersaft mit Formkräften." Fachschriftenverlag VDRB, Winikon, Switzerland, 4, 73-78 (2003)

- **Bolden, J.E., M.J. Peart, and R.W. Johnstone:** "Anticancer activities of histone deacetylase inhibitors." Nat Rev Drug Discov, (2006). 5(9): p. 769-84.

- **Bourtchuladze, R., Frenguelli B., Blendy J., Cioffi D., Schutz G., and Silva A.J.:** "Deficient long-term memory in mice with a targeted mutation of the cAMP-responsive element-binding protein." *Cell*, (1994). 79(1): p. 59-68.

- **Brankatschk M, Eaton S.:** "Lipoprotein particles cross the blood-brain barrier in Drosophila." *J Neurosci*. 2010 Aug 4;30(31):10441-7.

- **Bredy, T.W. and M. Barad:** "The histone deacetylase inhibitor valproic acid enhances acquisition, extinction, and reconsolidation of conditioned fear." *Learn Mem*,(2008). 15(1): p. 39-45.

- **Brito RM, McHale M, Oldroyd BP:** " Expression of genes related to reproduction and pollen foraging in honey bees (*Apis mellifera*) narcotized with carbon dioxide." *Insect Mol Biol*.2010 Aug;19(4):451-61. Epub 2010 Mar 31.

- **Burzynski, Patila S., Ilkowska-Musiala E., Chittur S., Gupta V., Sarang, R.:** „Pathway analysis of the effect of chromatin remodeling agent phenylbutyrate on the brains of honeybees." Society for Neuroscience, Washington 2008, Abstract 494.2/UU42

- **CHABAN VICTOR V., ALEXANDER J. LAKHTER, AND PAUL MICEVYCH:** "A Membrane Estrogen Receptor Mediates Intracellular Calcium Release in Astrocytes." *Endocrinology*. 2004 Aug;145(8): 3788-95. Epub 2004 May 6.

- **Cooney CA, Dave AA, Wolff GL.:** "Maternal methyl supplements in mice affect epigenetic variation and DNA methylation of offspring." *J Nutr*. 2002 Aug;132(8 Suppl):2393S-2400S.

- **Crailsheim K.:** "Trophallactic interactions in the adult Honey-bee." *Apidologie*29(1998)97-112. - Honey bee

- **Cuthbert G.L., Daujat, S., Snowden A.W., Erdjument-Bromage H., Hagiwara T., Yamada M., Schneider R.,Gregory P.D., Tempst P., Bannister, A.J.,Kouzarides, T.:** "Histone deimination antagonizes arginine methylation." (2004)*Cell* 118, 545–553.

- **Da Li, Wu-Ping Sun, Yi-Ming Zhou, Qi-Gui Liu, Shi-Sheng Zhou, Ning Luo, Fu-Ning Bian, Zhi-Gang Zhao, and Ming Guo:** "Chronic niacin overload may be

involved in the increased prevalence of obesity in US children World." J Gastroenterol. 2010 May 21; 16(19): 2378–2387.

- **Dash PK, Orsi SA, Zhang M, Grill RJ, Pati S, Zhao J, Moore AN:** "Valproate administered after traumatic brain injury provides neuroprotection and improves cognitive function in rats. PLoS One.2010 Jun 30;5(6):e11383
- **Davis CD, Uthus EO:** "DNA methylation, cancer susceptibility, and nutrient interactions." Exp Biol Med (Maywood).2004 Nov;229(10):988-95.
- **Dimri M, Bommi PV, Sahasrabudde AA, Khandekar JD, Dimri GP.:** "Dietary omega-3 polyunsaturated fatty acids suppress expression of EZH2 in breast cancer cells." Carcinogenesis. 2010 Mar;31(3):489-95. Epub 2009 Dec 7.
- **D'Mello SR.:** "Histone deacetylases as targets for the treatment of human neurodegenerative diseases." Drug News Perspect. 2009 Nov;22(9):513-24.
- **Dubnau J, Tully T:** "Gene discovery in Drosophila: new insights for learning and memory." (1998) Annu Rev Neurosci 21:407–444
- **Dudai, Y., Y.N. Jan, D. Byers, W.G. Quinn, and S. Benzer:** "dunce, a mutant of Drosophila deficient in learning." Proc Natl Acad Sci U S A, (1976). 73(5): p. 1684-8.
- **Eissenberg JC, Shilatifard A.:** "Histone H3 lysine 4 (H3K4) methylation in development and differentiation." Dev Biol. 2010 Mar 15;339(2):240-9. Epub 2009 Aug 21.
- **Erber J 1981.:** Neural correlates of learning in the honeybee Trends in Neurosciences Volume 41981, Pages 270-273
- **Evans JD, Wheeler DE.:** " Expression profiles during honeybee caste determination." Genome Biol. 2001;2(1)
- **Evans JD, Wheeler DE.:** "Differential gene expression between developing queens and workers in the honey bee, Apis mellifera." Proc Natl Acad Sci U S A. 1999 May 11;96(10):5575-80.

- **Fahrbach SE, Giray T, Robinson GE.:** "Volume changes in the mushroom bodies of adult honey bee queens." *Neurobiol Learn Mem.* 1995 Mar;63(2):181-91.

- **Federman N, Fustiñana MS, Romano A:** "Histone acetylation is recruited in consolidation as a molecular feature of stronger memories." *Learn Mem.* 2009 Sep 30;16(10):600-6. Print 2009.

- **Fontana R, Mendes MA, de Souza BM, Konno K, César LM, Malaspina O, Palma MS.:** "Jelleines: a family of antimicrobial peptides from the Royal Jelly of honeybees (*Apis mellifera*)." *Peptides.* 2004 Jun;25(6):919-28.

- **Fontan-Lozano, A., R. Romero-Granados, J. Troncoso, A. Munera, J.M. Delgado-Garcia, and A.M. Carrion:** "Histone deacetylase inhibitors improve learning consolidation in young and in KA-induced-neurodegeneration and SAMP-8-mutant mice." *Mol Cell Neurosci,* (2008). 39(2): p. 193-201

- **Friedrich, A., U. Thomas, and U. Muller:** " Learning at different satiation levels reveals parallel functions for the cAMP-protein kinase A cascade in formation of long-term memory." *J Neurosci,* (2004). 24(18): p. 4460-8.

- **Fronte B, Paci G, Montanari G, Bagliacca M.:** "Learning ability of 1-d-old partridges (*Alectoris rufa*) from eggs laid by hens fed with different n-3 fatty acid concentrations." *Br Poult Sci.* 2008 Nov;49(6):776-80.

- **Fujiwara S., Imai J., Fujiwara M., Yaeshima T., Kawashima T., and Kobayashi K.:** "A potent antibacterial protein in royal jelly. purification and determination of the primary structure of royalisin." *J Biol Chem,* 265(19):11333–11337, Jul 1990.

- **Fuks, F.:** "DNA methylation and histone modifications: teaming up to silence genes." *Curr Opin Genet Dev,* (2005). 15(5): p. 490-5.

- **Green KN, Steffan JS, Martinez-Coria H, Sun X, Schreiber SS, Thompson LM, LaFerla FM:** "Nicotinamide restores cognition in Alzheimer's disease transgenic mice via a mechanism involving sirtuin inhibition and selective reduction of Thr231-phosphotau." *J Neurosci.* 2008 Nov 5;28(45):11500-10.

- **Goldberg S, Visochek L, Giladi E, Gozes I, Cohen-Armon M.:** "PolyADP-ribosylation is required for long-term memory formation in mammals." *J Neurochem.* 2009 Oct;111(1):72-9. Epub 2009 Jul 23.

- **Grozinger CM, Fan Y, Hoover SE, Winston ML.:** "Genome-wide analysis reveals differences in brain gene expression patterns associated with caste and reproductive status in honey bees (*Apis mellifera*)." *Mol Ecol.* 2007 Nov;16(22):4837-48. Epub 2007 Oct 9.

- **Grünbaum, L., Müller, U.:** "Induction of a specific olfactory memory leads to a longlasting activation of protein kinase C in the antennal lobe of the honeybee." *JNeurosci.* **18**: 4384-4892 (1998).

- **Gupta S, Kim SY, Artis S, Molfese DL, Schumacher A, Sweatt JD, Paylor RE, Lubin FD:** "Histone methylation regulates memory formation." *J Neurosci.* 2010 Mar 10;30(10):3589-99.

- **Harting K, Knöll B.:** "SIRT2-mediated protein deacetylation: An emerging key regulator in brain physiology and pathology." *Eur J Cell Biol.* 2010 Feb-Mar;89(2-3):262-9. Epub 2009 Dec 11.

- **Hattori N, Nomoto H, Fukumitsu H, Mishima S, Furukawa S. (2007):** "Royal jelly and its unique fatty acid, 10-hydroxy-trans-2-decenoic acid, promote neurogenesis by neural stem/progenitor cells in vitro." *Biomedical Research* 28: 261-266

- **HAYDAK M.H.:** "HONEY BEE NUTRITION." *Annu. Rev. Entomol.* 1970.15:143-156

- **Haydak M.H.:** "Larval food and development of castes in the honey-bee." (1943) *J.Econ. Entomol.* 36: 778-792.

- **Haydak M.H., Palmer L.S.:** " Royal jelly and bee bread as sources of vitamins B1, B2, B6, C and nicotinic and pantothenic acids," (1942) in *J. Econ. Entomol.* 35: 319-320.

- **Hebb, D.:** "The Organization of Behavior: a neuropsychological approach. (1949),New York: Wiley."

- **Heinrichs SC:** "Dietary omega-3 fatty acid supplementation for optimizing neuronal structure and function." *Mol Nutr Food Res.* 2010 Apr;54(4):447-56.
- **Hoane MR, Pierce JL, Holland MA, Anderson GD.:** "Nicotinamide treatment induces behavioral recovery when administered up to 4 hours following cortical contusion injury in the rat." *Neuroscience.* 2008 Jun 26;154(3):861-8. Epub 2008 May 2.
- **Hoane MR, Tan AA, Pierce JL, Anderson GD, Smith DC.:** "Nicotinamide treatment reduces behavioral impairments and provides cortical protection after fluid percussion injury in the rat." *J Neurotrauma.* 2006 Oct;23(10):1535-48.
- **Hoane MR, Akstulewicz SL, Toppen J.:** "Treatment with vitamin B3 improves functional recovery and reduces GFAP expression following traumatic brain injury in rats." *J Neurotrauma.* 2003 Nov;20(11):1189-99.
- **Huang CC, Lee CC, Hsu KS.:** "The role of insulin receptor signaling in synaptic plasticity and cognitive function." *Chang Gung Med J.* 2010 Mar-Apr;33(2):115-25.
- **Hsieh J, Eisch AJ:** "Epigenetics, hippocampal neurogenesis, and neuropsychiatric disorders: unraveling the genome to understand the mind." *Neurobiol Dis.* 2010 Jul;39(1):73-84. Epub 2010 Jan 28.
- **Imai S, Guarente L.:** "Ten years of NAD-dependent SIR2 family deacetylases: implications for metabolic diseases." *Trends Pharmacol Sci.* 2010 May;31(5):212-20. Epub 2010 Mar 11.
- **Imhof A, Becker PB:** "Modifications of the histone N-terminal domains. Evidence for an "epigenetic code"?" *Mol Biotechnol.* 2001 Jan;17(1):1-13.
- **Izquierdo, I., Bevilacqua, L.R., Rossato, J.I., Bonini, J.S., Medina, J.H., Cammarota, M. (2006):** "Different molecular cascades in different sites of the brain control memory consolidation." *Trends Neurosci* 29(9): 496-505.
- **Jenuwein, T. and Allis C. D.:** "Translating the histone code." (2001). *Science* 293(5532):1074-80.

- **Jones P.L., Veenstra G.J., Wade P.A., Vermaak D., Kass S.U., Landsberger N., Strouboulis J. and Wolffe A.P.:** "Methylated DNA and MeCP2 recruit histone deacetylase to repress transcription." *Nat Genet*, (1998). 19(2): p. 187-91.
- **Kaltschmidt B, Kaltschmidt C.:** „NF-kappaB in the nervous system.“ *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2009 Sep;1(3):a001271.
- **Kamakura M, Maebuchi M, Ozasa S, Komori M, Ogawa T, Sakaki T, Moriyama T.:** „Influence of royal jelly on mouse hepatic gene expression and safety assessment with a DNA microarray.“ *J Nutr Sci Vitaminol (Tokyo)*. 2005 Jun;51(3):148-55.
- **Kamakura M., Mitani N., Fukuda T. and Fukushima M.:** "Antifatigue effect of fresh royal jelly in mice." *J Nutr Sci Vitaminol (Tokyo)*, 47(6):394–401, Dec 2001.
- **Kandel ER, Hawkins R.D.:** „molekulare Grundlagen des Lernens.“ *Spektrum der Wissenschaft*, Nov. 1992
- **Kandel ER, Tauc L.:** "Prolonged increase in the efficiency of an efferent pathway of an isolated ganglion after the coupled activation of a more effective tract." *J Physiol (Paris)*.1963;55:271-2.
- **Kilgore M, Miller CA, Fass DM, Hennig KM Haggarty SJ, Sweatt JD, Rumbaugh G:** "Inhibitors of class 1 histone deacetylases reverse contextual memory deficits in a mouse model of Alzheimer's disease." *Neuropsychopharmacology*. 2010 Mar;35(4):870-80. Epub 2009 Dec 9.
- **Kim JK, Samaranayake M, Pradhan S.:** "Epigenetic mechanisms in mammals." *Cell Mol Life Sci*. 2009 Feb;66(4):596-612. Review.
- **Kirkbride-Smith AE, Bell HA, Edwards JP.:** "Effects of three vertebrate hormones on the growth, development, and reproduction of the tomato moth, *Lacanobia oleracea* L. (Lepidoptera: Noctuidae)." *Environ Toxicol Chem*. 2001 Aug;20(8):1838-45.

- **Klein, M. and E.R. Kandel:** " Mechanism of calcium current modulation underlying presynaptic facilitation and behavioral sensitization in *Aplysia*." Proc Natl Acad Sci US A, (1980). 77(11): p. 6912-6.
- **Klose RJ., Zhang Y.:** "Regulation of histone methylation by demethyliminon and demethylation." Nat Rev Mol Cell Biol.2007 Apr;8(4):307-18. Epub 2007 Mar 7."
- **Korzus E., Rosenfeld M.G. and Mayford M.:** " CBP histone acetyltransferase activity is a critical component of memory consolidation." Neuron, (2004). 42(6): p.961-72.
- **Kowalczyk WJ, Sullivan MA, Evans SM, Bisaga AM, Vosburg SK, Comer SD.:** " Sex differences and hormonal influences on response to mechanical pressure pain in humans." J Pain. 2010 Apr;11(4):330-42. Epub 2009 Oct 22.
- **Koya-Miyata S, Okamoto I, Ushio S, Iwaki K, Ikeda M, Kurimoto M:** " Identification of a collagen production-promoting factor from an extract of royal jelly and its possible mechanism." Biosci Biotechnol Biochem.2004 Apr;68(4):767-73
- **Kouzarides T.:** "Chromatin Modifications and Their Function." . Cell. 2007;128:693–705.
- **Kramer KJ, Tager HS, Childs CN, Speirs RD.:** „Insulin-like hypoglycemic and immunological activities in honeybee royal jelly." J Insect Physiol. 1977;23(2):293-5
- **Kucharski R, Maleszka J, Foret S, Maleszka R.:** " Nutritional control of reproductive status in honeybees via DNA methylation." Science. 2008 Mar 28;319(5871):1827-30. Epub 2008 Mar 13.
- **Kucharski R., R. Maleszka, D. C. Hayward and E. E. Ball:** " A Royal Jelly Protein Is Expressed in a Subset of Kenyon Cells in the Mushroom Bodies of the Honey Bee Brain." SHORT COMMUNICATIONS
- **Kumar A, Naidu PS, Seghal N, Padi SS.:** "Neuroprotective effects of resveratrol against intracerebroventricular colchicine-induced cognitive impairment and oxidative stress in rats. " Pharmacology. 2007;79(1):17-26. Epub 2006 Nov 28.

- **Kuwabara M.:** " Bildung des bedingten Reflexes von Pavlovs Typus bei der Honigbiene, *Apis mellifica*." (1957) *J Fac Sci Hokkaido Univ Zool* 13:458-464.
- **Lane AA, Chabner BA.:** " Histone deacetylase inhibitors in cancer therapy." *J Clin Oncol*. 2009 Nov 10;27(32):5459-68. Epub 2009 Oct 13.
- **Lattal, K.M., R.M. Barrett, and M.A. Wood:** " Systemic or intrahippocampal delivery of histone deacetylase inhibitors facilitates fear extinction." *Behav Neurosci*, (2007).121(5): p. 1125-31.
- **Lee JY, Ahn K, Jang BG, Park SH, Kang HJ, Heo JI, Ko YJ, Won MH, Tae-Cheon Kang, Jo SA, Kim MJ.:** "Nicotinamide reduces dopamine in postnatal hypothalamus and causes dopamine-deficient phenotype." *Neurosci Lett*. 2009 Sep 18;461(2):163-6. Epub 2009 Jun 17.
- **Kocher Sarah D, Freddie-Jeanne Richard, David R Tarpy, and Christina M Grozinger:** "Genomic analysis of post-mating changes in the honey bee queen (*Apis mellifera*)." *BMC Genomics*. 2008; 9: 232.
- **Leipe, D.D. and D. Landsman:** " Histone deacetylases, acetoin utilization proteins and acetylpolyamine amidohydrolases are members of an ancient protein superfamily." *Nucleic Acids Res*, (1997). 25(18): p. 3693-7.
- **Lercker G., Caboni M. F., Vecchi M. A., Sabatini A. G., Nanetti A.:** "Caratterizzazione dei principali costituenti della gelatina reale." (1993):*Apicoltura*: 827-37
- **Leuner B, Mendolia-Loffredo S, Shors TJ.:** "High levels of estrogen enhance associative memory formation in ovariectomized females." *Psychoneuroendocrinology*. 2004 Aug;29(7):883-90.
- **Levenson, J.M., Roth T.L., Lubin F.D., Miller C.A., Huang I.C., Desai P., Malone L.M, and J.D. Sweatt:** "Evidence that DNA (cytosine-5) methyltransferase regulates synaptic plasticity in the hippocampus." *J Biol Chem*, (2006). 281(23): p.15763-73.

- **Levenson, J.M., K.J. O'Riordan, K.D. Brown, M.A. Trinh, D.L. Molfese, J.D.Sweatt:** "Regulation of histone acetylation during memory formation in the hippocampus." *J Biol Chem*, (2004). 279(39): p. 40545-59.

- **Li Da, Wu-Ping Sun, Yi-Ming Zhou, Qi-Gui Liu, Shi-Sheng Zhou, Ning Luo, Fu-Ning Bian, Zhi-Gang Zhao, and Ming Guo:** "Chronic niacin overload may be involved in the increased prevalence of obesity in US children." *World J Gastroenterol*. 2010 May 21; 16(19): 2378–2387.

- **Li J, Wang T, Zhang Z, Pan Y.:** "Proteomic analysis of royal jelly from three strains of western honeybees (*Apis mellifera*)." *J Agric Food Chem*. 2007 Oct 17;55(21):8411-22.

- **Liang F, Kume S, Koya D.:** "SIRT1 and insulin resistance." *Nat Rev Endocrinol*. 2009 Jul;5(7):367-73. Epub 2009 May 19.

- **Lin CH, Tomioka M, Pereira S, Sellings L, Iino Y, van der Kooy D.:** "Insulin signaling plays a dual role in *Caenorhabditis elegans* memory acquisition and memory retrieval." *J Neurosci*. 2010 Jun 9;30(23):8001-11.

- **Liu J, Head E, Gharib AM, Yuan W, Ingersoll RT, Hagen TM, Cotman CW, Ames BN.:** "Memory loss in old rats is associated with brain mitochondrial decay and RNA/DNA oxidation: partial reversal by feeding acetyl-L-carnitine and/or R-alpha -lipoic acid." *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2002 Feb 19;99(4):2356-61. Erratum in: *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002 May 14;99(10):7184-5.

- **Lockett G., Helliwell P. and Maleszka R.:** "Involvement of DNA methylation in memory processing in the honey bee." *Neuroreport* 2010 21: 812-816

- **Lu Q, Yang YT, Chen CS, Davis M, Byrd JC, Etherton MR, Umar A, Chen CS.:** "Zn²⁺-chelating motif-tethered short-chain fatty acids as a novel class of histone deacetylase inhibitors." *J Med Chem*. 2004 Jan 15;47(2):467-74.

- **Maglich JM, Sluder A, Guan X, Shi Y, McKee DD, Carrick K, Kamdar K, Willson TM, Moore JT.:** "Comparison of complete nuclear receptor sets from the human, *Caenorhabditis elegans* and *Drosophila* genomes." *Genome Biology*. 2001;2:0029.1–0029.7

- **Mansuy I.M. and Shenolikar S.:** "Protein serine/threonine phosphatases in neuronal plasticity and disorders of learning and memory" *Trends Neurosci*, (2006). 29(12): p.679-86.

- **Menzel R., Muller U.:** "Learning and memory in honeybees: from behavior to neural substrates." *Annu Rev Neurosci*. 1996;19:379-404. Review.

- **Michán S, Li Y, Chou MM, Parrella E, Ge H, Long JM, Allard JS, Lewis K, Miller M, Xu W, Mervis RF, Chen J, Guerin KI, Smith LE, McBurney MW, Sinclair DA, Baudry M, de Cabo R, Longo VD.:** "SIRT1 is essential for normal cognitive function and synaptic plasticity." *J Neurosci*. 2010 Jul 21;30(29):9695-707.

- **Milgram NW, Araujo JA, Hagen TM, Treadwell BV, Ames BN.:** "Acetyl-L-carnitine and alpha-lipoic acid supplementation of aged beagle dogs improves learning in two landmark discrimination tests." *FASEB J*. 2007 Nov;21(13):3756-62. Epub 2007 Jul 10.

- **Miller, C.A. and J.D. Sweatt:** " Covalent modification of DNA regulates memory-formation." *Neuron*, (2007). 53(6): p. 857-69.

- **Mishima S, Suzuki KM, Isohama Y, Kuratsu N, Araki Y, Inoue M, Miyata T.:** "Royal jelly has estrogenic effects in vitro and in vivo." *J Ethnopharmacol*. 2005 Oct 3;101(1-3):215-20.

- **Monneret C.:** "Histone deacetylase inhibitors." *Eur J Med Chem*. 2005 Jan;40(1):1-13. Review.

- **Monti B, Polazzi E, Contestabile A.:** " Biochemical, molecular and epigenetic mechanisms of valproic acid neuroprotection." *Curr Mol Pharmacol*. 2009 Jan;2(1):95-109.

- **Morley JE, Banks WA.:** "Lipids and cognition." *J Alzheimers Dis*. 2010;20(3):737-47.

- **Müller U.:** "Prolonged Activation of cAMP-Dependent Protein Kinase during Conditioning Induces Long-Term Memory in Honeybees." *Neuron*, Vol. 27, 159–168, July, 2000

- **Müller, U.:** "Inhibition of nitric oxide synthase impairs a distinct form of long-term memory in the honeybee, *Apis mellifera*." *Neuron* 16: 541-549 (1996).
- **Münstedt K, Bargello M, Hauenschild A.:** " Royal jelly reduces the serum glucose levels in healthy subjects." *J Med Food*. 2009 Oct;12(5):1170-2.
- **Nakaya M, Onda H, Sasaki K., Yukiyoishi A, Tachibana H, Yamada K:** " Effect of royal jelly on bisphenol A-induced proliferation of human breast cancer cells." *Biosci Biotechnol Biochem*.2007 Jan;71(1):253-5. Epub 2007 Jan 7.
- **North Brian J, Brett L Marshall, Margie T Borra, John M Denu and Eric Verdin:** "The Human Sir2 Ortholog, SIRT2, Is an NAD⁺-Dependent Tubulin Deacetylase." *Molecular Cell*, Volume 11, Issue 2, 437-444, 1 February 2003
- **Oliveira AM, Wood MA, McDonough CB, Abel T.:** "Transgenic mice expressing an inhibitory truncated form of p300 exhibit long-term memory deficits." *Learn Mem*. 2007 Aug 29;14(9):564-72. Print 2007 Sep.
- **Page RE, Erber J, & Fondrak MK:** "The effect of genotype on response thresholds to sucrose and foraging behavior of honey bees (*Apis mellifera* L.)." (1998). *J Comp Physiol A* 182: 489-500.
- **Pan Y, Larson B, Araujo JA, Lau W, de Rivera C, Santana R, Gore A, Milgram NW.:** " Dietary supplementation with medium-chain TAG has long-lasting cognition-enhancing effects in aged dogs." *Br J Nutr*. 2010 Jun;103(12):1746-54. Epub 2010 Feb 9.
- **Pankiw T & Page RE (1999).:** "The effect of genotype, age, sex, and caste on response thresholds to sucrose and foraging behavior of honey bees (*Apis mellifera* L.)." *J Comp Physiol A* 185: 207-213.
- **Pavlov, I.P.:** *Conditioned Reflexes: An Investigation of the Physiological Activity of the Cerebral Cortex*. (1927), London: Oxford University Press.
- **Peixoto LG, Calábria LK, Garcia L, Capparelli FE, Goulart LR, de Sousa MV, Espindola FS.:** "Identification of major royal jelly proteins in the brain of the

honeybee *Apis mellifera*. " *J Insect Physiol.* 2009 Aug;55(8):671-7. Epub 2009 May 30.

- **Peters, M., Mizuno, K., Ris, L., Angelo, M., Godaux, E., Giese, K.P.:** " Loss ofCa²⁺/calmodulin kinase kinase beta affects the formation of some, but not all types of hippocampus-dependent long-term memory." (2003): *J Neurosci* 23(30): 9752–9760.
- **Pinilla FG:** " The impact of diet and exercise on brain plasticity and disease." *Nutr Health* 2006;18(3):277-84.
- **Quigley A, Tan AA Hoane MR.:** "The effects of hypertonic saline and nicotinamide on sensorimotor and cognitive function following cortical contusion injury in the rat." *Brain Res.* 2009 Dec 22;1304:138-48. Epub 2009 Sep 23.
- **Rachinsky A, Strambi C, Strambi A, Hartfelder K.:** "Caste and metamorphosis: hemolymph titers of juvenile hormone and ecdysteroids in last instar honeybee larvae." *Gen Comp Endocrinol.* 1990 Jul;79(1):31-8.
- **Ramadori G, Lee CE, Bookout AL, Lee S, Williams KW, Anderson J, Elmquist JK, Coppari R. Brain:** "SIRT1: anatomical distribution and regulation by energy availability." *J Neurosci.* 2008 Oct 1;28(40):9989-96.
- **Rembold H, Hanser G.:** "On the royal jelly of honey bees. Demonstration of the determining principle in the jelly of queen bee larvae." *Hoppe Seylers Z Physiol Chem.* 19
- **Rodgers JT, Lerin C, Haas W, Gygi SP, Spiegelman BM, Puigserver P.:** "Nutrient control of glucose homeostasis through a complex of PCG-1 α and SIRT1." *Nature.* 2005;434:113–118.
- **Rodgers JT, Puigserver P.:** " Fasting-dependent glucose and lipid metabolic response through hepatic sirtuin 1." *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2007 Jul 31;104(31):12861-6. Epub 2007 Jul 23.
- **Roy S, De J, Kundu S, Biswas A, Pramanik M, Ray AK.:** "Estradiol-17beta: tracing its metabolic significance in female fatbody of fifth instar larvae of silkworm, *Bombyx mori* L (race: Nistari)." *Life Sci.* 2007 Jan 9;80(5):446-53. Epub 2006 Oct 5.

- **Scheiner R, Muller U, Heimbürger S, & Erber J.:** "Activity of protein kinase A and gustatory responsiveness in the honey bee (*Apis mellifera* L.)." 2003 Journal of Comparative Physiology A-Neuroethology Sensory Neural and Behavioral Physiology 189: 427-434.

- **Scheiner R, Plückerhahn S, Öney B, Blenau W, & Erber J (2002).** Behavioural pharmacology of octopamine, tyramine and dopamine in honey bees. Behav Brain Res 136: 545-553.

- **Serra-Bonvehi, J.:** "Composition en sels minéraux et en vitamines de la gelée royale." Bulletin Technique Apicole 74 (18), 13-20 (1991)64;339(1):251-4."

- **Sesta G.:** " Determination of sugars in royal jelly by HPLC." Apidologie 37 1 (2006) 84-90

- **Siegelbaum, S.A., J.S. Camardo, and E.R. Kandel:** "Serotonin and cyclic AMP close single K⁺ channels in *Aplysia* sensory neurones." Nature, (1982). 299(5882): p. 413-7.

- **Silva A.J., Kogan J.H., Frankland P.W. and Kida S.:** " *CREB and memory.*" AnnuRev Neurosci, (1998). 21: p. 127-48.

- **Sönmez U, Sönmez A, Erbil G, Tekmen I, Baykara B.:** "Neuroprotective effects of resveratrol against traumatic brain injury in immature rats." Neurosci Lett. 2007 Jun 13;420(2):133-7. Epub 2007 May 6.

- **Spiteri T, Musatov S, Ogawa S, Ribeiro A, Pfaff DW, Agmo A.:** " The role of the estrogen receptor alpha in the medial amygdala and ventromedial nucleus of the hypothalamus in social recognition, anxiety and aggression." Behav Brain Res. 2010 Jul 11;210(2):211-20. Epub 2010 Feb 23.

- **Sterner DE, Berger SL:** " Acetylation of histones and transcription-related factors." Microbiol Mol Biol Rev.2000 Jun;64(2):435-59.

- **Stocker A.:** " Isolation and characterisation of substances from Royal Jelly, dissertation, 2003 an der Technischen Universität München

- **Su HM.:** "Mechanisms of n-3 fatty acid-mediated development and maintenance of learning memory performance." *J Nutr Biochem.* 2010 May;21(5):364-73. Epub 2010 Mar 16.

- **Su XH, Xing LX, Yin LF, Xi GS. :** "[Immunocytochemical localization of estrogen receptor in the spermatogenesis of termites]." *Fen Zi Xi Bao Sheng Wu Xue Bao.* 2007 Apr;40(2):173-8. Chinese.

- **Suchankova G, Nelson LE, Gerhart-Hines Z, Kelly M, Gauthier MS, Saha AK, Ido Y, Puigserver P, Ruderman NB.:** "Concurrent regulation of AMP-activated protein kinase and SIRT1 in mammalian cells." *Biochem Biophys Res Commun.* 2009 Jan 23;378(4):836-41. Epub 2008 Dec 9.

- **Sullivan, J.P., S.E. Fahrbach, J.F. Harrison, E.A. Capaldi, J.H. Fewell, and G.E.Robinson:** "Juvenile hormone and division of labor in honey bee colonies: effects of allatectomy on flight behavior and metabolism." *J Exp Biol,* (2003). 206(Pt 13):

- **Sung YJ, Ambron RT.:** "PolyADP-ribose polymerase-1 (PARP-1) and the evolution of learning and memory." *Bioessays.* 2004 Dec;26(12):1268-71.

- **Suzuki KM, Isohama Y, Maruyama H, Yamada Y, Narita Y, Ohta S, Araki Y, Miyata T, Mishima S. :** "Estrogenic activities of Fatty acids and a sterol isolated from royal jelly." *Evid Based Complement Alternat Med.* 2008 Sep;5(3):295-302.

- **Swati Gupta, Se Y. Kim, Sonja Artis, David L. Molfese, Armin Schumacher,4J. David Sweatt,Richard E. Paylor, and Farah D. Lubin:** "Histone Methylation Regulates Memory Formation". *The Journal of Neuroscience,* March 10, 2010 • 30(10):3589 –3599 • 3589

- **T. Takeuchi:** "Roles of Jumonji and Jumonji Family Genes in Chromatin Regulation and Development," *Dev.Dyn.* 235, no. 9 (2006): 2449-2459.

- **Thomas EA.:** "Focal nature of neurological disorders necessitates isotype-selective histone deacetylase (HDAC) inhibitors." *Mol Neurobiol.*2009 Aug;40(1):33-45. Epub 2009 Apr 28.

- **Tian X. and Fang J.:** "Current Perspectives on Histone Demethylases," *Acta Biochim.Biophys.Sin.(Shanghai).* 39, no. 2 (2007): 81-88.

- **TOWNSEND GF, MORGAN JF, TOLNAI S, HAZLETT B, MORTON HJ, SHUEL RW.:** "Studies on the in vitro antitumor activity of fatty acids. I. 10-Hydroxy-2-decenoic acid from royal jelly. *Cancer Res.* 1960 May;20:503-10."

- **Van der Kooij MA, Nijboer CH, Ohi F, Groenendaal F, Heijnen CJ, van Bel F, Kavelaars A.:** "NF-kappaB inhibition after neonatal cerebral hypoxia-ischemia improves long-term motor and cognitive outcome in rats." *Neurobiol Dis.* 2010 May;38(2):266-72. Epub 2010 Feb 2.

- **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. and Wood M.A.:** "Histone deacetylase inhibitors enhance memory and synaptic plasticity via CREB:CBPdependent transcriptional activation." *J Neurosci.* (2007). 27(23): p. 6128-40.

- **Von Frisch K. (1934):** " Ueber den Geschmackssinn der Biene." *Journal of Comparative Physiology A* 21: 1-156.

- **Weaver N.:** " Rearing of Honeybee Larvae on Royal Jelly in the Laboratory. *Science.*" 1955 Apr 8;121(3145):509-10.

- **Wei W, Wei M, Kang X, Deng H, Lu Z:** "A novel method developed for acetylcholine detection in royal jelly by using capillary electrophoresis coupled with electrogenerated chemiluminescence based on a simple reaction." *Electrophoresis.* 2009 Jun;30(11):1949-52.

- **Wheeler D. E., N. Buck and J. D. Evans:** "Expression of insulin pathway genes during the period of caste determination in the honey bee, *Apis mellifera*." *Insect Molecular Biology* (2006) 15 (5), 597-602

- **Wicher D.:** "Metabolic regulation and behavior: how hunger produces arousal - an insect study." *Endocr Metab Immune Disord Drug Targets.* 2007 Dec;7(4):304-10.

- **Wilson BJ, Tremblay AM, Deblois G, Sylvain-Drolet G, Giguère V.:** "An acetylation switch modulates the transcriptional activity of estrogen-related receptor alpha." *Mol Endocrinol.* 2010 Jul;24(7):1349-58. Epub 2010 May 19.

- **Wolff GL, Kodell RL, Moore SR, Cooney CA.:** "Maternal epigenetics and methyl supplements affect agouti gene expression in Avy/a mice." *FASEB J.* 1998 Aug;12(11):949-57.

- **Wustenberg, D., Gerber B., and Menzel R.:** "Short communication: long- but not medium-term retention of olfactory memories in honeybees is impaired by actinomycin D and anisomycin". *Eur J Neurosci*, (1998). 10(8): p. 2742-5.

- **Yang J, He L, Wang J, Adams JD Jr.:** „ Early administration of nicotinamide prevents learning and memory impairment in mice induced by 1-methyl-4-phenyl-1, 2, 3, 6-tetrahydropyridine." *Pharmacol Biochem Behav.* 2004 May;78(1):179-83.

- **Yeung F, Hoberg JE, Ramsey CS, Keller MD, Jones DR, Frye RA :** « Modulation of NF-kappaB-dependent transcription and cell survival by the SIRT1 deacetylase." *EMBO J.* 2004; 23:2369–2380.

- **Yin, J.C. and T. Tully,:** "CREB and the formation of long-term memory." *Curr Opin Neurobiol*, (1996). 6(2): p. 264-8.

- **Ying W.:** "NAD+ and NADH in brain functions, brain diseases and brain aging." *Front Biosci.* 2007 Jan 1;12:1863-88.

- **Yurko-Mauro K.** " Cognitive and cardiovascular benefits of docosahexaenoic acid in aging and cognitive decline." *Curr Alzheimer Res.*2010 May 1;7(3):190-6.

- **Zamami Y, Takatori S, Goda M, Koyama T, Iwatani Y, Jin X, Takai-Doi S, Kawasaki H.:** "Royal jelly ameliorates insulin resistance in fructose-drinking rats." *Biol Pharm Bull.* 2008 Nov;31(11):2103-7.

- **Zhang Y. and Reinberg D.:** " Transcription regulation by histone methylation: interplay between different covalent modifications of the core histone tails." *Genes Dev.* 2001 15: 2343-2360

- **Zhao Z, Fan L, Frick KM.:** "Epigenetic alterations regulate estradiol-induced enhancement of memory consolidation." *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2010 Mar 23;107(12):5605-10. Epub 2010 Mar 8.

- **Zhou Y, Watters JJ, Dorsa DM.:** "Estrogen rapidly induces the phosphorylation of the cAMP response element binding protein in rat brain. *Endocrinology*. 1996 May;137(5):2163-6.

8.4 Abkürzungsverzeichnis

▪ (v/v) volume per volume	Volumenprozent
▪ (w/v) weight per volume	Gewichtsprozent
▪ °C	Grad Celsius
▪ μ	Mikro – 10 ⁻⁶
▪ 10-HDA	10-hydroxy-2-decensäure
▪ Abb.	Abbildung
▪ Ac-18	Acetylierung an Lysin 18
▪ Act-D	Actinomycin D
▪ AS	Aminosäure
▪ Bzw.	beziehungsweise
▪ ca.	circa
▪ Ca ²⁺	Kalzium-Kation
▪ CaM-Kinase	Ca ²⁺ /calmodulin-dependent protein kinase
▪ cAMP	cyclisches Adenosinmonophosphat
▪ CBP/p300	CREB binding protein
▪ CREB	cAMP response element binding protein
▪ CS	konditionierter Stimulus
▪ d	Tag
▪ d.h.	das heißt
▪ DMSO	Dimethylsulfoxid
▪ DNA	Desoxyribonukleinsäure
▪ DNMT	DNA Methyltransferase
▪ ELISA	Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay
▪ EtOH	Ethanol
▪ g	Gramm
▪ GR	Gelée royale
▪ h	Stunde
▪ HAT	Histonacetyltransferase
▪ HDAC	Histondeacetylase
▪ Hz	Hertz - Anzahl pro Sekunde
▪ K ⁺	Kalium-Kation
▪ Kr-h1	Krüppel homolog-1 - Transkriptionsfaktor
▪ l	Liter

▪ LTM	long-term memory - Langzeitgedächtnis
▪ Lys	Lysin
▪ m	Milli – 10 ⁻³
▪ M	Molar (mol pro Liter)
▪ max.	maximal/ Maximum
▪ Met-27.3	Tri-Methylierung an Lysin 27
▪ Met-4.1	Mono-Methylierung an Lysin 4
▪ min	Minute
▪ min.	mindestens
▪ n	Anzahl der Tiere pro Gruppe
▪ NAD	Nikotinsäureamid-Adenin-Dinukleotid
▪ NAM	Nikotin(säure)amid
▪ NF-kB	nuclear factor kappa b
▪ NO	Stickstoffmonoxid
▪ NO-Synthase	Nitric oxide synthase (Stickstoff-Synthase)
▪ PBS	Phosphate buffered saline
▪ PER	proboscis extension (Rüsselrausstreck)-reflex
▪ PKA	Proteinkinase A
▪ PKC	Proteinkinase C
▪ PLC	Phospholipase C
▪ RT	Raumtemperatur
▪ s	Sekunde
▪ SDS	sodium dodecyl sulfate, Natriumdodecylsulfat
▪ s.o.	siehe oben
▪ s.u.	siehe unten
▪ STM	short-term memory - Kurzzeitgedächtnis
▪ Tab.	Tabelle
▪ TSA	Trichostatin A
▪ ün	über Nacht
▪ US	unkonditionierter Stimulus
▪ WB	Westernblot
▪ z.B.	zum Beispiel

9. Danksagung

Selten hat man im Leben das große Glück mit Menschen zu arbeiten, die nicht nur großes Wissen und Erfahrung besitzen, sondern diese Erkenntnisse auch jederzeit mit einem teilen und mehren wollen. Sachkenntnis, Hilfsbereitschaft und ein humorvoller menschlicher Umgang haben mich in den letzten dreieinhalb Jahren Misserfolge besser ertragen und Erfolge besser feiern lassen. Daher ein herzliches Dankeschön an:

- meinen Chef Professor Dr. Uli Müller, dafür, dass Du mich angestellt hast und ich in meiner Doktorarbeit nicht nur die Gelegenheit hatte Laborarbeit mit klassisch biologischen Tätigkeiten zu verknüpfen, sondern auch ein spannendes Thema bearbeiten durfte. Danke auch für Deine permanente Gesprächsbereitschaft, Deine Unterstützung und nicht zuletzt ein Dank dafür, dass ich auch mal einen Chef erleben durfte, der einem Zeit zum Nachdenken, Ausprobieren und Lernen gibt.
- meinen Zweitgutachter Professor Dr. Walldorf für die Übernahme der Zweitkorrektur und die lehrreiche Zeit in seinem Seminar.
- Dr. Helmut Kallenborn für Deine Bereitschaft mein akademischer Mittelbau zu sein und für die „Nachhilfestunden“ in klassischer Biologie.
- Dr. Susanne Meuser fürs Korrekturlesen, Deine Fragen und Ideen und die interessanten (Fach-) Gespräche.
- Dr. Thomas Läger und Dr. Jakob Hättig, von denen ich freundlich aufgenommen wurde und gerade am Anfang meiner Arbeit sehr viel gelernt habe.
- Dr. Alfred Wisser, dafür dass die Tür für Fragen immer offen stand.
- Angelika Gardezi für die histologischen Untersuchungen, die lehrreiche Zeit bei den Bienen, die unzähligen, vielfältigen, interessanten, schönen, persönlichen, witzigen und wissenschaftlichen Gespräche, danke auch dafür, dass ich keinen Horror mehr vor dem Zeichnen habe und dass Dein freundliches Wesen auch noch Deine Backkünste übertrifft (und das ist wirklich schwer!).
- Iris Fuchs, die mit ihrer unkomplizierten Art die Arbeit erleichtert und ganz entscheidend das gute Betriebsklima mitbestimmt.
- Michael Glander für technischen Support und seinen ganz eigenen Humor über den ich mich jedes Mal „kringeln“ könnte.

- Tina Martin, Kathy Rether und Davide Raccuglia fürs Korrekturlesen, ihren Blick für die Details und die gute Zusammenarbeit in den letzten Jahren.
- Fabian Büttner, der nicht nur viel kann, sondern nie aufgibt, immer alles verbessern will und daher für mich ein Vorbild an Selbstmotivation ist.
- Katja Merschbächer und Silke Pabst, die beide die hervorragende und seltene Eigenschaft haben auch mit viel Arbeit und unter hoher Anspannung gut gelaunt und motiviert zu sein, „es einfach wissen wollen“ und die, aber nicht nur deshalb, weit mehr als Kollegen, sondern Freunde sind.
- alle meine Hiwis, Praktikanten, F-Praktikanten und Diplomanden (besonders an Iliana Nedewa, Aline Schwarz und Jennifer Folz). Die Arbeit mit Euch hat einige Erkenntnisse gebracht und mir viel Spaß gemacht. In diesem Zusammenhang auch noch ein herzliches Dankeschön an Dr. Inge Bauer, die mir während meiner eigenen F-Arbeit in vorbildlicher Art und Weise vorgeführt hat, wie eine gute Betreuung aussieht.

Zu guter Letzt sind noch die Menschen zu erwähnen, die nur indirekt mit meiner Arbeit konfrontiert wurden, aber für das Gelingen gleichermaßen wichtig waren, daher ein herzliches Dankeschön an:

- meinen Mann, für seine Liebe, seine Unterstützung und das Ermutigen auch in den schwierigen Phasen vor dem Abitur, während des Studiums, der Diplom- und auch der Doktorarbeit.
- meine Tochter, die es mit ihrem sonnigen Wesen schafft trotz Pubertät eine wichtige Quelle des Glücks, der Freude, der Inspiration und Ablenkung zu sein und die immer wieder unerwartete, verblüffende Ideen hat.
- meine Eltern, die meine kindliche Neugier nicht nur ertragen, sondern auch gefördert haben, indem tage- und oft nächtelang kritisch über alles diskutiert wurde, was ich wissen wollte.
- meine leider verstorbenen Großeltern für ihre Liebe und das Erlernen von Verantwortung.

- meine Freunde, denn wer solche Freunde hat kann beruhigt durchs Leben gehen, vor allem Birgit Wahl, Sabine Cappel, Tim Schenkel und Susanne Bethge mit denen man über die Arbeit und Privates reden kann, die ebenso fachliche, wie private Ratschläge erteilen, die dem „Gejammer“ zuhören und bei denen man ganz man selbst sein kann und genau so gemocht wird. Ein gutes Gefühl!