

**Die Rolle acetylierungsabhängiger Prozesse
auf Chromatin- und Transkriptionsebene
bei der Bildung unterschiedlicher
Gedächtnisse**

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

von

Katja Mershbächer

Saarbrücken

2013

Tag des Kolloquiums: 30.07.2013

Dekan: Prof. Dr. Volkhard Helms

Berichterstatter: Prof. Dr. Uli Müller

Prof. Dr. Manfred Schmitt

Prof. Dr. Andre Fiala

Vorsitz: Prof. Dr. Uli Kazmaier

Akad. Mitarbeiter: Dr. Andreas Neuner

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung

1.1	Lernen und Gedächtnisbildung	1
1.2	Gedächtnisformen	2
1.3	Gedächtnisbildung auf molekularer Ebene	3
1.4	Transkriptions- und Translationsabhängiges Gedächtnis	5
1.4.1	Der cAMP-PKA-Signalweg	5
1.4.2	Gedächtnisrelevante Proteine	7
1.5	Epigenetische Mechanismen der Genregulation	8
1.5.1	Histonmodifikationen	9
1.5.2	Histonacetylierung	11
1.5.3	Histonacetyltransferasen	12
1.5.4	Histondeacetylasen	14
1.6	Histonacetylierung und Gedächtnisbildung	16
1.7	Gedächtnisinduzierende und -reprimierende Mechanismen	17
1.8	Die Honigbiene als Modellorganismus	19
1.9	Zielsetzung dieser Arbeit	20

2. Material und Methoden

2.1	Material	21
2.1.1	Chemikalien	21
2.1.2	Verbrauchsmaterial	22
2.1.3	Geräte	23
2.1.4	Enzyme und Kits	25
2.1.5	Sonstige Reagenzien	25
2.1.6	Puffer und Lösungen	26
2.1.7	Injektionslösungen	30
2.1.8	Antikörper	30
2.1.9	Primer	31
2.1.10	Software und Datenbanken	31
2.2	Methoden	32
2.2.1	Haltung der Versuchstiere (<i>Apis mellifera carnica</i>)	32
2.2.2	Vorbereitung der Versuchstiere	32

2.2.3	Thoraxinjektion	33
2.2.4	Verhaltensexperimente	33
2.2.4.1	Test der Reaktion auf gustatorische Reize	33
2.2.4.2	Nicht-assoziative Lernparadigmen	34
2.2.4.3	Assoziative olfaktorische Konditionierung	35
2.2.5	Nachweismethoden auf Proteinebene	37
2.2.5.1	Präparation des Bienenhirns	37
2.2.5.2	Diskontinuierliche Polyacrylamid Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	38
2.2.5.3	Westernblot	39
2.2.5.4	Enzyme-linked Immunosorbent Assay – ELISA	39
2.2.5.5	Immunhistologie	41
2.2.6	Nachweismethoden auf RNA-Ebene	42
2.2.6.1	RNA-Aufreinigung aus Bienenhirn	43
2.2.6.2	Qualitäts- und Quantitätskontrolle der RNA	43
2.2.6.3	Dotblot	44
2.2.6.4	<i>In vivo</i> Markierung von RNA	45
2.2.6.5	Immunopräzipitation (IP) BrU-markierter RNA	46
2.2.6.6	Separation EU-markierter RNA	48
2.2.6.7	Reverse Transkription	51
2.2.6.8	Standard-PCR	51
2.2.6.9	DNA-Gelelektrophorese	52
2.2.6.10	Quantitative real time PCR (RT-qPCR)	52
2.2.6.11	Analyse aktivitätsabhängiger Transkriptionsänderungen	57
2.2.6.12	Transkriptomanalyse der EU-RNA mittels FLX-Sequenzierung	58

3. Ergebnisse

3.1	Überprüfung der Antikörper zur Quantifizierung der Acetylierung	62
3.2	Die lerninduzierte Änderung der Histonacetylierung im Bienenhirn ist abhängig von der Trainingsstärke	64
3.3	Änderungen des Acetylierungslevels im Bienenhirn haben Auswirkungen auf das assoziative Gedächtnis	67
3.3.1	Der HDAC-Inhibitor TSA und der HAT-Inhibitor Garcinol haben Auswirkungen auf das Acetylierungslevel im Bienenhirn	67

3.3.2	Die Änderung des Acetylierungslevels im Bienenhirn hat keinen Einfluss auf gustatorische Sensorik und nicht-assoziative Lernformen	70
3.3.3	Der Einfluss des geänderten Acetylierungslevels auf das assoziative Gedächtnis ist abhängig von der Trainingsstärke	73
3.4	Die acetylierungsabhängigen Effekte auf das Gedächtnis der Honigbiene sind transkriptionsabhängig	76
3.5	Etablierung einer Methode für Analysen aktivitätsabhängiger Transkriptionsänderungen <i>in vivo</i>	81
3.5.1	Markierung der RNA mit Bromouridin (BrU)	81
3.5.2	Nachweis des BrU-Einbaus in die RNA des Bienenhirns	82
3.5.2.1	Test eines geeigneten Antikörpers zum BrU-Nachweis im Dotplot	83
3.5.2.2	Optimierung der BrU-Konzentration und Markierungsdauer	85
3.5.3	Separation der BrU-RNA mittels Immunopräzipitation (BrU-IP)	88
3.5.3.1	Austesten eines geeigneten Waschpuffers	88
3.5.3.2	BrU-IP mit anschließender Quantifizierung durch RT-qPCR	89
3.5.4	Markierung der RNA mit 5-Ethynyluridin (EU)	91
3.5.4.1	Präzipitation der EU-RNA und anschließender Quantifizierung mittels real-time PCR	93
3.6	Analyse lerninduzierter Genexpressionsänderungen im Gehirn der Honigbiene	95
3.6.1	Test der Primer auf ihre Funktionalität	95
3.6.2	Analyse der lerninduzierter Expressionsänderungen	96
3.6.2.1	Quantifizierung der Inputkontrollen	97
3.6.2.2	Schwaches Training induziert zeitabhängig eine veränderte Expression verschiedener Gene	99
3.6.2.3	Der HDAC-Inhibitor TSA verändert die Genexpression nach schwachem Training	101
3.6.2.4	Der HAT-Inhibitor Garcinol hat keinen Einfluss auf die Expression der untersuchten Gene nach schwachem Training	103
3.7	<i>In vivo</i> Transkriptomanalyse lerninduzierter Expressionsänderungen im Gehirn der Honigbiene	104
3.7.1	Aufbereitung und Optimierung der EU-RNA-Proben	105
3.7.2	Hochdurchsatz-Sequenzierung (EU-RNA-Seq)	107

4. Diskussion		112
4.1	Schwaches sowie starkes Training induzieren Änderungen im Acetylierungslevel von H3 an spezifischen Modifikationsstellen	113
4.2	Die pharmakologische Manipulation der Acetylierung macht versteckte Transkriptionsprozesse sichtbar	113
4.3	Expressionsanalysen markierter de novo RNA als neuer Tool zum Nachweis gedächtnisrelevanter Transkriptionsprozesse in vivo	117
4.4	Durch schwaches Training induzierte Prozesse zur Gedächtnissuppression	118
4.4.1	Schwaches Training verändert die Expressionsrate gedächtnisrelevanter Gene	119
4.4.2	<i>EF1α</i> als Zielgen lerninduzierter acetylierungsabhängiger Prozesse	121
4.5	TSA und Garcinol wirken auf unterschiedliche Targets	123
4.5.1	TSA und Garcinol haben auch einen Einfluss auf die Acetylierung von Nichthistonproteinen	124
4.6	Transkriptomanalyse EU-markierter RNA nach schwachem und starkem Training mittels RNA-Seq	125
4.6.1	Nach schwachem und starkem Training zeigen sich Unterschiede an Transkripten aus verschiedenen funktionellen Gruppen	125
4.6.2	Nach schwachem und starkem Training identifizierte Gene für weiterführende quantitative Expressionsanalysen	126
4.7	Fazit	127
5. Zusammenfassung		129
6. Summary		130
Literaturverzeichnis		131
Abkürzungsverzeichnis		149
Danksagung		152
Lebenslauf und wissenschaftlicher Werdegang		154

1. Einleitung

1.1 Lernen und Gedächtnisbildung

„Die Erinnerungen verschönern das Leben, aber das Vergessen allein macht es erträglich“ (Honoré de Balzac).

Dieses Zitat spiegelt wohl sehr gut den Wunsch eines jeden Menschen wider, wählen zu können, was in unserem Gedächtnis verbleibt und was wir wieder vergessen. Wie schön wäre es, wenn wir uns alle nützlichen und positiven Dinge erhalten und alle für uns irrelevanten und negativen Ereignisse schnell wieder aus unserer Erinnerung streichen könnten. Aus diesem Grund strebt der Mensch schon lange danach, die Funktionsweise des Gehirns und die Mechanismen des Lernens und der Gedächtnisbildung zu erforschen. Einer der großen Pioniere der Gedächtnisbildung war der Berliner Psychologe Hermann Ebbinghaus (1850-1909), der im Jahre 1885 auf die Idee kam, das Gedächtnis experimentell zu erforschen. Damals waren der Erforschung des Gedächtnisses noch viele Grenzen gesetzt und somit war Ebbinghaus seine eigene Versuchsperson. Er experimentierte mit Silben, die er sich merken musste und hatte somit erstmalig das Kurzzeitgedächtnis getestet. Heute weiß man, dass Lernen und Gedächtnisbildung alle Änderungen des Verhaltens, Denkens und Fühlens, die aufgrund von Interaktionen mit der Umwelt entstehen, umfasst. Dabei werden neue Informationen aufgenommen, bewertet und gespeichert, die in der gleichen oder einer ähnlichen Situation angewendet werden können [Kimble, 1961]. Aufgrund molekularbiologischer Methoden ist es sogar möglich, Prozesse, die beim Lernen und der Gedächtnisbildung beteiligt sind, bis zur kleinsten Ebene, der einzelnen Gehirnzelle (Neuron) erforschen zu können [Kandel und Spencer, 1968]. Seit Jahrzehnten wird daran geforscht, welche molekularen Prozesse bei Lernen und Gedächtnisbildung beteiligt sind. Außerdem ist es den Forschern von großer Bedeutung zu verstehen, wie sich die Prozesse bei der Bildung unterschiedlicher Gedächtnisformen unterscheiden. Einige grundlegende Mechanismen sind bereits bekannt, die aber immer wieder durch neue Erkenntnisse bereichert werden.

1.2 Gedächtnisformen

Deklaratives und nicht-deklaratives Gedächtnis

Das deklarative (explizite) Gedächtnis beinhaltet Tatsachen und Ereignisse, die bewusst abgerufen werden können. Dieses wird wiederum in das semantische Gedächtnis, welches von einer Person unabhängige Fakten enthält und das episodische Gedächtnis, welches personenbezogene Ereignisse speichert, unterteilt. Im Gegensatz dazu gibt es das nicht-deklarative (implizite) Gedächtnis, welches Erleben und Verhalten ändert, ohne ins Bewusstsein zu treten. Hierbei handelt es sich um das Abrufen automatisierter Fertigkeiten oder Handlungsabläufe [Squire, 1986].

Nicht-assoziatives Gedächtnis

Das implizite Gedächtnis lässt sich weiter unterteilen in assoziative und nicht-assoziative Gedächtnisformen. Zu den nicht-assoziativen Gedächtnisformen gehören Habituation und Sensitisierung, wobei etwas über die Bedeutung eines Reizes gelernt wird. Man spricht von Habituation (Gewöhnung), wenn nach wiederholter Konfrontation mit einem Reiz, die Reaktion stetig abnimmt oder völlig ausbleibt. Die Habituation muss von einer Ermüdungserscheinung abgegrenzt werden. Wurde ein Individuum an einen Reiz habituiert, bleibt seine Reaktionsbereitschaft auf alle anderen Reize in vollem Maße erhalten (Dishabituation). Bei einer allgemeinen Ermüdung ist die Reaktion auf alle anderen Reize ebenfalls reduziert oder bleibt sogar aus [Hinde, 1970]. Bei der Sensitisierung (Empfindlichkeitssteigerung) findet eine Reaktionsverstärkung auf einen Reiz durch einen besonders intensiven oder schädlichen zweiten Reiz statt. Dabei wird der Verhaltenskontext von der Art des Stimulus bestimmt.

Assoziatives Gedächtnis

Beim assoziativen Lernen werden zwei Ereignisse miteinander verknüpft. Ein bekanntes Beispiel für assoziatives Lernen ist die klassische Konditionierung. Dabei werden zwei Reize miteinander gepaart, die bei einem Individuum unterschiedliche Reaktionen auslösen. Der CS (konditionierter Stimulus oder bedingter Reiz) ist ein für das Individuum ursprünglich neutraler Reiz, der keine spezifische sondern höchstens eine allgemeine Orientierungsreaktion auslöst.

Der US (unkonditionierter Stimulus oder unbedingter Reiz) ist ein Reiz, der ohne experimentelles Zutun, immer eine Reaktion (UR - unbedingte Reaktion) hervorruft.

Nach CS-US-Paarung und erfolgreicher Konditionierung löst der CS die CR (konditionierte Reaktion) aus. Die CR ist der UR ähnlich, jedoch nicht gleich. Die CR ist weniger stark und hat eine längere Latenzzeit. Die klassische Konditionierung wurde als erstes von Ivan Petrovitsch Pavlov beschrieben [Pavlov, 1927]. Pavlov konditionierte bei Hunden den Speichelflussreflex (UR und CR), ausgelöst durch den Anblick von Futter (US), auf das Ertönen einer Glocke (CS).

Die klassische Konditionierung kann aversiv oder appetitiv erfolgen. Beim aversiven Lernen ist der US ein schädlicher Reiz, wie zum Beispiel ein Elektroschock, der eine Abwehr- oder Angstreaktion auslöst. Beim appetitiven Lernen, wie von Pavlov beschrieben, stellt der US eine Futterbelohnung dar.

Kurzzeit- und Langzeitgedächtnis

Bei allen Gedächtnisformen wird unter anderem zwischen Kurzzeit- (STM – short-term memory) und Langzeitgedächtnis (LTM – long-term memory) unterschieden. Das Kurzzeitgedächtnis besitzt eine begrenzte Speicherkapazität und eine erhöhte Störanfälligkeit gegenüber neuen Ereignissen. Das Langzeitgedächtnis ist stabiler und kann Tage, Wochen oder sogar Jahre andauern. Der wichtigste Unterschied auf molekularer und zellulärer Ebene besteht darin, dass die Etablierung des STM auf Proteinmodifikationen und der Aktivierung von Signalkaskaden beruht, wobei für das LTM die Transkription und Translation induziert wird, da zusätzlich neu synthetisierte Proteine benötigt werden [Izquierdo et al., 2002]. Darauf soll in Kapitel 1.4 noch näher eingegangen werden.

1.3 Gedächtnisbildung auf molekularer Ebene

Die Grundlage der Gedächtnisbildung liefert die Kommunikation zwischen den Nervenzellen (Neuronen) im Gehirn. Die Informationsübertragung von einem Neuron zum anderen findet an so genannten Synapsen statt. Eine Synapse ist die Kontaktstelle zwischen zwei Neuronen [Sherrington, 1906]. Elektrische Synapsen (Gap junctions) sind aneinander gekoppelte Ionenkanäle zweier benachbarter Zellen, über die Ionen und kleine Moleküle in beide Richtungen übertragen werden können.

Bei einer chemischen Synapse führen über das Axon ankommende elektrische Signale dazu, dass Kalziumkanäle (Ca^{2+} -Kanäle) an der präsynaptischen Endigung geöffnet werden. Dadurch kommt es zu einer Verschmelzung der Transmitter gefüll-

ten Vesikel mit der präsynaptischen Membran, so dass die Transmitter nach außen diffundieren können. Sie wandern über den synaptischen Spalt zur postsynaptischen Membran und binden dort an spezifische Rezeptoren, wodurch entweder ein exzitatorisches oder ein inhibitorisches Potential entsteht [Bailey und Kandel, 1993]. Beim Lernen und der Gedächtnisbildung werden molekulare Mechanismen ausgelöst, die das komplexe Netzwerk aus Neuronen physiologisch und morphologisch verändern [Byrne und Kandel, 1996]. Die zellulären und molekularen Grundlagen des Lernens sind unabhängig von der Lernform sehr ähnlich und im Tierreich konserviert. Zur Erforschung molekulare Prozesse ist es von Vorteil besser kontrollierbare Experimente an einfachen Systemen mit Lernformen, die zu einem impliziten Gedächtnis führen, zu machen.

Die ersten grundlegenden Erkenntnisse zur Gedächtnisbildung auf molekularer Ebene lieferten Experimente mit der Meersschnecke *Aplysia californica*, die auch in anderen Spezies bestätigt wurden.

Synaptische Plastizität

Schon im Jahre 1949, noch bevor die ersten Experimente zur Gedächtnisbildung durchgeführt wurden, postulierte Donald Hebb bereits folgendes: "Wenn ein Axon der Zelle A [...] Zelle B erregt und wiederholt und dauerhaft zur Erzeugung von Aktionspotentialen in Zelle B beiträgt, so resultiert dies in Wachstumsprozessen oder metabolischen Veränderungen in einer oder beiden Zellen, die bewirken, dass die Effizienz von Zelle A in Bezug auf die Erzeugung eines Aktionspotentials in B größer wird." Dies wird als Hebbsche Regel bezeichnet und beschreibt die aktivitätsabhängige Änderung der Stärke der synaptischen Übertragung, die als synaptische Plastizität bezeichnet wird [Hebb, 1949].

Die zur Verstärkung einer Synapse führenden physiologischen Änderungen äußern sich in einer erhöhten Transmitterausschüttung [Castellucci et al., 1980] und einer veränderten postsynaptischen Rezeptorausstattung [Kandel und Squire 1999]. Morphologische Veränderungen resultieren in zusätzlich ausgewachsenen synaptischen Endigungen, um die Kontaktfläche zwischen den beteiligten Nervenzellen zu vergrößern.

1.4 Transkriptions- und Translationsabhängiges Gedächtnis

Die synaptischen Veränderungen können kurz- oder langfristig sein. Für eine erhöhte Transmitterausschüttung bedarf es lediglich Proteinmodifikationen, die zu einer erhöhten Aktivität von Proteinen führen, die an der Transmitterausschüttung beteiligt sind. Diese Änderungen passieren in der Regel schnell und führen zu einer kurzfristigen Verstärkung der Synapse, da sie sehr schnell wieder rückgängig gemacht werden können (z.B. durch Phosphodiesterasen (PDE) und Proteinphosphatasen (PP)) [Blokland et al., 2006; Mansuy und Shenolikar, 2006]. Sie sind die Grundlage zur Ausbildung eines Kurzzeitgedächtnisses (STM). Damit morphologische Änderungen stattfinden können, bedarf es der Synthese neuer Proteine, entweder auf Transkriptions- oder Translationsebene. Dieser Prozess läuft langsamer ab und führt zu einer langfristigen Verstärkung der Synapse (LTP - Langzeitpotenzierung). Ein transkriptions- oder translationsabhängiges Gedächtnis wird als Langzeitgedächtnis (LTM) definiert [Uphouse et al., 1973]. Zur Überprüfung von Kurzzeit- oder Langzeitgedächtnis werden Lernexperimente durchgeführt, bei denen Translations- oder Transkriptioninhibitoren verwendet werden und überprüft, ob diese Auswirkungen auf das Gedächtnis haben. Heute weiß man zum Beispiel, dass beim appetitiven Lernen erst durch wiederholte Präsentation von CS und US ein LTM ausgebildet wird. Bei aversiven Lernformen reicht meist schon eine einzige CS-US-Paarung aus.

1.4.1 Der cAMP-PKA-Signalweg

Bei der Gedächtnisbildung aufgrund physiologischer und morphologischer Änderungen an Synapsen spielt der cAMP-PKA-Signalweg eine wichtige Rolle [Abel et al., 1998; Silva et al., 1998; Schwärzel und Müller, 2006]. Da die molekularen Mechanismen bei der Gedächtnisbildung in verschiedenen Modellorganismen konserviert sind, konnte bei der Meeresschnecke (*Aplysia californica*) [Castellucci et al., 1980; Bernier, 1982; Dash et al., 1990; Bacskai et al., 1993; Kaang et al., 1993], der Fruchtfliege (*Drosophila melanogaster*) [Dudai et al., 1976; Livingstone et al., 1984; Yin et al., 1994; Li et al., 1996], der Maus (*Mus musculus*) [Bourtchuladze et al., 1994; Pittenger et al., 2002] und der Honigbiene (*Apis mellifera*) [Müller, 2000; Friedrich et al., 2004] gezeigt werden, dass eine Hemmung dieses Signalweges zu Defekten in der Gedächtnisbildung oder der Langzeitpotenzierung (LTP) führt.

Eine Schlüsselkomponente ist die Proteinkinase A (PKA), die durch cAMP aktiviert wird [Rall und Sutherland, 1961], wodurch sie dann weitere Enzyme und Proteine phosphoryliert. Sie phosphoryliert unter anderem Kaliumkanäle, deren Öffnen für die Repolarisierung des Aktionspotentials notwendig ist. Durch Phosphorylierung werden die Kanäle inaktiviert (geschlossen), wodurch das Aktionspotential zeitlich ausgedehnt wird, was in einer verlängerten Transmitterausschüttung resultiert. [Klein und Kandel, 1980; Siegelbaum et al., 1982].

Durch das Auftreten sehr starker oder wiederholter Signale kann die PKA derart aktiviert werden, dass die katalytische Untereinheit (kUE) nach Abspaltung von der regulatorischen UE (rUE) in den Zellkern wandert und dort Transkriptionsfaktoren, wie zum Beispiel CREB (CRE-element binding protein) aktiviert [Gonzalez und Montminy, 1989; Deisseroth et al., 1996] (Abb. 1). Durch die darauf folgende Interaktion zwischen CREB und dem Cofaktor CBP (CREB binding protein), der eine beim Lernen beteiligte Histonacetyltransferase (HAT) darstellt, wird die Expression neuer Proteine induziert, die zur Ausbildung eines Langzeitgedächtnisses führen [Lonze und Ginty, 2002; Silva et al., 1998].

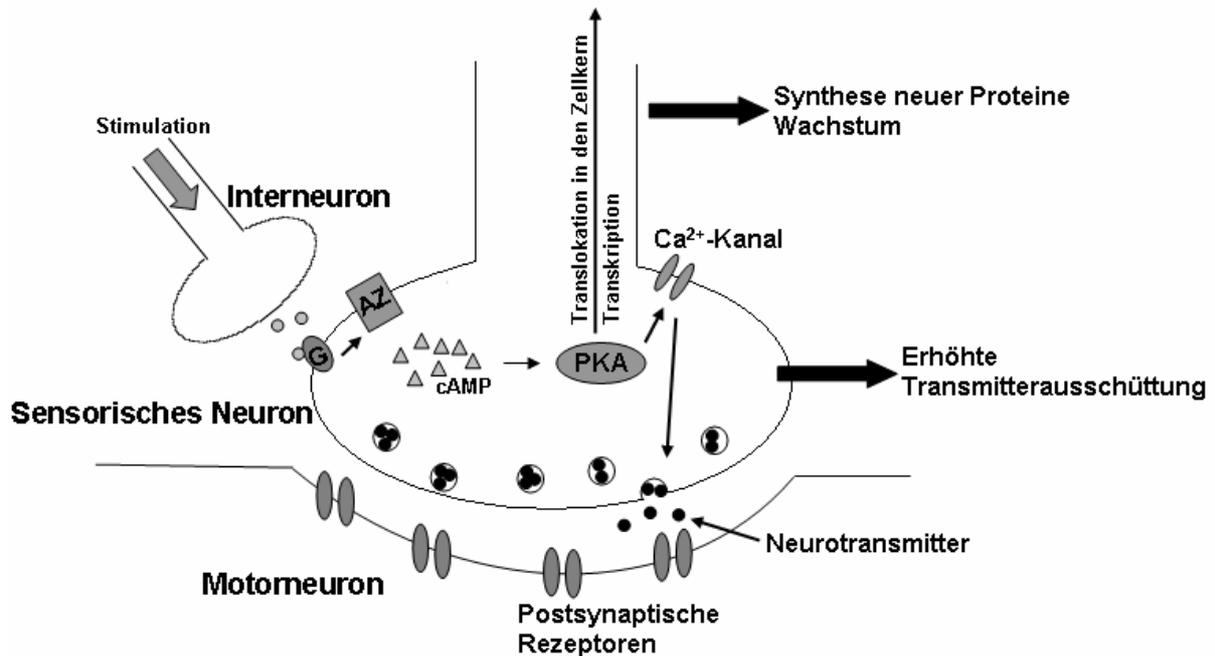


Abbildung 1: Molekulare Mechanismen bei der kurzzeitigen und langzeitigen Verstärkung einer Synapse am Beispiel der Sensibilisierung von *Aplysia californica*

Bei der Sensibilisierung des Kiemenrückzugsreflexes von *Aplysia* wird durch Stimulation des Schwanzes über ein Interneuron Serotonin ausgeschüttet. Dadurch kommt es, nach Bindung an den G-Protein-gekoppelten Rezeptor (G), im nachgeschalteten sensorischen Neuron zu einer Aktivierung der Adenylatzyklase (AZ). Diese produziert cAMP, wodurch die PKA aktiviert wird und es unter anderem durch Phosphorylierung von Ca²⁺-Kanälen zu einer erhöhten Transmitterausschüttung kommt. Durch Bindung an spezifische Rezeptoren an der Postsynapse des Motoneurons wird der Reiz weitergeleitet und bei Stimulation des Siphons ein verstärkter Rückzugsreflex hervorgerufen. Diese Verstärkung der Reaktion hält jedoch nur kurzfristig an. Wird der Schwanz wiederholt stimuliert, wird länger Serotonin ausgeschüttet und dadurch die PKA derart aktiviert, dass die katalytische Untereinheit in den Kern transloziert wird und dort Transkriptionsfaktoren aktiviert. Somit können dann Zielgene induziert werden, die das Wachstum neuer synaptischer Verbindungen bewirken. Die dadurch verstärkte Reaktion wird langfristig gespeichert [verändert nach Hawkins et al., 2006].

1.4.2 Gedächtnisrelevante Proteine

Nachdem die ersten grundlegenden Erkenntnisse nach Erforschung der cAMP-PKA-Kaskade über Proteine und Gene, die bei der Gedächtnisbildung eine wichtige Rolle spielen, aufkamen, wurden noch weitere wichtige Signalkaskaden und Proteine identifiziert. Neben der PKA gibt es noch weitere Proteinkinasen, die auch bei der Weiterleitung synaptischer Signale eine wichtige Rolle spielen. Eine davon ist die Ca²⁺/Calmodulin-abhängige Proteinkinase II (CamKII), die nach der Aktivierung durch Ca²⁺ mit Calmodulin einen Komplex bildet und dann weitere Zielproteine aktiviert. Dazu gehören z.B. Rezeptoren in der Postsynapse, welche nach Aktivierung durch die CamKII sensitiver auf Transmitter reagieren [Bevilaqua et al., 2005].

Eine veränderte Aktivität von Enzymen, die Botenstoffe synthetisieren, kann sich ebenfalls auf das Gedächtnis auswirken. Ein solches Protein ist die Stickstoffmonoxid-Synthase (NO-Synthase), die die Herstellung von NO aus der Aminosäure L-Arginin katalysiert. Eine Hemmung dieses Enzyms kann das Gedächtnis verschlechtern [Böhme et al., 1993; Fin et al., 1995; Müller, 1996].

Bei allen Prozessen innerhalb einer Zelle bedarf es dem Transport von Molekülen entlang des Zytoskeletts. Bei Neuronen müssen mitunter große Distanzen zwischen dem Zellkern im Soma und der peripheren Synapse zurückgelegt werden. Ein wichtiger Bestandteil des Zytoskeletts ist das Protein Tubulin, aus dessen Bausteinen die Mikrotubuli aufgebaut sind. Bei der synaptischen Plastizität bedarf es neuronaler Differenzierung, Bewegung und Wachstum. Eine wichtige Grundlage dafür ist der zelluläre Transport und die Umstrukturierung der Zelle, wobei die Mikrotubuli immer wieder auf- und abgebaut werden müssen [Woolf, 2006].

1.5 Epigenetische Mechanismen der Genregulation

Die Transkription von Genen kann auf zwei Ebenen reguliert werden. Zum einen müssen Transkriptionsfaktoren aktiviert werden, die dann an regulatorische Elemente der Gene binden und deren Expression initiieren. Damit diese Transkriptionsfaktoren jedoch an ihre Zielsequenzen binden können, muss die DNA zugänglich sein. Dazu gibt es molekulare Mechanismen, wobei Enzyme gewisse Abschnitte der DNA markieren und somit die Aktivität bestimmter Gene beeinflussen. Da hierbei nicht die Nukleotidsequenz betroffen ist, sondern die Änderungen auf der nächsten Ebene stattfinden, spricht man von epigenetischen Modifikationen (griechisch: epi - über) [Russo et al., 1996].

Es werden zurzeit drei verschiedene Arten epigenetischer Modifikationen unterschieden:

1. Chemische Modifikationen auf Nukleotidebene, wie DNA-Methylierung und RNA-Interferenz (RNAi)
2. Nukleosomenremodelling
3. Posttranslationale Modifikationen der Histonproteine

Bei der DNA-Methylierung wird durch das Enzym DNA-Methyltransferase (DNMT) eine Methylgruppe von S-adenosylmethionin (SAM) übertragen und kovalent an Zytosine des DNA-Rückrats gebunden [Laird, 2003]. Die Methylierung von DNA-

Abschnitten geht überwiegend mit einer Repression der Genexpression einher [Robertson und Wolffe, 2000]. Die Repression von Genaktivität kann ebenfalls durch kleine nicht-kodierende RNA-Moleküle vermittelt werden. Dies geschieht dabei auf allen Ebenen der Transkription durch Induzierung von DNA- und Histonmethylierung sowie der Blockierung und dem Abbau von mRNA [Matzke und Birchler, 2005; Fabian und Sonenberg, 2012]. Bei den anderen beiden Arten epigenetischer Modifikationen spielt nicht nur die DNA eine Rolle sondern auch DNA-assoziierte Proteine, die sogenannten Histone, die an der Verpackung der DNA zu Chromatin beteiligt sind. Beim sogenannten Nukleosomenremodelling werden durch ATP-abhängige Enzyme Histonoktamere verschoben, um bestimmte DNA-Abschnitte für die Transkriptionsmaschinerie zugänglich zu machen [Becker und Horz, 2002].

Posttranslationale Histonmodifikationen, wie z.B. Acetylierung und Methylierung, können die Genexpression aktivieren sowie reprimieren, worauf im folgenden Kapitel näher eingegangen werden soll.

1.5.1 Histonmodifikationen

Das DNA-Molekül einer einzelnen eukaryontischen Zelle ist im linearen Zustand etwa 2 m lang. Der Durchmesser dieser Zelle beträgt weniger als 10 μm . Aus diesem Grund benötigt die DNA eine hochkomprimierte Verpackung (Abb.2 A), damit sie in den Zellkern einer solchen Zelle passt. Die DNA ist mit Proteinen assoziiert, die Histone genannt werden. Dieser Nukleoproteinkomplex bildet das Chromatin. Das Chromatin ist in seiner Struktur sehr variabel und existiert in kondensierter und ausgedehnter Form [Kornberg, 1974]. Je höher der Grad der Kondensation, umso erschwerter ist die Genexpression, da die entsprechenden DNA-Abschnitte nicht für die Transkriptionsmaschinerie zugänglich sind. Die erste Verpackungsstufe des Chromatins stellt das Nukleosom dar (Abb.2 B). Es besteht aus einem Histonoktamer (je zwei der Histonproteine H2A, H2B, H3 und H4), um welches jeweils 146 bp der Doppelhelix gewunden sind. Zwischen jedem Nukleosom befindet sich ein Stück Linker-DNA, welches bei verschiedenen Organismen unterschiedlich lang ist. Histon H1 bindet sowohl an die Linker-DNA als auch an das Nukleosom [Gräff et al., 2011].

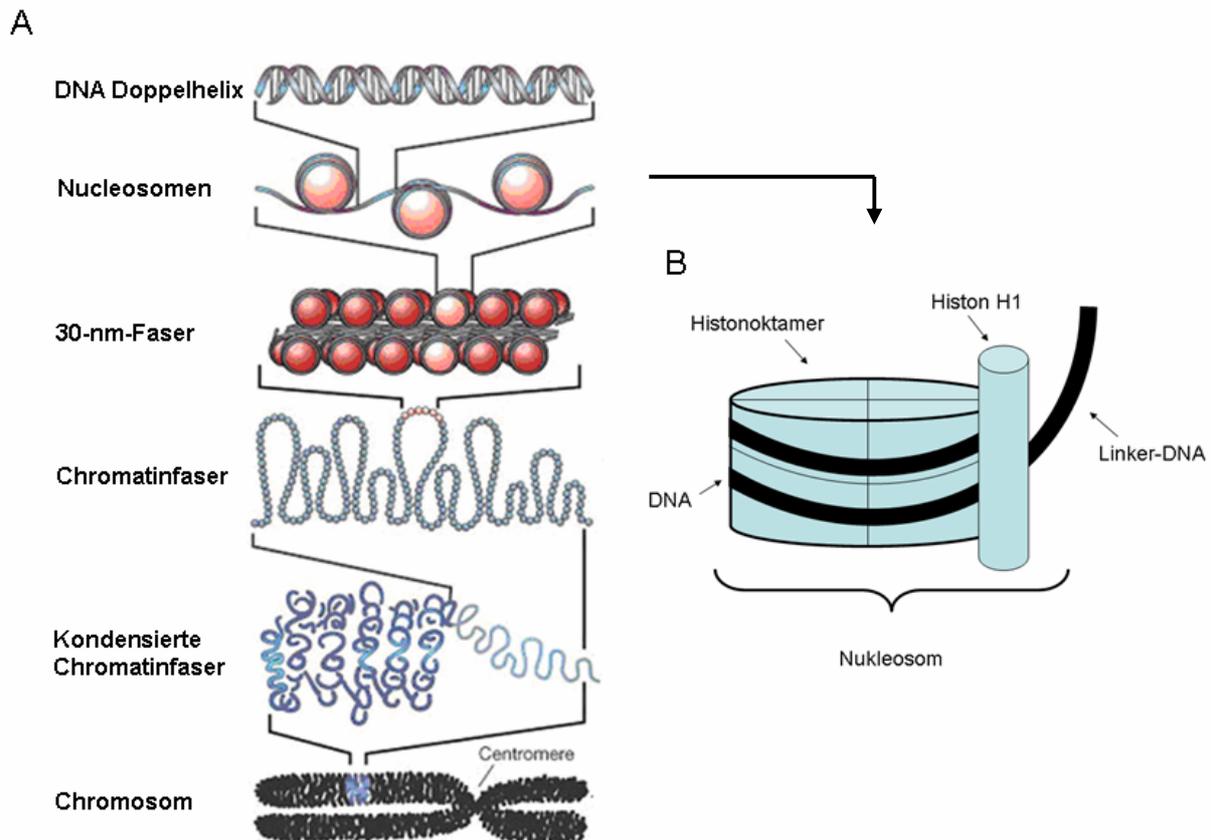


Abbildung 2: Die Verpackung der DNA

A: Dargestellt sind die verschiedenen Verpackungsstufen der DNA bis hin zum Chromosom [verändert nach www.integratedhealthcare.eu].

B: Zu sehen ist ein Nukleosom, die kleinste Verpackungseinheit des Chromatins. Die DNA ist um ein Histonoktamer (bestehend aus je zwei der Histonproteine H2A, H2B, H3 und H4) gewunden. Histon H1 vervollständigt die Struktur. Zwischen 2 Nucleosomen verläuft jeweils ein Stück Linker-DNA.

Die nächste Verpackungsstufe ist die 30-nm-Faser, die aufgrund von Wechselwirkungen zwischen den H1-Proteinen entsteht. Es gibt noch weitere Verpackungsstufen bis hin zu den Chromosomen, welche in der Metaphase während der Zellteilung zu sehen sind.

Die Grundlage für die Kompaktierung der DNA beruht auf den elektrostatischen Wechselwirkungen zwischen dem negativ geladenen DNA-Rückgrat und positiv geladenen Aminosäuren der Histone. Histonmodifikationen wurden am C- und N-terminalen Ende der Histonproteine sowie an Aminosäureresten innerhalb des Nucleosoms gefunden. Die am meisten modifizierten Aminosäuren befinden sich an den N-terminalen Histonschwänzen, welche überwiegend aus basischen Aminosäuren bestehen. Sie ragen aus dem Nucleosom heraus und sind somit für kovalente Modifikationen besonders zugänglich (Abb.3). Die wichtigsten Histonmodifikationen,

die Einfluss auf die Transkription von Genen haben, sind die Phosphorylierung von Serinen, Threoninen und Tyrosinen, die Methylierung von Lysinen und Argininen und die Acetylierung von Lysin-Resten [Gräff et al., 2011]. Man unterscheidet zwischen Modifikationen, die zu einer Ladungsänderung führen und somit direkt Einfluss auf die Chromatinstruktur haben und solche, die die DNA-Bindeaffinität nicht beeinflussen. Letztere benötigen Cofaktoren, um die Chromatinstruktur zu verändern. Modifikationen mit Ladungsänderung, wie zum Beispiel die Acetylierung, können Modifikationen ohne Ladungsänderung überschreiben. Außerdem können sich die unterschiedlichen Modifikationen auch untereinander beeinflussen. Aufgrund der Komplexität dieser reversiblen Prozesse spricht man auch vom so genannten Histon-Code, dessen komplette Entschlüsselung noch weit entfernt ist [Berger, 2007; Daujat et al., 2002; Jenuwein und Allis, 2001].

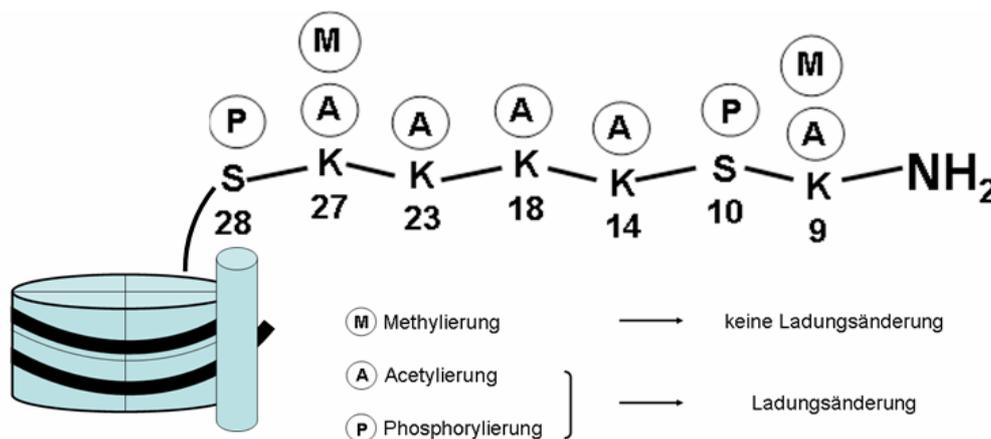


Abbildung 3: Histonmodifikationen am Histon H3

Schematische Darstellung des Histon H3 mit einer Auswahl an Aminosäuren (AS) am N-terminalen Histon Schwanz und möglichen Modifikationen. Die Zahl gibt die Position und der Buchstabe die Art der AS an (Einbuchstabencode: S = Serin, K = Lysin). AS die zwei Modifikationen tragen, können beide besitzen, wobei sie sich gegenseitig ausschließen.

1.5.2 Histonacetylierung

Die am besten untersuchte Histonmodifikation ist die Histonacetylierung, die in der Regel eine eindeutige Auswirkung auf die Chromatinstruktur hat. Der reversible Prozess der Histonacetylierung wurde erstmals im Jahre 1964 von Allfrey et al. beschrieben. Einige Jahre später wurde die Korrelation zwischen Histonacetylierung und Genexpression veröffentlicht [Allfrey et al., 1964; Allfrey, 1970; Wangh, 1972]. Durch die Übertragung einer Acetylgruppe auf die ϵ -Aminogruppe der Lysine am N-terminalen Histon Schwanz, wird die positive Ladung der ϵ -Aminogruppe neutralisiert.

Dadurch werden die biophysikalischen Eigenschaften des Chromatins verändert und die Bindeaffinität zur DNA geht verloren, was dazu führt, dass aktivierte Transkriptionsfaktoren besser binden können [Davie, 1998; Turner, 1991]. Der Acetylierungszustand der Histone wird durch zwei Enzymklassen reguliert: die Histonacetyltransferasen (HAT) übertragen die Acetylgruppe vom Cofaktor Acetyl-CoA auf die Lysinreste und die Histondeacetylrasen (HDAC) entfernen diese wieder [Kuo und Allis, 1998; Biel et al., 2005] (Abb. 4).

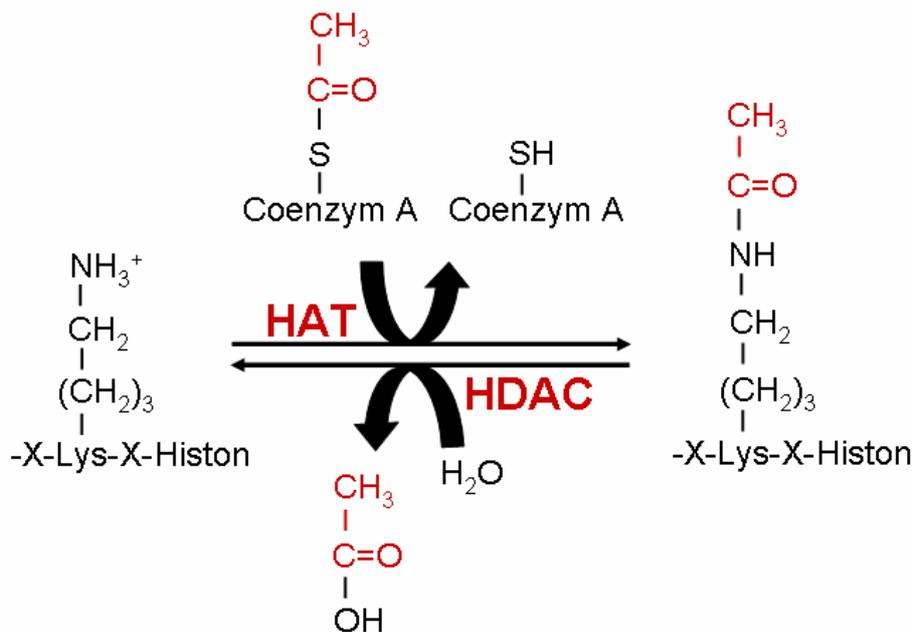


Abbildung 4: Acetylierung von Lysinresten an Histonen

Die Acetylgruppe wird durch eine Histonacetyltransferase (HAT) auf die ϵ -Aminogruppe eines Lysinrestes am Histonschwanz übertragen. Die Acetylgruppe liefert dabei der Cofaktor Acetyl-Coenzym A. Nach der Acetylierung ist die positive Ladung des Lysins neutralisiert. Die entgegengesetzte Reaktion wird durch eine Histondeacetylase (HDAC) katalysiert.

1.5.3 Histonacetyltransferasen

Seit Untersuchung der Histonacetylierung hat man schon über 20 Enzyme gefunden, die eine HAT-Aktivität aufweisen. Die historische Einteilung erfolgte in Typ A HATs, die im Zellkern lokalisiert und an der Regulation der Transkription beteiligt sind [Sternier und Berger, 2000] und Typ B HATs, die sich im Zytoplasma befinden und neu synthetisierte freie Histone und auch andere zytosolische Proteine acetylieren [Allis et al., 1985; Ruiz-Carrillo et al., 1975]. Es gibt jedoch auch Hinweise, dass einige Enzyme Bestandteile von Multiproteinkomplexen sind und sowohl im Zytoplasma als auch im Zellkern an zellulären Vorgängen beteiligt sind und somit nicht

ganz in dieses historische Schema passen [Lee und Workman, 2007; Ruiz-Garcia et al., 1998]. Die Einteilung der HATs in 5 Familien wurde aufgrund von Sequenzähnlichkeiten der Enzyme, unterschiedlichen katalytischen Mechanismen und unterschiedlicher Substratspezifität zusammengestellt [Marmorstein, 2001; Marmorstein, 2004; Poux und Marmorstein, 2003; Thompson et al., 2001].

Nachfolgend sind die HAT-Familien mit einigen bekannten Vertretern aufgelistet:

- Gcn5/PCAF-Familie:
 - Gcn5 (General control of amino acid synthesis protein 5)
 - PCAF (p300/CBP associated factor)

Vertreter dieser Familie besitzen eine HAT- und eine carboxyterminale Bromodomäne, sie acetylieren vorwiegend Histon H3 und übertragen den Acetylrest von Acetyl-CoA direkt vom Cofaktor auf das Stickstoffatom des Substratlysins [Clements et al., 2003; Rojas et al., 1999].

- MYST-Familie:

Wurde nach ihren ersten Vertretern benannt: **MOZ**, **Ybf2/Sas3**, **Sas2** und **Tip60**.

Vertreter dieser Familie besitzen eine Chromo-, Zinkbinde- und eine HAT-Domäne. Es wird vorwiegend H4 acetyliert. Die Übertragung der Acetylgruppe von Ac-CoA auf die Lysinreste erfolgt direkt oder indirekt über ein selbst-acetyliertes Intermediat [Berndsen et al., 2007; Yan et al., 2002].

- p300/CBP-Familie:
 - p300
 - CBP (CREB binding protein)

Sie besitzen eine Bromo- und eine carboxyterminale HAT-Domäne. Außerdem findet man drei Cystin-Histidin-reiche Domänen, die für das Vermitteln von Protein-Protein-Interaktionen bekannt sind. p300/CBP sind globale Coaktivatoren und anders als andere HATs können sie alle vier Histone und auch nukleosomale Histone acetylieren [Bannister und Kouzarides, 1996; Ogryzko et al., 1996].

- TAFII250-Familie:

Eine der TAFII-Untereinheiten (**TATA-binding protein [TBP]-associated factor**) ist selbst eine Histonacetyltransferase.

Sie besitzt eine doppelte Bromodomäne, eine HAT-Domäne und zusätzlich noch zwei Kinasedomänen. Vorwiegend wird H4 als Substrat verwendet.

- SRC-Familie (Coaktivatoren der nukleären Rezeptoren):

Die humanen Coaktivatoren SRC-1 (steroid receptor coactivator), TIF-2 und ACTR weisen eine Histonacetyltransferaseaktivität auf [Chen et al., 1997; Kamei et al., 1996; Voegel et al., 1996]. Sie besitzen eine HAT-Domäne und eine Rezeptorinteraktionsdomäne.

Der Transkriptionsfaktor ATF-2, der sequenzspezifisch an die DNA bindet und die Transkription aktiviert, besitzt auch eine HAT-Domäne [Kawasaki et al., 2000]. Er wird jedoch in keine Familie eingeteilt.

Für die Histonacetyltransferasen sind nur sehr wenige selektive und potente Hemmstoffe bekannt. Dazu gehören unter anderem die Isothiazolone, Curcumin, Anacardinsäure und Garcinol [Balasubramanyam et al., 2003, 2004; Stimson, 2005].

1.5.4 Histondeacetylasen

Bislang wurden 11 Proteine identifiziert, die eine hoch konservierte Deacetylasedomäne aufweisen. Die Histondeacetylasen sind meist mit Transkriptionsfaktoren assoziiert oder Bestandteil großer Multiproteinkomplexe. Man findet sie sowohl im Zytoplasma als auch im Zellkern [Haberland et al., 2009].

Sie werden aufgrund von Sequenzübereinstimmung und Domänenverwandtschaft, basierend auf der Homologie in der Hefe, in vier Klassen eingeteilt [Biel et al., 2005; Leipe und Landsman, 1997]:

- Klasse I
 - HDAC1 - HDAC3
 - HDAC8

Diese HDACs besitzen eine relativ einfache Proteinstruktur, bestehend aus einer Deacetylasedomäne mit kurzen amino- sowie carboxyterminalen Verlängerungen.

- Klasse IIa
 - HDAC4 – HDAC5
 - HDAC7
 - HDAC9

Diese HDACs haben einen langen Aminoterminus mit Bindestellen für den Transkriptionsfaktor MEF2 (myocyte enhancer factor 2) und das Chaperonprotein 14-3-3. MEF2 kann sowohl als transkriptioneller Aktivator (in Assoziation mit der HAT p300) oder als Repressor (nach Bindung einer Klasse IIa HDAC) fungieren.

Das Chaperon 14-3-3 sorgt dafür, dass die HDAC nach Inaktivierung aus dem Kern ins Zytoplasma transportiert wird.

- Klasse IIb
 - HDAC6
 - HDAC10

HDAC6 unterscheidet sich von allen anderen Deacetylasen. Sie besitzt zwei Deacetylasedomänen und eine carboxyterminale Zinkfingerdomäne. Man findet sie im Zytoplasma, wo sie hauptsächlich α -Tubulin, Chaperone und Transmembranproteine deacetyliert [Hubbert et al., 2002; Kovacs et al., 2005; Li et al., 2008]. Über die HDAC10 ist noch wenig bekannt. Sie besitzt neben ihrer Deacetylasedomäne eine carboxyterminale Leucin-reiche Region.

Alle Vertreter der Klassen I und II spalten Zn^{2+} -abhängig die Acetylgruppen von Lysinresten ab und werden durch die bekannten HDAC-Inhibitoren Trichostatin A (TSA), Natriumbutyrat und Valproat (VPA) inhibiert [Bolden et al., 2006].

- Klasse III
 - SIRT1 – SIRT7

Die HDACs der Klasse III werden auch als Sirtuine bezeichnet und sind sowohl im Zytoplasma, im Zellkern als auch in den Mitochondrien lokalisiert. Sie weisen einen NAD^+ -abhängigen Mechanismus auf, bei dem Nicotinamid (NAM), O-acetyl-ADP-ribose (AADPR) und das deacetylierte Substrat frei wird [Rajendran et al., 2011]. Daher besitzen sie alle eine NAD^+ -abhängige katalytische Domäne, sowie Zinkfingerdomänen. Die Sirtuine sind unempfindlich gegenüber Klasse I und II Hemmstoffen, sie können jedoch durch Nicotinamid (NAM) inhibiert werden (Produktthemung). Es wurden bisher sieben humane Sirtuine (SIRT1-SIRT7) identifiziert [Gray und Ekström, 2001].

- Klasse IV

Sie besteht nur aus der humanen HDAC 11 und bildet eine eigenständige Klasse [Gregoretto et al., 2004; Xu et al., 2007]. Die HDAC11 besitzt eine Deacetylasedomäne, die Homologie zur Domäne der HDACs Klasse I und II aufweist. Sie hat kurze amino- und carboxyterminale Verlängerungen [Haberland et al., 2008].

Sowohl HATs als auch HDACs acetylieren und deacetylieren neben Histonen auch Nicht-Histonproteine, wie z.B. Tubulin oder das Tumorsuppressorprotein p53 [Liu et al., 1999; de Forges, 2012]. Dabei dient die Acetylierung des Proteins der Stabilisierung, Aktivierung oder verzögert den proteasomalen Abbau [Caron, 2005; Sadoul, 2007].

1.6 Histonacetylierung und Gedächtnisbildung

Der Einfluss epigenetischer Mechanismen auf Lernen und Gedächtnisbildung wird erst seit einigen Jahren erforscht. Im Jahr 1999 wurde zum ersten Mal die Annahme geäußert, dass epigenetische Mechanismen einen Einfluss auf das Langzeitgedächtnis haben müssten [Holliday, 1999] und es begannen die ersten Experimente an Mäusen mit einer Mutation im CBP-Gen, die schwere Defizite bei der Gedächtnisbildung aufwies, da die bei der Transkription benötigte, durch CBP (CREB binding protein) vermittelte Histonacetylierung nicht mehr stattfinden konnte [Alarcón et al., 2004; Bourtchouladze et al., 2003; Korzus et al., 2004; Oike et al., 1999; Wood et al., 2005]. In späteren Jahren wurde dies auch für andere HATs in Mausmodellen nachgewiesen [Oliveira et al., 2007; Maurice et al., 2004].

Neben genmanipulativen Methoden wurden auch Inhibitoren Histon-modifizierender Enzyme eingesetzt, um deren Funktion bei der Gedächtnisbildung zu untersuchen. Es konnte gezeigt werden, dass sich durch Verwendung von HDAC-Inhibitoren und der dadurch induzierten Erhöhung der Histonacetylierung das Gedächtnis bei *Aplysia* [Guan et al., 2002], der Krabbe *Chasmagnathus* [Federman et al., 2009] und der Maus [Chwang et al., 2007; Levenson et al., 2004; Vecsey et al., 2007] verbessern lässt. Der Einsatz von HAT-Inhibitoren hat auf epigenetische Mechanismen der Genregulation und deren Auswirkungen auf Lernen und Gedächtnisbildung den entgegengesetzten Effekt. Die Histonacetylierung wird verringert und das Gedächtnis verschlechtert sich. Man fand heraus, dass Garcinol die Östrogen-induzierte Erhöhung der Acetylierung von H3 und die damit verbundene Verbesserung des Gedächtnisses bei Mäusen wieder auf das Kontrolllevel reduziert [Zhao et al., 2012]. Bei der Krabbe führt die Injektion eines HAT-Inhibitors dazu, dass das erhöhte Acetylierungslevel von H3 in der Rekonsolidierungsphase nach starkem Training reduziert wird und sich dadurch das Gedächtnis verschlechtert [Federman et al., 2012].

Aber nicht nur Auswirkungen einer manipulierten Histonacetylierung auf das Gedächtnis konnten nachgewiesen werden. Man fand auch erhöhte Acetylierungslevel an H3 und H4 nach dem Lernen bei *Aplysia* [Fioravante et al., 2008; Guan et al., 2002], *Chasmagnathus* [Federman et al., 2009] und bei der Maus [Chwang et al., 2006, 2007; Lubin und Sweatt, 2007; Koshibu et al., 2009].

Durch Hyperacetylierung der Histone wird die CREB/CBP-vermittelte Induktion der Transkription erleichtert, was zu einer verstärkten Expression von Proteinen führt, die bei Lernprozessen benötigt werden.

1.7 Gedächtnisinduzierende und -reprimierende Mechanismen

Bei der Regulation der Speicherung relevanter Gedächtnisinhalte sind jedoch nicht nur Proteine oder Gene beteiligt, nach deren Aktivierung die Gedächtnisbildung gefördert wird (positive Regulatoren). Es gibt auch sogenannte memory suppressor genes [Abel et al., 1998], deren Aktivität die Speicherung unwichtiger Ereignisse verhindert (negative Regulatoren) (Abb. 5). Ein solcher negativer Regulator bei *Aplysia* ist der Transkriptionsfaktor CREB2, der durch Heterodimerbildung mit CREB1 verhindert, dass die CREB1-induzierte Aktivierung der Expression gedächtnisfördernder Gene unterdrückt wird.

Beim Bewerten und Speichern von Informationen und der darauf folgenden Gedächtnisbildung bildet das ausgeglichene Zusammenspiel der positiven und negativen Regulatoren eine essentielle Grundlage.

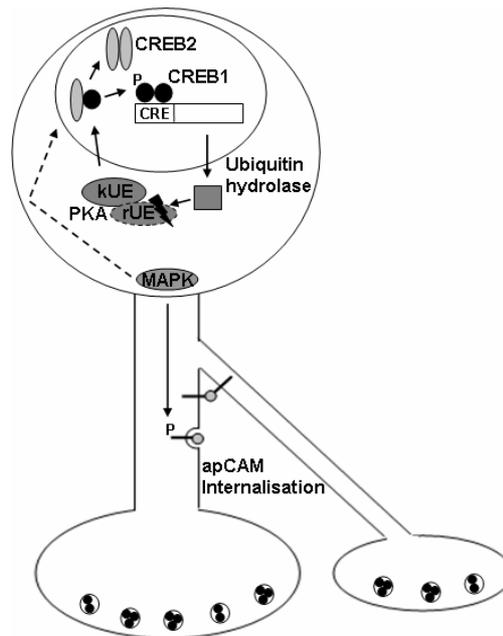


Abbildung 5: Molekulare Mechanismen bei der Bildung eines Langzeitgedächtnisses (LTM) am Beispiel der Sensibilisierung von *Aplysia californica*

Bei der Bildung eines Langzeitgedächtnisses für die Sensibilisierung des Kiemenrückzugsreflexes von *Aplysia* bedarf es einem ausgeglichenen Zusammenspiel zwischen positiven und negativen Regulatoren. Es werden sowohl Proteine und Gene aktiviert, die zur Langzeitverstärkung der Synapse führen als auch solche, die beim Auftreten unwichtiger Ereignisse verhindern, dass diese abgespeichert werden. Die Proteinkinase A (PKA) wird so stark aktiviert, dass die katalytische Untereinheit (kUE) im Zellkern (Nucleus) den Transkriptionsfaktor CREB1 (CRE element binding protein) aktiviert. Dieser induziert u.a. Gene, deren Proteine das Wachstum synaptischer Verbindungen fördern. Ein weiteres Gen kodiert für die Ubiquitinhydrolase, die den Abbau der regulatorischen Untereinheit der PKA (rUE) fördert und somit verhindert, dass eine länger anhaltende Aktivität der kUE unterdrückt wird. Damit CREB1 aktiviert werden kann, muss zuerst CREB2, welches die Aktivierung von CREB1 verhindert, deaktiviert werden. Dies erfolgt durch eine MAPK (mitogen activated proteine kinase). Sie induziert außerdem die Internalisation von apCAM (*Aplysia* cell adhesion molecule), welches das Auswachsen neuer synaptischer Verbindungen erschwert [verändert nach Hawkins et al., 2006].

Induzierende sowie reprimierende Mechanismen können zum einen auf der Ebene von Transkriptionsfaktoren die Gedächtnisbildung regulieren, zum anderen kann die Regulation auf Chromatinebene durch Änderung der Histonacetylierung erfolgen [McQuown et al., 2011], die dann in einem veränderten Expressionslevel von gedächtnisrelevanten Zielgenen resultiert. Wie die Änderung der Histonacetylierung bei der Ausbildung unterschiedlich starker Gedächtnisse oder nach pharmakologischer Manipulation die Expression vieler verschiedener gedächtnisrelevanter Gene verändert, ist noch völlig unklar und wurde im gleichen Umfang wie in dieser Arbeit noch nie untersucht.

1.8 Die Honigbiene als Modellorganismus

Schon seit über 50 Jahren wird die Honigbiene als Modellorganismus zu Untersuchungen an Lernen und der Gedächtnisbildung verwendet [Bitterman et al., 1983; Kuwabara, 1957]. Sie besitzt ein sehr komplexes Lernverhalten [Hammer und Menzel, 1995; Menzel, 2001], wobei sie ein sehr gutes visuelles und olfaktorisches Gedächtnis ausbilden kann (Navigation beim Flug und Wiederfinden von Futterplätzen) [Pahl et al., 2007].

Assoziatives Lernen (Konditionierung) lässt sich bei der Honigbiene unter Laborbedingungen gut durchführen. Bei der appetitiven olfaktorischen Konditionierung lernt die Biene einen Duft (CS) mit einer Zuckerwasserbelohnung (US) zu assoziieren, wobei eine einzelne CS-US-Paarung ein Gedächtnis induziert, welches nicht durch Translations- oder Transkriptioninhibitoren beeinflusst werden kann [Friedrich et al., 2004]. Durch eine dreimalige CS-US-Paarung jedoch kann ein solches Gedächtnis bei der Honigbiene nach 72 h ausgebildet werden [Wüstenberg et al., 1998]. Auch alle anderen vorgestellten Lernparadigmen und die Lernkaskaden sind in der Biene analysiert und etabliert worden.

Sequenzanalysen haben gezeigt, dass Chromatin-modifizierende Enzyme, wie *de novo* DNA-Methyltransferasen, Histonacetyltransferasen und Histondeacetylasen, in der Biene exprimiert werden [Honeybee Genome Sequencing Consortium, 2006].

Experimente mit dem HDAC-Inhibitor TSA und dem HAT-Inhibitor Garcinol beim Lernen und der Gedächtnisbildung der Honigbiene wurden bisher nur in unserem Labor durchgeführt [Merschbaecher et al., 2012]. Experimente zu lerninduzierten Veränderungen des Histonacetylierungslevels und der Expression gedächtnisrelevanter Gene wurden erstmalig im Rahmen dieser Arbeit durchgeführt.

1.9 Zielsetzung dieser Arbeit

In dieser Arbeit sollte der Zusammenhang zwischen der Histonacetylierung und der dadurch induzierten Genexpression beim Lernen und der Gedächtnisbildung untersucht werden. Dazu wurden verschiedene Methoden angewandt und etabliert:

- Mittels proteinquantifizierenden Messungen sollte getestet werden, ob sich die Dynamik der Histonacetylierung bei der Ausbildung unterschiedlich starker Gedächtnisse unterscheidet. Ebenfalls sollte untersucht werden, ob sich diese Dynamik mit einem HDAC-Inhibitor (TSA) und einem HAT-Inhibitor (Garcinol) manipulieren lässt.
- Der Einfluss von TSA und Garcinol auf das Gedächtnis sollte in Verhaltensexperimenten nachgewiesen werden.
- Mit quantitativen real-time Experimenten sollte untersucht werden, ob sich die Expression einiger bei der Gedächtnisbildung relevanter Gene zu bestimmten Zeitpunkten nach dem Lernen ändert, ebenso nach TSA- und Garcinol-Applikation. Es sollten die Zeitfenster gewählt werden, bei denen sich auch die Histonacetylierung verändert hat.
- Desweiteren war geplant, anhand einer Transkriptomanalyse mittels Hochdurchsatz-Sequenzierung weitere Gene zu identifizieren, die in diesem Zeitfenster unterschiedlich stark exprimiert werden.

Um den Einfluss epigenetischer Mechanismen auf die Gedächtnisbildung zu untersuchen, wurden bisher ausschließlich Genexpressionsanalysen auf Grundlage von Quantifizierungen des gesamten mRNA-Pools gemacht. In dieser Arbeit sollten jedoch lerninduzierte Änderungen der Genexpression untersucht werden.

Daher wurde eine Methode in der Honigbiene etabliert, um *de novo* mRNA *in vivo* zu markieren und anschließend zu separieren, um gezielt Transkriptions- und Transkriptomanalysen aktivitätsabhängiger Genexpressionsänderungen zu beliebigen Zeitpunkten nach dem Training durchführen zu können.

2. Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Chemikalien

1-Butanol (wassergesättigt)	Chemikalienlager (Z-Chem), Saarbrücken
2-Mercaptoethanol	Merck, Darmstadt
Agarose	Sigma Aldrich, München
Ammoniumacetat	Z-Chem, Saarbrücken
APS (Ammoniumperoxodisulfat)	Z-Chem, Saarbrücken
Biotinazid	Jena Bioscience, Jena
Bis-Acrylamid (0,8 % [w/v] Bisacrylamid, 30% [w/v] Acrylamid)	Roth, Karlsruhe
Bromphenolblau (3,3',5,5'-Tetrabromphenol- sulfonphthalein-Na-Salz)	Appli Chem, Darmstadt
BSA (Rinder Albumin Fraktion V)	Roth, Karlsruhe
CaCl ₂ x2H ₂ O (Calciumchlorid-2-Hydrat)	Merck, Darmstadt
Chemolumineszenz-HRP-Substrat (Luminol Reagenz, Peroxid)	Elmer Perkin, Waltham
DEPC (Diethylpyrocarbonat)	Roth, Karlsruhe
DMSO (Dimethylsulfoxid)	Z-Chem, Saarbrücken
EDTA (Dinatriumsalz-Dihydrat)	Z-Chem, Saarbrücken
Eisessig (99,7% Essigsäure)	Z-Chem, Saarbrücken
EtBr (Ethidiumbromid)	AppliChem, Darmstadt
Ethanol absolut	Sigma Aldrich, München
Formaldehyd	Z-Chem, Saarbrücken
Formamid	Z-Chem, Saarbrücken
Glycerin	Z-Chem, Saarbrücken
Glycin	Roth, Karlsruhe
Harnstoff	Z-Chem, Saarbrücken
HCL (Salzsäure)	Merck, Darmstadt
KCl (Kaliumchlorid)	Merck, Darmstadt
KH ₂ PO ₄ (Kaliumdihydrogenphosphat)	Merck, Darmstadt
Methanol	Z-Chem, Saarbrücken

MgCl ₂ x6H ₂ O (Magnesiumchlorid)	Merck, Darmstadt
MOPS (3-(N-Morpholino)-Propansulfonsäure)	Roth, Karlsruhe
NaCl (Natriumchlorid)	Z-Chem, Saarbrücken
NaHCO ₃ (Natriumhydrogencarbonat)	Merck, Darmstadt
Na ₂ HPO ₄ x2H ₂ O (Dinatriumhydrogenphosphat-2-Hydrat)	Z-Chem, Saarbrücken
NaN ₃ (Natriumazid)	Acros Organics, Geel
NaOH (Natriumhydroxid)	Z-Chem, Saarbrücken
Natriumacetat	Z-Chem, Saarbrücken
Natriumbutyrat	Sigma Aldrich, München
Natriumcitrat	Z-Chem, Saarbrücken
Nelkenöl	Apotheke, Saarbrücken
Paraffin Histowax	Leica, Solms
p-NPP (para-Nitrophenylphosphat)	AppliChem, Darmstadt
Poly-L-Lysin	Sigma Aldrich, München
RNase-Dekontaminationsreagenz	Appli Chem, Darmstadt
Saccharose	Lebensmittelhandel
SDS (Natriumdodecylsulfat)	Roth, Karlsruhe
Temed (N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin)	Appli Chem, Darmstadt
Trinatriumcitrat Dihydrat	Z-Chem, Saarbrücken
Tris (Tris(hydroxymethyl)-aminomethan)	Sigma Aldrich, München
Triton-X-100 (Polyethylen-glycol-tert-octylphenylether)	Z-Chem, Saarbrücken
Tween 20 (Polyoxyethylensorbitanmonolaurat)	Appli Chem, Darmstadt
Wasser UltraPure DNase/Rnase frei	Fisher Scientific, Schwerte
Xylencyanol	Appli Chem, Darmstadt

2.1.2 Verbrauchsmaterial

96-well PCR-Platten High-Profile	Biozym, Oldendorf
96-well Platten Immuno-Plate	Nunc, Wiesbaden
Deckgläschen	Roth, Karlsruhe
Dentalwachs (medium)	Ubert, Raesfeld
Falconröhrchen, steril (15 ml und 50 ml)	Greiner, Solingen
Filterspitzen	Biozym, Oldendorf

Glaskapillaren Capilettor Tips (1 - 5 µl)	Selzer, Waghäusel
Glasobjektträger	Roth, Karlsruhe
Kanülen	Braun, Melsungen
Klebefilm für Multiplate 96	Biozym, Oldendorf
Metallstößel für die Glaskapillaren	Selzer, Waghäusel
Nitrocellulose-Membran (Optitran BA-S 85)	Schleicher / Schuell, Dassel
Optical adhesive film (für PCR Platten)	Finnzymes, Vantaa FIN
Pasteurpipetten	Roth, Karlsruhe
PCR-Reaktionsgefäße	Sarstedt, Nümbrecht
Rasierklingen	Drogerie, Saarbrücken
Reaktionsgefäße (1,5 ml)	Eppendorf, Wesseling
Reaktionsgefäße (0,5 ml)	Eppendorf, Wesseling
Röntgenfilm BioMax Xar Film	Kodak, Stuttgart
Röntgenfilm-Entwickler REF 103482	Tetenal, Norderstedt
Röntgenfilm-Fixierer REF 103655	Tetenal, Norderstedt
Silikon (Baysilone-Paste mittelviskos)	Bayer, Berlin
Spritzen (2 ml und 50 ml)	Braun, Melsungen
Tafelzucker (Sucrose)	Geschäft, Saarbrücken
Textilklebeband	Geschäft, Saarbrücken
UV-Küvette Mikro	Brand, Wertheim
Whatman-Papier	Schleicher / Schuell, Dassel
Zahnstocher	Drogerie, Saarbrücken

2.1.3 Geräte

1 ml-Glashomogenisator mit Glas-S-Stößel	Braun, Melsungen
Bechergläser	VWR, Darmstadt
Bienenracks	eigene Herstellung
Bienenröhrchen	eigene Herstellung
Binokular S6D	Leica, Solms
Block-Heizgerät (Accu Block)	Labnet, Ried im Innkreis
Brutschrank	Horo, Ostfildern
Elektrophoresesysteme (vertikal und horizontal)	Owl, Rochester NY
ELISA-Reader safire ²	Tecan, Crailsheim
Fangröhrchen PS-Röhrchen (68 ml)	Greiner, Solingen

Fangpyramide	eigene Herstellung
Fluoreszenzmikroskop Axiovert 200 M	Zeiss, Oberkochen
Fluoreszenzmikroskop-Filtersatz TRICT/CY3 (HQ535/50, Q565LP, HQ610/75)	AHF, Tübingen
Folienschweißgerät	Severin, Sundern
Genome Sequencer FLX System	Roche, Grenzach-Wyhlen
Inkubationsschüttler Th15	Johanna Otto GmbH, Bodelshausen
Kaltlichtquelle KL 1500 LCD	Schott, Mainz
Kamera Cool Snap HQ ²⁺	Photometrics, Tucson
Kasten mit UV-Licht	eigene Herstellung
Klingenbrecher	Nopa Instruments, Tuttlingen
Lötkolben	eigene Herstellung
Magnetic Separation Stand	Promega, Mannheim
Mastercycler Personal	Eppendorf, Wesseling
Mehrfach-Vakuumfiltrationsgerät	Schleicher / Schuell, Dassel
Membran Vakuumpumpe	Vacuubrand, Wertheim
Mikropipetten Puller Model P-87	Sutter Instrument, Freiburg
Mikroskop Leitz DMRB	Leica, Wetzlar
Mikrotom Autocut 2040	Reichert-Jung, Pliening
Mx3000P QPCR System	Stratagene, Waldbronn
MyiQ2 Two-Color RT-PCR Detection System	Bio-Rad, München
Nanodrop 2000c Spectrophotometer	Peqlab, Erlangen
pH-Meter (inoLab pH 730)	WTW, Weilheim
Pinzetten (Dumont)	Neolab, Heidelberg
Pipetten (Einkanal: 10, 100, 200, 1000 µl)	Abimed, Langenfeld
Powerstation 300 PLUS	Labnet, Edison, NJ (USA)
Präparationsbesteck	Laborbedarf, Hamburg
Rührheizgerät IKA RCT basic	IKA-Labortechnik, Staufen
Schüttler KS501 digital	IKA-Labortechnik, Staufen
Semi Dry Electroblotting	Owl, Rochester NY
Switching Power DPS-4005 PFC	Voltkraft, Hirschau
Thermomixer MB-102	Biozym, Oldendorf
Ultraschallgerät HTU Soni 130	Heinemann, Schwäb.Gmünd

Vortex VX 100	Labnet, Berlin
Waage CP3202S und CP225D	Sartorius, Göttingen
Zentrifuge 5417R	Eppendorf, Wesseling
Zentrifuge (Spectrafuge 24D)	Labnet, Edison NJ
Zentrifuge 5804 R	Eppendorf, Wesseling

2.1.4 Enzyme und Kits

Click-iT® Nascent RNA Capture Kit	Invitrogen, Darmstadt
GS FLX Titanium General Library Preparation Kit	Roche, Grenzach-Wyhlen
GS FLX Titanium PicoTiterPlate Kit 70x75	Roche, Grenzach-Wyhlen
GS FLX Titanium Sequencing Kit XLR70	Roche, Grenzach-Wyhlen
GS FLX Titanium SV emPCR Kit (Lib-L)v2	Roche, Grenzach-Wyhlen
Maxima® Hot Start Taq DNA Polymerase	Fermentas, St. Leon-Rot
Premix Ex Taq™ Perfect real Time	Takara, Saint-Germain-en-Laye
QuantiTect® Whole Transcriptome	Qiagen, Hilden
RevertAid™ H Minus First Strand cDNA	
Synthesis Kit	Fermentas, St. Leon-Rot
RiboLock RNase Inhibitor	Fermentas, St. Leon-Rot
Rnase-Free DNase Set	Qiagen, Hilden
RNeasy Mini Kit	Qiagen, Hilden

2.1.5 Sonstige Reagenzien

DNA-Standard (6x O'RangeRuler™ DNA-Ladder)	Fermentas, St. Leon-Rot
dNTP Mix (je 10 mM)	Fermentas, St. Leon-Rot
Dynabeads Protein G	Invitrogen, Darmstadt
Flüssiger Stickstoff	Air Liquide, Düsseldorf
Ladepuffer (6x Orange DNA loading dye)	Fermentas, St. Leon-Rot
Protein-Standard (SeeBlue® Plus2	
Pre-Stained Standard)	Invitrogen, Darmstadt
RiboRuler™ High Range RNA Ladder	Fermentas, St. Leon-Rot
Rox II Dye	Takara, Saint-Germain-en-Laye
SYBR® Green (10000x)	Sigma-Aldrich, München
tRNA (Yeast)	Ambion, Berlin

UltraPure™ Glycogen

Invitrogen, Darmstadt

2.1.6 Puffer und Lösungen

DNA-Gelelektrophorese

50 x TAE-Puffer:

2 M Tris

50 mM EDTA (pH 8,0)

1 M Eisessig

DNA-Agarosegel 1% (60 ml):

0,6 g Agarose

3 µl Ethidiumbromid

in TAE-Puffer

SDS-PAGE

5 x Probenpuffer:

10 mM 2-Mercaptoethanol

0,05% [w/v] Bromphenolblau

20% [v/v] Glycerin

10% [w/v] SDS

200 mM Tris-HCl (pH 6,8)

Sammelgel 4% (2 ml):

267 µl Bis-Acrylamid

25 µl 20% [w/v] SDS

10 µl 10% [w/v] APS

5 µl Temed

1,193 ml H₂O dest.

500 µl 0,5 M Tris-HCl (pH 6,8)

Trenngel 10% (4 ml):

1,3 ml Bis-Acrylamid

20 µl 20% [w/v] SDS

20 µl 10% [w/v] APS

10 µl Temed

1,617 ml H₂O dest.

1 ml 1,5 M Tris-HCl (pH 8,8)

2 MATERIAL & METHODEN

10 x Laufpuffer:

2 M Glycin
1% SDS
250 mM Tris

RNA-Gelelektrophorese

DEPC-H₂O (1 L)

999 ml H₂O bidest.
1 ml DEPC
über nach bei 37°C, autoklavieren

5 x RNA-Probenpuffer:

25 % Glycerin
0,2 % Bromphenolblau
0,2 % Xylencyanol
0,5 mM EDTA (pH 8,0)
0,5 µg/ml EtBr

10 x MOPS-Puffer (pH 7,0):

200 mM MOPS
50 mM NaAcetat
10 mM 0,5 M EDTA (pH 8,0)

RNA-Agarosegel 1% (60 ml)

0,6 g Agarose
6 ml 10x MOPS-Puffer
45 ml H₂O
aufkochen und abkühlen auf ca. 50°C
10,2 ml Formaldehyd

RNA-Dot Blot

20 x SSC :

3 M NaCl
300 mM Na Citrat (pH 7,0)

RNA-Denaturierungslösung (1ml):

660 µl Formamid
210 µl 37 % [w/v] Formaldehyd
130 µl 10 x MOPS

2 MATERIAL & METHODEN

Blockpuffer:	1 x PBS 0,5 % [w/v] BSA 0,1 % [v/v] Tween20
Waschpuffer:	1 x PBS 0,1 % [v/v] Tween20
<u>ELISA und Westernblot</u>	
Blockpuffer (ELISA):	1 x PBS 0,5 % [w/v] BSA
Blockpuffer (Westernblot):	1 x PBS 1 % [w/v] BSA 0,1 % [v/v] Tween20
Blotpuffer (Westernblot):	250 mM Tris 200 mM Glycin 20% (v/v) Methanol
Färbelösung (ELISA):	1 mM p-NPP in RxN-Puffer
Histon-Homogenisierungspuffer:	1x PBS 1 mM EDTA 5 mM Na-Butyrat
Histon-Homogenisierungspuffer mit Harnstoff:	1 x PBS 1 mM EDTA 5 mM Na-Butyrat 8 M Harnstoff
RxN-Puffer (ELISA):	1 mM MgCl ₂ ·6H ₂ O 100 mM Tris-HCl (pH 8,7)

2 MATERIAL & METHODEN

Waschpuffer (Westernblot):	1 x PBS 0,1 % [v/v] Tween20
<u>Immunohistologie</u>	
Fixierungspuffer	100 mM Phosphatpuffer 4 % Paraformaldehyd
Phosphatpuffer	40 mM KH_2PO_4 160 mM $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$
Blockpuffer-Tx	1 x PBS 0,5 % [w/v] BSA 0,1 % [v/v] Triton X-100
Waschpuffer PBS-Tx	0,1 % [v/v] Triton X-100 137 mM NaCl 2,7 mM KCl 10,1 mM Na_2HPO_4 1,8 mM KH_2PO_4
<u>Bromouridin-Immunopräzipitation</u>	
RSB	10 mM Tris-HCl (pH 7,4) 100 mM NaCl 2,5 mM MgCl_2 0,4 % [v/v] Triton X-100
10 x PBS+NaCl	400 mM NaCl 2,7 mM KCl 10,1 mM Na_2HPO_4 1,8 mM KH_2PO_4
TBST	50 mM Tris-HCL (pH 7,6) 150 mM NaCl 0,05 % [v/v] Tween20

Sonstige Puffer

10 x PBS	137 mM NaCl
	2,7 mM KCl
	10,1 mM Na ₂ HPO ₄
	1,8 mM KH ₂ PO ₄

2.1.7 Injektionslösungen

5-Bromouridin	Sigma Aldrich, München
5-Ethynyluridin	Jena Bioscience, Jena
Actinomycin D	Sigma Aldrich, München
Garcinol	Biomol, Hamburg
Trichostatin A	Sigma Aldrich, München

2.1.8 Antikörper

Primäre Antikörper:

5-Bromodeoxyuridin (mouse, monoklonal)	Sigma Aldrich, München
5-Bromodeoxyuridin (mouse, monoklonal)	Roche, Grenzach-Wyhlen
Acetyl-Histone H3 (Lys18) (rabbit, polyklonal)	Sigma Aldrich, München
Acetyl-Histone H3 (Lys9) (rabbit, polyclonal)	Sigma Aldrich, München
Acetyl-Lysin (rabbit, polyklonal)	Cell Signalling, Frankfurt
Histone H3 (rabbit, polyklonal)	Sigma Aldrich, München

Sekundäre Antikörper:

Anti-mouse IgG Peroxidase conjugated (rabbit, polyklonal)	Sigma Aldrich, München
Anti-rabbit IgG Peroxidase conjugated (goat, polyklonal)	Sigma Aldrich, München
Anti-rabbit IgG Alkaline Phosphatase conjugated (goat, polyklonal)	Sigma Aldrich, München
Anti-rabbit IgG AffiniPure Cy3™ conjugated (goat, polyklonal)	Dianova, Hamburg

2.1.9 Primer

Tabelle 1: Primer

mRNA-Primer	Sequenz (5' – 3')	RefSeq (NCBI)
EF1-alpha for	CCTCTTCAGGACGTATATAAAATCG	NM_001014993.1
EF1-alpha rev	AGCTTCGTGATGCATTTCAACAG	
CamKII for	CCGTCGCCGTTACCTATAA	NM_001134950.1
CamKII rev	CGGTTTCGTTCGTCCATTCC	
CBP for	TGCTCAGACAAGAACAAGAGGA	NM_001242468.1
CBP rev	ATGGCCATGCTGTACTGTGG	
CREB for	TTCTTGTCAGTAAACCCAACTCC	AJ430459.1 – 430466.2
CREB rev	ACCTCCTCTTTGTTCTGGAGATT	
NOS for	ACCGTTGCTGTCGTTCAATACA	NM_001012962.1
NOS rev	GGCGCACTACGTACAAATACAT	
TUB for	TGGTACCTGGTGGTGATCTTG	XM_001120096.1
TUB rev	ATACTTTCAGCCACATACCAGTG	

2.1.10 Software und Datenbanken

- Align (<http://www.ebi.ac.uk/Tools>)
- BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>)
- Cister (<http://zlab.bu.edu/~mfrith/cister.shtml>)
- ClastW2 (<http://www.ebi.ac.uk/Tools>)
- GS Reference Mapper (GS-FLX_Software_2.8, Roche)
- ImageJ (Bildverarbeitung und -analyse in Java)
- Microsoft Excel
- MxPro QPCR software for Mx3000P (v 4.1.0.0)
- Nucleotide (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide>)
- OligoAnalyzer 3.1 (<http://eu.idtdna.com/analyzer/applications/oligoanalyzer/>)
- OligoCalculator (<http://www.basic.northwestern.edu/biotools/oligoalc.html>)
- Origin8 (Datenanalyse- und Graphikprogramm)
- Primer of Biostatistics (Statistikprogramm)
- RefSeq (Reference Sequences - www.ncbi.nlm.nih.gov/RefSeq/)
- UniProtKB (Protein Knowledgebase - www.uniprot.org/)
- VassarStats (<http://faculty.vassar.edu/lowry/VassarStats.html>)

2.2 Methoden

2.2.1 Haltung der Versuchstiere (*Apis mellifera carnica*)

Im Sommer

Die Versuchstiere wurden in eigenen Bienenstöcken im Botanischen Garten der Universität des Saarlandes gehalten. Dort wurden die Bienen beim Ausflug am Stock mit Hilfe einer Plexiglaspyramide abgefangen und in Fangröhrchen überführt.

Im Winter

Im Winter wurden die Bienenstöcke in einer mit Fliegengitter umspannten Voliere in einem Winterflughaus mit Glasdach und einer zusätzlichen Lichtquelle gehalten. Temperatur (23-25 °C mit Nachtabsenkung) und Luftfeuchtigkeit (ca. 50%) wurden künstlich reguliert. Als Futterquelle für die Bienen diente 30% (w/v) Zuckerwasser und Pollen. Für die Experimente wurden die Bienen mit den Fangröhrchen aus der Voliere gefangen.

2.2.2 Vorbereitung der Versuchstiere

Zur Durchführung der Experimente wurden ausschließlich Sammlerbienen verwendet. Die gefangenen Bienen wurden in den mit Schaumstoffpfropf verschlossenen Fangröhrchen auf Eis immobilisiert und per Hand mit Textilklebeband in kleine Plastikröhrchen so fixiert, dass ausschließlich der Kopf mit Antennen und Proboscis (Rüssel) frei beweglich, sowie der Thorax für Injektionen zugänglich war (Abb. 6).

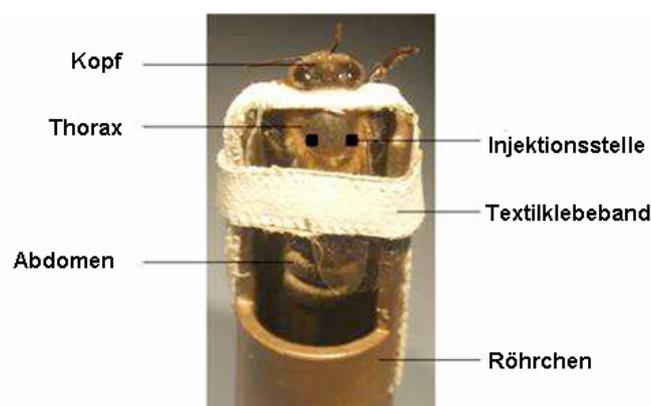


Abbildung 6: Zur Durchführung der Experimente eingespannte Biene

Dargestellt ist eine in einem Plastikröhrchen eingespannte Biene. Kopf und Abdomen sind mit Textilklebeband fixiert, bleiben dabei jedoch beweglich. Der Thorax liegt frei, um die Injektionen an den hier markierten Injektionsstellen durchzuführen.

Das Füttern erfolgte mit einer 1 M Saccharoselösung mittels einer Spritze. Die genauen Fütterungszeiten und Mengenangaben der jeweiligen Experimente sind dem Methoden- und Ergebnisteil zu entnehmen. Vor und zwischen einzelnen Versuchseinheiten wurden die Bienen in abgedunkelten, mit feuchten Tüchern ausgelegten Boxen bei Raumtemperatur (RT) aufbewahrt.

2.2.3 Thoraxinjektion

Die getesteten Substanzen wurden manuell mittels einer aus einer Glaskapillare spitz gezogenen Mikropipette in die in Abb. 6 gezeigte Injektionsstelle in den Thorax injiziert. Das Injektionsvolumen betrug 1 μ l. Die jeweiligen Injektionszeitpunkte sind dem Methoden- und Ergebnisteil zu entnehmen. Nach Optimierung wurden immer folgende Konzentrationen der jeweiligen Injektionslösung verwendet:

TSA: 1,65 mM (16,5 μ M im Tier), Lösungsmittel: PBS/20% DMSO

Garcinol: 6 mM (60 μ M Tier), Lösungsmittel: DMSO

ActD: 1,8 mM (18 μ M im Tier), Lösungsmittel: PBS/20% DMSO

BrU: 100 mM (1 mM im Tier), Lösungsmittel: DMSO

EU: 100 mM (1 mM im Tier), Lösungsmittel: PBS/50% DMSO

2.2.4 Verhaltensexperimente

2.2.4.1 Test der Reaktion auf gustatorische Reize

Hierbei wird der Rüsselrausstreckreflexes (proboscis extension response - PER) der Bienen nach Berühren der Antennen mit Wasser und verschiedenen Zuckerwasserlösungen (0 M, 0,03 M und 1 M) getestet (Abb. 7).

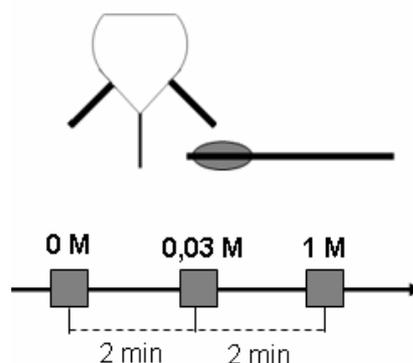


Abbildung 7: Schema zur Durchführung des Test der Reaktion auf gustatorische Reize
Die Bienen wurden im Abstand von 2 min mittels eines Zahnstochers mit Wasser und verschiedenen Zuckerwasserlösungen (0 M, 0,03 M und 1 M Saccharoselösung) in aufsteigender Reihenfolge an den Antennen berührt und auf den PER getestet.

Um den Einfluss von Garcinol und TSA auf gustatorische Reize zu überprüfen, wurden die Bienen in zwei Gruppen geteilt. Der Testgruppe wurde Garcinol bzw. TSA und der Kontrollgruppe nur das Lösemittel injiziert. Bei der Durchführung des Tests 2 h nach der Injektion wurde zu jeder der drei unterschiedlichen Konzentrationen bei beiden Gruppen notiert, ob der PER erfolgte oder nicht. Zur statischen Auswertung wurde der Fisher Exact Test verwendet. Ein p-Wert $\leq 0,05$ wurde als signifikant betrachtet.

2.2.4.2 Nicht-assoziative Lernparadigmen

Die Experimente zu Habituation und Sensitisierung wurden mit denselben Tieren durchgeführt. Die Bienen wurden am Vortag gefangen und am darauf folgenden Tag wurde zuerst die Sensitisierung mit den hungrigen Bienen 1 h nach Injektion von Garcinol und TSA durchgeführt. Im Anschluss wurden die Tiere mit 3 Tropfen 1 M Saccharoselösung gefüttert. Die Habituation erfolgte dann 2 h nach Injektion.

Sensitisierung

Bei der Sensitisierung wurde den Bienen zunächst ein Nelkenduft (CS) präsentiert. Die Biene stand dabei vor einem Abzug während sie mit Luft aus einer Spritze angeblasen wurde, in der sich ein mit Nelkenöl getränkter Zellstoff befand. Nach 2 min wurde sie dann mit einem in 1 M Saccharoselösung (US) getränkten Zahnstocher an den Antennen berührt. 20 s später erfolgte eine erneute Nelkenduftpräsentation. Nach jeder der drei aufeinander folgenden Stimulationen (CS – US - CS) wurde der PER notiert (Abb. 8).

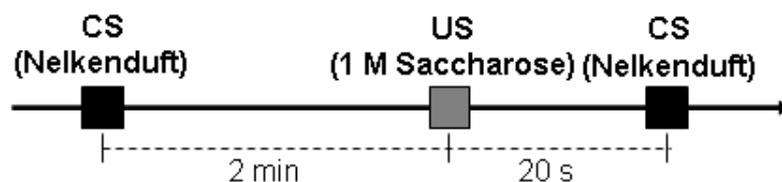


Abbildung 8: Schema zur Durchführung der Sensitisierung

Den Bienen wurde zuerst der CS und 2 min später der US präsentiert. Nach weiteren 20 s erfolgte eine erneute CS-Präsentation. Bei jeder Stimulation wurde der PER notiert.

Bei der Auswertung der Ergebnisse wurden die Bienen ausgeschlossen, die beim ersten CS mit dem PER reagierten und ebenfalls diejenigen, die keinen PER beim

US zeigten (< 5%). Zur statischen Auswertung wurde der Fisher Exact Test verwendet. Ein p-Wert $\leq 0,05$ wurde als signifikant betrachtet.

Habituation

Die Bienen wurden mittels eines Zahnstochers mit einer 1 M Saccharoselösung an einer Antenne mit einem Intervall von jeweils 1 s stimuliert. Dies wurde so lange wiederholt, bis entweder der Cut-Off (50 Stimuli) erreicht war oder die Bienen nach fünf aufeinander folgenden Stimuli nicht mehr mit dem PER reagierten. Diese Bienen galten als habituiert. Da es sich beim PER um eine Alles-oder-Nichts-Reaktion handelt, gelangt man nach fünf ausbleibenden Stimuli in den Bereich der Signifikanz (50%, 25%, 12,5%, 6,25%, **3,125%** Wahrscheinlichkeit des PER).

Danach wurden sie mit dem in 1 M Saccharoselösung getränkten Zahnstocher an der anderen Antenne berührt. Zeigten sie dabei den PER, galten sie als dishabituiert (Abb. 9).

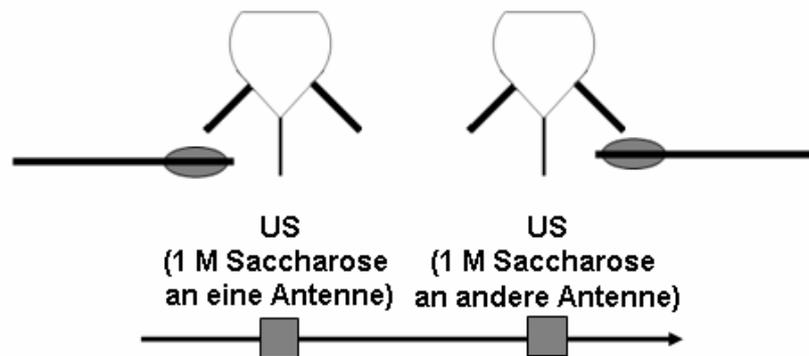


Abbildung 9: Schema zur Durchführung der Habituation

Die Bienen wurden mittels eines in 1 M Saccharoselösung getränkten Zahnstochers an einer Antenne mit einem Intervall von jeweils 1 s berührt. Nach Ausbleiben des PER (= Habituation) wurde noch die Dishabituation durch Berühren der anderen Antenne getestet.

Die Bienen, bei denen der Cut-Off erreicht war und diejenigen, bei denen keine Dishabituation eintrat, wurden aus dem Experiment ausgeschlossen (< 5%). Zur Auswertung wurde bei den habituierten Bienen die Anzahl der Stimuli gezählt, bis der PER ausblieb. Für die Statistik wurde der Student's t-Test verwendet. Ein p-Wert $\leq 0,05$ wurde als signifikant betrachtet.

2.2.4.3 Assoziative olfaktorische Konditionierung

Die Bienen wurden am Vortag gefangen und am Nachmittag mit 2 Tropfen 1 M Saccharoselösung gefüttert. Anschließend waren sie über Nacht einer ca. 18-stündigen

Hungerperiode ausgesetzt. Bei der appetitiven Konditionierung stellt der US eine Futterbelohnung dar. Aus diesem Grund müssen die Bienen vor dem Training hungrig sein. Bei der assoziativen olfaktorischen Konditionierung wurde ein zu konditionierender Nelkenduft (CS) mit einem unkonditionierten Zuckerwasserstimulus (US) in einem bestimmten zeitlichen Muster gepaart. Den Bienen wurde der Nelkenduft mittels einer Spritze präsentiert und dann mit einem in 1 M Saccharoselösung getränkten Zahnstocher die Antennen berührt. Zeigte die Biene nach Berühren der Antennen den PER, wurde ihr das Zuckerwasser mit dem Zahnstocher an den Rüssel appliziert. Die Tiere, die auf den US nicht mit dem PER reagierten, wurden aus dem Experiment ausgeschlossen (< 5%).

Je nach Trainingsprozedur erfolgte die CS-US-Paarung einmal (Ein-Trial- oder schwaches Training) oder dreimal hintereinander jeweils mit einem Intertrialinterval (ITI) von 2 min (Drei-Trial- oder starkes Training). Für den Gedächtnisabruf wurde den Bienen zu bestimmten Zeiten (2 h, 1 d und 2 d) nach dem Training der Nelkenduft präsentiert (Abb. 10). Es wurde notiert, ob sie dabei den PER zeigten oder nicht.

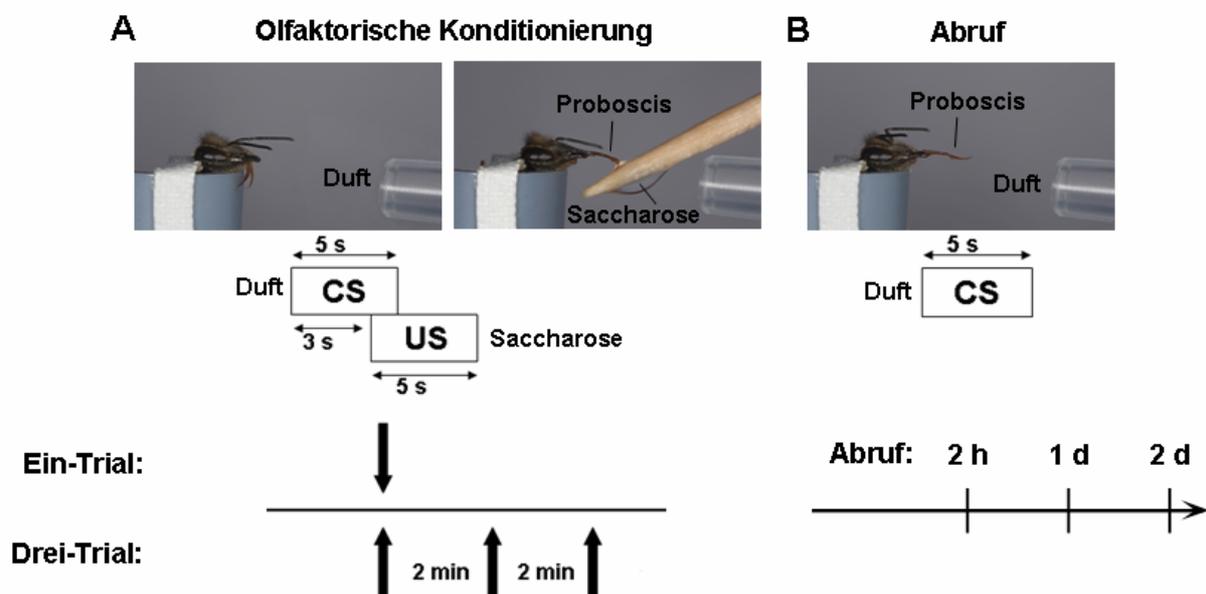


Abbildung 10: Darstellung der Trainingsprozedur bei der assoziativen olfaktorischen Konditionierung

Für die Konditionierung der Bienen auf einen Nelkenduft wurden beim Training (A) der CS (Nelkenduft) und der US (1 M Saccharoselösung) gepaart. Der CS wurde für eine Dauer von 5 s präsentiert. Der US wurde 3 s nach Beginn des CS ebenfalls für eine Dauer von 5 s präsentiert. Beim Gedächtnisabruf (B) wird nur der CS für 5 s präsentiert. Gezeigt sind der praktische und zeitliche Ablauf des Ein-Trial- und des Drei-Trial-Trainings und die Gedächtnisabrufe zu unterschiedlichen Zeitpunkten. (Fotos: verändert nach A. Gardezi).

Während des gesamten Versuchszeitraums wurden die Bienen, wie in Kapitel 2.2.2 beschrieben, versorgt, wobei die erste Fütterung frühestens 30 min nach dem 2 h-Abruf erfolgen durfte.

Für die Injektion der verwendeten Substanzen wurden verschiedene Zeitpunkte gewählt. Der für das jeweilige Experiment gewählte Injektionszeitpunkt und Art und Konzentration der Substanz können dem Methoden- und Ergebnisteil entnommen werden. Zur statistischen Auswertung wurde der Chi-Quadrat-Test verwendet. Ein p-Wert $\leq 0,05$ (Vergleich zwischen 2 Gruppen) bzw. $\leq 0,025$ (Vergleich zwischen 3 Gruppen) wurde als signifikant betrachtet.

Bei den Experimenten zur quantitativen Analyse der Histonacetylierung und Genexpression nach schwachem bzw. starkem Training wurden als Kontrolle untrainierte Bienen verwendet. Diesen wurde, im Gegensatz zu den trainierten Tieren, der CS und der US ungepaart, im Abstand von 15 s, präsentiert.

2.2.5 Nachweismethoden auf Proteinebene

2.2.5.1 Präparation des Bienengehirns

Nachdem die Bienen für zirka 1-2 min auf Eis betäubt worden waren, wurde der Kopf mit einem Skalpell abgetrennt und auf einem Wachsblöckchen fixiert. Nun wurde vorsichtig die Kopfkapsel geöffnet und danach Futterdrüsen, Tracheen, Hirnhaut und Ocellen (OC) mit einer feinen Pinzette entfernt. Im Anschluss wurde das Zentralhirn mit den für das olfaktorische Lernen wichtigen Bereichen wie Antennalloben (AL) und Pilzkörper (MB) entnommen (Abb. 11). Ausschließlich für histologische Präparate wurde das gesamte Gehirn mit Ocellen und optische Loben (OL) herauspräpariert.

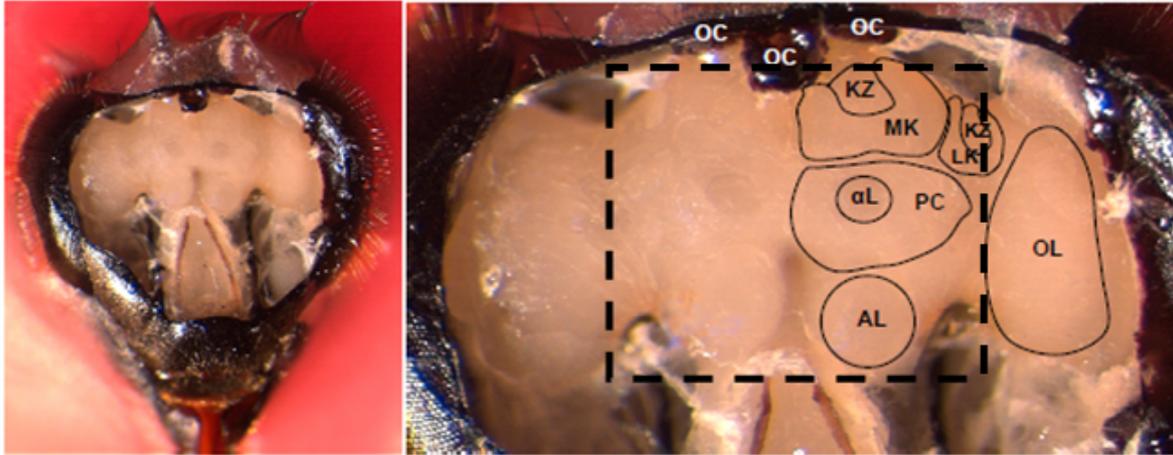


Abbildung 11: Ein zur Präparation freigelegtes Bienengehirn

Links: Ein in Wachs eingebetteter Bienenkopf mit geöffneter Kopfkapsel

Rechts: Detailansicht des Bienengehirns. Das gestrichelte Rechteck markiert den Bereich, der bei der Präparation entnommen und als Zentralhirn bezeichnet wird. Für histologische Präparate wurde aber das gesamte Gehirn (einschließlich Ocellen (OC) und optischer Loben (OL)) herauspräpariert.

OC = Ocellus, KZ = Kenyonzellen, MK = medianer Pilzkörper, LK = lateraler Pilzkörper, α L = alpha-Lobus, PC = Protocerebrum, AL = Antennallobus, OL = optischer Lobus (Fotos: verändert nach A. Gardezi)

2.2.5.2 Diskontinuierliche Polyacrylamid Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Bei der SDS-PAGE (sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis) werden Proteine nach ihrem Molekulargewicht aufgetrennt.

Probenvorbereitung

Zur Herstellung der Proben wurde ein Bienengehirn wie in Kapitel 2.2.5.1 beschrieben präpariert und umgehend in 250 μ l Histon-Homogenisierungspuffer aufgenommen und in einem Glashomogenisator mit einem S-Pistill auf Eis homogenisiert. Die Probe wurde in ein Eppendorfgefäß überführt und 50 μ l Probenpuffer zugegeben. Im Anschluss wurde die Probe 5 min bei 95 °C erhitzt und direkt auf das Polyacrylamidgel aufgetragen.

Herstellung des Polyacrylamidgels

Es erfolgte eine diskontinuierliche SDS-PAGE nach Laemmli. Zur Auftrennung von Histonen wurde ein Gel hergestellt, welches aus einem 4%-igen Sammelgel und einem 15%-igen Trenngel besteht. Nach Auftragung des oben beschriebenen Homogenats und eines Proteinstandards wurde das Gel bei 20 mA für etwa 40-60 min laufen gelassen, so dass die Lauffront noch im Gel verblieb.

2.2.5.3 Westernblot

Beim Westernblot werden die Proteine nach Auftrennung im Polyacrylamidgel mit Hilfe eines elektrischen Feldes auf eine Nitrozellulose-Membran übertragen. Die Proteine werden durch hydrophobe Wechselwirkungen an der Membran immobilisiert und können dann immunologisch detektiert werden.

Das Gel wurde im Semi-Dry-Verfahren für 40 min bei 20 V und 400 mA auf eine Nitrozellulose-Membran geblottet. Danach wurde die Membran für 1 h bei Raumtemperatur (RT) in Blocklösung geblockt und dann in Streifen geschnitten, um je einen Streifen in 4 ml der jeweiligen Antikörperlösung über Nacht bei 4°C zu inkubieren. Die Antikörper wurden in folgenden Verdünnungen eingesetzt:

Histone H3	1:5000	in Blockpuffer
Acetyl-Histone H3 (Lys9)	1:1000	in Blockpuffer
Acetyl-Histone H3 (Lys18)	1:1000	in Blockpuffer
Acetyl-Lysine	1:10000	in Blockpuffer

Danach wurden die Blotstreifen dreimal für je 5 min bei RT mit PBS gewaschen und für 1 h bei RT in 40 ml des sekundären Peroxidase-gekoppelten Antikörpers (1:10000 in Blockpuffer) inkubiert. Nach einer weiteren Waschung mit PBS (dreimal 5 min) wurden die Streifen in einer Plastikfolie wieder zusammengesetzt und dann mit dem Luminol-Peroxidase-Substrat (400 µl + 400 µl) getränkt. Im Anschluss konnte der Film mit einer Expositionszeit von 1 min in der Dunkelkammer entwickelt werden.

2.2.5.4 Enzyme-linked Immunosorbent Assay – ELISA

Der ELISA ist ein immunologisches Nachweisverfahren, mit dem Proteine (Antigen) sowie Proteinmodifikationen mittels einer enzymatischen Farbreaktion detektiert werden können. Der ELISA wurde verwendet, um Änderungen der relativen Acetylierung zu messen.

Probenvorbereitung

Zur Herstellung der Proben wurde ein Bienen Gehirn präpariert und direkt in 300 µl Histon-Homogenisierungspuffer aufgenommen und in einem Glashomogenisator mit einem S-Pistill auf Eis homogenisiert. Im Anschluss wurden 50 µl der Probe mit 50 µl

des Histon-Homogenisierungspuffers mit 4 M Harnstoff versetzt (zur Detektion mit dem H3-Antikörper). Der Rest der Probe wurde 1:1 mit dem Histon-Homogenisierungspuffer ohne Harnstoff verdünnt. Alle Proben wurden dann bei -20°C über Nacht eingefroren.

Durchführung des ELISA

Die Proben wurden am darauf folgenden Tag wieder aufgetaut und auf eine 96-well-Platte aufgetragen. Dabei wurde in einer Reihe eine fünfstufige Verdünnungsreihe (jeweils 1:1) mit dem Puffer erzeugt, in dem sich die Probe befand (H3: Histon-Homogenisierungspuffer mit 4 M Harnstoff; Rest: Histon-Homogenisierungspuffer). Das sechste well diente dabei als Nullkontrolle. Danach wurde in alle wells noch 50 µl Histon-Homogenisierungspuffer gegeben, um ein größeres Endvolumen zu erhalten. Durch ein größeres Volumen steht mehr Oberfläche für die Bindung des Antigens zur Verfügung. Zum Coaten der Proben wurden die ELISA-Platten 1 h bei RT auf dem Schüttler inkubiert. Dann erfolgte die Inkubation mit 300 µl Blocklösung für 1 h bei RT. Der Primärantikörper (100 µl) wurde ebenfalls 1 h bei RT inkubiert.

Die Primärantikörper wurden in folgenden Verdünnungen eingesetzt:

Histone H3	1:5000	in Blockpuffer
Acetyl-Histone H3 (Lys9)	1:1000	in Blockpuffer
Acetyl-Histone H3 (Lys18)	1:1000	in Blockpuffer
Acetyl-Lysine	1:1000	in Blockpuffer

Nach der Inkubation wurden die Primärantikörper wieder recycelt.

Im Anschluss wurden die Platten einmal mit PBS gespült und zweimal je 3 min mit PBS gewaschen und anschließend mit 100 µl des sekundären Phosphatasegekoppelten Antikörpers (1:4000) 1 h bei RT inkubiert. Nach erneutem Waschen mit PBS wurden jeweils 200 µl der Färbelösung in die wells gegeben und über Nacht im Brutschrank bei 37°C inkubiert.

Zur Auswertung wurde die Absorption bei 405 nm gemessen. Die Proben der unterschiedlichen Gruppen einer Messung wurden immer auf dieselbe ELISA-Platte aufgetragen (unterschiedliche Platten wurden für die verschiedenen Antikörper verwendet.). Von jeder Probe wurde aus den Messwerten der Verdünnungsreihe eine Kurve erstellt und deren Steigung ermittelt, welche die relative Menge an Protein bzw. ace-

tyliertem Protein darstellt. Um unterschiedlich starke Färbung der verschiedenen Platten mit gleicher Probenverteilung auszugleichen, wurde die Steigung jeder Probe innerhalb einer Platte auf den Mittelwert aller Steigungen der gesamten Platte normalisiert. Die relative Acetylierung ergab sich dann aus dem Verhältnis der auf die Platte normalisierten Steigung des acetylierten Proteins H3 (an Lysin18 bzw. Lysin9) oder aller acetylierten Proteine zur auf die Platte normalisierten Steigung des gesamten Proteins H3. Alle Verhältnisse wurden auf den Mittelwert der Ratios der Kontrollen normiert. Zur statistischen Auswertung wurde der Student's t-test (two-tailed) verwendet. Ein p-Wert $\leq 0,05$ (2 Gruppen) bzw. $\leq 0,025$ (3 Gruppen) wurde als signifikant betrachtet.

2.2.5.5 Immunhistologie

Es wurden histologische Schnitte des Bienehirns verwendet, um die Acetylierung von H3K9 und H3K18 zu lokalisieren.

Probenvorbereitung

Zum Fertigen histologischer Präparate wurde das Gehirn in der Kopfkapsel durch Zugabe von 20 μ l mit 4 %-iger Formaldehydlösung für 15 min vorfixiert. Danach wurde es, wie in Kapitel 2.2.5.1 beschrieben, herauspräpariert und für 2 h in 4 %-iger Formaldehydlösung auf Eis fixiert.

Anfertigung histologischer Schnitte

Das fixierte Bienehirn wurde dann dreimal für 15 min mit 0,1 M PBS ausgewaschen. Um die Gehirne zu entwässern, erfolgte danach eine Behandlung mit einer aufsteigenden Isopropanolreihe (60 %, 90 %, 100 % für je 1 h bei RT), wobei das 100 % Isopropanol während der Inkubationszeit zweimal erneuert wurde. Danach wurde das Gehirn für jeweils 1 h bei 45°C in 100 % Isopropanol und bei 70°C in einem Paraffin-Isopropanolgemisch (1:1) inkubiert. Im Anschluss wurde das Gehirn dann über Nacht bei 60°C in Paraffin belassen. Am darauf folgenden Tag wurde das Paraffin erneuert und 2 h später in kaltem Wasser ausgehärtet. Für die Anfertigung von Mikrotom-Paraffinschnitten wurden kleine Paraffinblöcke zurechtgetrimmt und 7 μ m dünne Serienschnitte gefertigt, die auf einen mit Poly-L-Lysin beschichteten und mit Aqua dest. befeuchteten Glasobjektträger übertragen und dann bei 40°C auf

einer Heizplatte gestreckt und getrocknet wurden. Danach wurden die Schnitte über Nacht bei 45°C im Trockenschrank inkubiert.

Immunodetektion histologischer Präparate

Um eine Antikörperfärbung durchzuführen, mussten die Schnitte auf dem Objektträger zuerst entparaffiniert werden. Der Objektträger wurde zunächst zweimal für 5 min in Xylol und dann jeweils für 2 min in einer absteigenden Ethanolreihe (96 %, 90 %, 80 %, 70 %, 50 %) inkubiert. Im Anschluss erfolgte die Demaskierung, wobei der Objektträger für 1 min in 0,1 M Na-Citratpuffer (pH 6) gekocht und weitere 9 min unter dem Siedepunkt inkubiert wurde. Der Objektträger wurde, nachdem er 20 min abgekühlt war, für 5 min mit Aqua dest. gewaschen und dann für 30 min mit Blockpuffer-Tx behandelt. Daraufhin erfolgte die Inkubation mit dem primären Antikörper bei 4°C über Nacht.

Die Primärantikörper wurden in folgenden Verdünnungen eingesetzt:

Histone H3	1:5000	in Blockpuffer-Tx
Acetyl-Histone H3 (Lys9)	1:1000	in Blockpuffer-Tx
Acetyl-Histone H3 (Lys18)	1:1000	in Blockpuffer-Tx

Nach Abspülen des Antikörpers wurden die Schnitte dreimal für 5 min mit PBS-Tx gewaschen und anschließend mit dem Cy3-gekoppelten Sekundärantikörper (1:2000 in Blockpuffer-Tx) für 1,5 h Stunden bei RT inkubiert. Danach wurden die Schnitte wieder dreimal für 5 min mit PBS-Tx gewaschen und dann direkt mit 50 % Glycerin (1:1 in Aqua dest.) eingedeckt. Die Schnitte wurden nach erfolgreicher Färbung mit Hilfe eines inversen Fluoreszenzmikroskops (200 M von Zeiss) und einer Kamera (Cool Snap HQ²⁺ von Photometrics) fotografiert.

2.2.6 Nachweismethoden auf RNA-Ebene

Beim Arbeiten mit RNA wurden stets saubere Handschuhe getragen, um Kontaminationen mit RNasen zu vermeiden. Es wurden Filterspitzen und RNase-freie Verbrauchsmaterialien verwendet. Glaswaren, Geräte und Werkbänke wurden mit RNase-Exitus-Plus inkubiert und mit DEPC-H₂O abgewaschen. Die RNA-Proben wurden zwischen einzelnen Arbeitsschritten immer auf Eis gelagert.

2.2.6.1 RNA-Aufreinigung aus Bienenhirn

Die Gesamt-RNA wurde, nachdem das Bienenhirn präpariert worden war, mit dem „RNeasy Mini Kit“ von Qiagen nach Angaben des Herstellers über Säulen aufgereinigt. Zur Probenaufbereitung wurden die Bienenhirne entweder direkt nach der Präparation unter flüssigem Stickstoff (N₂) in ein Eppendorfgefäß überführt oder ohne diesen Zwischenschritt direkt in einem RNase-freien Glashomogenisator in mitgeliefertem, 2-mercapto-ethanolhaltigem Puffer homogenisiert. Da für eine Probe jeweils drei bis fünf Gehirne (3-5 mg) vereint wurden und die Gesamtgewebemasse unter 20 mg lag, wurde zum homogenisieren ein Puffervolumen von 350 µl gewählt. Zusätzlich wurde auf der Säule ein DNase-Verdau mit dem „RNase Free DNase Set“ von Qiagen, wie vom Hersteller angegeben, durchgeführt. Am Ende wurde die aufgereinigte RNA mit 30 µl DEPC-H₂O eluiert. Die RNA wurde im Anschluss entweder direkt für weitere Experimente eingesetzt oder vorerst bei -70°C eingefroren.

2.2.6.2 Qualitäts- und Quantitätskontrolle der RNA

Konzentrationsbestimmung im Photometer

Zur Konzentrationsbestimmung der aufgereinigten RNA wurden jeweils 2 µl unverdünnt im Spectrophotometer (Nanodrop 2000c) gemessen. Als Referenz diente DEPC-H₂O. Die Quantität und Qualität der RNA wurde durch Messung der optischen Dichte (OD) bei 260 nm (Absorptionsmaximum Nukleinsäuren) und bei 280 nm (Absorptionsmaximum Proteine) ermittelt. Da die Probe zur Messung nicht verdünnt wurde und eine OD₂₆₀ von 1 hierbei 40 µg/ml RNA entspricht, kann die RNA-Konzentration wie folgt berechnet werden:

$$\text{RNA-Konzentration} = \text{OD}_{260} \times 40 \text{ µg/ml}$$

Die Reinheit der RNA wird durch einen Faktor bestimmt, der zwischen 1,8 und 2,0 liegen soll. Dieser Faktor wird wie folgt errechnet:

$$\text{OD}_{260} / \text{OD}_{280}$$

Bei den Experimenten wurden ausschließlich RNA-Proben verwendet, deren Reinheit in diesem Bereich lag.

RNA-Gelelektrophorese

Um die RNA-Proben auf Degradationen zu überprüfen, wurde eine RNA-Gelelektrophorese durchgeführt. Dabei wandert die RNA aufgrund ihrer negativen Ladung durch ein elektrisches Feld in einem Agarosegel zur Anode. Das Agarosegel wirkt dabei als Molekularsieb, wodurch die RNA ihrer Größe nach aufgetrennt wird.

Es wurde auch die RNA aus derselben Menge an Gewebe Mäusegehirn (3 mg) aufgereinigt und zum Vergleich der Bienenhirnproben auf das Gel aufgetragen. Die Gewebestücke aus Mäusegehirn waren zuvor von Herrn Prof. Dr. Uli Müller präpariert und unter flüssigem Stickstoff eingefroren worden.

Von jeder RNA-Probe (Mäuse- und Bienenhirn) wurde jeweils 0,5 µg RNA nach Zugabe von 0,2 Volumen 5x RNA-Probenpuffer für fünf Minuten bei 70°C im Heizblock erwärmt, um die RNA zu denaturieren. Weitere 0,5 µg wurden nach Zugabe des Probenpuffers nicht erhitzt, da bekannt ist, dass durch Erhitzen der Probe bei der Biene nur eine Bande auf Höhe der 18S rRNA sichtbar ist [DeLucca et al., 1974]. Die Proben wurden dann direkt auf ein 1%-iges Agarosegel aufgetragen. Das Gel wurde in einer Elektrophoresekammer mit 1x MOPS-Puffer überdeckt und im elektrischen Feld (60 V) aufgetrennt. Im Anschluss konnte das Gel direkt unter UV-Licht analysiert werden, da der Probenpuffer EtBr enthielt.

2.2.6.3 Dotblot

Der Dotblot dient der Detektion von RNA, wenn keine Größenauftrennung erforderlich ist. Die RNA-Proben werden über eine Schablone mit 96 Löchern (Dots) direkt auf eine Nitrozellulose-Membran gegeben und mittels Vakuum angesaugt. Das Fixieren der RNA auf der Membran erreicht man im Anschluss durch Crosslinken mit kurzwelligem UV-Licht. Die RNA kann dann entweder mittels Sonden (bekannte Sequenz) oder mit einem Antikörper nachgewiesen werden. Mit dieser Methode sollte der Einbau von 5-Bromouridin (BrU) in die RNA sowie die Funktionalität der 5-Bromodeoxyuridin-Antikörper getestet werden. Antikörper gegen 5-Bromouridin sind kommerziell nicht erhältlich. Es wurden zwei verschiedene Antikörper (von Sigma und Roche) gegen 5-Bromodeoxyuridin getestet, da laut Herstellerangaben eine Kreuzreaktion zu 5-Bromouridin besteht.

Probenvorbereitung

Die Proben wurden wie in Kapitel 2.2.6.1 beschrieben aufgereinigt und in drei Verdünnungsstufen (1 µg, 0,5 µg und 0,25µg) in einem Volumen von je 10 µl angesetzt. Jeder Ansatz wurde mit 30 µl RNA-Denaturierungslösung gemischt und 5 min bei 65°C erhitzt. Danach wurden sie kurz auf Eis abgekühlt und abzentrifugiert. Am Ende wurde das gleiche Volumen 20x SSC-Puffer zugegeben und direkt nach Spülen der Dots mit 10x SSC auf die in 10x SSC äquilibrierte Nitrozellulose-Membran aufgetragen.

Durchführung

Nach Auftragen und Ansaugen der Proben auf die Membran wurden die Dots zweimal mit je 1 ml 10x SSC-Puffer gewaschen. Im Anschluss wurde noch einmal ohne Füllung der Dots für 5 min Vakuum angelegt, um die Membran zu trocknen. Das Crosslinken der RNA erfolgte dann für 10 min unter UV-Licht (254 nm). Danach wurde die Membran direkt für 1 h bei RT in Blockpuffer und dann in Antikörperlösung inkubiert. Die Primärantikörper wurden in folgenden Verdünnungen eingesetzt:

5-Bromodeoxyuridin (Sigma)	1:1000	in Blockpuffer
5-Bromodeoxyuridin (Roche)	1:1000	in Blockpuffer

Im Anschluss wurde die Membran dreimal für je 5 min bei RT mit PBS gewaschen und für 1 h bei RT in 40 ml des sekundären Peroxidase-gekoppelten Antikörpers (1:10000 in Blockpuffer) inkubiert. Nach einer weiteren Waschung mit PBS (dreimal 5 min) wurde die Membran in 400 µl + 400 µl des Luminol-Peroxidase-Substrats getaucht und direkt in eine Plastikfolie gelegt. Im Anschluss konnte der Blot mit einer Expositionszeit von 1 min in der Dunkelkammer mit einem Röntgenfilm entwickelt werden.

2.2.6.4 *In vivo* Markierung von RNA

Zur Untersuchung der Genexpression bei der Gedächtnisbildung in der Honigbiene *Apis mellifera* wurden zur *in vivo* Markierung neu synthetisierter RNA die beiden Nukleosidanaloga 5-Bromouridin (BrU) und 5-Ethynyluridin (EU) verwendet. Diese werden in der Zelle zu 5-Bromouridintriphosphat (5-BrUTP) bzw. 5-Ethynyluridin-

triphosphat (5-EUTP) umgewandelt und in neue Transkripte anstelle von Uridintriphosphat (UTP) eingebaut (Abb. 12).

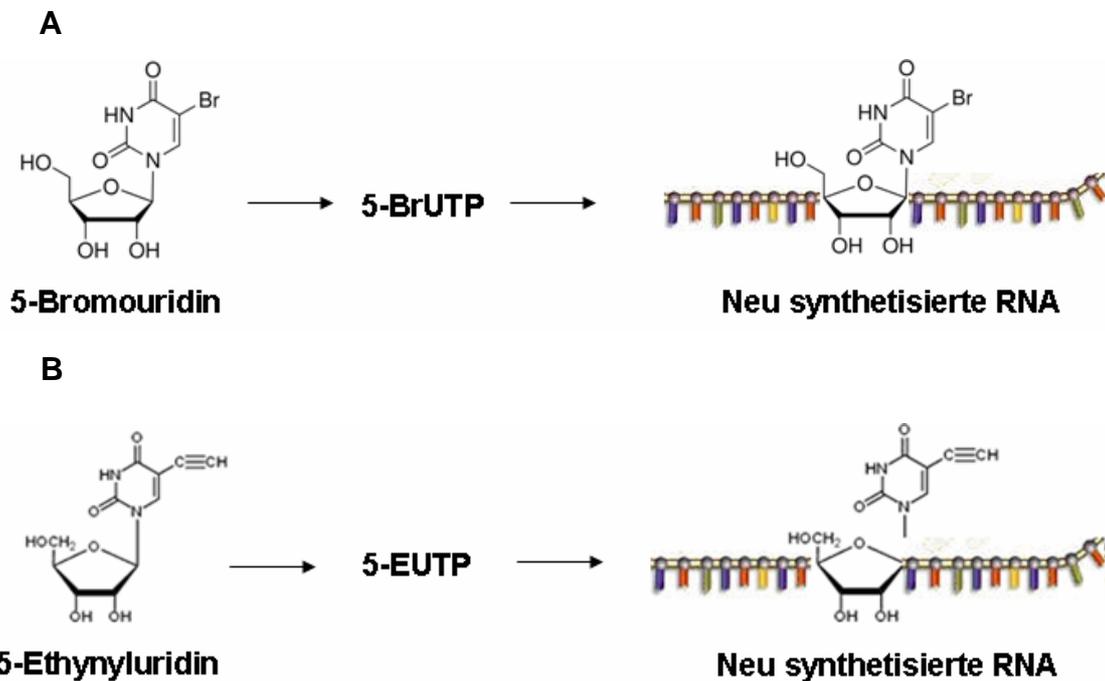


Abbildung 12: Pulse-Markierung von mRNA

Die beiden Nukleosidanaloga 5-Bromouridin (A) und 5-Ethynyluridin (B) wurden in den Thorax der Bienen injiziert, um eine *in vivo* Markierung neu synthetisierter mRNA zu erreichen. In der Zelle werden diese zu 5-Bromouridintriphosphat bzw. 5-Ethynyluridintriphosphat umgewandelt und in *de novo* Transkripte eingebaut.

2.2.6.5. Immunopräzipitation (IP) BrU-markierter RNA

Zur Separation der BrU-markierten RNA (BrU-RNA) wurden oberflächenfunktionalisierte Magnetpartikel („Dynabeads® Protein G“ der Firma Invitrogen) verwendet. Es handelt sich dabei um superparamagnetische Beads auf deren Oberfläche Protein G kovalent gebunden ist, so dass Antikörper mit ihrer Fc-Region binden können.

Das Protokoll für die Immunopräzipitation der BrU-RNA wurde auf der Grundlage von drei früheren Arbeiten [Haider et al., 1997; Kageyama et al., 2004; Lin et al., 2008] und nach dem Handzettel der „Dynabeads® Protein G“ durchgeführt und modifiziert (Abb. 13).

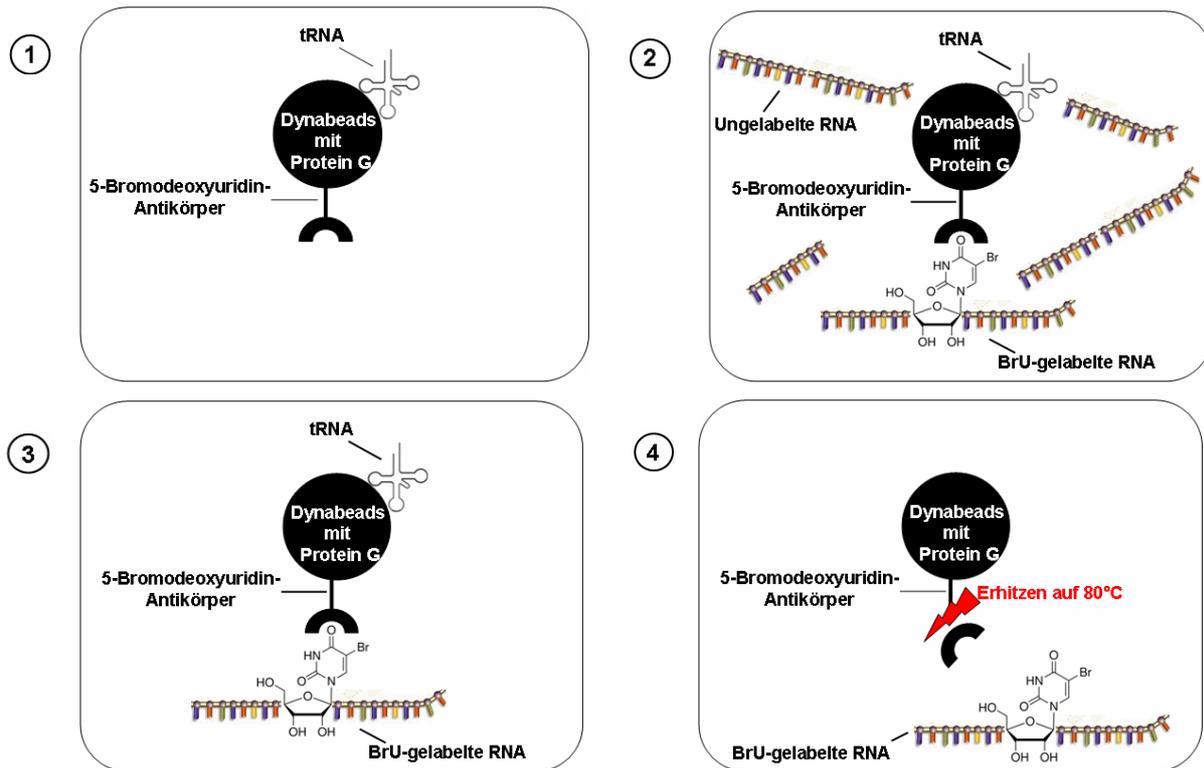


Abbildung 13: Immunopräzipitation (IP) BrU-markierter RNA

(1) Die zur Separation verwendeten magnetischen Beads (Dynabeads mit Protein G) wurden mit dem 5-Bromodeoxyuridin-Antikörper (BrU-AK) und tRNA (zum Blocken) vorinkubiert. (2) Danach erfolgte die Inkubation mit der entsprechenden Probe (Gesamt-RNA), (3) wobei nur die BrU-markierte RNA an den AK gebunden und die unmarkierte RNA durch Waschschrte eliminiert wurde. (4) Am Ende konnte die BrU-markierte RNA mit DEPC-H₂O durch Erhitzen auf 80°C eluiert werden.

Die Präzipitation der BrU-RNA erfolgte mit einem Antikörper gegen 5-Bromodeoxyuridin der Firma Roche. Vor der IP wurden pro Probe jeweils 0,5 µg RNA als Input-Kontrolle entnommen und bis zur reversen Transkription bei -20°C eingefroren. Weitere 0,5 µg der RNA wurden für die IP verwendet. Die folgenden Mengenangaben beziehen sich jeweils auf eine Probe. Die Beads (10 µl) wurden dreimal mit 100 µl RSB Puffer gewaschen und dann in der gleichen Menge Puffer aufgenommen. Nun erfolgte die Inkubation mit dem Antikörper (50 ng) und 0,25 µg tRNA für 30 min bei RT unter ständigem Schütteln. Danach folgten drei weitere Waschschrte mit RSB. Nun wurden die IP-Proben in 150 µl RSB mit 1 µl RNase-Inhibitor (40 U/µl) und 0,25 µg tRNA 1 h bei RT auf dem Schüttler inkubiert und danach wieder dreimal mit RSB gewaschen. Die Elution der gebundenen RNA erfolgte mit 10 µl DEPC-H₂O durch Erhitzen bei 80°C für 10 min. Im Anschluss der Präzipitation wurden die Proben direkt in cDNA umgeschrieben.

2.2.6.6 Separation EU-markierter RNA

Das Protokoll für die Separation der EU-markierten RNA (EU-RNA) wurde auf der Grundlage des „Click-it® Nascent RNA Capture Kit“ der Firma Invitrogen durchgeführt und modifiziert.

Biotinylierung EU-markierter RNA

Nach der Aufreinigung der EU-RNA wurde die Probe zunächst biotinyliert. Die Biotinylierung erfolgte in einem Reaktionsansatz mit Biotinazid und CuSO_4 über eine Cycloaddition laut Angaben des Herstellers (Abb. 14).

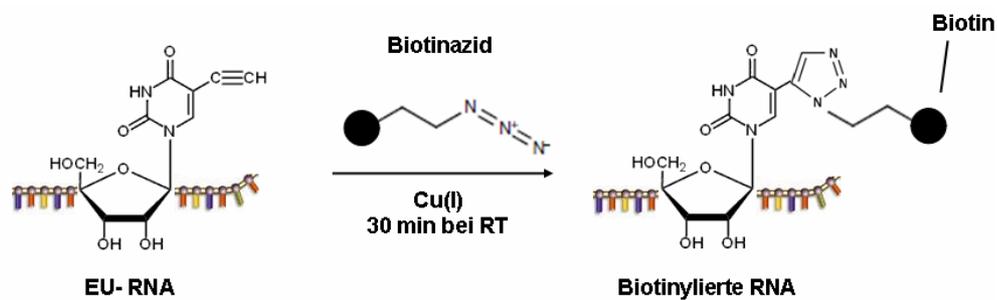


Abbildung 14: Biotinylierung EU-markierter RNA

Die aufgereinigte EU-RNA wurde in einem Reaktionsansatz mit CuSO_4 und Biotinazid für 30 min bei RT inkubiert. Das Cu(II) vom CuSO_4 wurde im Reaktionsansatz zu Cu(I) reduziert und diente dann als Katalysator für die Biotinylierung. Über eine Cycloaddition reagierte die Ethynylgruppe mit dem Azid zu einer Triazolgruppe worüber das Biotinmolekül kovalent an die RNA gebunden wurde.

Ein Reaktionsansatz (50 μl) wurde wie folgt angesetzt (Tab. 2):

Tabelle 2: Click-it® Reaktionsansatz

Reaktionskomponente	Konzentration Stocklösung	Endkonzentration	Volumen pro 50 μl
Click-it® EU-Puffer	2x	1x	25 μl
CuSO_4	25 mM	2 mM	4 μl
Biotin-Azid	10 mM	0,5 mM	2,5 μl
EU-RNA	-	-	15,75 μl
Click-it® Reaktionspuffer1	400 mM	10 mM	1,25 μl
Click-it® Reaktionspuffer 2	400 mM	12 mM	1,5 μl

Die einzelnen Reaktionskomponenten wurden in angegebener Reihenfolge zugegeben. Wichtig dabei war, dass der Click-it® Reaktionspuffer 2 genau 3 min nach dem Click-it® Reaktionspuffer 1 hinzu gegeben wurde. Im Anschluss wurde der Ansatz kurz gemischt und dann 30 min bei RT auf dem Schüttler inkubiert. Nach der Inkubationszeit erfolgte direkt eine RNA-Fällung.

RNA-Fällung

Nach der Biotinylierung der EU-RNA im Reaktionsansatz wurde die RNA gefällt. Zum gesamten Reaktionsansatz (50 µl) wurden 1 µl Glykogen, 50 µl Ammoniumacetat (7,5 M) und 700 µl eisgekühltes 100 % Ethanol hinzugefügt und kurz gemischt. Die Fällung erfolgte bei -70°C über Nacht. Am darauf folgenden Tag wurde die Probe bei 4°C mit 13.000 rcf für 20 min zentrifugiert. Danach wurde der Überstand verworfen ohne das Pellet (RNA) zu zerstören und es folgte ein Waschschritt mit 75 % Ethanol. Dazu wurden 700 µl Ethanol zum Pellet gegeben, kurz gevortext und dann bei 4°C mit 13.000 rcf für 5 min zentrifugiert. Nach Verwerfen des Überstandes erfolgte ein weiterer Waschschritt mit Ethanol. Im Anschluss wurde das Pellet 5-10 min trocknen gelassen, bis es nicht mehr sichtbar war, und dann in 30 µl DEPC-H₂O gelöst. Die Bestimmung der RNA-Konzentration erfolgte wie in Kapitel 2.2.6.2 beschrieben mittels Spectralphotometer. Es wurden nur Proben für weiterführende Experimente verwendet, bei denen durch die RNA-Fällung nicht mehr als 10 % des Ausgangsmaterials verloren ging. Die RNA wurde am Ende entweder bei -70°C eingefroren oder direkt für die darauf folgende Präzipitation verwendet.

Präzipitation biotinylierter RNA

Zur Separation der EU-markierten RNA wurden ebenfalls oberflächen-funktionalisierte Magnetpartikel („Dynabeads® MyOne™ Streptavidin T1“ der Firma Invitrogen) verwendet. Auf deren Oberfläche ist ein Monolayer Streptavidin gebunden, so dass die EU-markierte RNA nach Biotinylierung präzipitiert werden kann. Das Protokoll für die Präzipitation biotinylierter RNA wurde auf der Grundlage des „Click-it® Nascent RNA Capture Kit“ von Invitrogen durchgeführt und modifiziert (Abb. 15).

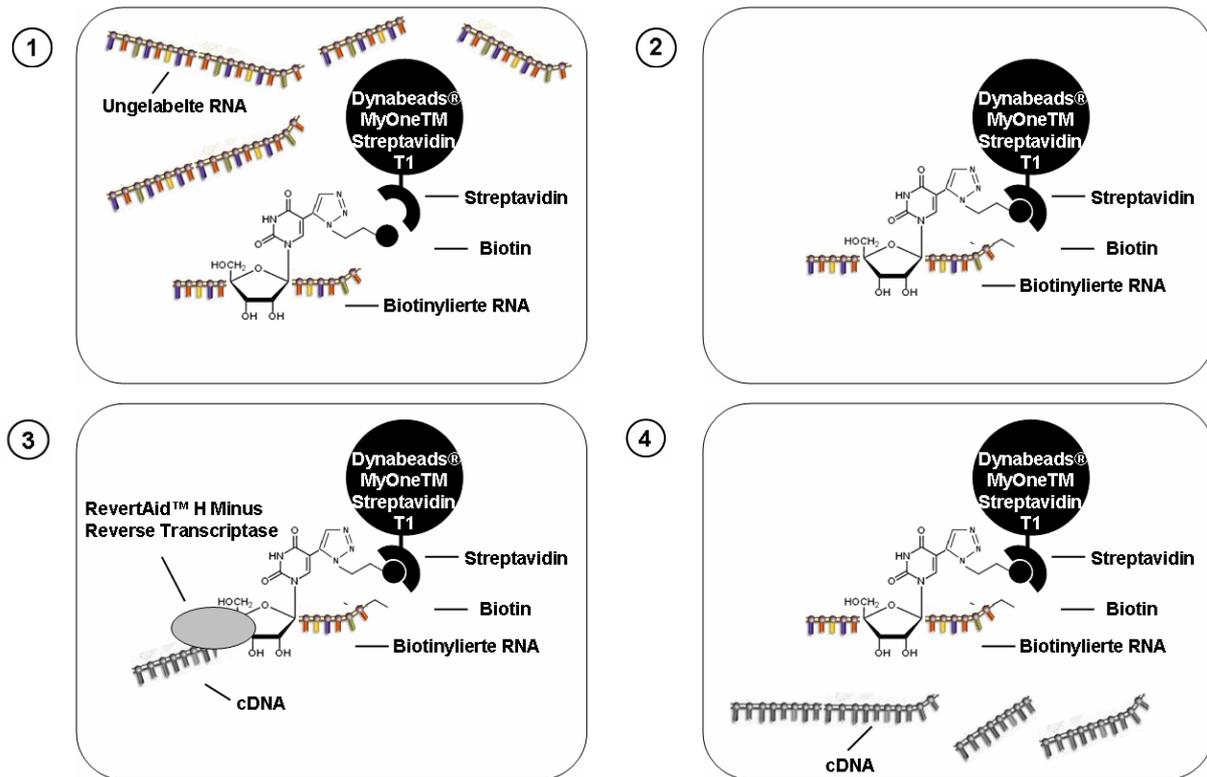


Abbildung 15: Präzipitation biotinylierter RNA

(1) Die zur Präzipitation verwendeten magnetischen Beads (Dynabeads® MyOne™ Streptavidin T1) wurden mit der entsprechenden Probe (Gesamt-RNA) inkubiert, (2) wobei nur die biotinylierte RNA gebunden und die unmarkierte RNA durch Waschschriffe eliminiert wurde. (3) Im Anschluss wurde direkt eine Reverse Transkription (RevertAid™ H Minus First Strand cDNA Synthesis Kit von Fermentas) mit der an den Beads gebundenen biotinylierten RNA durchgeführt. (4) Am Ende wurde die im Überstand befindliche cDNA entnommen.

Vor der Präzipitation wurden pro Probe 0,5 µg RNA als Input-Kontrolle entnommen und bis zur reversen Transkription bei -20°C eingefroren. Weitere 0,5 µg wurden für die Präzipitation verwendet. Die Mengenangaben beziehen sich jeweils auf eine Probe. Die Beads (10 µl) wurden dreimal mit 16 µl Waschpuffer 2 gewaschen und dann wieder in 10 µl Puffer aufgenommen. Um eventuelle Sekundärstrukturen der RNA zu verhindern, wurde der Reaktionsansatz 5 min bei 70°C inkubiert (Tab. 3):

Tabelle 3: RNA Bindereaktionsansatz

Reaktionskomponente	Volumen pro 100 µl
Click-it® RNA-Bindepuffer (2x)	50 µl
RiboLock Rnase Inhibitor (40U/µl)	1 µl
RNA	0,5 µg
DEPC-H ₂ O	auf 100 µl

Danach wurde der Ansatz kurz auf Eis abgekühlt, abzentrifugiert, die Beads hinzugegeben und dann bei RT für 30 min auf dem Schüttler inkubiert. Danach wurden die Beads dreimal mit 100 µl Waschpuffer 1 und dreimal mit 100 µl Waschpuffer 2 gewaschen und dann in 11 µl Waschpuffer 2 resuspendiert.

2.2.6.7 Reverse Transkription

Um quantitative Analysen der Genexpression mittels real-time PCR durchzuführen, mussten sowohl die Input-Kontrollen als auch die separierte biotinylierte RNA jeder Probe direkt in cDNA umgeschrieben werden. Da die biotinylierte RNA nach der Separation über Streptavidin kovalent an die Beads gebunden war, erfolgte die cDNA-Synthese ebenfalls an den Beads, was laut Angaben des Herstellers keine Beeinträchtigung darstellte. Zur reversen Transkription wurde das „RevertAid™ H Minus First Strand cDNA Synthesis Kit“ von Fermentas nach Angaben des Herstellers verwendet.

2.2.6.8 Standard-PCR

Mit dieser Methode wurden die Primerpaare, die später in der RT-qPCR verwendet werden sollten, ausgetestet. Der Reaktionsansatz (Maxima® Hot Start Taq DNA Polymerase, Fermentas) setzte sich wie folgt zusammen:

2	µl Hot Start PCR Puffer (10x)
0,4	µl dNTP (je 10 mM)
1	µl Primer forward (10 µM)
1	µl Primer reverse (10 µM)
1,6	µl MgCl ₂ (25 mM)
0,16	µl Taq DNA Polymerase (5 U/µl)
1	µl cDNA
12,84	µl HPLC-H ₂ O

Nachdem die Reaktion auf Eis in PCR-Reaktionsgefäßen angesetzt worden war, wurden sie umgehend verschlossen, kurz abzentrifugiert und in das PCR-Gerät überführt.

Danach wurde die PCR mit folgenden Reaktionsbedingungen durchgeführt:

4 min	95°C	
45 s	95°C	← 35 Zyklen
45 s	58°C	
45 s	72°C	
10 min	72°C	

2.2.6.9 DNA-Gelelektrophorese

Um die Funktionalität der Primerpaare für die RT-qPCR zu überprüfen, wurde im Anschluss an die PCR eine DNA-Gelelektrophorese durchgeführt. Auch die Proben, die für die Hochdurchsatz-Sequenzierung aufbereitet worden waren, wurden mittels Agarose-Gelelektrophorese auf ihre Fragmentgröße überprüft. Die DNA wandert in einem Agarosegel aufgrund ihrer negativen Ladung durch ein elektrisches Feld zur Anode und wird nach Größe aufgetrennt. Die Proben wurden mit 0,16 Volumen 6x -Ladepuffer versetzt und auf ein 1%-iges Agarosegel mit Ethidiumbromid geladen. Zusätzlich wurden 5 µl eines DNA-Standards aufgetragen. Das Gel wurde in einer Elektrophoresekammer mit 1x TAE-Puffer überdeckt und im elektrischen Feld (60 V) aufgetrennt. Im Anschluss konnte das Gel direkt unter UV-Licht analysiert werden.

2.2.6.10 Quantitative real time PCR (RT-qPCR)

Die RT-qPCR ist eine etablierte Methode mit der Nukleinsäuren wie DNA und mRNA absolut und relativ quantifiziert werden können. Sie findet überwiegend Anwendung bei Genexpressionsanalysen. Bei der RT-qPCR wird, im Gegensatz zur Endpunktanalyse bei der Standard PCR, nach jedem Zyklus ein Fluoreszenzsignal (R) gemessen. Dieses Signal wird durch den Farbstoff SYBR®Green erzeugt, welcher beim Einlagern in doppelsträngige DNA fluoresziert. Somit kann die zum gebildeten Amplifikat proportionale Fluoreszenzzunahme detektiert werden. Die Quantifizierung erfolgt durch Vergleichsmessungen mit definierten Standards, welche in der Regel Haushaltsgene (konstitutiv exprimierte Gene) darstellen.

Durch spezielle Algorithmen kann die Gerätesoftware den dRn-Wert berechnen (Abb. 16). Dieser ergibt sich aus dem Rn^+ -Wert einer Probe mit Template und dem Rn^- -Wert einer Probe ohne DNA (No-Template-control = NTC). Die Rn -Werte geben die normalisierte Fluoreszenzintensität von SYBR®Green bezogen auf die Intensität

des Referenzfarbstoffs ROX II an, welcher dem Reaktionsansatz ebenfalls zugegeben wird. Zur Auswertung wird ein von der Gerätesoftware ermittelte Amplifikationskurve herangezogen. Darin ist der dR_n -Wert gegen den so genannten cycle threshold (C_t) aufgetragen, der den Teil der Kurve beschreibt, bei dem das Fluoreszenzsignal erstmals exponentiell gegen den Hintergrundwert (Baseline) ansteigt. Dieser C_t -Wert wird dann als Maß für die Quantifizierung der Startmenge der Probe herangezogen. Am C_t befindet sich bei allen Proben die gleiche Menge neu synthetisierter DNA. Ist der C_t einer Probe um einen Zyklus geringer als der einer anderen Probe, entspricht dies der doppelten Menge an eingesetzter cDNA. Dies ist der Fall, wenn die PCR eine Effizienz von 100 % aufweist, wobei sich die DNA Produktmenge mit jedem Zyklus verdoppelt.

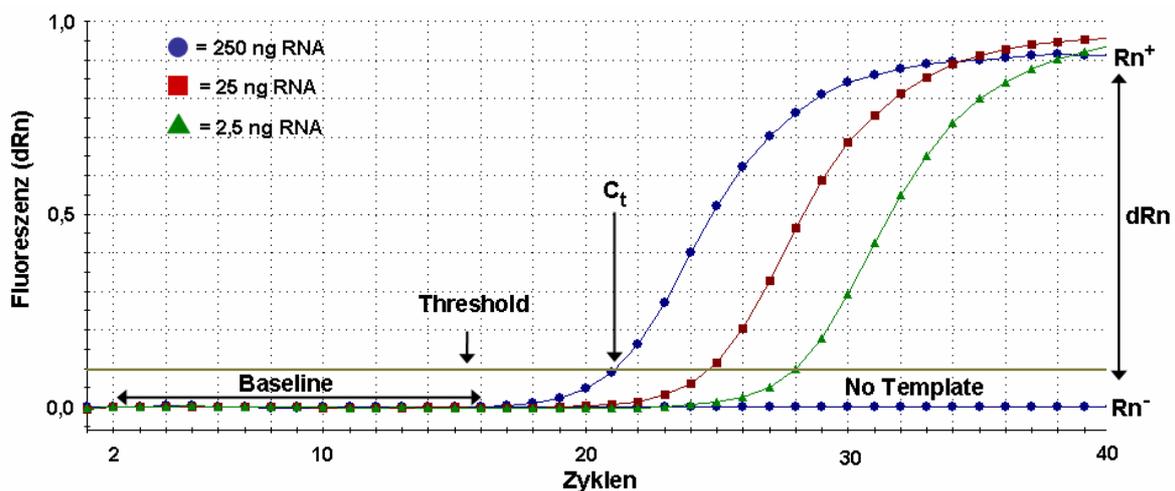


Abbildung 16: Amplifikationskurve

Dargestellt ist eine Amplifikationskurve von Kalibrierproben mit bekannter Ausgangskonzentration sowie die No-template-control (NTC) nach einem real-time PCR Lauf. Die Kalibrierproben (250 ng, 25 ng und 2,5 ng) wurden in verschiedenen Anfangskonzentrationen (jeweils 1:10 verdünnt) eingesetzt. Die NTC enthielt keine DNA. Aufgetragen ist das Delta (d) der auf den Referenzfarbstoff ROX II normierten (n) Fluoreszenz (R) in Abhängigkeit von der Zyklenzahl. Der C_t (cycle threshold) ist der Zyklus, bei dem die Fluoreszenzintensität erstmals exponentiell gegen den Hintergrundwert (Baseline) steigt.

Primerdesign

Die für die real-time PCR verwendeten Primer wurden mit Hilfe der Online-Software „Oligonucleotide Properties Calculator“ und „IDT OligoAnalyzer 3.1“ entworfen. Von den zur Quantifikation von mRNA eingesetzten Primerpaaren sollte mindestens ein Primer Intron überspannend sein, so dass keine genomische DNA (gDNA) amplifiziert werden kann.

Die Primer wurden unter folgenden Voraussetzungen entworfen:

- Amplikongröße: 120 - 150 bp
- Primergröße: 17 - 23 bp
- GC-Gehalt: 40 - 60 %
- Schmelztemperatur (T_m): 60 - 62°C (maximal 1 °C Differenz)

Im Anschluss wurde überprüft, ob die Primer keine Homo- oder Heterodimere sowie keine Sekundärstrukturen bilden. Mittels einer BLAST-Analyse wurde sichergestellt, dass keine weiteren Sequenzhomologien in der Biene bestehen. Die in dieser Arbeit verwendeten Primer sind in Tab. 1 aufgelistet. Die Funktionalität der Primer wurde vor Einsatz in der RT-qPCR in einer Standard-PCR und anschließender Agarosegelelektrophorese, wie in Kapitel 2.2.6.8 und 2.2.6.9 beschrieben, getestet.

Verunreinigungen durch genomische DNA konnten anhand der von der Gerätesoftware nach jedem PCR-Lauf erstellten Dissoziationskurve identifiziert werden (Abb. 17). Experimente, bei denen eine Amplifikation von gDNA auftrat, wurden nicht ausgewertet. Ebenso wurden Experimente aus der Auswertung ausgeschlossen, bei denen sich in der NTC Primerdimere gebildet hatten.

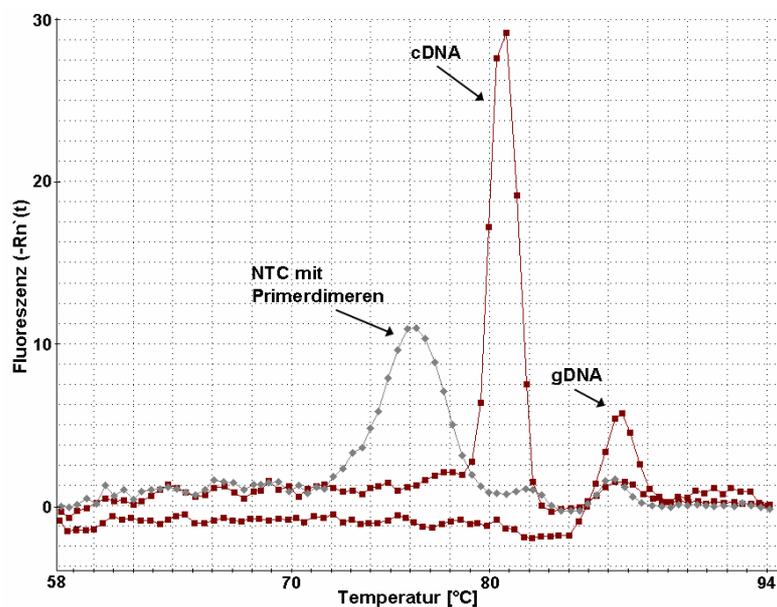


Abbildung 17: Dissoziationskurve

Dargestellt ist das Beispiel einer Dissoziationskurve. Die Probe (cDNA) zeigt einen Peak bei ihrer spezifischen Schmelztemperatur. In der No-template-control (NTC) haben sich Primerdimere gebildet, die einen Peak bei niedrigerer Schmelztemperatur zeigen. Durch Verunreinigungen mit genomischer DNA (gDNA) zeigt sich ein Peak bei höherer Temperatur, da das Amplikon im Vergleich zum Intron überspannenden Amplikon für die entsprechende mRNA größer ist. Aufgetragen ist die durch den Übergang von dsDNA in ssDNA auftretende auf den Referenzfarbstoff ROX II normierte Fluoreszenzabnahme $[-Rn'(T)]$ gegen die Temperatur.

Durchführung der RT-qPCR

Bei der Durchführung der RT-qPCR wurde stets mit Handschuhen gearbeitet und nur sterile RNase- und DNase-freie Materialien, sowie Pipettenspitzen mit Filtern verwendet. Alle Komponenten wurden stets auf Eis gekühlt. Zur Durchführung der RT-qPCRs wurden das Mx3000P QPCR System von Stratagene und die dazugehörige Herstellersoftware MxPro QPCR Software für Mx3000P (Version 4.1.0.0) verwendet, die vom Institut für Genetik an der Universität des Saarlandes unter Leitung von Herrn Prof. Dr. Walter zur Verfügung gestellt wurden. Es wurden die beiden Fluoreszenzfarbstoffe SYBR®Green und ROX II verwendet, wobei bei diesen Arbeitsschritten immer direktes Licht vermieden wurde. Alle Reaktionskomponenten außer Farbstoffe, Primer und Template waren in dem „Premix Ex Taq™ Perfect real Time“ von Takara enthalten. Als Template für die Proben diente der Reaktionsansatz aus der reversen Transkription (siehe Kapitel 2.2.6.7) 1:1 [v/v] in DNase- und RNase-freiem H₂O verdünnt. Als Standard wurde eine RNA-Probe aus Bienengehirn mit bekannter Konzentration an Gesamt-RNA in drei Verdünnungsstufen (von 250 ng bis 2,5 ng; jeweils 1:10 in DNase- und RNase-freiem H₂O) eingesetzt. Von jedem Gen wurde zusätzlich eine Negativkontrolle ohne Template angesetzt. Von den Standards, der Negativkontrolle sowie den Input-Kontrollen wurden immer Dupletts und von den präzipitierten Proben immer Tripletts pipettiert. Ein Reaktionsansatz setzt sich wie folgt zusammen:

8	µl Premix Ex Taq (2x)
0,3	µl ROX II (50x)
0,3	µl Primer forward (10 µM)
0,3	µl Primer reverse (10 µM)
1	µl SYBR® Green (1:5000)
1	µl Probe
9,1	µl HPLC-H ₂ O

Nachdem die Reaktion auf Eis in 96-well PCR-Platten angesetzt worden war, wurden sie umgehend mit einem Klebefilm verschlossen, 1 min bei 4°C mit 1000 rcf abzentrifugiert und in das PCR-Gerät überführt.

Nach der RT-qPCR wurden die Daten mit der Herstellersoftware und MS-Excel ausgewertet. Anhand der Dissoziationskurve und der Standardgeraden wurde jedes Experiment zuerst auf seine Auswertbarkeit überprüft. Von den Dupletts der Standards und Inputkontrollen sowie den Tripletts der präzipitierten Proben wurde jeweils der Mittelwert zur Auswertung herangezogen, wobei die den Mittelwert ergebenden Einzelwerte nicht mehr als 0,5 Zyklen auseinander liegen durften.

Im Anschluss wurden die von der Herstellersoftware mittels der Standardgerade berechneten Mengen in MS-Excel übertragen. Von jeder Probe wurde immer die Expression von sechs verschiedenen Genen untersucht. Die Werte der Inputkontrollen und der präzipitierten Proben stellen die anfängliche Menge an RNA [ng] dar und wurden zur Auswertung in relative Menge normiert auf die Menge aller gemessenen Gene in jeder einzelnen Probe angegeben.

2.2.6.11 Analyse aktivitätsabhängiger Transkriptionsänderungen

Um lerninduzierte und acetylierungsabhängige Expressionsänderungen zu quantifizieren, wurde der Versuchsablauf so geplant, dass die Zeitpunkte, in denen sich die Histonacetylierung (H3K18ac) geändert hatte, im Zeitfenster der EU-Markierung (1 h) lagen (Abb. 19).

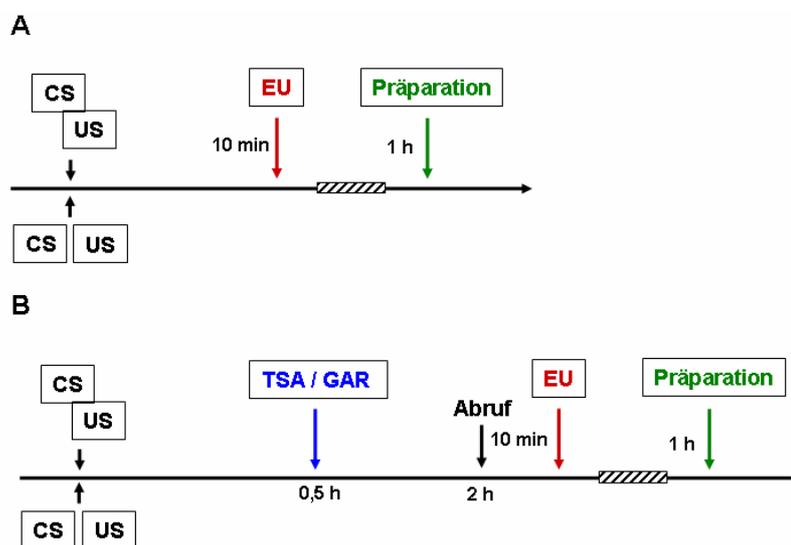


Abbildung 19: Experimenteller Versuchsablauf für Analysen lerninduzierter Expressionsänderungen

Die EU-Injektionszeitpunkte wurden so gewählt, dass bei einer Markierung innerhalb 1 h die Zeitpunkte erfasst werden, bei denen H3K18ac (gestrichelt) nach schwachem Training (0,5 h und 2,5 h) sowie TSA- und Garcinol-Injektion (2,5 h) zwischen Kontroll- und Testgruppe signifikant verändert war. Der erste Zeitpunkt (A) war 10 min nach Training und die Präparation der Bienengehirne erfolgte 1 h später. Der zweite Zeitpunkt (B) war 10 min nach dem 2 h-Abruf. Bei den Experimenten mit TSA und Garcinol wurde der zweite Zeitpunkt gewählt.

Wie bei den Experimenten, bei denen die Acetylierung mittels ELISA quantifiziert wurde, wurde mit dieser Methode untersucht, ob sich die Expression verschiedener Gene nach schwachem Training zwischen trainierten (CS – US gepaart) und untrainierten (CS – US ungepaart) Bienen zu verschiedenen Zeitpunkten nach dem Training unterscheidet. Ebenso wurden die Auswirkungen des HDAC-Inhibitors TSA und des HAT-Inhibitors Garcinol nach schwachem Training auf die Expression dieser Gene getestet. Es wurden pro Probe (n) jeweils drei Bienenhirne gepoolt und die RNA aufgereinigt. Im Anschluss folgte die Separation der EU-markierten RNA, cDNA-Synthese sowie Quantifizierung mittels real-time PCR (Kapitel 2.2.6.6, 2.2.6.7 und 2.2.6.10). Die Konzentration der injizierten Substanzen können Kapitel 2.2.3 (Thoraxinjektion) des Methodenteils entnommen werden.

2.2.6.12 Transkriptomanalyse der EU-RNA mittels FLX-Sequenzierung

Die gesamte mRNA, die in einem bestimmten Zeitfenster nach dem Training der Bienen mit EU markiert und separiert wurde, wurde mit dem „QuantiTect® Whole Transcriptome Kit“ von Qiagen vervielfältigt und mit dem „Genome Sequencer FLX System“ von Roche sequenziert.

Herstellung der Sequenzierproben

Es wurden jeweils 10 Bienen mit schwachem oder starkem Training konditioniert, 1,5 h nach dem Training mit EU injiziert und 2 h später die Gehirne präpariert, gepoolt und die RNA aufgereinigt (Abb. 20). Im Anschluss wurde eine Präzipitation, wie in Kapitel 2.2.6.6 beschrieben, durchgeführt und cDNA synthetisiert.

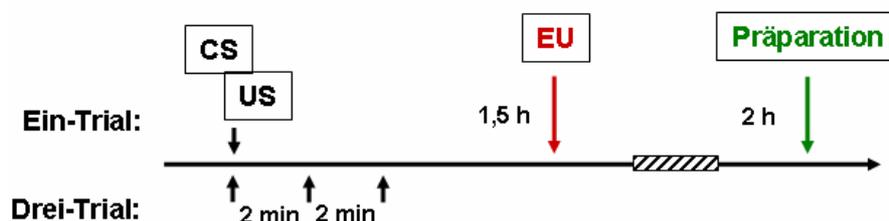


Abbildung 20: Experimenteller Versuchsablauf für die Transkriptomanalyse

Für die Transkriptomanalyse wurde der EU-Injektionszeitpunkt (1,5 h nach Training) so gewählt, dass bei einer Markierung innerhalb 2 h der Zeitpunkt erfasst wurde, bei dem die Histonacetylierung (schraffiert) nach schwachem und starkem Training unterschiedlich war (2,5 h nach Training). Die Präparation der Bienenhirne erfolgte 2 h später.

Whole Transcriptome Amplification

Um cDNA-Mengen zu erhalten, die für eine FLX-Sequenzierung notwendig sind, wurden die Proben mit dem „QuantiTect® Whole Transcriptome Kit " von Qiagen nach Angaben des Herstellers gleichmäßig amplifiziert und ein Teil der Probe zur Kontrolle der Fragmentgrößen auf ein Agarosegel aufgetragen.

Fragmentierung

Die Fragmentgröße der cDNA-Proben für die FLX-Sequenzierung muss im Bereich zwischen 200 - 1000 bp liegen. Aus diesem Grund mussten die Proben nach der Amplifikation noch fragmentiert werden, um die gewünschte Fragmentgröße zu erhalten. Dies erfolgte mittels Sonifikation bei einer Amplitude von 40 % (130 W, 20 kHz) mit 20 Zyklen aus 15 s Beschallung und 15 s Pause. Danach wurde wieder ein Teil der Probe zur Kontrolle auf ein Agarosegel aufgetragen. Die Konzentration wurde im Spectrophotometer (Nanodrop) gemessen (Mindestkonzentration: 100 ng/ 11µl). Bis zur FLX-Sequenzierung wurden die Proben bei -20 °C eingefroren.

FLX-Sequenzierung

Die Hochdurchsatz-Sequenzierung, auch Next-Generation-Sequencing oder 454-Sequenzierung genannt, der Proben wurde in der Genetik (Universität des Saarlandes) mit dem „Genome Sequencer FLX System" (Roche) durchgeführt (Abb.21) [Jarvie und Harkins, 2008; Rothberg und Leamon, 2008]. Dabei können in einem Lauf von 10 h bis zu 400 Megabasenpaare sequenziert werden. Dies entspricht einer Million Shotgun- oder 700.000 Amplikon-Sequenzen mit einer durchschnittlichen Länge von 400 Basenpaaren. Für die Durchführung wurden folgende zugehörige „GS FLX Titanium Kits“ verwendet:

- „General Library Preparation Kit“
- „SV emPCR Kit (Lib-L)v2“
- „PicoTiterPlate Kit 70x75“
- „Sequencing Kit XLR70“

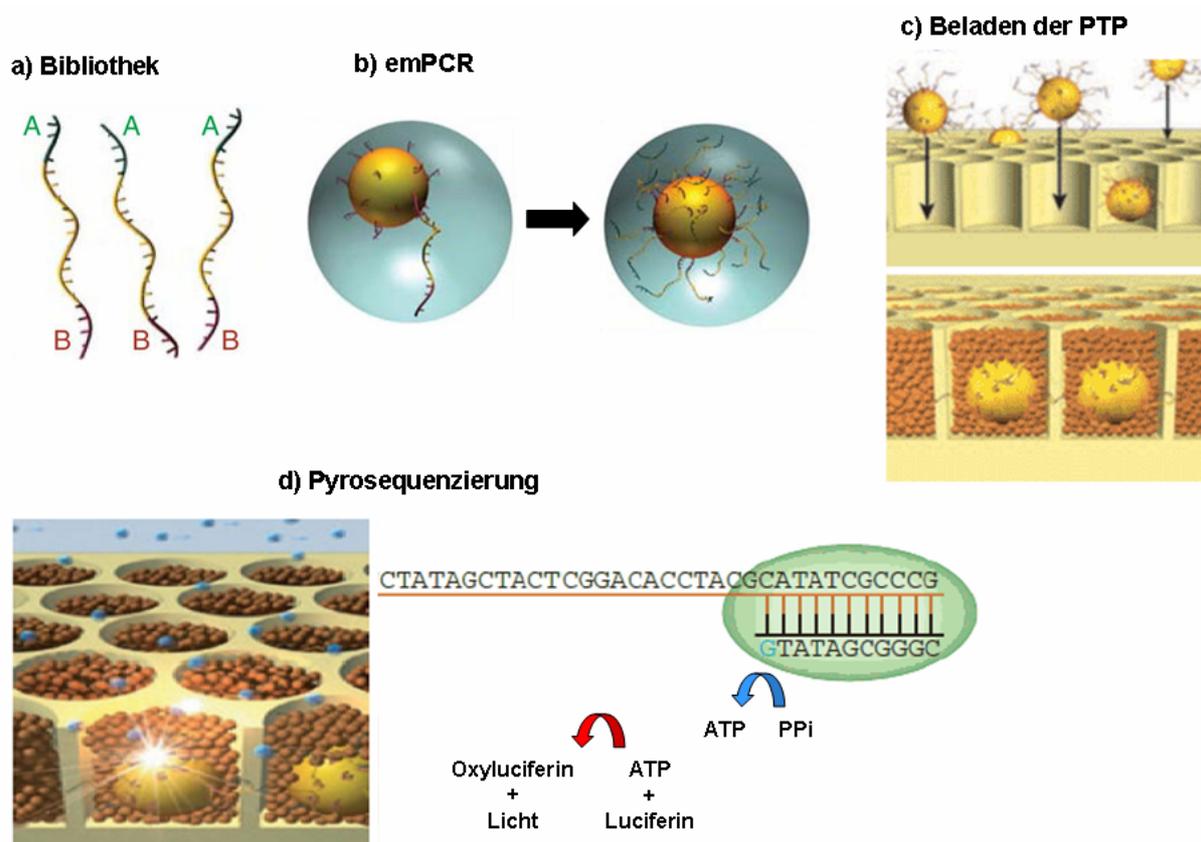


Abbildung 21: FLX-Sequenzierung

a) Die aus mRNA synthetisierte doppelsträngige cDNA wird zur Herstellung einer Bibliothek verwendet. Dazu wird diese fragmentiert, in Einzelstränge (ssDNA) separiert und an Adaptoren (A und B) ligiert. **b)** Die Einzelstrangfragmente werden dann an Beads gekoppelt, so dass pro Bead nur ein Fragment gebunden ist. Jedes Bead wird anschließend in einen Tropfen aus PCR-Reaktionsmix-in-Öl-Emulsion gebettet. In jedem Tropfen werden die Fragmente in einer Emulsions-PCR (emPCR) amplifiziert und die PCR-Produkte auch an die Beads gebunden. Danach werden die Emulsionen aufgebrochen und die ssDNA-Stränge denaturiert. **c)** Die dadurch entstandenen Beads mit zehn Millionen Kopien eines ssDNA-Fragments, werden nun auf eine Picotiterplatte (PTP) geladen. Es passt immer nur genau ein Bead in ein Loch auf der Platte. Kleinere, mit immobilisierten Enzymen für die Sequenzierung beladene, Beads (braun) werden den Löchern zugegeben. **d)** Daraufhin wird eine Pyrosequenzierung mit dem GS-FLX-System durchgeführt. Die ssDNA-Fragmente werden mit einer Polymerase amplifiziert. Der PTP wird nacheinander eines der vier Nucleotide A, C, G und T zugefügt (linkes Bild, blau). Kann das jeweilige Nucleotid aufgrund des vorhandenen ssDNA-Templates eingebaut werden, wird Pyrophosphat (PPi) frei, welches durch Sulfurylase zu ATP umgewandelt wird (rechtes Bild). ATP wird durch Luciferin verbraucht, wobei Oxyluciferin und Licht entsteht. Die Intensität des Lichts wird dann über eine CCD-Kamera detektiert [verändert nach Rothberg und Leamon, 2008].

Auswertung der Sequenzierung

Die Rohdaten aus der Sequenzierung (DNA-Sequenzen - Reads genannt) wurden zuvor auf ihre Auswertbarkeit überprüft. Es wurden nur Reads mit einer Mindestlänge von 70 bp verwendet und die Reads ausgeschlossen, bei denen mehr als eine Sequenz pro Loch der PTP detektiert wurde. Mit der Herstellersoftware „GS Reference Mapper“ wurden die Reads mit einer Referenzdatenbank (ftp://ftp.ncbi.nih.gov/genomes/Apis_mellifera/RNA/) an das Transkriptom der Biene angeglichen.

3. Ergebnisse

In dieser Arbeit wurden erstmals die dynamischen Änderungen der Proteinacetylierung an verschiedenen Acetylierungsstellen von Histon H3 (H3K9ac und H3K18ac) abhängig von der Trainingsstärke analysiert. Mit dem HAT-Inhibitor Garcinol und dem HDAC-Inhibitor TSA wurde der Acetylierungsstatus im Gehirn der Honigbiene verändert und die Auswirkungen auf die durch schwaches und starkes Training induzierten assoziativen Gedächtnisse untersucht. Außerdem wurde eine Methode etabliert, mit der *in vivo* neu synthetisierte RNA im Gehirn der Biene markiert und separiert werden kann, um im Anschluss zu verschiedenen Zeiten nach dem Training Genexpressionsanalysen machen zu können.

3.1 Test der Antikörper zur Quantifizierung der Acetylierung

Im Rahmen dieser Arbeit wurden zur Quantifizierung der Acetylierung ein Antikörper gegen Histon H3, zwei Antikörper gegen die beiden acetylierten Lysine 9 und 18 an Histon H3 (H3K9ac und H3K18ac) sowie ein Antikörper gegen acetylierte Lysine (Ac-Lys) verwendet. Um diese kommerziell erhältlichen Antikörper für quantitative Messungen mittels ELISA verwenden zu können, wurde im Westernblot überprüft, ob neben den Histonen noch weitere Banden im Bienenhirn erkannt werden (Abb. 22).

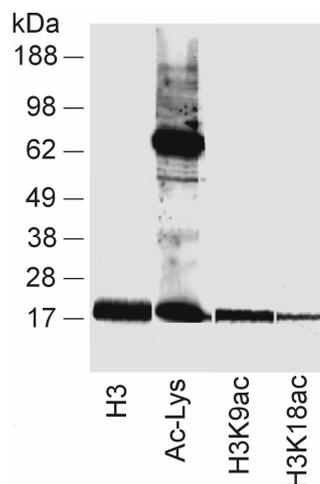


Abbildung 22: Testen der Antikörper im Westernblot

Ein Antikörper gegen Histon H3 und drei Acetylierungsantikörper wurden auf ihre Funktionalität im Homogenat aus Bienenhirn untersucht.

H3 = Histon H3 Antikörper

Ac-Lys = Acetyl-Lysin Antikörper

H3K9ac = Acetyl-Histon H3 (Lys9) Antikörper

H3K18ac = Acetyl-Histon H3 (Lys18) Antikörper

Bei den drei Antikörpern gegen Histon H3 (H3, H3K9ac, H3K18ac) war außer der Histonbande auf der Höhe von 18 kDa keine weitere Bande zu sehen. Entsprechend der Erwartung zeigte der Ac-Lys-Antikörper im Westernblot zusätzlich zur Bande auf der Höhe von Histon H3 weitere Banden mit einem höheren Molekulargewicht, da alle Proteine detektiert werden, die an Lysinen acetyliert sind. Somit konnten die Antikörper für quantitative Messungen mittels ELISA verwendet werden.

Desweiteren wurden die Antikörper gegen Histon H3, H3K9ac und H3K18ac in der Immunhistologie getestet, um einen Überblick über die Histonacetylierung im Bienenhirn zu erhalten (Abb. 23).

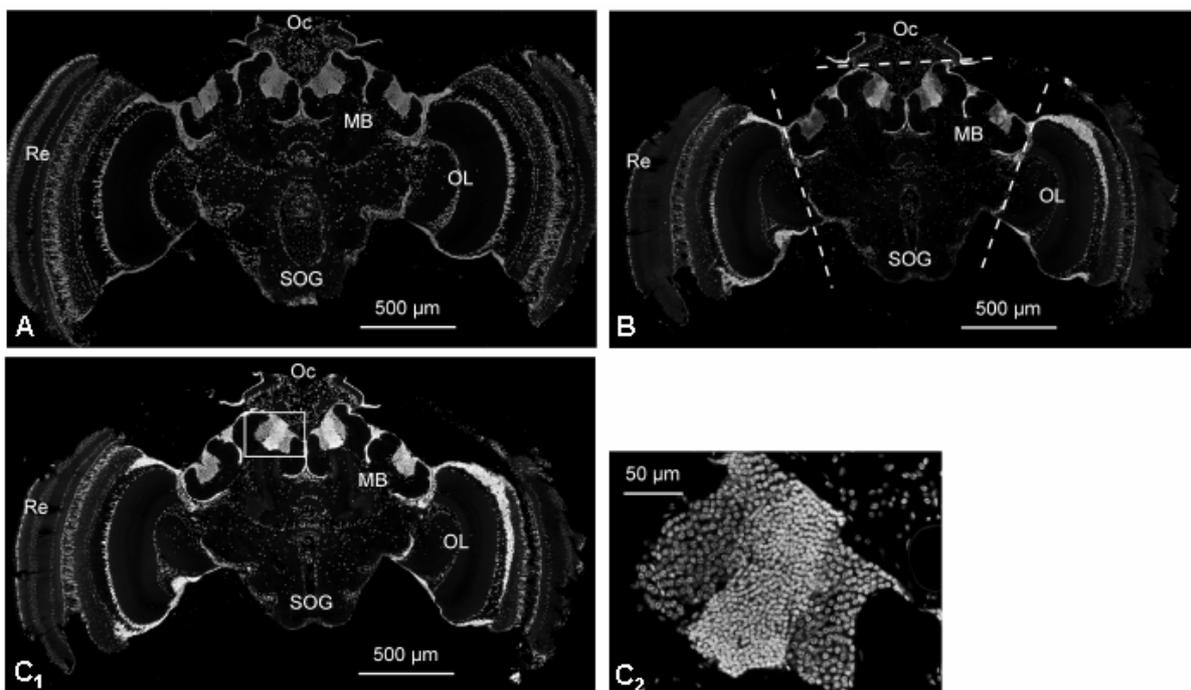


Abbildung 23: Immunhistologische Färbung eines Bienenhirns mit Anti-Histon Antikörper

Immunhistologische Färbung eines Bienenhirns mit Antikörpern gegen H3 (A), H3K9ac (B) und H3K18ac (C). Mit allen drei Antikörpern wurden die Somata der Neuronen im Bienenhirn markiert. Die Vergrößerung (C₂) eines Ausschnitts der Pilzkörper zeigt die angefärbten Nuclei der Kenyonzellen. Die gestrichelte Linie in B markiert das Zentralhirn mit den Antennalloben, den suboesophagealen Ganglia (SOB) und den Pilzkörpern. Weitere erkennbare Strukturen sind die optischen Loben (OL), die Retina (Re) und die Ocelli (Oc).

Mit allen drei Antikörpern wurden selektiv die Nuclei von Neuronen und Gliazellen markiert. Das stärkste Signal war in den Kenyonzellen der Pilzkörper zu sehen.

Da die Pilzkörper und die Antennalloben eine wichtige Rolle beim Lernen und der Gedächtnisbildung spielen [Schwärzel und Müller, 2006], wurde in den folgenden Experimenten zur Quantifizierung der Acetylierung und der Genexpression das Zen-

trahirn der Biene präpariert (Abb. 23B). Im Zentralhirn der Bienen repräsentieren die Kenyonzellen über 80% der gesamten Anzahl an Somata [Witthöft, 1967].

3.2 Die lerninduzierte Änderung der Histonacetylierung im Bienenhirn ist abhängig von der Trainingsstärke

Um lerninduzierte Änderungen der Histonacetylierung nach assoziativer olfaktorischer Konditionierung zu untersuchen, wurden Bienenhirne (Zentralhirn, Abb. 23B) nach assoziativem Training (CS-US gepaart) zu unterschiedlichen Zeiten präpariert und die relative Menge an H3 und die relative Acetylierung an H3K9 und H3K18 mittels ELISA quantifiziert. Um auszuschließen, dass die sensorische Verarbeitung des CS und US oder die Aufnahme der Futterbelohnung eine veränderte Histonacetylierung induziert, wurden den Tieren der Kontrollgruppe ebenfalls beide Stimuli präsentiert, aber in einem zeitlichen Muster, welches zu keiner assoziativen Verknüpfung führt (CS-US ungepaart). Es wurden zwei verschiedene Trainingsstärken gewählt und miteinander verglichen, da beide unterschiedliche Gedächtnisse induzieren. Das Ein-Trial-Training (schwaches Training) induziert ein Gedächtnis, welches nicht mit Translations- oder Transkriptionsblockern gehemmt werden kann und schon nach einem Tag wieder stetig abnimmt. Im Gegensatz dazu bewirkt das Drei-Trial-Training (starkes Training) ein stabiles translations- und transkriptionsabhängiges Gedächtnis [Müller, 2008; Müller, 2002; Grünbaum und Müller, 1998; Wüstenberg et al., 1998].

Damit die relative H3-Menge zur Normalisierung von H3K9ac (H3K9ac/H3) und H3K18ac (H3K18ac/H3) verwendet werden konnte, musste zuerst überprüft werden, ob sich die relative Menge an H3 in den verschiedenen Gruppen unterscheidet (Tab. 5).

Tabelle 5: Die assoziative olfaktorische Konditionierung hat keinen Einfluss auf die relative Menge an Histon H3

Dargestellt ist die relative Menge an H3 aller gemessenen Proben in den unterschiedlichen Gruppen. Die Daten repräsentieren die Mittelwerte (MW) \pm Standardabweichung (SD). Die Anzahl der gemessenen Bienengehirne ist in Klammern angegeben. Es wurden keine signifikante Unterschiede festgestellt (ANOVA; ns: $p > 0,9$).

H3	Ein-Trial-Training		Drei-Trial-Training	
	CS-US ungepaart	CS-US gepaart	CS-US ungepaart	CS-US gepaart
	MW SD	MW SD	MW SD	MW SD
0,5 h	1,02 \pm 0,18 (19)	0,98 \pm 0,18 (19)	1,01 \pm 0,24 (15)	0,99 \pm 0,23 (15)
1 h	0,98 \pm 0,16 (17)	1,02 \pm 0,17 (17)	0,98 \pm 0,24 (16)	1,02 \pm 0,26 (16)
2,5 h	0,94 \pm 0,24 (16)	1,06 \pm 0,34 (16)	0,96 \pm 0,37 (15)	1,04 \pm 0,38 (16)

In der folgenden Abbildung 24 ist zu sehen, dass starkes und schwaches Training eine unterschiedliche Dynamik der Acetylierung von H3K9 und H3K18 induzieren. Starkes Training (Abb. 24A) führt zu einem anhaltenden Anstieg von H3K18ac (0,5 h: $t = 2,11$; $df = 18,4$; $p = 0,048$; 1 h: $t = 2,91$; $df = 22,2$; $p = 0,008$; 2,5 h: $t = 2,66$; $df = 19,5$; $p = 0,015$).

Im Gegensatz dazu kam es nach schwachem Training (Abb. 24C) zu einem vorübergehenden Anstieg von H3K18ac (0,5 h) ($t = 2,16$; $df = 25,7$; $p = 0,04$), die nach 2,5 h jedoch unter das Level der Kontrollgruppe fiel ($t = 3,04$; $df = 23,1$; $p = 0,006$). Durch keine der beiden Trainingsprozeduren wurde die Acetylierung an H3K9ac verändert (Abb. 24B, D).

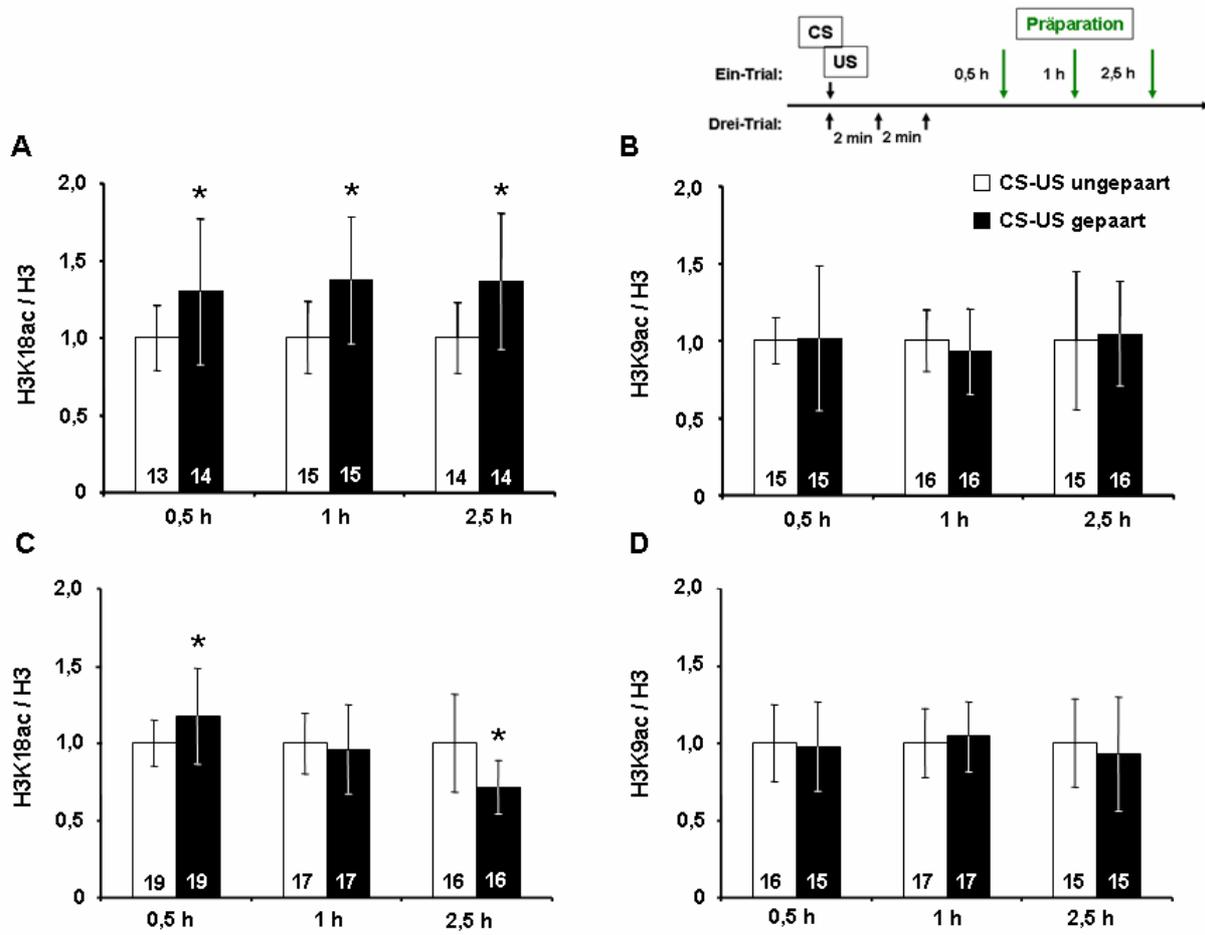


Abbildung 24: Die lerninduzierte Änderung der Histonacetylierung im Bienenhirn ist abhängig von der Trainingsstärke

Bienen wurden entweder in einem starken (A, B) oder schwachen (C, D) Training (CS – US Paarung) konditioniert (CS-US gepaart). Die Kontrollgruppen erhielten CS und US ungepaart (CS-US ungepaart). Die Zentralhirne wurden zu unterschiedlichen Zeiten (0,5 h, 1 h, 2,5 h) nach dem Training präpariert (Schema oben rechts). Anschließend wurde die relative Menge von H3 und die Acetylierung an H3K9 (B,D) und H3K18 (A,C) mittels ELISA quantifiziert. Gezeigt ist die relative Acetylierung von H3K9 und H3K18 normiert auf H3 (Ratio: H3K9ac / H3; H3K18ac / H3). Die jeweilige Kontrollgruppe wurde auf 1 normiert.

Die Daten repräsentieren die MW \pm SD. Die Anzahl der gemessenen Bienenhirne ist in jedem Balken angegeben. Signifikante Unterschiede sind durch Sternchen markiert (Student's t-test (two-tailed); * $p \leq 0,05$).

In der Literatur existieren bisher nur Daten zu Experimenten, bei denen die Hyperacetylierung von Histonen in der Konsolidierungsphase eines transkriptionsabhängigen Gedächtnisses nachgewiesen wurde [Sharma, 2010]. Durch die in dieser Dissertation durchgeführten Untersuchungen konnte erstmalig gezeigt werden, dass der Verlauf der Acetylierungskinetik von der Trainingsstärke abhängig ist und lerninduzierte Änderungen nur an definierten Acetylierungsstellen (hier H3K18ac jedoch nicht H3K9ac) auftreten.

3.3 Änderungen des Acetylierungslevels im Bienenhirn haben Auswirkungen auf das assoziative Gedächtnis

Um zu überprüfen, ob diese lerninduzierten Änderungen der Histonacetylierung eine Rolle bei der Gedächtnisbildung spielen, wurde im Folgenden getestet, ob eine Veränderung des Acetylierungsniveaus von H3K18 nach starkem und schwachem Training Auswirkungen auf das Gedächtnis der Honigbiene hat. Die Acetylierung von Histonen kann indirekt über eine Hemmung der entsprechenden Enzyme, den Histonacetyltransferasen (HATs) und den Histondeacetylasen (HDACs), manipuliert werden. In dieser Arbeit wurde der HAT-Inhibitor Garcinol und der HDAC-Inhibitor Trichostatin A (TSA) verwendet.

TSA ist ein Inhibitor der HDACs Klasse I und II, der den Acetylierungslevel von Histonen sowie Nicht-Histon-Proteinen erhöht und schon mehrfach in Experimenten zur synaptischen Plastizität und Gedächtnisbildung verwendet wurde [Fontán-Lozano et al., 2008; Wang et al., 2012; Sharma, 2010].

Garcinol inhibiert die beiden HATs p300 und p300/CBP-assoziiertes Faktor (PCAF), was zu einer Minderung des Acetylierungslevels führt [Balasubramanyam et al., 2004]. Garcinol wurde bisher erst in zwei Arbeiten verwendet, um die Rolle der HATs beim Lernen zu untersuchen [Maddox et al., 2013; Zhao et al., 2012]. Die beiden Inhibitoren wurden bereits in unserem Labor für Experimente mit der Honigbiene von Dr. Jakob Hättig in seiner Dissertation (TSA) und von mir in meiner Diplomarbeit (Garcinol) verwendet.

3.3.1 Der HDAC-Inhibitor TSA und der HAT-Inhibitor Garcinol haben Auswirkungen auf den Acetylierungslevel im Bienenhirn

Zuerst wurde die Wirkung der Inhibitoren auf den Acetylierungslevel im Gehirn der Honigbiene überprüft. Nach der Injektion in den Thorax wurden die Zentralhirne der Bienen zu unterschiedlichen Zeiten präpariert. Im Anschluss wurde die relative Menge an H3, H3K18ac sowie die Acetylierung von Lysinen (Ac-Lys) mittels ELISA quantifiziert, da HATs und HDACs auch Nicht-Histon-Proteine acetylieren bzw. deacetylieren. H3K9ac wurde nicht gemessen, da aus dem vorherigen Experiment (Abb. 24B, D) ersichtlich wurde, dass diese durch das Training nicht verändert war.

Da die relative Menge an Histon H3 in den verschiedenen Gruppen (Tab. 6) nicht unterschiedlich war, wurde in jeder Probe die entsprechende relative H3-Menge zur Normalisierung von H3K18ac (H3K18ac/H3) und der Acetylierung von Lysin (Ac-Lys/H3) verwendet.

Tabelle 6: Der HDAC-Inhibitor TSA und der HAT-Inhibitor Garcinol haben keinen Einfluss auf die relative Menge an Histon H3

Dargestellt ist die relative Menge an H3 aller gemessenen Proben in den unterschiedlichen Gruppen. Die Daten zeigen die Mittelwerte (MW) \pm Standardabweichung (SD). Die Anzahl der gemessenen Bienegehirne ist in Klammern angegeben. Es wurden keine signifikante Unterschiede festgestellt (ANOVA; ns: $p > 0,9$).

H3	HDAC-Inhibitor		HAT-Inhibitor	
	Kontrolle	TSA	Kontrolle	Garcinol
	MW SD	MW SD	MW SD	MW SD
0,5 h	1,03 \pm 0,34 (12)	0,97 \pm 0,25 (12)	1,04 \pm 0,24 (10)	0,96 \pm 0,18 (10)
2 h	1,02 \pm 0,22 (13)	0,98 \pm 0,30 (13)	0,96 \pm 0,36 (14)	1,04 \pm 0,47 (14)
4 h	0,96 \pm 0,28 (13)	1,04 \pm 0,32 (13)	1,04 \pm 0,15 (10)	0,96 \pm 0,24 (10)

In Abbildung 25 ist zu sehen, dass sowohl TSA als auch Garcinol zu transienten Änderungen der Acetylierung im Bienegehirn führten. Durch TSA (Abb. 25A) kam es 2 h nach Injektion zu einer Erhöhung ($t = 2,3$; $df = 21,3$; $p = 0,03$) und durch Garcinol (Abb. 25C) zu einer Reduktion ($t = 2,3$; $df = 19,4$; $p = 0,03$) der relativen Menge an H3K18ac. Weitere 2 h später (4 h) war H3K18ac wieder gleich dem Kontrolllevel (Abb. 25A,C). Ac-Lys (Abb. 25B,D) zeigte nach 2 h die gleichen Änderungen wie bei den Messungen mit dem anderen Antikörper (TSA: $t = 2,4$; $df = 11,2$; $p = 0,035$; Garcinol: $t = 2,1$; $df = 15,8$; $p = 0,049$).

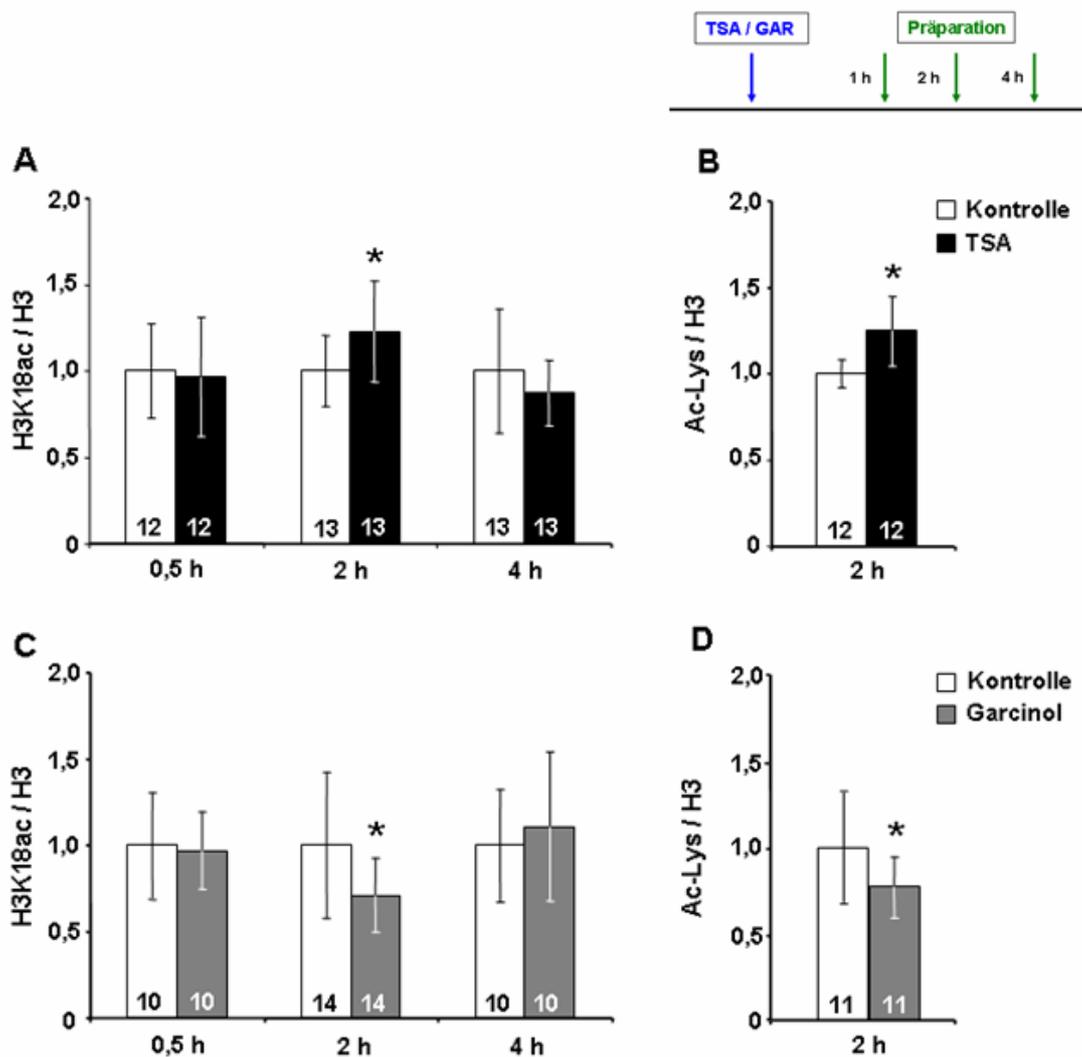


Abbildung 25: Der HDAC-Inhibitor TSA und der HAT-Inhibitor Garcinol führen zu einer transienten Erhöhung bzw. Reduzierung des Acetylierungslevels im Bienengehirn

Nach der Injektion von TSA und Garcinol bzw. der entsprechenden Lösungsmittel (Kontrollen) wurden zu verschiedenen Zeiten (0,5 h, 2 h, 4 h) die Bienengehirne präpariert (Schema oben rechts) und die relative Menge an H3, H3K18ac (A,C) sowie die Acetylierung von Lysin (Ac-Lys) (B,D) mittels ELISA quantifiziert. Dargestellt sind H3K18ac und Ac-Lys normiert auf H3 (Ratio: H3K18ac / H3; Ac-Lys / H3). Die jeweilige Kontrollgruppe wurde auf 1 normiert. Die Daten zeigen die MW \pm SD. Die Anzahl der gemessenen Bienengehirne ist in jedem Balken angegeben. Signifikante Unterschiede sind durch Sternchen markiert (Student's t-test (two-tailed); *p \leq 0,05).

Mit der Bestimmung des maximalen Wirkzeitpunktes (2 h nach Injektion), konnten die Inhibitoren in den folgenden Verhaltensexperimenten gezielt eingesetzt werden, um den Acetylierungslevel zu einem bestimmten Zeitpunkt zu verändern.

3.3.2 Die Änderung des Acetylierungslevels im Bienengehirn hat keinen Einfluss auf gustatorische Sensorik und nicht-assoziative Lernformen

Die olfaktorische Konditionierung ist eine appetitive Lernform, bei der der unkonditionierte Stimulus (US - Saccharoselösung) die Belohnung darstellt. Die Bewertung der Belohnung hängt stark vom physiologischen Zustand und der sensorischen Prozessierung der Biene ab. Durch die Manipulation der Acetylierung kann auch die Aktivität zytosolischer Proteine beeinflusst werden, was zu einer veränderter sensorischen Prozessierung führen kann. Um Auswirkungen eines durch TSA und Garcinol veränderten Acetylierungslevels auf das olfaktorische Gedächtnis der Biene zu untersuchen, muss deshalb zuvor überprüft werden, ob die Inhibitoren die Sensorik beeinflussen.

Reaktion auf gustatorische Reize (Wasser-/Zuckerwasserempfindlichkeit)

Zuerst wurde der Einfluss der Inhibitoren TSA und Garcinol auf die Empfindlichkeit der Bienen gegenüber gustatorischen Reizen und somit auf die Wahrnehmung des US überprüft. Vor der Injektion und 2 h nach Injektion von TSA, Garcinol bzw. den entsprechenden Lösungsmitteln (Kontrolle) wurden Bienen auf ihre Empfindlichkeit gegenüber Wasser und verschiedenen Zuckerwasserlösungen (0 M, 0,03 M und 1 M Saccharoselösung) getestet (Abb. 26).

Die Empfindlichkeit der Bienen auf gustatorische Reize wurde weder von TSA (Abb. 26A) noch von Garcinol (Abb. 26B) beeinflusst.

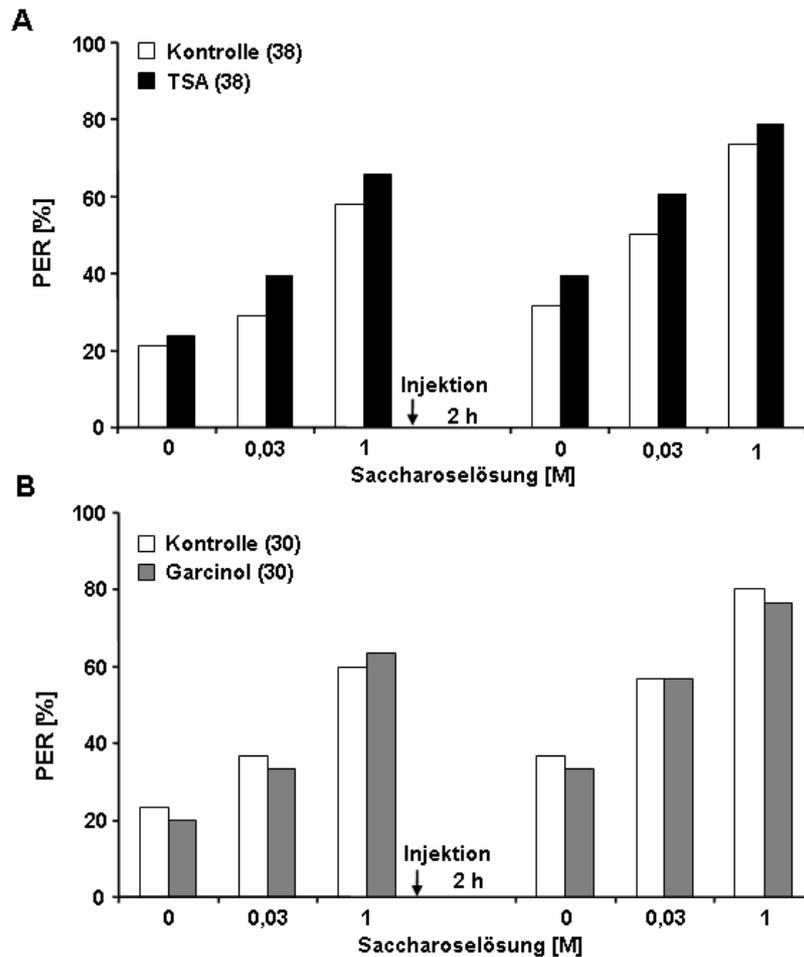


Abbildung 26: Die Änderung des Acetylierungslevels hat keinen Einfluss auf die gustatorische Empfindlichkeit der Bienen

Die Bienen wurden vor und 2 h nach der Injektion von TSA (A), Garcinol (B) bzw. des entsprechenden Lösemittels (Kontrolle) auf ihre Empfindlichkeit gegenüber Wasser und verschiedenen Saccharoselösungen getestet. Dargestellt ist die Anzahl der Tiere in Prozent, die auf den gegebenen Stimulus an den Antennen mit dem PER reagierten. Die Anzahl der Tiere ist in Klammern hinter der Gruppenbezeichnung in der Legende vermerkt.

Habituation und Sensitisierung

In den folgenden Experimenten wurde der Einfluss von TSA und Garcinol auf nicht-assoziative Lernformen wie Habituation und Sensitisierung untersucht (Abb. 27). Die Sensitisierung wurde etwa 1 h und im Anschluss die Habituation etwa 2 h nach Injektion des jeweiligen Inhibitors durchgeführt.

Sowohl TSA als auch Garcinol hatten keinen Einfluss auf die Sensitisierung (Abb. 27A) und die Habituation (Abb. 27B).

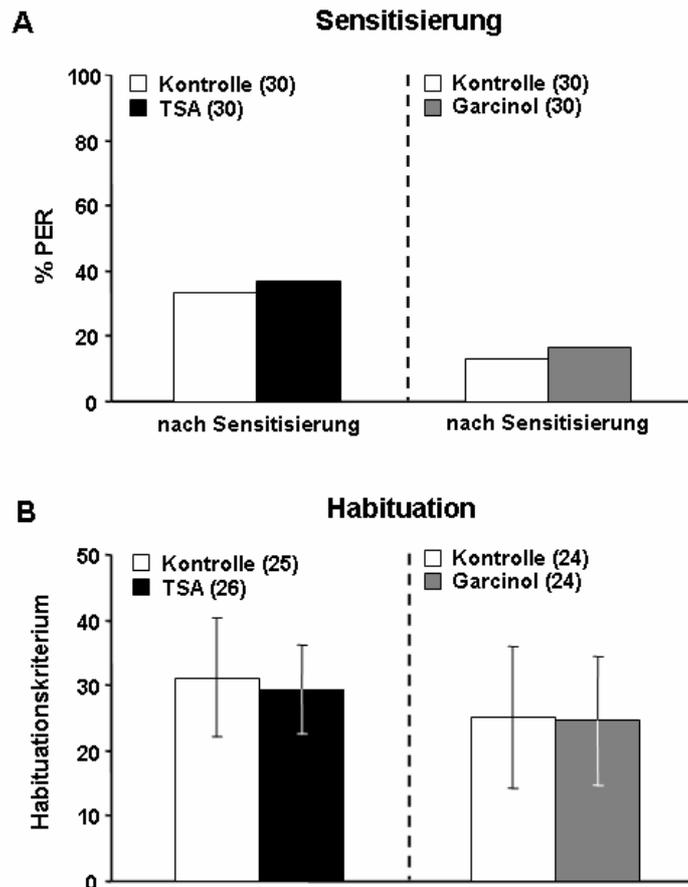


Abbildung 27: Die Änderung des Acetylierungslevels hat keinen Einfluss auf Sensitisation und Habituation

(A) 1 h nach Injektion von TSA, Garcinol bzw. der entsprechenden Lösungsmittel (Kontrolle) wurde ein Sensitisationsexperiment durchgeführt. Dargestellt ist die Anzahl der Tiere in Prozent, die nach Sensitisation auf den gegebenen Stimulus (CS - Nelkenduft) mit dem PER reagierten.

(B) 2 h nach Injektion von TSA, Garcinol bzw. der entsprechenden Lösungsmittel (Kontrolle) wurde mit den selben Tieren ein Habituationsexperiment durchgeführt. Dargestellt sind die Mittelwerte der Anzahl gegebener Stimuli (US – 1 M Saccharoselösung) an einer der beiden Antennen, bis zum Ausbleiben des PER (Habituationskriterium). Die Dishabituation erfolgte im Anschluss.

Die Anzahl der Tiere ist in Klammern hinter der Gruppenbezeichnung in der Legende vermerkt. Die Fehlerbalken stellen die Standardabweichung dar.

Nach diesen Experimenten konnte ausgeschlossen werden, dass die Änderung des Acetylierungslevels durch TSA und Garcinol die CS- und US-Prozessierung bei der Honigbiene beeinflusst. Dies ist eine Grundvoraussetzung, um Auswirkungen von TSA und Garcinol auf assoziatives Lernen zu untersuchen.

3.3.3 Der Einfluss des geänderten Acetylierungslevels auf das assoziative Gedächtnis ist abhängig von der Trainingsstärke

Auf Grundlage der gemessenen lerninduzierten Acetylierungsmuster an H3K18 (Abb. 24) wurde nun untersucht, ob eine Erhöhung bzw. Reduzierung der Acetylierung das Gedächtnis der Bienen verändert. Der Injektionszeitpunkt (0,5 h nach Training) wurde so gewählt, dass die maximale Wirkung des jeweiligen Inhibitors (2 h nach Injektion) mit dem Zeitpunkt der lerninduzierten Acetylierungsänderung von H3K18 zusammenfällt (Abb. 24) (2,5 h nach Training).

Starkes Training (Drei-Trial-Training)

Das assoziative Gedächtnis nach starkem Training wurde sowohl von TSA als auch von Garcinol beeinflusst (Abb. 28). Durch TSA, welches die Erhöhung von H3K18ac bewirkt, kam es zu einer Verbesserung des 1 d- und 2 d-Gedächtnisses (1d: $\chi^2 = 7,33$; $df = 1$; $p = 0,007$; 2 d: $\chi^2 = 6,9$; $df = 1$; $p = 0,009$) (Abb. 28A). Garcinol (Abb. 28B), welches zu einer Reduzierung von H3K18ac führt, hatte den gegenteiligen Effekt und verschlechterte sowohl das 1 d- als auch das 2 d-Gedächtnis (1d: $\chi^2 = 11,9$; $df = 1$, $p = 0,0011$; 2d: $\chi^2 = 7,33$; $df = 1$; $p = 0,007$). Die Akquisition selbst und das 2 h-Gedächtnis wurden nicht beeinflusst (TSA: $\chi^2 = 0,12$; $df = 1$; $p = 0,73$; Garcinol: $\chi^2 = 0,24$; $df = 1$; $p = 0,62$).

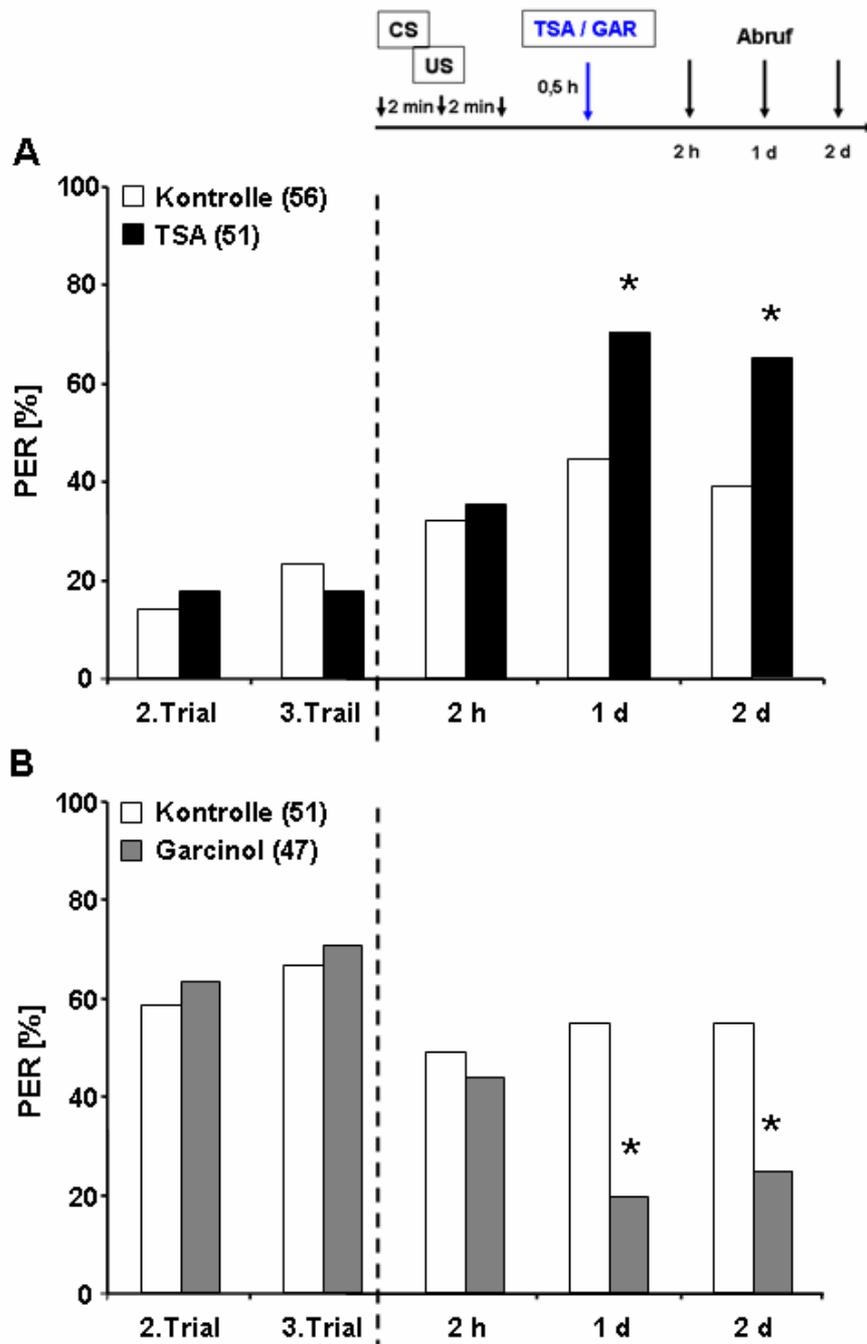


Abbildung 28: Die Änderung des Acetylierungslevels hat Einfluss auf das 1- und 2-Tages-Gedächtnis nach starkem Training

Die Bienen wurden 0,5 h nach dem Training mit TSA (A), Garcinol (B) bzw. dem entsprechenden Lösungsmittel (Kontrolle) injiziert und nach unterschiedlichen Zeiten (2 h, 1 d und 2 d) das Gedächtnis abgerufen (Schema oben rechts). Dargestellt ist die Anzahl der Tiere in Prozent, die beim Abruf mit dem PER reagierten. Die Anzahl der Tiere ist in Klammern hinter der Gruppenbezeichnung in der Legende vermerkt. Signifikante Unterschiede sind durch Sternchen markiert (χ^2 ; * $p \leq 0,05$).

Schwaches Training (Ein-Trial-Training)

Sowohl TSA als auch Garcinol beeinflussten das assoziative Gedächtnis nach schwachem Training (Abb. 29). Durch TSA kam es zu einer Verbesserung des 1 d-Gedächtnisses ($\chi^2 = 4,56$; $df = 1$; $p = 0,033$). Das 2 h-Gedächtnis ($\chi^2 = 0,22$; $df = 1$; $p = 0,64$) sowie das 2 d-Gedächtnis ($\chi^2 = 0,03$; $df = 1$; $p = 1$) waren nicht betroffen (Abb. 29A). Garcinol, welches zu einer Reduzierung von H3K18ac führt, hatte den gegenteiligen Effekt und verschlechterte das 1 d-Gedächtnis ($\chi^2 = 13,2$; $df = 1$; $p = 0,0004$). Ebenfalls waren 2 h- ($\chi^2 = 0,02$; $df = 1$; $p = 1$) und 2 d-Gedächtnis ($\chi^2 = 0,46$; $df = 1$; $p = 0,56$) nicht betroffen (Abb. 29B).

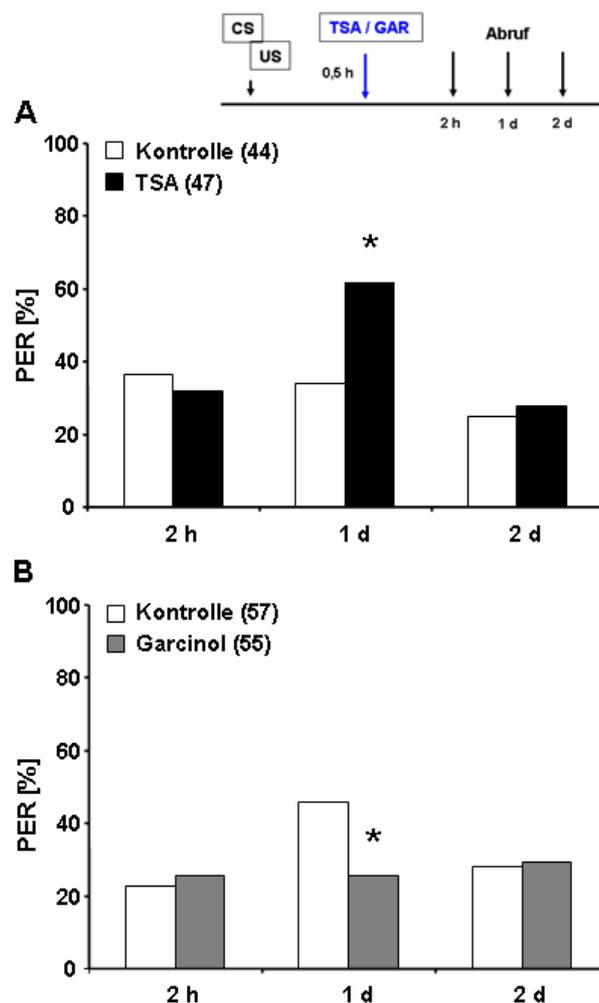


Abbildung 29: Die Änderung des Acetylierungslevels beeinflusst das 1-Tages-Gedächtnis nach schwachem Training

Die Bienen wurden 0,5 h nach dem Training mit TSA (A), Garcinol (B) bzw. dem entsprechenden Lösungsmittel (Kontrolle) injiziert und nach unterschiedlichen Zeiten (2 h, 1 d und 2 d) das Gedächtnis abgerufen (Schema oben rechts). Dargestellt ist die Anzahl der Tiere in Prozent, die beim Abruf mit dem PER reagierten. Die Anzahl der Tiere ist in Klammern hinter der Gruppenbezeichnung in der Legende vermerkt. Signifikante Unterschiede sind durch Sternchen markiert (χ^2 ; * $p \leq 0,05$).

In Übereinstimmung mit anderen Arbeiten [Fontán-Lozano et al., 2008; Sharma, 2010; Wang et al., 2012] werden durch den HDAC-Inhibitor TSA sowohl Gedächtnisse nach schwachem als auch starkem Training verbessert. Allgemein wird dabei davon ausgegangen, dass die erhöhte Histonacetylierung lerninduzierte Transkriptionsprozesse erleichtert. Überraschend und neu war jedoch der Befund, dass nach schwachem Training nur das 1 d-Gedächtnis verbessert wurde. Im Gegensatz dazu reduziert der HAT-Inhibitor Garcinol die Acetylierung von Histonen und hat somit inhibierende Auswirkungen auf die Transkription von Genen. Die Effekte von Garcinol nach schwachem sowie starkem Training waren völlig unerwartet, da die betroffenen Gedächtnisse durch Transkriptionsinhibitoren nicht inhibiert werden. [Friedrich et al., 2004; Grünbaum und Müller, 1998; Wüstenberg et al., 1998].

3.4 Die acetylierungsabhängigen Effekte auf das Gedächtnis der Honigbiene sind transkriptionsabhängig

Im Folgenden sollte mit dem Transkriptionsinhibitor ActinomycinD (ActD) untersucht werden, ob die Effekte von TSA und Garcinol auf das Gedächtnis tatsächlich über chromatinmodifizierende Transkriptionsprozesse vermittelt werden.

ActD ist ein DNA-interkalierender Stoff, der so die Transkription irreversibel hemmt.

Die verwendeten Konzentrationen der Injektionslösungen können dem Methodenteil (Kapitel 2.2.3) entnommen werden.

Starkes Training (Drei-Trial-Training)

Die Effekte von TSA und Garcinol auf die Gedächtnisbildung nach starkem Training konnten durch gleichzeitige Gabe von ActD wieder aufgehoben werden (Abb. 30). Die Verbesserung des 1 d- und 2 d-Gedächtnisses durch TSA (Abb. 30A) wurde mit ActD wieder auf das Kontrolllevel reduziert (1 d: TSA: $\chi^2 = 6,3$; df = 1; p = 0,012; TSA+ActD: $\chi^2 = 5,3$; df = 1; p = 0,022; 2 d: TSA: $\chi^2 = 5,9$; df = 1; p = 0,015; TSA+ActD: $\chi^2 = 6,3$; df = 1; p = 0,012). Die Abnahme des Gedächtnisses durch Garcinol (Abb. 30B) wurde ebenfalls durch ActD wieder ausgeglichen (1 d: Garcinol: $\chi^2 = 10,3$; df = 1; p = 0,001; Garcinol+ActD: $\chi^2 = 5,8$; df = 1; p = 0,016; 2 d: Garcinol: $\chi^2 = 5,1$; df = 1; p = 0,023; Garcinol+ActD: $\chi^2 = 5,7$; df = 1; p = 0,017).

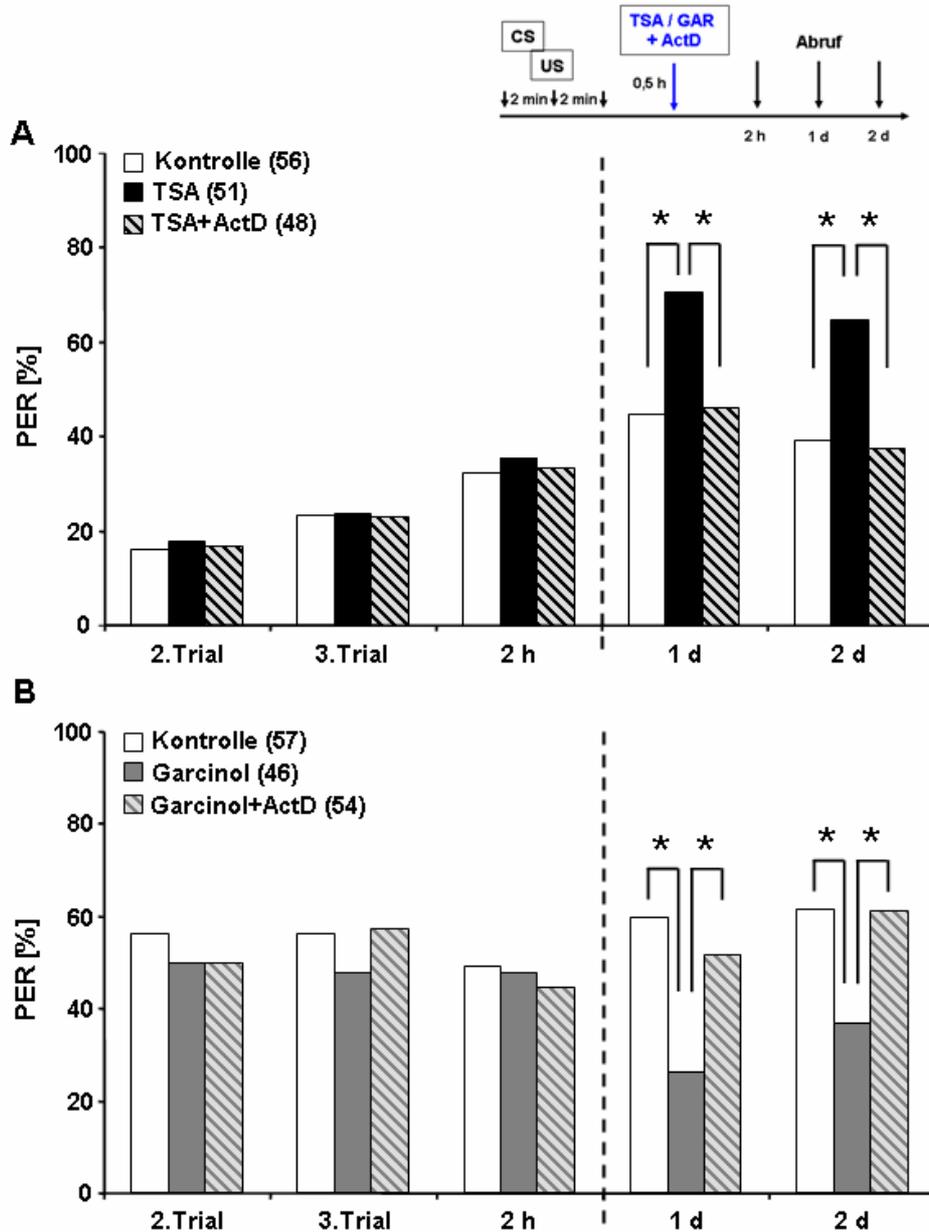


Abbildung 30: Der Einfluss von TSA und Garcinol auf das Gedächtnis nach starkem Training ist transkriptionsabhängig

Die Bienen wurden 0,5 h nach dem Training mit TSA, TSA+ActD bzw. dem Lösungsmittel (A) bzw. Garcinol, Garcinol+ActD oder dem Lösungsmittel (B) injiziert. Nach 2 h, 1 d und 2 d wurde das Gedächtnis abgerufen (Schema oben rechts). Dargestellt ist die Anzahl der Tiere in Prozent, die beim Abruf mit dem PER reagierten. Die Anzahl der Tiere ist in Klammern hinter der Gruppenbezeichnung in der Legende vermerkt. Signifikante Unterschiede sind durch Sternchen markiert (χ^2 ; * $p \leq 0,025$).

Schwaches Training (Ein-Trial-Training)

Da das durch schwaches Training induzierte Gedächtnis nicht durch ActD beeinflussbar ist, war die kombinierte Wirkung von ActD und TSA bzw. Garcinol unerwartet (Abb. 31). Das durch TSA verbesserte Gedächtnis (Abb. 31A) wurde wieder auf Kontrolllevel reduziert (TSA: $\chi^2 = 6,6$; $df = 1$; $p = 0,01$; TSA+ActD: $\chi^2 = 5,8$; $df = 1$; $p = 0,016$) und die Abnahme des Gedächtnisses durch Garcinol (Abb. 30B) ausgeglichen (Gar: $\chi^2 = 8,1$; $df = 1$; $p = 0,004$; Gar+ActD: $\chi^2 = 6,8$; $df = 1$; $p = 0,009$).

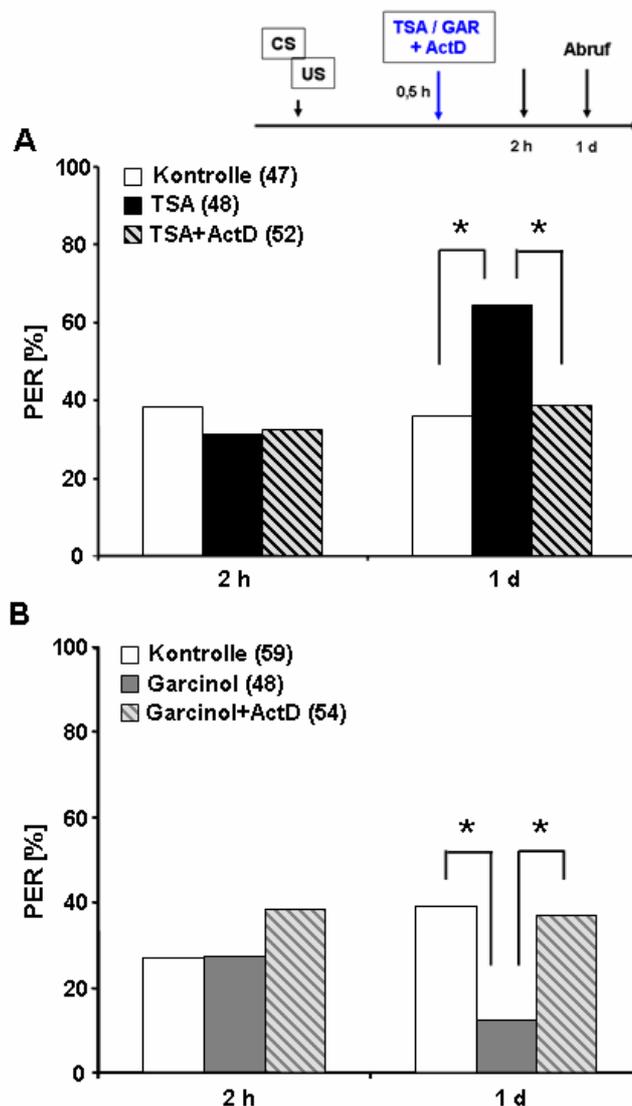


Abbildung 31: Der Einfluss von TSA und Garcinol auf das Gedächtnis nach schwachem Training ist transkriptionsabhängig

Die Bienen wurden 0,5 h nach dem Training mit TSA, TSA+ActD oder dem Lösungsmittel (Kontrolle) (A) bzw. Garcinol, Garcinol+ActD oder dem Lösungsmittel (B) injiziert und später das Gedächtnis abgerufen (Schema oben rechts). Dargestellt ist die Anzahl der Tiere in Prozent, die auf den Nelkenduft (CS) mit dem PER reagierten. Die Anzahl der Tiere ist in Klammern hinter der Gruppenbezeichnung in der Legende vermerkt. Signifikante Unterschiede sind durch Sternchen markiert (χ^2 ; * $p \leq 0,025$).

In diesen Experimenten konnte gezeigt werden, dass durch den Transkriptioninhibitor ActD die Effekte von TSA und Garcinol auf das Gedächtnis der Honigbiene aufgehoben werden. Jedoch ist nicht auszuschließen, dass durch ActD die Wirksamkeit der Inhibitoren auf die Histon-modifizierenden Enzyme beeinträchtigt wurde. Desweiteren könnte es sein, dass die Enzyme zwar weiterhin gehemmt werden, die Interkolation von ActD in die DNA jedoch die Zugänglichkeit der HDACs und HATs zu den Histonen erschwert. In beiden Fällen würde der Acetylierungslevel in Anwesenheit von ActD unverändert bleiben, was die obigen Ergebnisse erklären könnte. Um dies zu überprüfen, wurde getestet ob TSA und Garcinol auch bei gleichzeitiger Injektion mit ActD den Acetylierungslevel von H3K18 im Bienenhirn verändern.

Es hat sich gezeigt, dass weder der acetylierungserhöhende Effekt von TSA noch der acetylierungsreduzierende Effekt von Garcinol bei gleichzeitiger Injektion mit ActD beeinträchtigt wurden (Abb. 32). Die relativen Mengen an H3, die zur Normalisierung von H3K18ac verwendet wurden, waren in allen drei Gruppen des jeweiligen Experiments gleich (Abb. 32A, C). Durch TSA (Abb. 32B) kam es, wie schon in Kapitel 3.3.1 gezeigt, 2 h nach Injektion zu einer Erhöhung von H3K18ac im Gehirn der Honigbiene ($t = 3,38$; $df = 19,8$; $p = 0,003$). Bei gleichzeitiger Injektion von TSA und ActD war ebenfalls H3K18ac erhöht ($t = 3,05$; $df = 21,5$; $p = 0,006$). Eine Injektion mit Garcinol führte, wie in Kapitel 3.3.1 beschrieben, 2 h später zu einer Reduzierung von H3K18ac ($t = 2,46$; $df = 21,89$; $p = 0,022$). Wurde Garcinol mit ActD injiziert, war H3K18ac ebenfalls niedriger als in der Kontrollgruppe ($t = 2,45$; $df = 24$; $p = 0,021$) (Abb. 32C).

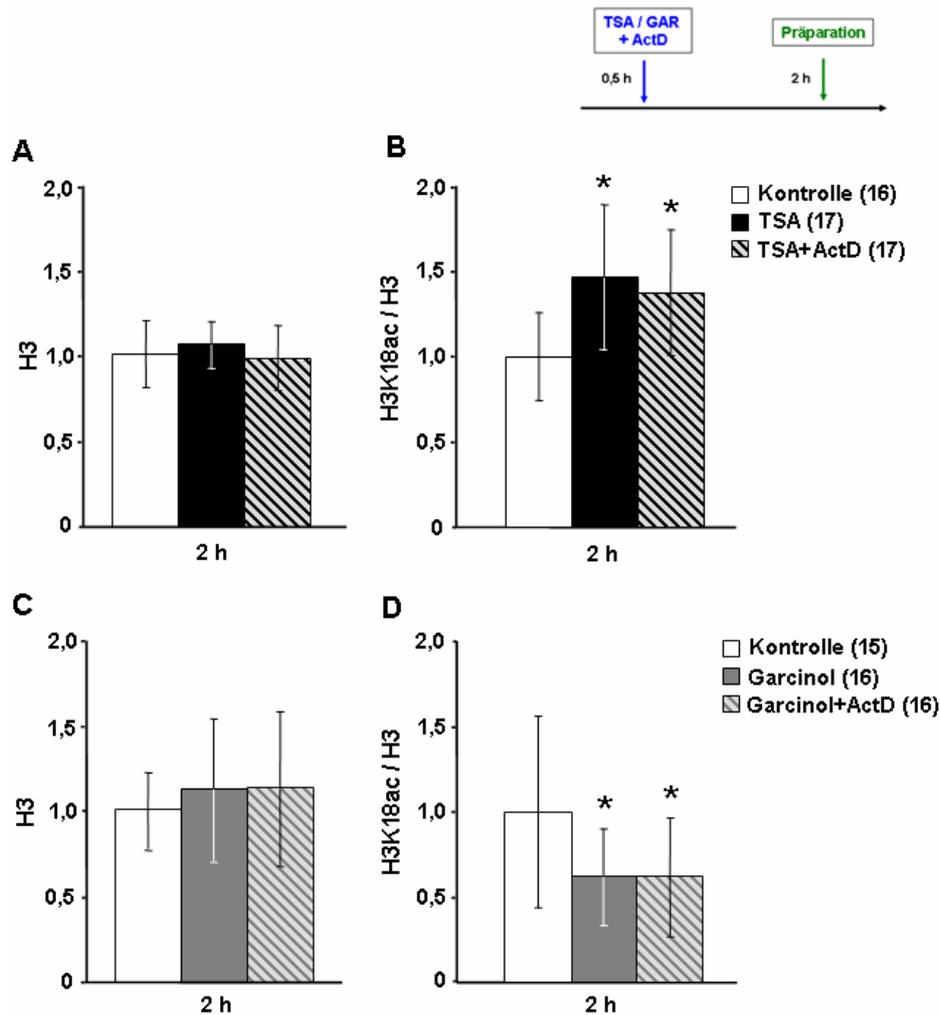


Abbildung 32: Die Effekte von TSA und Garcinol auf H3K18ac im Bienengehirn werden durch ActD nicht beeinträchtigt

Die Bienen wurden mit TSA, TSA+ActD oder dem Lösungsmittel (A, B) bzw. Garcinol, Garcinol+ActD oder dem Lösungsmittel (C, D) injiziert, die Gehirne 2 h später präpariert (Schema oben rechts) und die relative Menge an H3 und H3K18ac mittels ELISA quantifiziert. Da die relative Menge an H3 unverändert blieb (A, C) wurde die Acetylierung von H3K18 auf H3 normiert (H3K18ac/H3) (B, D). Die jeweilige Kontrollgruppe wurde auf 1 normiert. Die Daten repräsentieren die MW \pm SD. Die Anzahl der Bienen ist in jedem Balken angegeben. Signifikante Unterschiede sind durch Sternchen markiert (Student's t-test (two-tailed); * $p \leq 0,025$).

Nach bisherigem Erkenntnisstand wurde ein durch schwaches Training induziertes Gedächtnis, welches nicht durch Transkriptioninhibitoren beeinflusst wurde immer als transkriptionsunabhängig bezeichnet. Dabei wurde angenommen, dass nur Proteinmodifikationen benötigt werden, um z.B. die Transmitterausschüttung an der Synapse zu erhöhen. Es hatte sich nun aber gezeigt, dass auch nach schwachem Training die Histonacetylierung im Bienengehirn verändert ist (Abb. 24C), das Gedächtnis durch pharmakologische Manipulation von histonmodifizierenden Enzymen verbessert und verschlechtert wird (Abb. 29) und diese Effekte durch den Transkrip-

tionsinhibitor ActD eliminiert wurden (Abb. 31). Deshalb sollte nun untersucht werden, ob auch Änderungen auf Transkriptionsebene nachweisbar sind.

3.5 Etablierung einer Methode für *in vivo* Analysen aktivitätsabhängiger Transkriptionsänderungen

Um die durch physiologische Stimuli induzierten Transkriptionsvorgänge zu analysieren, ist es notwendig zwischen den durch den Stimulus induzierten Änderungen (neu synthetisierte mRNA) und dem bereits vorhandenen mRNA-Pool zu diskriminieren. Ohne eine solche Unterscheidung müssen die Stimulus-induzierten neu synthetisierten mRNA-Mengen so groß sein, dass diese mit Hilfe von real-time PCR vom Gesamtpool der jeweiligen mRNA Spezies unterscheidbar ist.

In diesem Fall ist es von besonderem Vorteil, neu synthetisierte mRNA markieren und separieren zu können, um dann damit quantitative real-time Experimente zu machen. Da mit dieser Methode noch nie zuvor lerninduzierte Änderungen der Genexpression weder in Vertebraten noch Invertebraten untersucht worden sind, musste auf der Grundlage vorhandener Arbeiten, in denen RNA zu anderen Zwecken *in vivo* markiert wurde, die Anwendung für die spezielle Fragestellung im Modellorganismus Honigbiene etabliert werden.

In den folgenden Kapiteln wurde die Gesamt-RNA (rRNA, snRNA, mRNA etc.) vereinfacht als RNA bezeichnet. Wenn es sich um mRNA handelt, wurde dies dementsprechend bezeichnet.

3.5.1 Markierung der RNA mit Bromouridin (BrU)

Die Markierung von RNA kann unter anderem radioaktiv, mit Fluoreszenzfarbstoffen [Armitage, 2011; Paredes et al., 2011; Tabor und Boyle, 2001; Temsamani und Agrawal, 1996] oder Haptenen, wie z.B. Digoxigenin (DIG) oder Biotin erfolgen. Dafür werden modifizierte Ribonukleoside (meist Uridin) verwenden, die in der Zelle zu Nukleosidtriphosphat umgewandelt und dann in neu synthetisierte RNA eingebaut werden. Radioaktiv markierte RNA kann nicht separiert werden. Diese Methode wird hauptsächlich verwendet, um Expressionsanalysen mittels Autoradiografie zu quantifizieren. Eine Separation von mit Fluoreszenzfarbstoffen markierter RNA ist ebenfalls nicht möglich. Sie dient vorwiegend der Visualisierung der RNA bei Lokalisierungsanalysen.

Die Separation DIG-markierter RNA erfolgt mittels kommerziell erhältlicher Anti-DIG-Antikörper und die Isolierung Biotin-markierter RNA beruht auf der hoch affinen Biotin-Avidin-Bindung [Chevalier et al., 1997]. Da DIG- bzw. Biotin mittels Spacer an Uridin gekoppelt werden müssen und dadurch ein relativ großes Uridin-Analog entsteht, welches die Plasmamembran sehr schlecht durchdringen kann, ist diese Methode nur für *in vitro*-Experimente geeignet.

Für die in dieser Arbeit geplanten *in vivo*-Experimente mit anschließender Separation und Quantifizierung der neu synthetisierten RNA kamen ausschließlich gut zellgängige, markierte Ribonukleoside in Frage. Für diesen Zweck stehen kommerziell erhältliche halogenierte Ribonukleoside, wie z.B. Bromouridin (BrU) zur Verfügung. Der Nachweis über den Einbau bzw. die Separation der mit Bromouridin markierten RNA (BrU-RNA) kann im Anschluss mit einem ebenfalls kommerziell erhältlichen Antikörper gegen das halogenierte Nukleosid erfolgen.

3.5.2 Nachweis des BrU-Einbaus in die RNA des Bienenhirns

Nach der systemischen Injektion von BrU in den Thorax der Biene, musste zuerst deren Einbau in die RNA im Bienenhirn nachgewiesen werden. Hierfür wurden Bienen mit jeweils 1 µl 30 mM BrU injiziert (300 µM im Tier), die Gehirne nach 8 h präpariert und die Qualität der isolierten RNA mit Hilfe der Gelelektrophorese überprüft. Als Positivkontrolle wurde ebenfalls RNA aus Mäusehirn isoliert und die gleiche Menge auf das Gel aufgetragen. Der einzige Unterschied zwischen Mäuse- und Bienen-RNA besteht darin, dass Mäuse eine 28S und eine 18S rRNA besitzen, Bienen eine 26S und 18S rRNA [DeLucca et al., 1974].

Die RNA-Proben aus Bienen- und Mäusehirn wurden jeweils geteilt und einmal erhitzt und nicht erhitzt aufgetragen. Wie in Abbildung 33 zu sehen, ist ein Erhitzen der Proben notwendig, um deutliche Banden zu erhalten (1, 3). Die nicht erhitzten Proben waren bei gleicher Menge undeutlicher zu sehen (2, 4). Die 26S rRNA der Bienen ist hitzeempfindlich [DeLucca et al., 1974], weshalb nur eine dickere Bande auf Höhe der 18S rRNA zu sehen ist (1).

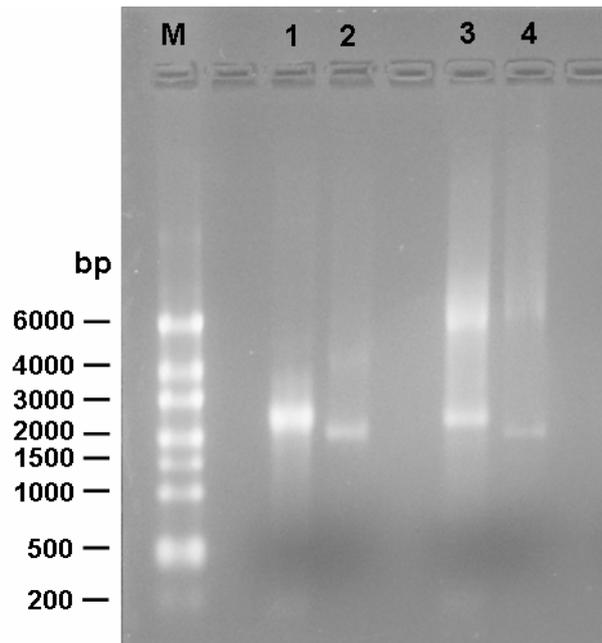


Abbildung 33: Die Qualität der RNA im Bienenhirn ist nach BrU-Injektion nicht beeinträchtigt

Bienen wurden mit 1 µl BrU (30 mM) injiziert und 8 h später die Qualität der RNA überprüft. Die Hälfte der Probe wurde mit Ladepuffer versetzt, erhitzt und auf das Gel aufgetragen (1). Die andere Hälfte wurde auch mit Ladepuffer versetzt, jedoch nicht erhitzt (2). Als Positivkontrolle wurde RNA aus Mäusehirn verwendet (3: erhitzt, 4: nicht erhitzt). Die Größe in Basenpaaren (bp) der entsprechenden Banden können anhand des RNA-Markers (M) abgelesen werden.

Somit konnte nachgewiesen werden, dass nach BrU-Injektion und anschließender RNA-Isolierung keine qualitative Beeinträchtigung der RNA aus Bienenhirn besteht. Nach Überprüfung der Qualität der aus Bienenhirn isolierten RNA sollte nun der Einbau des zuvor injizierten BrU nachgewiesen werden.

3.5.2.1 Test eines geeigneten Antikörpers zum BrU-Nachweis im Dotblot

Der Nachweis des BrU-Einbaus erfolgte mit Bromodeoxyuridin-Antikörpern im Dotblot. Antikörper die spezifisch nur BrU erkennen sind kommerziell nicht erhältlich. Es gibt ausschließlich Antikörper gegen das halogenierte Ribonukleosid Bromodeoxyuridin (BrdU), welches bei der Replikation in DNA eingebaut wird. Einige dieser Antikörper zeigen laut Hersteller jedoch Kreuzreaktionen mit BrU. Aus diesem Grund werden diese Antikörper auch zur Detektion von BrU-RNA eingesetzt [Bogolyubov, 2007; Haider et al., 1997; Jensen et al., 1993; Kageyama et al., 2004]. Um zusätzlich schwache Kreuzreaktionen mit unmarkierter RNA abzublocken, wird dem Blockpuffer tRNA oder ribosomale RNA aus *E.coli* zugegeben.

Mit folgendem Dotblot wurde untersucht, ob die Zugabe von tRNA notwendig ist. Die RNA wurde aus Bienengehirnen isoliert, die 8 h zuvor mit 1 μ l BrU (30 mM) injiziert wurden. Der verwendete BrdU-Antikörper (Sigma) detektierte sowohl unmarkierte als auch BrU-RNA (Abb. 34). Auch das Vorhandensein von tRNA im Blockpuffer konnte das starke Hintergrundsignal nicht abschwächen. Somit war gezeigt, dass der BrdU-Antikörper der Firma Sigma nicht für weitere Experimente verwendet werden konnte.

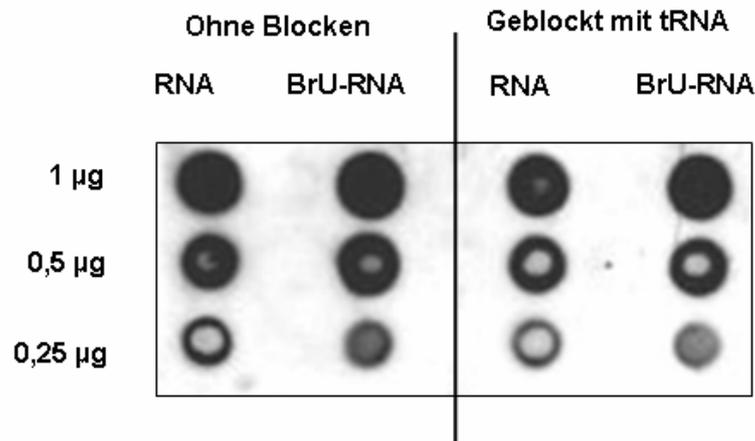


Abbildung 34: Der BrdU-Antikörper der Firma Sigma detektiert auch unmarkierte RNA
 Von jeder Probe (unmarkierte RNA und BrU-RNA) wurde eine Verdünnungsreihe aufgetragen (1 μ g, 0,5 μ g und 0,25 μ g). Die gleiche Menge derselben Proben wurde auf zwei Blots aufgetragen, die mit unterschiedlichen Puffern geblockt wurden (mit und ohne tRNA).

Im Folgenden wurde ein zweiter BrdU-Antikörper der Firma Roche ausgetestet. Es wurde zudem eine zweite Negativkontrolle verwendet, wozu die Bienen 0,5 h vor der BrU-Injektion (1 μ l, 30 mM) mit ActD injiziert und die RNA nach weiteren 8 h isoliert wurde. ActD ist ein Transkriptioninhibitor, der somit auch den BrU-Einbau blockiert. In den folgenden Experimenten wurde dem Blockpuffer immer tRNA zugegeben.

Im Dotblot (Abb. 35) konnte nachgewiesen werden, dass der BrdU-Antikörper der Firma Roche BrU-RNA mit höherer Empfindlichkeit detektiert. Bei der Negativkontrolle (RNA) war nur ein schwaches Hintergrundsignal zu sehen. Bei der Probe, bei der die Bienen zusätzlich zur BrU-Injektion ActD erhielten war ebenfalls nur ein schwaches Signal zu sehen. Somit konnte ebenfalls gezeigt werden, dass BrU nach systemischer Injektion durch Transkriptionsprozesse in die RNA des Bienengehirns eingebaut wird.

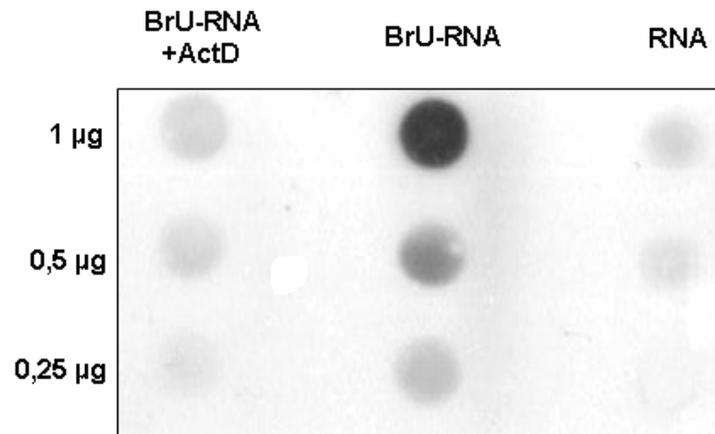


Abbildung 35: Der BrdU-Antikörper der Firma Roche bindet an BrU-RNA mit höherer Empfindlichkeit

Von jeder Probe (unmarkierte RNA, BrU-RNA und BrU-RNA+ActD) wurde eine Verdünnungsreihe aufgetragen (1µg, 0,5 µg und 0,25 µg). Die Detektion erfolgte mit einem BrdU-Antikörper der Firma Roche.

Nachdem sowohl der Einbau von BrU in die RNA im Bienenhirn als auch deren Detektion erfolgreich war, sollte nun eine geeignete BrU-Konzentration für eine kürzere Markierungsdauer gefunden werden.

3.5.2.2 Optimierung der BrU-Konzentration und Markierungsdauer

In den bisherigen Experimenten wurde eine lange Markierungszeit gewählt (8 h), um zu gewährleisten, dass nachweisbare Mengen an BrU eingebaut werden. Für folgende Transkriptionsanalysen bei Lernen und Gedächtnisbildung ist jedoch eine möglichst kurze Markierungsdauer gefordert. Neu synthetisierte BrU-RNA sollte auch nach kürzeren Inkubationszeiten detektiert werden können. Aus diesem Grund wurden im Folgenden verschiedene Markierungszeiten gewählt und getestet. Die Bienen wurden mit BrU oder dem Lösungsmittel injiziert und nach verschiedenen Zeiten die Gehirne präpariert und die RNA isoliert. Der Nachweis über den BrU-Einbau erfolgte im Dotblot mittels BrdU-Antikörpern (Roche) (Abb. 36).

Der Einbau von BrU konnte erst nach einer Inkubationszeit von 8 h nachgewiesen werden. Bei kürzeren Markierungszeiten war im Dotplot nur ein schwaches Hintergrundsignal zu sehen, welches dem der unmarkierten RNA entsprach.

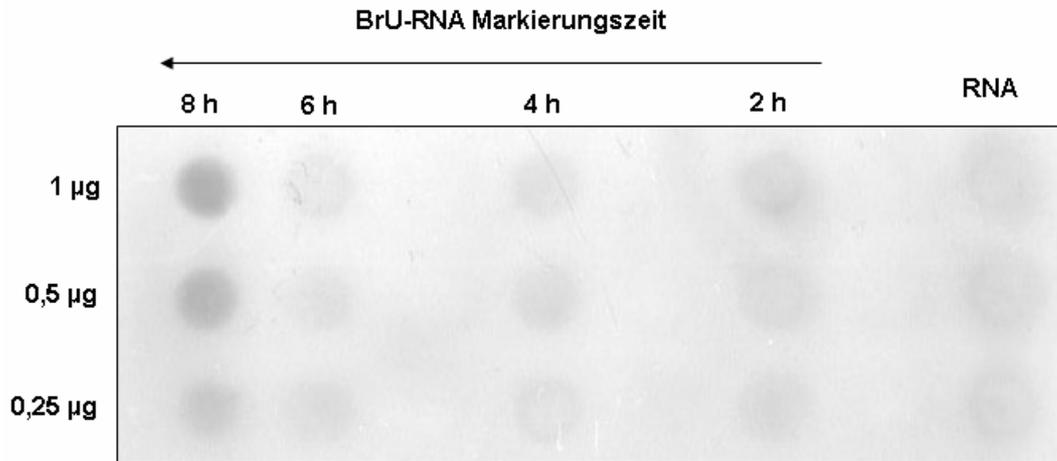


Abbildung 36: BrU-RNA war erst 8 h nach Injektion von 30 mM BrU im Gehirn der Biene nachweisbar

Bienen wurden mit 1 µl BrU (30 mM) (BrU-RNA) oder dem Lösungsmittel (RNA) injiziert und die RNA nach unterschiedlichen Markierungszeiten (2 h, 4 h, 6 h und 8 h) aus dem Gehirn isoliert. Die unterschiedlichen RNA-Proben wurden jeweils in einer Verdünnungsreihe aufgetragen (1 µg, 0,5 µg und 0,25 µg).

Neben der bisher verwendeten Konzentration von 30 mM BrU [Haider et al., 1997; Kageyama et al., 2004] wurden auch höhere Konzentration in anderen Arbeiten verwendet [Bogolyubov, 2007; Jensen et al., 1993]. Um den Einbau zu erhöhen, wurden die Bienen in weiteren Versuchen mit 100 mM BrU (1 mM im Tier) (BrU-RNA) oder dem Lösungsmittel (RNA) injiziert und kürzere Inkubationszeiten gewählt.

Es zeigte sich, dass mit dieser hohen Konzentration bereits nach einer Stunde ein Einbau von BrU in die RNA nachgewiesen werden konnte (Abb. 37).

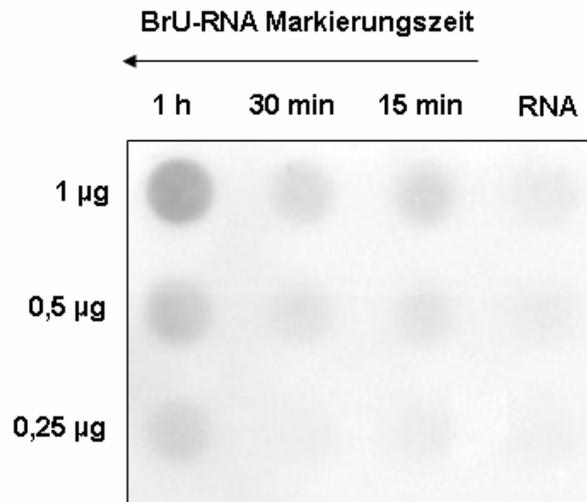


Abbildung 37: Die Injektion von BrU (100 mM) führt bereits nach 1 h zu nachweisbarer BrU-RNA

Die Bienen wurden mit 1 µl BrU (100 mM) (BrU-RNA) oder dem Lösungsmittel (RNA) injiziert und die RNA nach unterschiedlichen Markierungszeiten (15 min, 30 min und 1 h) aus dem Gehirn isoliert. Die unterschiedlichen Proben wurden in Verdünnungsreihen aufgetragen (1 µg, 0,5 µg und 0,25 µg).

Da für folgende Experimente eine Markierungszeit von 1 h angestrebt wurde, was die Verwendung der hohen BrU-Konzentration voraussetzte, musste überprüft werden, ob dies toxische Auswirkungen auf die Bienen hat. Dazu wurden 30 Bienen mit BrU oder dem Lösungsmittel (Kontrolle) injiziert und die Überlebensrate dokumentiert (Abb. 38). Zwischen den Überlebensraten beider Gruppen gab es keinen Unterschied. Somit konnte eine toxische Wirkung bei Verwendung der höheren BrU-Konzentration ausgeschlossen werden.

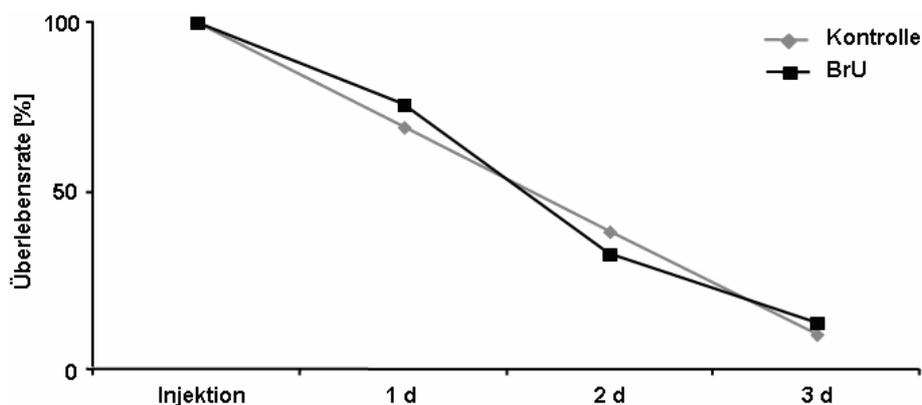


Abbildung 38: Eine Konzentration von 1 mM BrU in der Biene hat keinen Einfluss auf die Überlebensrate

Es wurden jeweils 30 Bienen mit Bromouridin (1 µl, 100mM BrU) oder dem Lösungsmittel (Kontrolle) injiziert und die Überlebensrate nach 1 d, 2 d und 3 d überprüft. Dargestellt ist die Überlebensrate in Prozent der zu Anfang injizierten Bienen.

Nachdem eine geeignete BrU-Konzentration und ein spezifischer Antikörper zur Detektion der BrU-RNA gefunden worden war, wurde nun getestet, ob sich die BrU-RNA separieren lässt.

3.5.3 Separation der BrU-RNA mittels Immunopräzipitation (BrU-IP)

Zu diesem Zweck wurden oberflächen-funktionalisierte Magnetpartikel („Dynabeads® Protein G“ der Firma Invitrogen) verwendet. Es handelt sich dabei um superparamagnetische Beads auf deren Oberfläche Protein G kovalent gebunden ist, so dass Antikörper mit ihrer Fc-Region binden können.

3.5.3.1 Austesten eines geeigneten Waschpuffers

Da RNA auch unspezifisch an die Beads binden kann, musste zuerst ein geeigneter Waschpuffer gefunden werden, um solche Bindungen zu minimieren. Zu diesem Zweck wurden die Beads gewaschen und geblockt. Der Antikörper wurde nicht zugegeben. Danach erfolgte die Inkubation mit der markierten RNA. Nach der Elution mit verschiedenen Puffern wurde cDNA synthetisiert und die Menge der an die Beads gebundenen RNA an Hand des *Elongationsfaktor 1-alpha (EF1 α)* mittels PCR nachgewiesen (Abb. 39).

In den drei Ansätzen, die mit TBST, PBS und PBS+NaCl gewaschen wurden, konnte man im Gel deutliche Banden sehen. Bei Verwendung des RSB Puffers war eine schwache Bande zu sehen.

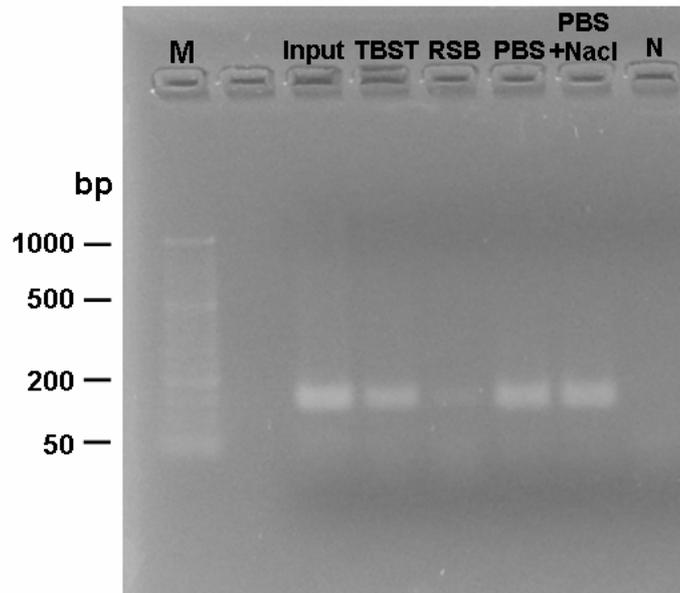


Abbildung 39: Test unterschiedlicher Waschpuffer für die Präzipitation mit oberflächen-funktionalisierten Magnetbeads

In vier verschiedenen Ansätzen wurden die Beads geblockt und mit BrU-RNA inkubiert. Bei den Waschschrritten wurden unterschiedliche Puffer verwendet: TBST, RSB, PBS und PBS+NaCl. Nach der Elution erfolgte die cDNA-Synthese und Amplifikation mit *Elongationsfaktor 1-alpha*-spezifischen Primern (*EF1 α*). Als Positivkontrolle diente BrU-RNA, die nicht mit den Beads inkubiert wurde (Input). Für die Negativkontrolle wurde die cDNA durch HPLC-H₂O ersetzt (N). Die Amplikonlänge beträgt 150 bp und kann anhand des Markers (M) abgelesen werden.

Aus diesem Grund wurde der RSB-Puffer in den folgenden Experimenten als Waschpuffer verwendet, da damit nur minimale unspezifische Bindungen zu beobachten waren.

3.5.3.2 BrU-IP mit anschließender Quantifizierung durch RT-qPCR

Im nächsten Experiment wurde die erste Immunopräzipitation von BrU-RNA durchgeführt. Als Negativkontrolle diente unmarkierte RNA. Von beiden Proben wurde zuvor eine definierte Menge an RNA (0,5 μ g) - im Weiteren als Inputkontrolle bezeichnet - entnommen und bis zur cDNA-Synthese eingefroren. Die der Inputkontrolle entsprechende Menge RNA wurde für die IP eingesetzt. Die Mengen wurden mittels real-time PCR quantifiziert.

Als Erstes erfolgte die Quantifizierung der Inputkontrollen. Zwischen den Inputkontrollen der BrU-RNA (Input BrU-RNA) und der unmarkierten RNA (Input RNA) gab es keine Unterschiede der mit real-time PCR quantifizierten Mengen an *EF1 α* - und *NOS*-mRNA (Abb. 40).

Somit konnte gezeigt werden, dass es durch den Einbau von BrU in die mRNA zu keiner Beeinträchtigung der cDNA-Synthese oder der Amplifikation in der real-time PCR kam.

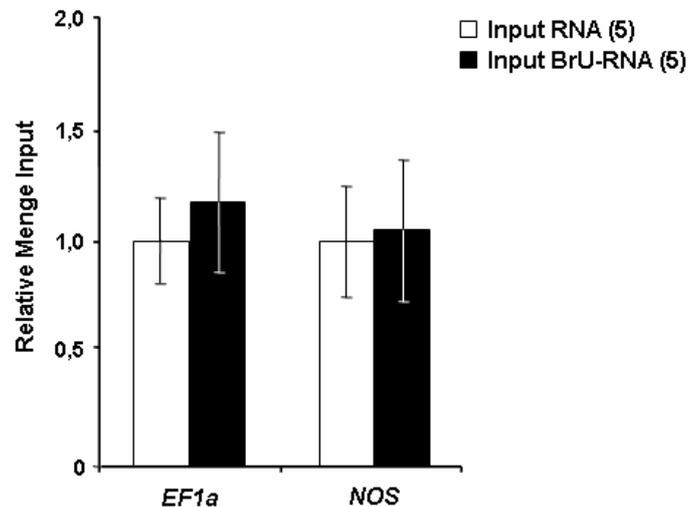


Abbildung 40: cDNA-Synthese und genspezifische Amplifikation sind durch den Einbau von BrU nicht beeinträchtigt

Jeweils aus der gleichen Menge BrU-RNA (Input BrU-RNA) sowie unmarkierter RNA (Input RNA) wurde cDNA synthetisiert und mittels real-time PCR quantifiziert. Die Amplifikation erfolgte mit Primern für *EF1 α* (*Elongationsfaktor 1-alpha*) und *NOS* (*NO-Synthase*). Angegeben ist die relative Menge \pm SD an mRNA normiert auf die Kontrollgruppe (Input RNA). Die jeweilige Kontrollgruppe wurde auf 1 normiert. Die Anzahl der Proben beider Gruppen ist in Klammern hinter der Gruppenbezeichnung in der Legende vermerkt.

Als nächstes wurden die Proben aus der Präzipitation (IP-Proben) quantifiziert. Da dieselbe Menge an RNA sowohl für die Inputkontrollen als auch für die Präzipitation eingesetzt wurde, wurden die IP-Proben bei der Quantifizierung in Prozent vom Input angegeben (Abb. 41).

Unabhängig von der BrU-Markierung wurde bei beiden Genen jeweils die gleiche Menge an mRNA präzipitiert.

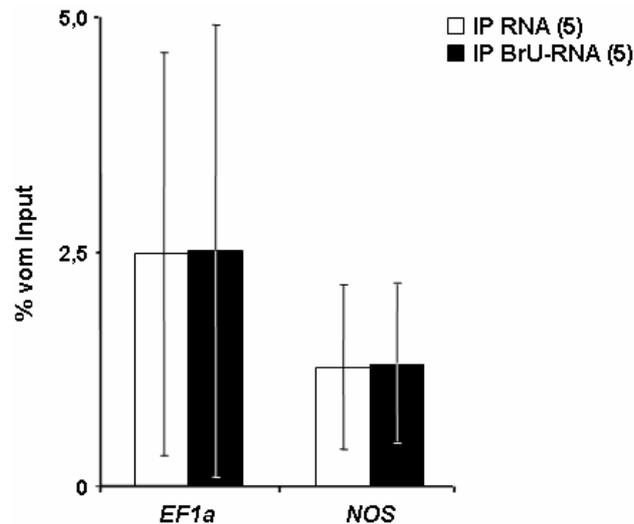


Abbildung 41: BrU-markierte mRNA von *EF1α* und *NOS* konnte nicht erfolgreich separiert werden

Jeweils die gleiche Menge an BrU-RNA (IP BrU-RNA) sowie unmarkierter RNA (IP RNA) wurde für die Immunopräzipitation eingesetzt. Im Anschluss wurde die präzipitierte mRNA mittels real-time PCR quantifiziert. Die Amplifikation erfolgte mit Primern für *EF1α* und *NOS*. Angegeben ist die Menge \pm SD an mRNA in Prozent vom Input. Die Anzahl der Proben beider Gruppen ist in Klammern hinter der Gruppenbezeichnung in der Legende vermerkt.

Obwohl der Antikörper im Dotblot erfolgreich BrU-RNA detektieren konnte, war eine Verwendung für die IP mit Magnetbeads und anschließender Quantifizierung mittels real-time PCR nicht möglich.

3.5.4 Markierung der RNA mit 5-Ethynyluridin (EU)

Ein weiteres für *in vivo*-Experimente gut geeignetes markiertes Ribonukleosid ist 5-Ethynyluridin (EU). Der Nachweis des EU-Einbaus bzw. die Separation der EU-markierten RNA (EU-RNA) kann nach Biotinylierung mit Hilfe von Magnetbeads, an deren Oberfläche Streptavidin kovalent gebunden ist, erfolgen. Die Biotinylierung erfolgt über eine Cycloaddition, wobei die Ethynylgruppe mit dem Azid zu einer Triazolgruppe reagiert und somit das Biotinmolekül kovalent an die RNA gebunden wird. Mit dieser „Click Chemie“ genannten Kopplung [Jao und Salic, 2008; Darzynkiewicz et al., 2011] können auch andere Moleküle, wie z.B. Fluoreszenzfarbstoffe an EU-RNA gekoppelt werden.

Aufgrund der vorherigen Probleme beim Nachweis von BrU-RNA mit unterschiedlichen Methoden (Dotblot und IP) wurde im Folgenden der Nachweis von EU-RNA und das Austesten der Separation direkt mittels Präzipitation und anschließender real-time PCR quantifiziert. Da es zu diesem Zeitpunkt von der Firma Invitrogen ein Kit

(„Click-it® Nascent RNA Capture Kit“) gab, welches alle Chemikalien für die Biotinylierung, Streptavidin-Beads sowie EU enthält, wurde dieses Kit verwendet.

Es wurde dieselbe Konzentration an EU gewählt, wie zuvor bei der Verwendung des BrU (100 mM). Diese EU-Konzentration wurde auch schon in Zellkultur verwendet [Jao und Salic, 2008]. Als Erstes wurde wieder überprüft, ob EU toxische Auswirkungen auf die Bienen hat. Dazu wurden jeweils 30 Bienen mit EU oder dem Lösungsmittel (Kontrolle) injiziert und die Überlebensrate dokumentiert (Abb. 42).

Zwischen den Überlebensraten beider Gruppen gab es keinen Unterschied. Somit konnte eine toxische Wirkung bei Anwendung einer EU-Konzentration von 1 mM pro Tier ausgeschlossen werden.

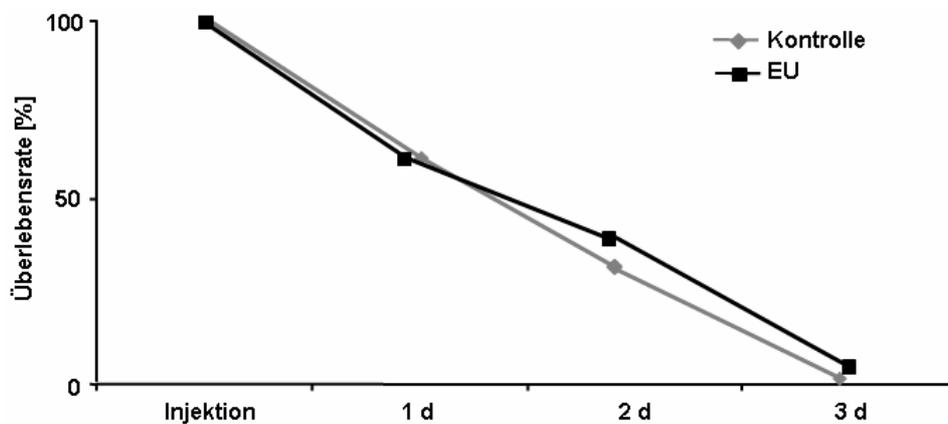


Abbildung 42: Eine Konzentration von 1 mM EU in der Biene hat keinen Einfluss auf die Überlebensrate

Jeweils 30 Bienen wurden mit 1 μ l EU (100mM) oder dem Lösungsmittel (Kontrolle) injiziert und die Überlebensrate über einen Zeitraum von 3 Tagen verfolgt. Dargestellt ist die Überlebensrate in Prozent der zu Anfang injizierten Bienen.

Nach Überprüfung der Eignung der verwendeten EU-Konzentration sollte nun direkt getestet werden, ob eine Separation mit anschließender Quantifizierung mittels real-time PCR möglich ist.

3.5.4.1 Präzipitation der EU-RNA und anschließender Quantifizierung mittels real-time PCR

Nach Präzipitation EU-markierter sowie unmarkierter RNA erfolgte zuerst wieder die Quantifizierung der Inputkontrollen (Abb. 43).

Da es keinen Unterschied zwischen den Mengen an *EF1 α* - und *NOS*-mRNA in beiden Proben gab, konnte gezeigt werden, dass die cDNA-Synthese sowie die Amplifikation unmarkierter und EU-markierter mRNA mit gleicher Effizienz ablaufen.

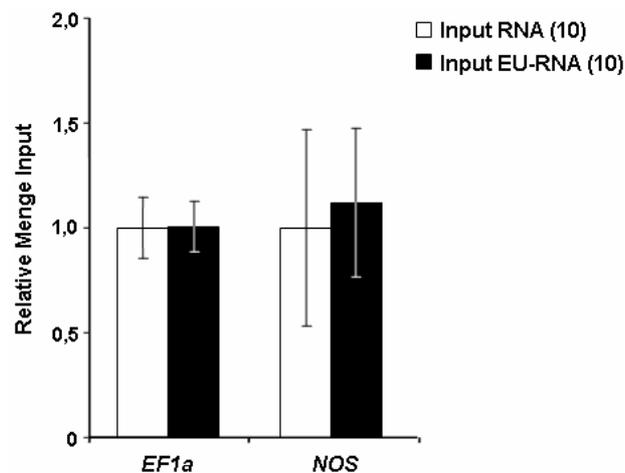


Abbildung 43: cDNA-Synthese und genspezifische Amplifikation sind durch den Einbau von Ethynyluridin (EU) nicht beeinträchtigt

Jeweils aus der gleichen Menge EU-RNA (Input EU-RNA) sowie unmarkierter RNA (Input RNA) wurde cDNA synthetisiert und mittels real-time PCR quantifiziert. Die Amplifikation erfolgte mit Primern für *EF1 α* (*Elongationsfaktor 1-alpha*) und *NOS* (*NO-Synthase*). Angegeben ist die relative Menge \pm SD an mRNA normiert auf die Kontrollgruppe (Input RNA). Die Anzahl der Proben beider Gruppen ist in Klammern hinter der Gruppenbezeichnung in der Legende vermerkt.

Als Nächstes wurden die Proben aus der Präzipitation (im Folgenden PR-Proben genannt, da nicht mit Antikörper präzipitiert) quantifiziert und wieder in Prozent des jeweiligen Inputs angegeben (Abb. 44).

Sowohl EU-markierte *EF1 α* - als auch *NOS*-mRNA konnte erfolgreich separiert werden. Das Signal-Rausch-Verhältnis lag für *EF1 α* etwa bei 100:1 und für *NOS* etwa bei 30:1.

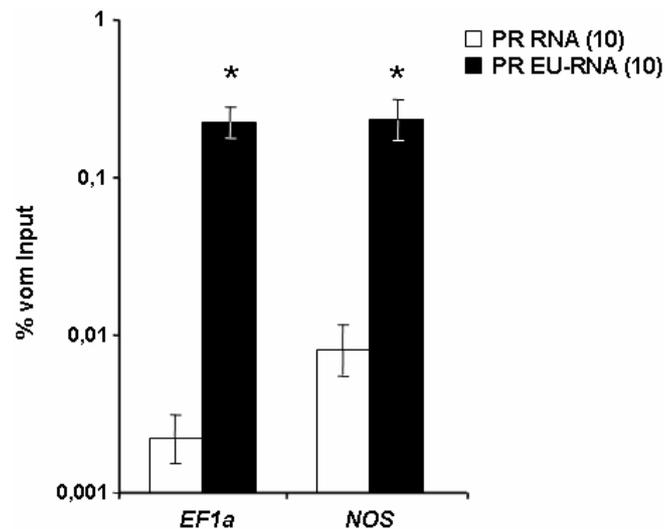


Abbildung 44: EU-markierte mRNA von *EF1α* und *NOS* konnte erfolgreich präzipitiert werden.

Jeweils die gleiche Menge an EU-RNA sowie unmarkierter RNA wurde für die Präzipitation eingesetzt und die präzipitierten Mengen an mRNA (PR EU-RNA bzw. PR RNA) im Anschluss mittels real-time PCR quantifiziert. Die Amplifikation erfolgte mit Primern für *EF1α* und *NOS*. Angegeben ist die Menge \pm SD an mRNA in Prozent vom Input. Die Anzahl der Proben beider Gruppen ist in Klammern hinter der Gruppenbezeichnung in der Legende vermerkt. Signifikante Unterschiede sind durch Sternchen markiert (Student's t-test (two-tailed); * $p \leq 0,05$).

Nachdem gezeigt worden war, dass es möglich ist neu synthetisierte mRNA in der Honigbiene in einem gewünschten Zeitfenster zu markieren, anschließend zu separieren und mittels real-time PCR zu quantifizieren, wurde diese Technik verwendet, um lerninduzierte Änderungen der Genexpression im Gehirn der Honigbiene zu untersuchen.

3.6 *In vivo* Analyse lerninduzierter Genexpressionsänderungen im Gehirn der Honigbiene

Um lerninduzierte Expressionsänderungen mittels real-time PCR quantifizieren zu können, müssen zunächst Gene ausgewählt werden, die beim Lernen und der Gedächtnisbildung eine Rolle spielen. Ursprünglich war geplant, zuerst mit Hochdurchsatz-Sequenzierung von EU-mRNA nach dem Training geeignete Kandidaten zu identifizieren. Aus organisatorischen Gründen verzögerte sich die Durchführung dieses Experimentes zeitlich und so wurden die Messungen mittels real-time PCR vorgezogen. Dafür wurden nun Gene ausgewählt, von denen bekannt ist, dass sie bei der Gedächtnisbildung eine Rolle spielen:

CREB (CRE-element binding protein) [Silva et al., 1998; Lonze und Ginty, 2002], *CBP* (CREB binding protein) [Alarcón et al., 2004, Korzus et al., 2004], *CamKII* (Ca²⁺/Calmodulin-abhängige Proteinkinase II) [Bevilaqua et al., 2005], *Tubulin* (TUB) [Woolf, 2006] und *NOS* (Stickstoffmonoxid-Synthase) [Böhme et al., 1993, Fin et al., 1995].

3.6.1 Test der Primer auf ihre Funktionalität

Zu den oben genannten Genen, außer für die *NOS*, wurden Primer gesucht und auf ihre Funktionalität getestet. Die Primersequenzen können dem Materialteil entnommen werden (Kapitel 2.1.9, Tab. 1). Als Positivkontrolle wurden die bereits verwendeten Primer für *EF1 α* und *NOS* eingesetzt.

Mit den für *CREB*, *CBP*, *CamKII* und *TUB* eingesetzten Primern konnte erfolgreich cDNA amplifiziert werden (Abb. 45). Auf eine Negativkontrolle (HPLC-H₂O) für das jeweilige Primerpaar wurde hier verzichtet. Erst bei den folgenden real-time Experimenten wurde die jeweilige Negativkontrolle gemessen. Kein Primerpaar zeigte ein Signal bei der Negativkontrolle (NTC - No template control).

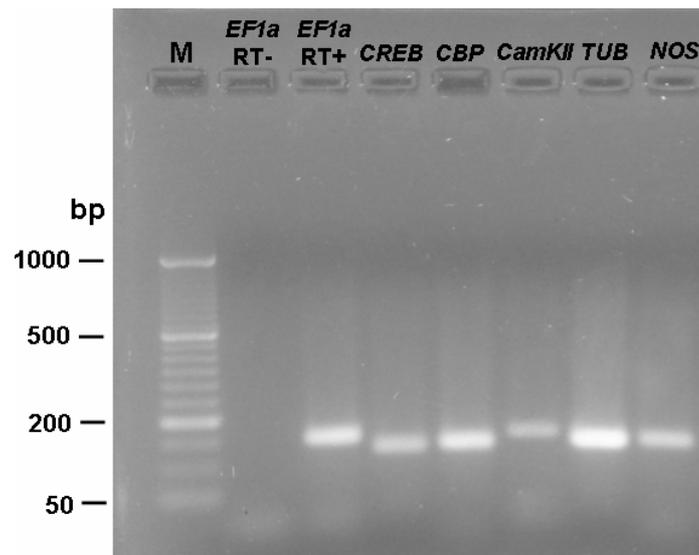


Abbildung 45: Test der Primer für lerninduzierte Expressionsanalysen

Es wurden Primer für *CREB* (CRE-element binding protein), *CBP* (CREB binding protein), *CamKII* (Ca^{2+} /Calmodulin-abhängige Proteinkinase II) und *TUB* (Tubulin) gesucht und anschließend mittels PCR und Gelelektrophorese getestet. Als Template diente cDNA, die zuvor aus 0,5 μg Bienen-RNA synthetisiert wurde. Die zuvor getesteten Primer für *EF1 α* und *NOS* dienten als Positivkontrolle. Als Negativkontrolle wurde die cDNA durch HPLC- H_2O ersetzt (*EF1 α* RT-). Die Amplikonlänge der verschiedenen Primerpaare liegt zwischen 120 und 150 bp und kann anhand des Markers (M) abgelesen werden.

Nachdem die Primer getestet worden waren, wurden nun die Experimente durchgeführt, um zu untersuchen, ob sich zu verschiedenen Zeitpunkten nach schwachem Training die Expression unterschiedlicher gedächtnisrelevanter Gene verändert. Ebenso wurde untersucht, ob der HDAC-Inhibitor TSA und der HAT-Inhibitor Garcinol nach schwachem Training Auswirkungen auf die Expression dieser Gene haben.

3.6.2 Analyse der lerninduzierten Expressionsänderungen

Da die vorherigen Ergebnisse (Kapitel 3.2, 3.3 und 3.4) erste Hinweise liefern, dass schwaches Training entgegen den bisherigen Kenntnissen Transkriptionsprozesse induziert, wurde ausschließlich die Expression der Gene nach schwachem Training untersucht.

3.6.2.1 Quantifizierung der Inputkontrollen

Bienen wurden in einem schwachem Training (Ein-Trial) konditioniert (TR) und entweder 10 min nach dem Training (0-1 h) oder 10 min nach dem 2 h-Abruf (2-3 h) mit EU injiziert. Eine Injektion unmittelbar nach dem Training wurde vermieden, da sich gezeigt hatte, dass eine Wartezeit von 10 min nach Training sowie Abruf eingehalten werden muss, um die Konsolidierung des Gedächtnisses nicht zu beeinträchtigen. Eine Stunde später wurden die Gehirne präpariert und die RNA isoliert. Als Kontrolle dienten Bienen, die nicht konditioniert wurden (UTR). Bei den Experimenten mit TSA (TSA) und Garcinol (GAR) erhielten die Bienen zusätzlich eine Injektion mit dem entsprechenden Inhibitor. Um die notwendige Anzahl von Messungen zu erreichen, wurden alle Experimente streng paarweise (z.B. TR + UTR für 1 Trial 0-1h) in mehreren Telexperimenten durchgeführt. Da sich die Messungen über einen Zeitraum von mehreren Monaten erstreckten, sind nur die zeitlich parallel behandelten Ergebnisse direkt vergleichbar.

Aus jeder Probe wurden die ausgewählten Kandidatengene sowohl in der gesamten mRNA (Input) als auch die in einem bestimmten Zeitraum nach dem Training neu synthetisierten EU-markierten mRNA quantifiziert. Bei allen real-time Experimenten gab es bei den Inputkontrollen weder bei einer Normierung auf *EF1 α* noch bei Normierung der mRNA-Menge eines Transkriptes auf die Summe der mRNA-Menge aller Gene in derselben Einzelprobe (z.B. $EF1\alpha / \sum(EF1\alpha, CREB, CBP, CamKII, TUB, NOS)$) einen Unterschied zwischen den einzelnen Gruppen. Aus diesem Grund sind die Werte der Inputkontrollen aller Experimente zusammen in Tabelle 7 aufgelistet.

Tabelle 7: Assoziatives Training sowie der HDAC-Inhibitor TSA und der HAT-Inhibitor Garcinol haben keinen Einfluss auf den mRNA-Level

Dargestellt ist die relative Menge an mRNA der Inputkontrollen aller gemessenen Proben in den unterschiedlichen Gruppen (UTR: CS – US ungepaart, TR: CS – US gepaart, TR + Inh: CS – US gepaart + TSA bzw. Garcinol) normiert auf die Menge der Transkripte aller Gene des jeweiligen Experiments. Die Daten repräsentieren die Mittelwerte (MW) \pm Standardabweichung (SD). Die Anzahl der Bienen ist in Klammern angegeben. Es wurden keine signifikante Unterschiede festgestellt (Mann-Whitney; ns: $p > 0,2$).

Input	<i>EF1α</i>		<i>CREB</i>		<i>CBP</i>	
	UTR	TR	UTR	TR	UTR	TR
1 TR 0-1 h	0,05 \pm 0,02	0,05 \pm 0,04	0,08 \pm 0,01	0,09 \pm 0,03	0,17 \pm 0,03	0,18 \pm 0,04
	(10)	(10)	(10)	(10)	(10)	(10)
	<i>CamKII</i>		<i>TUB</i>		<i>NOS</i>	
	UTR	TR	UTR	TR	UTR	TR
1 TR 2-3 h	0,56 \pm 0,04	0,54 \pm 0,06	0,16 \pm 0,07	0,14 \pm 0,1	0,15 \pm 0,03	0,15 \pm 0,07
	(10)	(10)	(10)	(9)	(10)	(10)
	<i>CamKII</i>		<i>TUB</i>		<i>NOS</i>	
	UTR	TR	UTR	TR	UTR	TR
1 TR 2-3 h	0,19 \pm 0,02	0,20 \pm 0,03	0,20 \pm 0,03	0,18 \pm 0,02	0,20 \pm 0,02	0,20 \pm 0,02
	(11)	(8)	(12)	(9)	(8)	(5)
	<i>CamKII</i>		<i>TUB</i>		<i>NOS</i>	
	UTR	TR	UTR	TR	UTR	TR
TSA 2-3 h	0,21 \pm 0,02	0,19 \pm 0,02	0,18 \pm 0,02	0,21 \pm 0,04	0,21 \pm 0,03	0,21 \pm 0,04
	(11)	(9)	(11)	(8)	(12)	(9)
	<i>CamKII</i>		<i>TUB</i>		<i>NOS</i>	
	UTR	TR	UTR	TR	UTR	TR
TSA 2-3 h	0,18 \pm 0,03	0,19 \pm 0,03	0,22 \pm 0,04	0,20 \pm 0,04	0,23 \pm 0,04	0,22 \pm 0,03
	(7)	(8)	(7)	(8)	(7)	(8)
	<i>CamKII</i>		<i>TUB</i>		<i>NOS</i>	
	TR	TR + Inh	TR	TR + Inh	TR	TR + Inh
GAR 2-3 h	0,18 \pm 0,03	0,19 \pm 0,03	0,20 \pm 0,05	0,18 \pm 0,02	0,20 \pm 0,02	0,20 \pm 0,04
	(7)	(7)	(7)	(8)	(7)	(8)
	<i>CamKII</i>		<i>TUB</i>		<i>NOS</i>	
	TR	TR + Inh	TR	TR + Inh	TR	TR + Inh
GAR 2-3 h	0,19 \pm 0,02	0,21 \pm 0,02	0,20 \pm 0,03	0,18 \pm 0,04	0,21 \pm 0,03	0,22 \pm 0,03
	(9)	(9)	(9)	(9)	(9)	(9)
	<i>CamKII</i>		<i>TUB</i>		<i>NOS</i>	
	TR	TR + Inh	TR	TR + Inh	TR	TR + Inh
GAR 2-3 h	0,18 \pm 0,03	0,18 \pm 0,02	0,19 \pm 0,03	0,18 \pm 0,05	0,22 \pm 0,03	0,21 \pm 0,02
	(8)	(8)	(9)	(9)	(9)	(9)
	<i>CamKII</i>		<i>TUB</i>		<i>NOS</i>	
	TR	TR + Inh	TR	TR + Inh	TR	TR + Inh

In den folgenden Kapiteln sind die Ergebnisse der präzipitierten Proben (PR) für jedes Experiment gesondert gezeigt. Eine Normierung auf *EF1 α* war nicht möglich, da es bei einigen Experimenten einen signifikanten Unterschied im mRNA-Level von *EF1 α* zwischen beiden Gruppen gab. Daher wurden, wie bei den Inputkontrollen, die Werte der mRNA-Menge eines jeden Gens auf die Summe der mRNA-Menge aller Gene in jeder Einzelprobe normiert. Bei den präzipitierten Proben wurde *Tubulin* (TUB) nicht in die Auswertung einbezogen, da bei sehr vielen Proben aufgrund der geringen Menge an präzipitierter mRNA die Messwerte zu niedrig oder gar keine Messwerte vorhanden waren.

3.6.2.2 Schwaches Training induziert zeitabhängig eine veränderte Expression verschiedener Gene

In diesem Experiment erfolgte die EU-Injektion 10 min nach dem Training bzw. der Stimulation (ungepaart) und die Gehirne wurden 1 h später präpariert (0-1 h). Damit wurde die transkribierte RNA in dem Zeitfenster markiert, in dem auch die Histonacetylierung im Vergleich zur Kontrollgruppe signifikant unterschiedlich war (Kapitel 3.2, Abb. 24).

Bei den trainierten Bienen konnte im Vergleich zur Kontrollgruppe innerhalb 1 h nach dem Training signifikant weniger *CBP*-mRNA gemessen werden. Im Gegensatz dazu konnten mehr Transkripte des *CamKII*-Gens detektiert werden (Abb. 46).

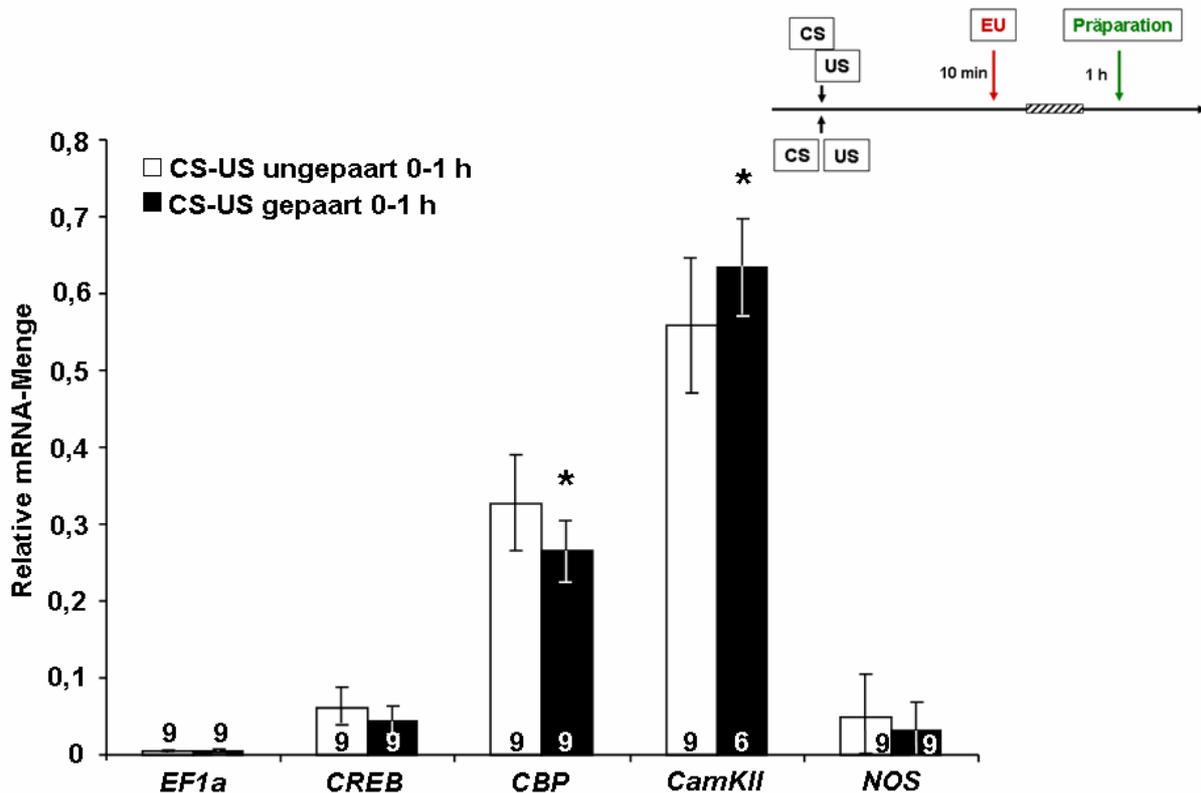


Abbildung 46: Innerhalb 1 h nach schwachem Training konnte eine geringere Menge an CBP-mRNA und eine höhere Menge an CamKII-mRNA gemessen werden

Die RNA trainierter (CS-US gepaart) und untrainierter (CS-US ungepaart) Bienen wurden mit EU in einem Zeitfenster markiert in dem die Histonacetylierung (////) bei beiden Gruppen unterschiedlich war (Schema oben rechts). Die Quantifizierung der Transkripte erfolgte mittels real-time PCR. Dargestellt sind für jedes Transkript die MW \pm SD der relativen mRNA-Mengen normiert auf die Summe der Menge aller Transkripte in einer Probe. Die Anzahl der gemessenen Proben (n) ist in dem entsprechenden Balken vermerkt. Signifikante Unterschiede sind durch Sternchen markiert (Mann-Whitney; * $p \leq 0,05$).

Im nächsten Versuch erfolgte die EU-Injektion 10 min nach dem 2 h-Abruf (2-3 h), womit die RNA markiert wurde, die während des Zeitfensters transkribiert wird, in dem die Histonacetylierung im Vergleich zur Kontrollgruppe reduziert war (Kapitel 3.2, Abb. 24).

Wie in Abbildung 47 gezeigt, wurde bei den trainierten Bienen im Vergleich zur Kontrollgruppe innerhalb von 2 h bis 3 h nach Training signifikant weniger *EF1 α* - und *CBP*-mRNA gemessen.

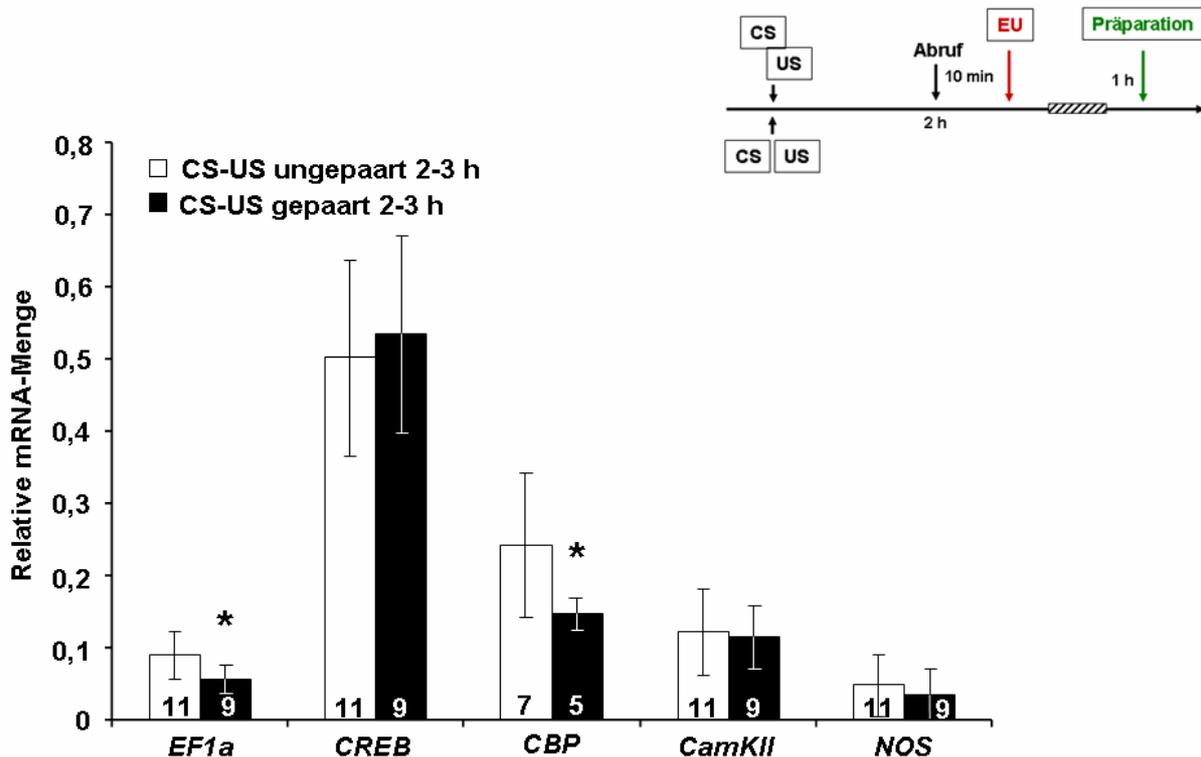


Abbildung 47: Innerhalb 2 bis 3 h nach schwachem Training konnte eine niedrigere Menge an *EF1α*- und *CBP*-mRNA gemessen werden

Die RNA trainierter (CS-US gepaart) und untrainierter (CS-US ungepaart) Bienen wurde mit EU in einem Zeitfenster markiert, in dem die Histonacetylierung (////) nach schwachem Training reduziert war (Schema oben rechts). Die Quantifizierung der Transkripte erfolgte mittels real-time PCR. Dargestellt sind für jedes Transkript die MW \pm SD der relativen mRNA-Mengen normiert auf die Summe der Menge aller Transkripte in einer Probe. Die Anzahl der gemessenen Proben (n) ist in dem entsprechenden Balken vermerkt. Signifikante Unterschiede sind durch Sternchen markiert (Mann-Whitney; *p \leq 0,05).

Nachdem sich gezeigt hatte, dass es zu unterschiedlichen Zeiten nach schwachem Training zu einer veränderten Expression verschiedener Gene kommt, sollte nun untersucht werden, ob der HDAC-Inhibitor TSA nach dem Training auch einen Einfluss auf die Genexpression hat.

3.6.2.3 Der HDAC-Inhibitor TSA verändert die Genexpression nach schwachem Training

In vorherigen Kapiteln wurde bereits gezeigt, dass TSA sowohl H3K18ac im Bienenhirn signifikant erhöht als auch das Gedächtnis der Biene verbessert. Nach derzeitigem Kenntnisstand [Fontán-Lozano et al., 2008; Tian et al., 2010; Wang et al., 2012] ist anzunehmen, dass durch die von TSA vermittelte Erhöhung der Histonacetylierung die Transkription gedächtnisrelevanter Gene erleichtert wird und dies dann den gezeigten Gedächtnis verbessernden Effekt erzeugt. Im folgenden Experiment

sollte deshalb geprüft werden, ob TSA in Kombination mit schwachem Training die Menge eines der untersuchten Transkripte verändert.

Die Bienen wurden konditioniert und 0,5 h nach Training mit TSA oder dem Lösungsmittel (Kontrolle) injiziert. Die EU-Injektion erfolgte 10 min nach dem 2 h-Abruf (2-3 h) und markierte transkribierte RNA im Zeitfenster, in dem die H3K18ac nach TSA Injektion erhöht war (Abb. 25A)

Eine TSA-Injektion führte nach schwachem Training dazu, dass die Menge an *EF1 α* -mRNA im Zeitraum von 2-3 h nach dem Training im Vergleich zur Kontrollgruppe signifikant höher war (Abb. 48).

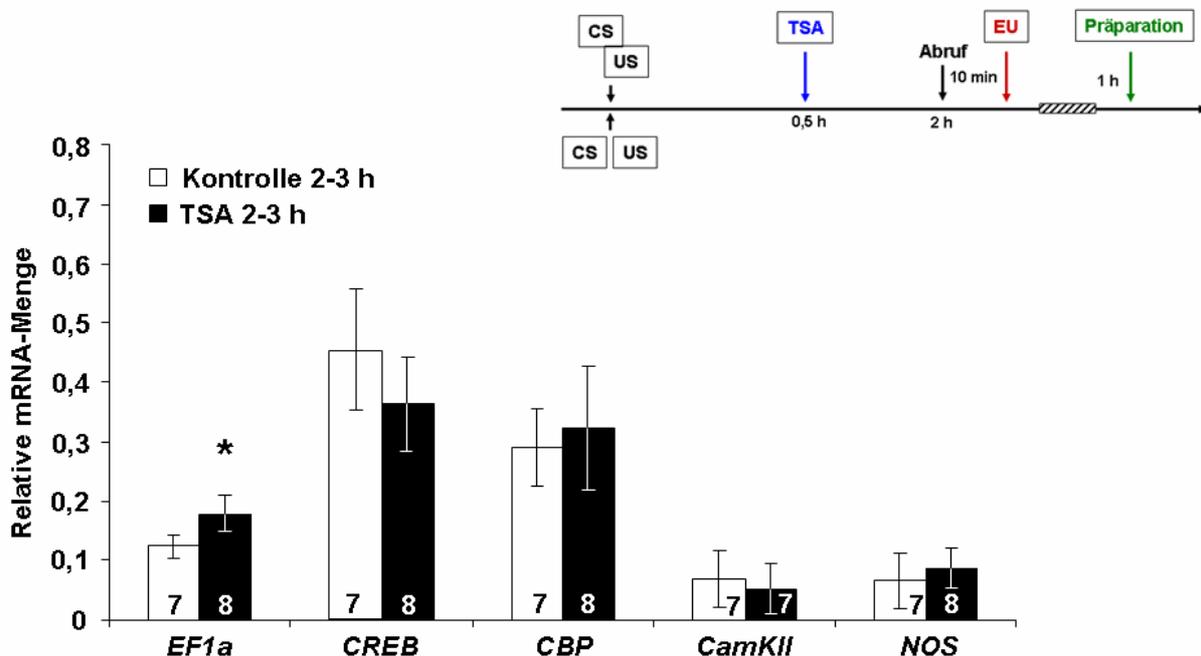


Abbildung 48: Schwaches Training in Kombination mit TSA führt zu einer erhöhten Menge von *EF1 α* -mRNA

Die RNA trainierter mit TSA oder Lösungsmittel (Kontrolle) injizierter Bienen wurde in einem Zeitfenster mit EU markiert, in dem die Histonacetylierung (////) durch TSA erhöht war, (Schema oben rechts). Die Quantifizierung der Transkripte erfolgte mittels real-time PCR. Dargestellt sind für jedes Transkript die MW \pm SD der relativen mRNA-Mengen normiert auf die Summe der Menge aller Transkripte in einer Probe. Die Anzahl der gemessenen Proben (n) ist in dem entsprechenden Balken vermerkt. Signifikante Unterschiede sind durch Sternchen markiert (Mann-Whitney; * $p \leq 0,05$).

Nachdem gezeigt wurde, dass der HDAC-Inhibitor TSA die Genexpression nach schwachem Training beeinflusst, sollte nun untersucht werden, ob dies auch für den HAT-Inhibitor Garcinol zutrifft.

3.6.2.4 Der HAT-Inhibitor Garcinol hat keinen Einfluss auf die Expression der untersuchten Gene nach schwachem Training

Da Garcinol H3K18ac im Bienenhirn innerhalb von 2 h signifikant reduziert und das Gedächtnis nach schwachem Training verschlechtert, könnte angenommen werden, dass sich die verringerte Acetylierung auf die Expression gedächtnisrelevanter Gene auswirkt. Um dies auf Transkriptionsebene zu prüfen, wurden Bienen konditioniert und 0,5 h nach Training mit Garcinol oder dem Lösungsmittel (Kontrolle) injiziert. Die EU-Injektion erfolgte 10 min nach dem 2 h-Abruf (2-3 h) und markierte transkribierte RNA im Zeitfenster in dem H3K18ac nach Garcinol Injektion erniedrigt war (Abb. 25C).

Wie zu sehen ist (Abb. 49), kam es durch Garcinol bei keinem der untersuchten Gene zu einer Veränderung der mRNA-Menge.

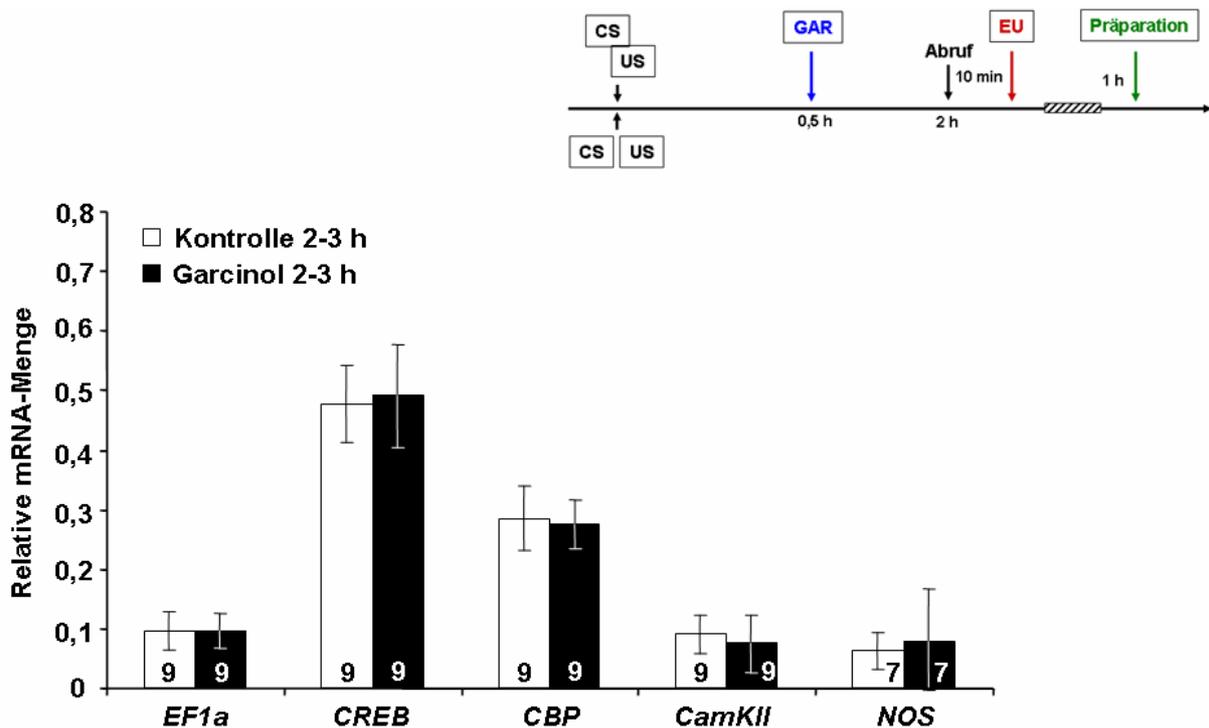


Abbildung 49: Schwaches Training in Kombination mit Garcinol hat keinen Einfluss auf die Expression der untersuchten Gene

Die RNA trainierter mit Garcinol oder Lösungsmittel (Kontrolle) injizierter Bienen wurde in einem Zeitfenster mit EU markiert, in dem die Histonacetylierung (schraffiert) durch Garcinol erniedrigt war (Schema oben rechts). Die Quantifizierung der Transkripte erfolgte mittels real-time PCR. Dargestellt sind für jedes Transkript die MW \pm SD der relativen mRNA-Mengen normiert auf die Summe der Menge aller Transkripte in einer Probe. Die Anzahl der gemessenen Proben (n) ist in dem entsprechenden Balken vermerkt.

Mit der neuen Methode zur Quantifizierung neu synthetisierter mRNA ist es möglich, aktivitätsabhängige Genaktivität *in vivo* zu untersuchen. Dadurch konnte zum ersten Mal gezeigt werden, dass auch ein schwaches Training, welches zu einem transienten Gedächtnis führt, die Expression gedächtnisrelevanter Gene verändert.

Wie bereits erwähnt, wurden die Experimente immer paarweise (z.B. UTR + TR zu einem Zeitpunkt) über das ganze Jahr verteilt durchgeführt. Da bei der Biene die Genexpression im Jahresverlauf deutlichen Änderungen unterliegt [Whitfield et al., 2003], sind die relativen Transkriptmengen zwischen den Experimenten zum Teil sehr unterschiedlich und dürfen nicht direkt miteinander verglichen werden.

Die Ergebnisse zeigen, dass nur einige der ausgewählten Transkripte lerninduzierten Änderungen unterliegen. Um weitere Gene zu identifizieren, die durch schwaches bzw. starkes Training differentiell verändert werden, wurde EU-markierte mRNA nach Ein- und Drei-Trial-Training mit Hilfe der Hochdurchsatz-Sequenzierung (RNA-Seq) analysiert.

3.7 *In vivo* Transkriptomanalyse lerninduzierter Expressionsänderungen im Gehirn der Honigbiene

Im gesamten Transkriptom des Bienenhirns sollten mittels Hochdurchsatz-Sequenzierung (Next-Generation-Sequencing) Gene gefunden werden, die durch unterschiedlich starkes Training (schwaches und starkes Training) verschieden stark induziert werden. Da es 2,5 h nach starkem Training zu einer Hyperacetylierung und nach schwachem Training zu einer Hypoacetylierung von H3K18 kommt, was Transkriptionsprozesse unterschiedlich beeinflussen kann, ist anzunehmen, dass abhängig von der Trainingsstärke verschiedene Gene unterschiedlich stark transkribiert werden.

Für dieses Experiment wurden Bienen in einem Ein-Trial- (schwach) oder in einem Drei-Trial-Training (stark) konditioniert. Die EU-Injektion erfolgte 1,5 h nach dem Training und 2 h später wurden die Gehirne präpariert. Da dieses Experiment nur einmal durchgeführt werden konnte, wurde der Markierungszeitraum von bisher 1 h auf 2 h erweitert, um ein größeres Spektrum an Transkripten anreichern zu können.

3.7.1 Aufbereitung und Optimierung der EU-RNA-Proben

Von jeder der beiden Proben wurden jeweils drei Präzipitationen durchgeführt, die im Anschluss noch amplifiziert werden mussten (whole transcriptome amplification), um eine für die Sequenzierung ausreichende Menge an cDNA zu erhalten. Dafür stehen verschiedene kommerziell erhältliche Kits zur Verfügung (z.B. von Sigma, Takara, Qiagen), die auf unterschiedlichen Methoden beruhen. Bei einigen dieser Kits erfolgt die Erststrangsynthese mit einem Oligo(dT)_x-Primer. Für die folgende Amplifikation wird an den Erststrang eine Poly(A)-Verlängerung adaptiert und dann mit einem Primer-Mix vervielfältigt [Brady und Iscove, 1993]. Diese Methode ist jedoch für eine darauf folgende Sequenzierung ungeeignet, da der Poly(A)-Schwanz an den PCR-Produkten noch vorhanden ist und die Sequenzierung, laut Angaben des Geräteherstellers Roche, unvollständig abläuft. Somit musste ein Kit verwendet werden, mit dem die Endprodukte für die Hochdurchsatz-Sequenzierung verwendet werden können. Bei dem verwendeten Kit (QuantiTect Whole Transcriptome Kit, Qiagen) werden im ersten Schritt Oligo(dT)-Primer sowie Random-Hexamer-Primer benutzt. Im Anschluss werden die synthetisierten cDNA-Stücke ligiert und in einer so genannten Multiple Displacement Amplification (MDA) vervielfältigt. Daraus resultieren hochmolekulare doppelsträngige cDNA-Produkte, die aus verschiedenen mRNAs (jeweils 500 bp) zusammengesetzt sind (Abb. 50).

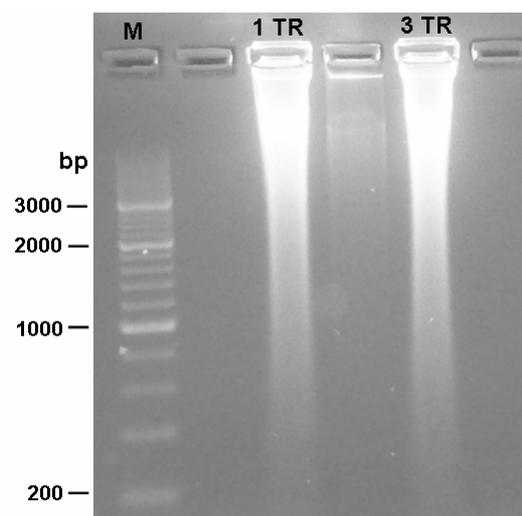


Abbildung 50: Überprüfung der Amplifikationsprodukte nach WTA

EU-RNA aus Bienen nach schwachem (1 TR) und starkem Training (3 TR) wurde präzipitiert und anschließend amplifiziert. Die WTA (whole transcriptome amplification) erfolgte mit einem Kit der Firma Qiagen (QuantiTect Whole Transcriptome Kit). Danach wurden die Proben auf ein Gel aufgetragen, um den Erfolg der Amplifikation zu testen. Die Fragmentgröße kann anhand des Markers (M) abgelesen werden.

Nach der Amplifikation mussten die cDNA-Proben fragmentiert werden, um die für eine Sequenzierung notwendige Fragmentgröße (200 - 1000 bp) zu erhalten. Die Proben wurden mit Ultraschall sonifiziert und im Anschluss ein Teil davon zur Kontrolle auf ein Agarosegel aufgetragen (Abb. 51).

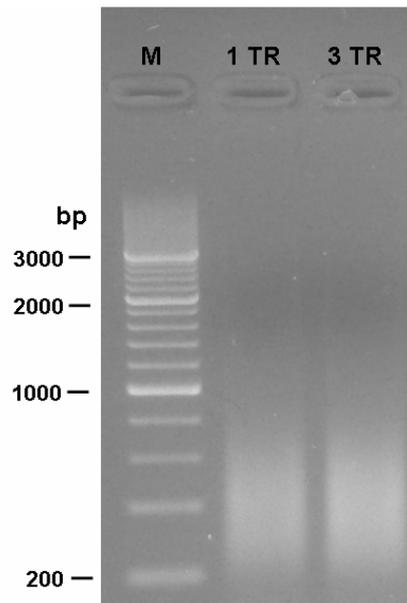


Abbildung 51: Überprüfung der Fragmentgröße nach Sonifikation der WTA-Produkte

Die zuvor amplifizierten Proben (whole transcriptome amplification) nach schwachem (1 TR) und starkem Training (3 TR) wurden sonifiziert. Danach wurden die Proben auf ein Agarosegel aufgetragen, um deren Fragmentgröße zu überprüfen. Diese kann anhand des Markers (M) abgelesen werden.

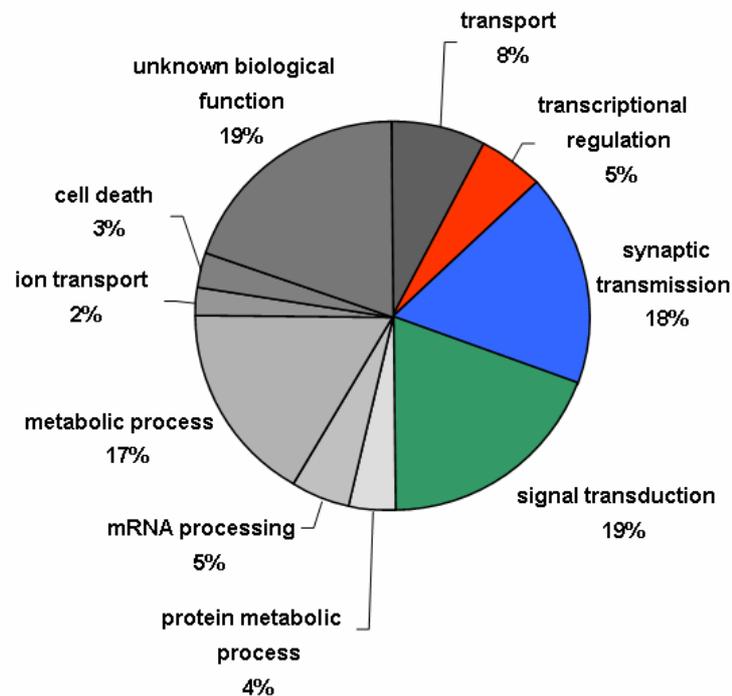
Nach der Sonifikation lagen die Fragmentgrößen der cDNA, wie gewünscht, in einem Bereich zwischen 200 - 1000 bp.

Die weitere Probenaufbereitung, wie Adaptorligation (library preparation) und Emulsions-PCR (emPCR), und die Hochdurchsatz-Sequenzierung wurde in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Jörn Walter (Genetik/Epigenetik, Universität des Saarlandes) von Dr. Sascha Tierling und Jasmin Gries durchgeführt. Für die Sequenzierung wurde das „Genome Sequencer FLX System“ (Roche), auch als 454-Sequencing bekannt, verwendet.

3.7.2 Hochdurchsatz-Sequenzierung (EU-RNA-Seq)

Für die Proben nach schwachem und starkem Training sollten insgesamt 40.000 cDNA-Fragmente sequenziert werden. Dies entspricht 20.000 Reads pro Probe. Von diesen Reads waren für die Proben nach schwachem Training insgesamt 12.567 und für die Proben nach starkem Training 8.803 auswertbar. Mit der Herstellersoftware „GS Reference Mapper“ (Version 2.8) von Roche wurden die Reads mit einer Referenzdatenbank (ftp://ftp.ncbi.nih.gov/genomes/Apis_mellifera/RNA/) an das Transkriptom der Biene angeglichen. Um die beiden Proben miteinander zu vergleichen, wurden im Anschluss nur die Referenzsequenzen ausgewertet, bei denen mehr als 10 Reads pro Transkript (74 Transkripte für schwaches und 93 Transkripte für starkes Training) vorhanden waren. Die Referenzsequenzen wurden auf ihre Funktionsweise untersucht und nach biologischen Prozessen in Gruppen eingeordnet, um einen Überblick über die gesamten Genprodukte beider Proben zu bekommen. Dafür wurden mit den „Gene Ontology Tools“ (geneontology.org) die Transkripte aus dem Sequenzabgleich den GeneOntology(GO)-Begriffen der dazugehörigen Gene aus der Datenbank des „Gene Ontology“-Projekts zugeordnet, wobei die englischen Originalbegriffe beibehalten wurden. Da für Bienengene nur sehr wenige GO-Daten verfügbar waren, wurden homologe Gene von der Fruchtfliege und der Maus verwendet. Die GO-Begriffe stellen u.a. biologische Prozesse dar, an denen die Genprodukte beteiligt sind. Die Ontologie der Gene wurde in Prozent der Reads aller Transkripte der jeweiligen Gruppe angegeben (Abb. 52).

A) Schwaches Training



B) Starkes Training

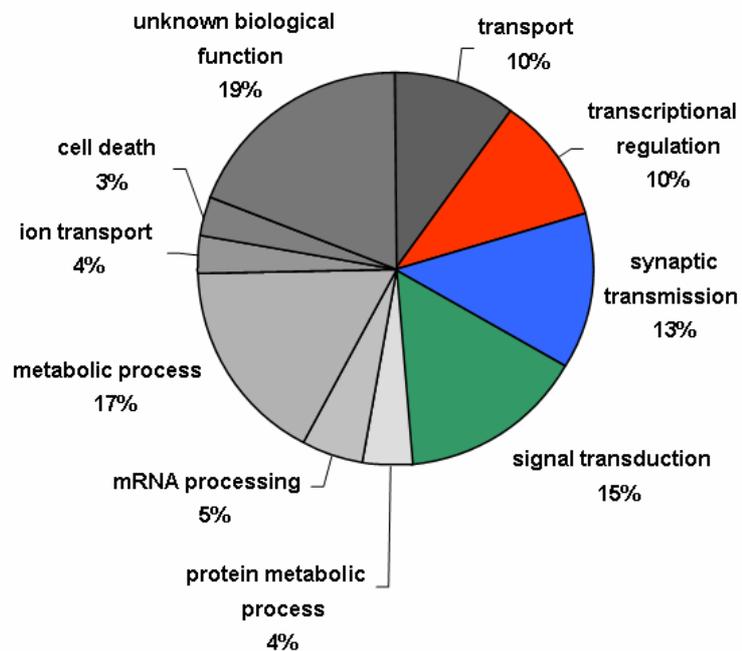


Abbildung 52: Einteilung der nach schwachem und starkem Training synthetisierten Transkripte nach biologischen Prozessen

Einteilung der nach schwachem (A) und starkem Training (B) identifizierten Transkripte in funktionelle Gruppen. Es handelt sich um neu synthetisierte Transkripte, die in einem Zeitraum von 1,5 - 3,5 h nach dem Training markiert und präzipitiert wurden. Die Einteilung der dazugehörigen Gene erfolgte nach biologischen Prozessen der GeneOntology-Datenbank, wobei die englischen Originalbegriffe beibehalten wurden.

Im Vergleich zu schwachem Training (5 %) sind bei der Probe nach starkem Training (10 %) vor allem solche Genprodukte mehr vorhanden, die an transkriptioneller Regulation beteiligt sind. Genprodukte, die an synaptischer Transmission (1 TR: 18%, 3 TR: 13 %) und an Signaltransduktion (1 TR: 19 %, 3 TR: 15 %) beteiligt sind, wurden bei den Proben nach schwachem Training häufiger gemessen.

Da es von besonderem Interesse war, Gene zu identifizieren, bei denen es nach schwachem und starkem Training zu einer unterschiedlich starken Aktivierung kommt, wurden die Gene ausgewählt, die diesen drei funktionellen Gruppen zugeordnet werden. Die Transkripte dieser Gruppen und deren Unterschiede (Anzahl der Reads mindestens doppelt so hoch: > oder <; gleich oder weniger als doppelt so viel: =) nach schwachem (1 TR) und starken (3 TR) Training sind in Tabelle 8 aufgelistet.

Tabelle 8: Liste der nach schwachem und starkem Training synthetisierten Transkripte
 Aufgelistet sind neu synthetisierte Transkripte nach schwachem (1 TR) und starkem (3 TR) Training, die durch Hochdurchsatz-Sequenzierung identifiziert wurden und nach biologischen Prozessen der Genprodukte in drei funktionellen Gruppen zusammengefasst wurden (transcription regulation, synaptic transmission, signal transduction). Die Unterschiede zwischen 1 TR und 3 TR basieren auf der Anzahl der Reads, die in einer der beiden Gruppen mindestens doppelt so hoch war als in der anderen (> oder <). Kein Unterschied zwischen den Gruppen (=) bedeutet gleiche oder weniger als doppelt so hohe Anzahl an Reads.

Biologischer Prozess	Transkript	Accession number	1 TR versus 3 TR
Transcription regulation	Transcriptional corepressor Sin3a	XM_003250115	>
	mediator of RNA-polymerase II-transcription subunit 13-like	XM_393643	>
	homeobox protein PKNOX2-like	XM_001120618	>
	proliferation-associated protein 2G4-like	XM_395683	>
	crocodile	XM_001121752	>
	DNA topoisomerase 3-beta-1-like, transcript variant 2	XM_625162	<
	Nipped-B	NM_001256034	<
	SAFB-like transcription modulator-like	XM_393282	<
	chromatin assembly factor 1 subunit A (Chaf1a)	XM_394624	<

Biologischer Prozess	Transkript	Accession number	1 TR versus 3 TR
Transcription regulation	ELAV-like protein 2-like (RNA-binding Protein)	XM_394166	<
	amyloid beta A4 precursor protein-binding family B member 2-like	XM_394328	<
	Blimp-1 protein	XM_391847	<
	SAFB-like transcription modulator-like	XM_393282	<
	zinc finger protein ZIC 5-like	XM_003250427	<
	PHD finger protein 2-like	XM_394272	<
	exportin-1	XM_396469	<
	protein kinase N	XM_001121710	<
	transcription factor mblk-1-like	NM_001011629	<
	homeodomain-like protein	XM_001120833	=
	zinc finger protein 341-like	XM_393809	=
Synaptic transmission	synapsin	XM_624125	>
	neuroligin 3	NM_001145736	>
	band 4.1-like protein 4A-like	XM_394927	>
	guanine nucleotide-releasing factor 2-like	XM_393346	>
	acetylcholinesterase 2	NM_001040230	<
	protein still life, isoform SIF type 1-like	XR_014928	<
	cytosolic carboxypeptidase 1-like	XM_624177	<
	GABA-neurotransmitter transporter 1B	NM_001011643	<
	NMDR-Rezeptor	NM_001011573	=
	neuroligin 1	XM_001120179	=
	vesicle-fusing ATPase 1-like	XM_001120201	=
protein couch potato-like	XM_392443	=	
Signal transduction	tubby-related protein 4-like	XM_003250254	>
	disks large homolog 5-like	XM_393661	>
	discoidin domain-containing receptor 2-like	XM_394686	>
	ankyrin	XM_392578	>
	plexin A	XM_394261	>
	tetraspanin 8, transcript variant 1	XM_393018	>

Biologischer Prozess	Transkript	Accession number	1 TR versus 3 TR
Signal transduction	coiled-coil domain-containing protein 50-like	XM_394908	>
	presenilin	XM_396620	>
	nucleostemin 1	XM_001119916	>
	whirlin-like	XM_393801	>
	mitogen-activated protein kinase 13-like	XM_397605	>
	Apis mellifera protein BTG2-like	XM_003249180	>
	fumble	XM_395406	>
	toll-like receptor 13-like	XM_001120678	<
	StAR-related lipid transfer protein 13	XM_394183	<
	GSK-3 beta, transcript variant 1	XM_392504	<
	PHD finger protein rhinoceros-like	XM_003251711	<
	G-protein-beta-subunit 2, transcript variant 1	XM_393976	<
	daughter of sevenless	XM_394316	<
	sterile alpha and TIR motif-containing protein 1	XM_394430	<
	putative odorant receptor 13a-like	XM_003250006	<
	protein kinase at 92B ortholog	XM_003250267	<
	ankyrin repeat and SAM domain-containing protein 1A-like	XM_392417	=
	follistatin-like 5	NM_001032361	=
	multiple ankyrin repeats single KH domain	XM_393472	=
	dedicator of cytokinesis protein 3-like	XM_001121716	=
guanylate cyclase 32E-like	XM_623358	=	
protein C kinase 98E ortholog	XR_014887	=	
phosphodiesterase 9	XM_393859	=	
protein unc-79 homolog	XR_015017	=	

Bei den Ergebnissen der Hochdurchsatz-Sequenzierung konnte keine statistische Auswertung gemacht werden, da es sich lediglich um einen einzigen Versuch mit einer Probenanzahl von $n = 1$ pro Probe handelt.

4. Diskussion

Bislang wurde das Kurzzeitgedächtnis, da es nicht mit Transkriptionsblockern inhibiert werden kann, als transkriptionsunabhängiges Gedächtnis definiert [Abel et al., 1997; Montarolo et al., 1986; Silva et al., 1998]. Diese Annahme wird durch Experimente unterstützt, bei denen eine Mutation des Transkriptionsfaktors CREB nur das Langzeit- und nicht das Kurzzeitgedächtnis stört [Bourtchuladze et al., 1994; Kogan et al., 1996].

In dieser Arbeit jedoch konnte mit Hilfe verschiedener molekularbiologischer Methoden gezeigt werden, dass bei der Honigbiene sowohl beim Kurzzeit- als auch Langzeitgedächtnis Transkriptionsprozesse stattfinden:

- erstmalig wurde die Acetylierungsdynamik zweier unterschiedlicher Modifikationsstellen an Histon H3 (H3K9ac und H3K18ac) nach dem Training quantifiziert.
- es wurde gezeigt, dass sich die Dynamik von H3K18ac abhängig von der Trainingsstärke verändert, wobei H3K9ac durch das Training nicht verändert wird.
- sowohl der HDAC-Inhibitor TSA als auch der HAT-Inhibitor Garcinol wurden dazu verwendet, die Acetylierung nach dem Training pharmakologisch zu manipulieren. Somit konnte gezeigt werden, dass abhängig von der Trainingsstärke durch Hyperacetylierung (TSA) das Gedächtnis verbessert und durch Hypoacetylierung (Garcinol) verschlechtert wird.
- dazu wurde zum ersten Mal *in vivo* das Wirkzeitspektrum dieser beiden Inhibitoren in Bezug auf die Acetylierung an H3K18 bestimmt.
- mit dem Einsatz dieser Inhibitoren, die die Transkription auf Chromatinebene beeinflussen, konnten Transkriptionsprozesse, die bisher durch den Einsatz von Transkriptionsblockern unerkant blieben, sichtbar gemacht werden.
- durch *in vivo* Markierung neu synthetisierter RNA nach dem Training konnten zeitabhängig lerninduzierte Änderungen des mRNA-Levels bestimmter Gene nachgewiesen und mittels Hochdurchsatz-Sequenzierung neue an der Gedächtnisbildung beteiligte Gene identifiziert werden.

4.1 Schwaches sowie starkes Training induzieren Änderungen im Acetylierungslevel von H3 an spezifischen Modifikationsstellen

In dieser Arbeit wurde erstmalig gezeigt, dass es bei der assoziativen olfaktorischen Konditionierung der Honigbiene nach schwachem und starkem Training zu einer unterschiedlichen Acetylierungsdynamik von H3K18 kommt, wobei H3K9ac nicht verändert wird. Ergebnisse aus anderen Arbeiten zeigten bisher ausschließlich, dass Trainingsprozesse, die stabile Gedächtnisse induzieren, eine veränderte Histonacetylierung aufweisen [Levenson und Sweatt, 2006; Sharma, 2010; Vecsey et al., 2007]. Dabei wurde jedoch stets die Acetylierung aller Modifikationsstellen eines Histons quantifiziert (H2, H3 oder H4).

In dieser Dissertation wurde gezielt die Acetylierung zweier unterschiedlicher Modifikationsstellen am selben Histon gemessen (H3K18ac und H3K9ac). Aus Experimenten mit Hefezellen ist bekannt, dass die Hyperacetylierung dieser Modifikationsstellen mit einer hohen Anzahl an gebundenen Transkriptionsfaktoren in Promotorregionen von Genen korreliert [Kurdistani et al., 2004; Pham et al., 2007].

Experimente mit embryonalen Mausfibroblasten zeigen, dass H3K18 substratspezifisch durch die beiden HATs CBP und p300 acetyliert wird, wohingegen die Acetylierung von H3K9 durch Vertreter einer anderen HAT-Familie GCN5/PCAF vermittelt wird [Jin et al., 2011]. Histone und Histon-modifizierende Enzyme sind evolutionär hoch konserviert. Daher lässt sich aufgrund der Ergebnisse aus dieser Arbeit die Hypothese äußern, dass CBP- bzw. dessen p300-Homolog in der Honigbiene für die lerninduzierte Acetylierung von H3K18 *in vivo* verantwortlich ist.

4.2 Die pharmakologische Manipulation der Acetylierung macht versteckte Transkriptionsprozesse sichtbar

Bislang wurden zur Differenzierung unterschiedlich starker Gedächtnisse, wie z.B. Kurzzeit- und Langzeitgedächtnis, auf molekularer Ebene stets Transkriptionsinhibitoren (ActinomycinD, α -Amanitin) verwendet. Nur Gedächtnisse, die durch Transkriptionsinhibitoren betroffen sind, wurden als transkriptionsabhängige Langzeitgedächtnisse klassifiziert, während die nicht veränderten Gedächtnisse als transkriptionsunabhängige Kurzzeitgedächtnisse bezeichnet wurden. Da die molekularen Mechanismen bei Lernen und Gedächtnisbildung über das Tierreich stark konserviert sind, wurde diese Unterteilung bei allen Modellorganismen angewandt (z.B.

in der Meeresschnecke *Aplysia californica*, der Maus *Mus musculus* und der Fruchtfliege *Drosophila melanogaster*) [Abel et al., 1997; Silva et al., 1998; Tully et al., 1994]. Auch Experimente mit *CREB*- und *CBP*-Mutanten, bei denen die an der Gedächtnisbildung beteiligten Targetgene von CREB und CBP nicht aktiviert werden können, wurden verwendet, um Gedächtnisse als transkriptionsabhängig oder -unabhängig zu definieren [Alarcon et al. 2004; Barrett et al., 2011; Bourtchouladze et al. 2003; Korzus et al. 2004; Wood et al. 2005; Vecsey et al. 2007]. Auch bei der Honigbiene basiert die bisherige Einteilung in transkriptionsabhängige und -unabhängige Gedächtnisse auf Experimenten mit ActD. Es wurde gezeigt, dass das Gedächtnis nach schwachem Training gar nicht und nach starkem Training erst ab dem 3.Tag inhibiert (verschlechtert) wird [Grünbaum und Müller, 1998; Wüstenberg et al., 1998] (siehe Abb. 53).

Durch den Einsatz von Substanzen, die Transkriptionsprozesse nicht auf DNA- sondern auf Chromatinebene beeinflussen, konnte jetzt gezeigt werden, dass das 1 d-Gedächtnis nach schwachem Training sowie das 1 d- und 2 d-Gedächtnis nach starkem Training doch transkriptionsabhängig sind (Abb. 53).

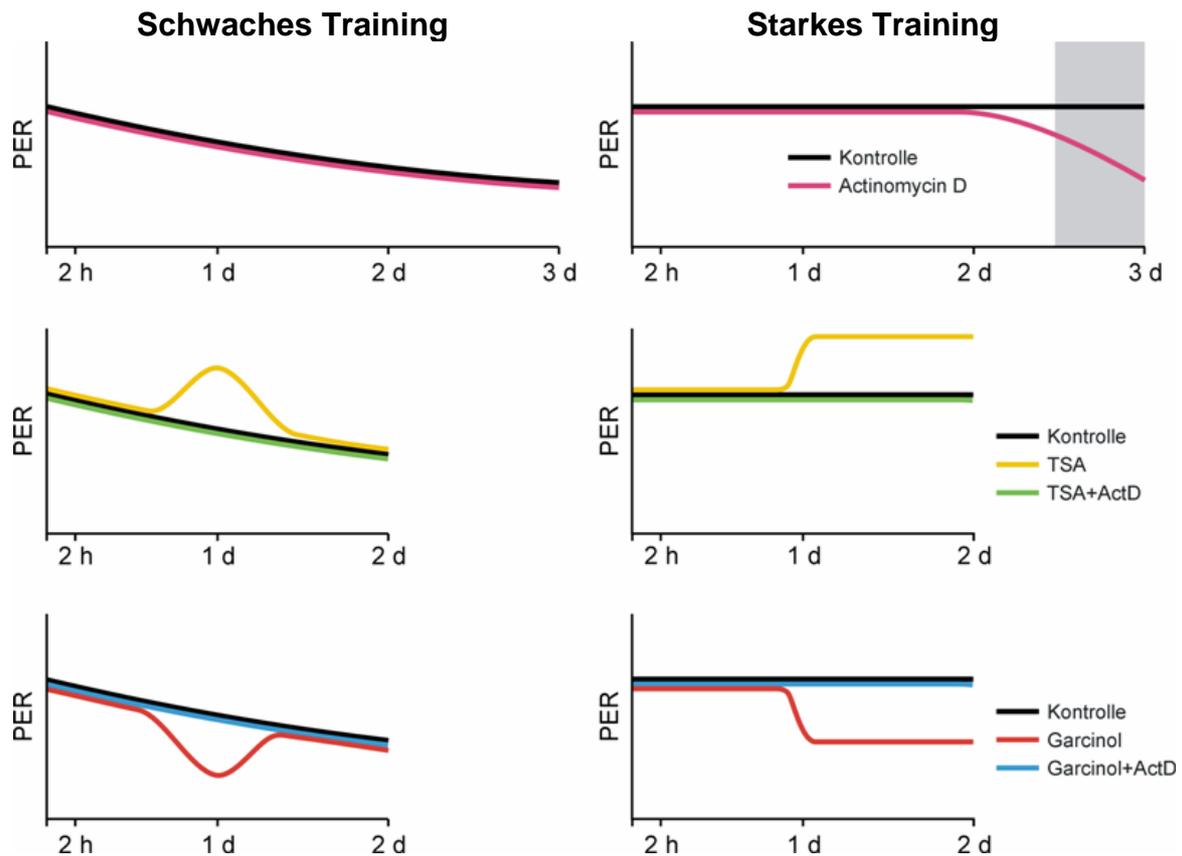


Abbildung 53: Schema der Wirkung unterschiedlicher Inhibitoren auf das Gedächtnis der Honigbiene nach schwachem und starkem Training

Der Transkriptionsinhibitor ActD hat keinen Einfluss auf das Gedächtnis der Biene nach schwachem sowie die frühen Gedächtnisse nach starkem Training (2 h, 1 d und 2 d). Erst das Gedächtnis nach 3 Tagen kann mit ActD verschlechtert werden (grau unterlegt). Der HDAC-Inhibitor TSA und der HAT-Inhibitor Garcinol haben einen Effekt auf das 1 d-Gedächtnis nach schwachem sowie das 1 d- und 2 d-Gedächtnis nach starkem Training. Diese Effekte sind transkriptionsabhängig, da sie mit ActD wieder rückgängig gemacht werden können.

Der durch TSA vermittelte acetylierungsabhängige Effekt eines verbesserten Gedächtnisses konnte auch schon in Vertebraten nachgewiesen werden und es wurde gezeigt, dass TSA die Transkription von *bdnf* (brain derived neurotrophic factor) induziert, einem bei Vertebraten gut untersuchten gedächtnisrelevanten Gen [Fontán-Lozano et al., 2008; Wang et al., 2012].

In der Honigbiene konnte nun gezeigt werden, dass der durch TSA induzierte gedächtnisverbessernde Effekt mit einem Transkriptionsinhibitor blockiert werden kann. Da TSA bei der Biene auch einen Effekt auf Gedächtnisse hatte, die als transkriptionsunabhängig definiert wurden und dieser Effekt mit einem Transkriptionsblocker inhibiert werden konnte, konnte gezeigt werden, dass auch diese Gedächtnisse von Transkriptionsprozessen abhängig sind.

Der HAT-Inhibitor Garcinol wurde erst in zwei anderen Arbeiten in Versuchen zur Gedächtnisbildung bei Vertebraten verwendet. In einer dieser Arbeiten wurde gezeigt, dass durch Garcinol der durch Östrogen induzierte gedächtnisverbessernde Effekt wieder auf den Kontrolllevel reduziert wird [Zhao et al., 2012]. In einer kürzlich erschienenen Veröffentlichung verschlechtert Garcinol durch Reduzierung von H3Ac die Konsolidierung und Rekonsolidierung des Gedächtnisses bei Ratten nach Angstkonditionierung [Maddox et al., 2013]. Zuvor schon publiziert [Merschbaecher et al., 2012] und in dieser Dissertation gezeigt, konnte in der Biene nachgewiesen werden, dass Garcinol über chromatinmodifizierende Prozesse das Gedächtnis verschlechtert und dieser Effekt transkriptionsabhängig ist.

Durch diese Ergebnisse zusammen mit zwei neueren Veröffentlichungen, die auch erste Hinweise liefern, dass CREB und CBP in der Maus beim Kurzzeitgedächtnis eine Rolle spielen [Chen et al., 2010; Suzuki et al., 2011], kann die bisherige strikte Trennung transkriptionsabhängiger und -unabhängiger Gedächtnisse, die auf Experimenten mit Transkriptionshemmung auf DNA-Ebene beruhen, nicht mehr aufrecht erhalten werden.

Bei näherer Betrachtung der Wirkung von ActD, welches mit der DNA interagiert und so die Transkription irreversibel hemmt [Goldberg und Rabinowitz, 1962; Zhou et al., 2007], werden auch sogenannte Superinduktionseffekte beschrieben [Garren et al., 1964; Newton et al., 1995; Steinberg et al., 1975; Palmiter und Schimke, 1973; Deguchi und Axelrod, 1972]. Hierbei handelt es sich um einen Mechanismus, der nach Hemmung der Genexpression bei verschiedenen Genen die mRNA-Stabilität oder die Aktivität des entsprechenden Genprodukts auf Proteinebene erhöht. Es ist anzunehmen, dass durch eine Hemmung der globalen Genexpression in der Zelle Rescuemechanismen ausgelöst werden, um den „Schaden“ auf physiologische Prozesse vorerst gering zu halten. Durch Erhöhung der mRNA-Stabilität stehen die entsprechenden Transkripte, für die Translation in Proteine, die für physiologische Prozesse in der Zelle benötigt werden, noch über einen längeren Zeitraum zur Verfügung. Eine Erhöhung der Proteinaktivität kann zum anderen das Ausbleiben neu synthetisierter Proteine eine zeitlang ausgleichen. Somit ist vorstellbar, dass Superinduktionseffekte auch bei Transkripten gedächtnisrelevanter Gene auftreten und ein Effekt auf das Verhalten, also eine Verschlechterung des Gedächtnisses, erst zu einem späteren Zeitpunkt sichtbar wird. Im Vergleich dazu ist Garcinol ein kompetitiver Inhibitor der HATs p300 und PCAF [Balasubramanyam et al., 2004; Dekker und

Haisma, 2009], dessen indirekte inhibitorische Wirkung auf die Genexpression transient ist, was in dieser Arbeit auch im Bienenhirn nachgewiesen werden konnte. Superinduktionseffekte sind bei Garcinol bislang nicht bekannt. Es ist jedoch vorstellbar, dass durch eine transiente Inhibition der Transkription kaum oder keine Rescuemechanismen in Gang gesetzt werden. Um dies zu untersuchen, müssten jedoch entsprechende Experimente gemacht und z.B. die inhibitorische Wirkung von Garcinol auf Transkriptionsebene eines bestimmten Gens in Kombination mit einem erhöhten Proteinlevel gezeigt werden.

4.3 Expressionsanalysen markierter *de novo* RNA als neuer Tool zum Nachweis gedächtnisrelevanter Transkriptionsprozesse *in vivo*

Um Transkriptionsprozesse zu untersuchen, werden quantitative Genexpressionsanalysen meist mittels real-time PCR oder Microarrays durchgeführt [Nolan et al., 2006; VanGuilder et al., 2008]. Das Problem dabei ist, dass man nicht differenzieren kann, ob z.B. ein höherer mRNA-Level aus einer Zunahme aufgrund erhöhter Genexpression oder aus einer geringeren Abbaurate resultiert. Außerdem ist es mit den konventionellen Methoden kaum möglich stimulusabhängige Änderungen des mRNA-Levels von Genen zeitnah zu bestimmen, besonders wenn entsprechende mRNAs lange Halbwertszeiten aufweisen. Aus diesem Grund wurde für die in dieser Arbeit durchgeführten Expressionsanalysen eine andere Methode verwendet und in der Honigbiene etabliert. Es wurde, wie bei anderen Analysen auch, *steady-state* mRNA quantifiziert, jedoch aus der gleichen Probe zusätzlich noch die, in einem bestimmten Zeitraum neu synthetisierte mRNA (*de novo*). Durch die Markierung neu synthetisierter RNA mit Ethynyluridin, ist es möglich zeitgenau einen erhöhten oder im Vergleich zur Kontrolle verringerten mRNA-Level zu messen. Die im Ergebnisteil in Kapitel 3.2 gezeigte Dynamik des Acetylierungslevels von H3K18 nach schwachem Training verläuft relativ schnell. Innerhalb von 2 h hat sich der Acetylierungslevel von H3K18 im Vergleich zur Kontrollgruppe von signifikant höher zu signifikant niedriger geändert. Der Histonacetylierungslevel kann Einfluss auf die Expression von Genen haben, d.h. eine Hyperacetylierung erleichtert die Transkription, wobei eine Hypoacetylierung die Transkription erschwert. Aufgrund der Ergebnisse der unterschiedlichen Acetylierungsdynamik nach dem Training war es von besonderem Interesse zu genau den Zeitpunkten die mRNA-Menge zu quantifizieren, an denen

auch die Histonacetylierung Änderungen zeigte. Damit sollten Hinweise erhalten werden, ob die geänderte Histonacetylierung Einfluss auf die Genexpression hat, worauf im nächsten Kapitel näher eingegangen werden soll.

Die Markierung der RNA mit EU ist ein relativ neuer Tool und wurde bisher nur in wenigen Arbeiten verwendet. So wurde durch EU-Markierung die *de novo* Transkription in Zellkultur mikroskopisch untersucht [Calera et al., 2011; Jao und Salic, 2008; Gomes et al., 2010; Schwertman et al., 2012] oder ebenfalls in Zellkultur die markierte mRNA auch separiert um mittels real-time PCR die mRNA-Stabilität von Interferon-beta bei der Immunantwort zu analysieren [Abe et al., 2012].

Bisher gibt es keine Arbeiten in denen die EU-Markierung von mRNA verwendet wird, um molekulare Prozesse bei Lernen und Gedächtnisbildung *in vivo* zu untersuchen. An Zebrafischlarven wurden Markierungsexperimente auf Translationsebene durchgeführt, um bei synaptischen Prozessen die Proteinsynthese außerhalb des Zellkörpers zu analysieren [Hinz et al., 2012]. Hierbei wurden neu synthetisierte Proteine markiert und die Zunahme nach Neurotransmitterstimulus quantifiziert und mikroskopisch in Dendriten und Synapsen lokalisiert.

Die Verwendung der Methode zur Markierung neu synthetisierter RNA *in vivo* zur Untersuchung lerninduzierter Genexpression wurde zum ersten Mal in dieser Dissertation gezeigt. Wie bei der gerade angesprochenen Proteinmarkierung kann die markierte RNA auch mit einem Fluorophor gekoppelt werden, um die Lokalisation der RNA mikroskopisch sichtbar zu machen. Darüber hinaus kann durch Kombination der EU-Markierung mit *in situ* Hybridisierung die Lokalisation definierter Transkripte analysiert werden.

4.4 Durch schwaches Training induzierte Prozesse führen zur Gedächtnissuppression

Bei Lernen und Gedächtnisbildung werden molekulare Prozesse nicht nur aktiviert, es müssen auch inhibitorische Mechanismen „abgeschaltet“ werden, die sonst verhindern, dass das Gelernte langfristig gespeichert wird. Diese Mechanismen sind besonders wichtig bei irrelevanten Ereignissen, die keinen Vorteil oder Nachteil für das Leben oder Überleben eines Individuums darstellen.

In ältere Arbeiten zur Aufklärung dieser Mechanismen wurden Enzyme identifiziert, die andere Proteine inaktivieren oder deren Abbau beschleunigen. Bei *Aplysia* wur-

den die entsprechenden Gene, sogenannte „memory suppressor genes“, [Abel et al., 1998] vorgestellt und als negative Regulatoren bei der Gedächtnisbildung bezeichnet. Ein solcher negativer Regulator ist z.B. der Transkriptionsfaktor CREB2, der durch Bindung an CREB1 verhindert, dass die CREB1-induzierte Aktivierung der Expression gedächtnisfördernder Gene vermittelt wird.

Spätere Arbeiten untersuchten die negativen Regulationsmechanismen auf Chromatinebene. Es wurde die Hypothese aufgestellt, dass die Regulation der reprimierenden Mechanismen auch durch Änderung der Histonacetylierung erfolgen kann, die dann in einem veränderten Expressionslevel von gedächtnisrelevanten Zielgenen resultiert [McQuown et al., 2011]. Durch gedächtnisinduzierende Mechanismen, die z.B. durch starkes Training in Gang gesetzt werden, können diese negativen Regulatoren „entfernt“ werden, was zu einer erleichterten Aktivierung der Genexpression führt. In Übereinstimmung mit dieser Hypothese führen die Ergebnisse dieser Dissertation zu der Annahme, dass nach schwachem Training acetylierungsabhängige Prozesse in Gang gesetzt werden, um eine langzeitige Speicherung der gelernten Information zu unterdrücken.

Somit zeigen die Ergebnisse, dass nach schwachem Training die langfristige Speicherung der gelernten Information nicht einfach nur ausbleibt, weil die neuronale Aktivierung zu schwach ist, sondern dass über die Chromatinebene Prozesse in Gang gesetzt werden, die aktiv die langfristige Speicherung verhindern.

4.4.1 Schwaches Training verändert die Expressionsrate gedächtnisrelevanter Gene

Um die reprimierenden Mechanismen nach schwachem Training weiter aufzuklären und da sich Änderungen im Histonacetylierungslevel auf die Genexpression auswirken kann, wurde untersucht, ob sich Änderungen im mRNA-Level verschiedener Gene feststellen lassen. Es konnte gezeigt werden, dass es nach schwachem Training im Gehirn der Biene zu einer Änderung der Transkriptionsrate einiger Gene kommt. Bei der *CamKII* kam es kurz nach dem Training zu einer erhöhten Expressionsrate, was kein überraschendes Ergebnis war. Die Beteiligung der *CamKII* bei der Ausbildung von sowohl Kurzzeit- als auch Langzeitgedächtnis ist schon länger bekannt [Chen et al., 2010; Luk et al., 2011; Sajikumar et al., 2009; Wang et al., 2008]. Bei beiden gemessenen Zeiten kam es bei *CBP* zu einer verringerten Expressionsra-

te gegenüber der Kontrollgruppe. Die verringerte Expressionsrate lässt vermuten, dass die von CBP (CREB binding protein mit intrinsischer Acetyltransferaseaktivität) und seinem Interaktionspartner CREB initiierten Transkriptionsprozesse, die an der langfristigen Speicherung von Informationen beteiligt sind [Alarcon et al. 2004; Wood et al., 2005], gehemmt werden. Entsprechende Experimente, in denen die Proteinmenge von CBP nach schwachem Training quantifiziert wird, könnten diese Annahme bestätigen.

Wie bereits erwähnt, gibt es bei *Aplysia* CREB2, welches die Aktivierung von CREB blockiert. Bei der Honigbiene ist kein CREB2-Homolog bekannt. Mit den Ergebnissen der lerninduzierten Expressionsanalyse lässt sich somit die Hypothese aufstellen, dass die Aktivität von CREB über CBP, welches durch Acetylierung der Histone die DNA für Transkriptionsprozesse zugänglich macht, reguliert wird. Da nach schwachem Training die Expressionsrate von CBP und auch die Acetylierung von H3K18 verringert sind, passen die Ergebnisse auch mit der Hypothese zusammen, dass die lerninduzierte Acetylierung von H3K18 bei der Biene durch CBP vermittelt wird. Zusammenfassend gibt es einige Hinweise darauf, dass sich bei der Biene die regulatorischen Mechanismen zur Gedächtnissuppression überwiegend auf Chromatinebene abspielen, wobei CBP eine wichtige Schlüsselkomponente darstellt (Abb. 54).

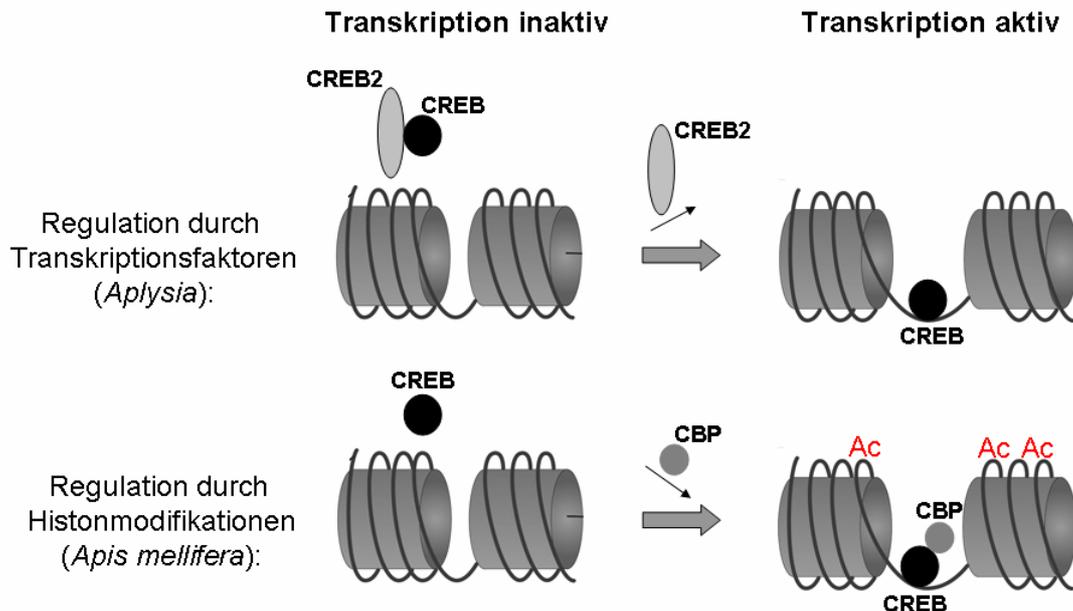


Abbildung 54: Hypothese über die Regulation der lerninduzierten durch CREB vermittelten Transkriptionsprozesse bei der Honigbiene

In *Aplysia* wurde gezeigt, dass die durch CREB induzierten Transkriptionsprozesse bei Lernen und Gedächtnisbildung durch CREB2 über Heterodimerbildung blockiert werden. Nachdem CREB2 inaktiviert wurde, kann CREB an Promotorregionen seiner Zielgene binden und Transkription aktivieren [verändert nach Hawkins et al., 2006]. Bei *Apis* ist CREB2 nicht bekannt. Somit scheint es für CREB andere regulatorische Mechanismen zu geben. CREB kann erst nach Bindung des Cofaktors CBP, der dafür sorgt, dass durch Acetylierung der Histone die DNA zugänglich ist, an entsprechende Promotorregionen binden und die Transkription aktivieren.

4.4.2 *EF1 α* als Zielgen lerninduzierter acetylierungsabhängiger Prozesse

Unter den untersuchten Genen war neben den an Gedächtnisprozessen beteiligten Kandidaten auch *EF1 α* (*Elongationsfaktor 1-alpha*). Das Genprodukt von *EF1 α* ist ein an der Translation beteiligtes Protein, welches die GTP-abhängige Bindung der Aminoacyl-tRNA an das Ribosom katalysiert. Man geht davon aus, dass dieses Gen konstitutiv exprimiert wird, da zu jeder Zeit in der Zelle vor allem für physiologische Vorgänge Translationsprozesse ablaufen müssen [Mateyak und Kinzy, 2010]. Erhöhte Expressionsraten (*steady-state* mRNA) findet man jedoch in transformierten Zellen [Sanders et al., 1992], während der Embryonalentwicklung [Krieg et al., 1989] und in einer Vielzahl von Tumoren [Grant et al., 1992]. Es ist aber durchaus denkbar, dass Stimuli, die eine verstärkte Proteinsynthese nach sich ziehen, eine erhöhte Expressionsrate von *EF1 α* induzieren, damit mehr EF1 α -Protein für den Translationsprozess vorhanden ist. Man weiß z.B., dass oxidativer Stress den EF1 α -Proteinlevel beeinflussen kann [Chen et al., 2000]. Änderungen auf mRNA-Ebene wurden dabei nicht bestätigt. Es wurde jedoch gezeigt, dass verschiedene Stressoren bei Insekten (ar-

tenpezifisch) die Expressionsrate von *EF1 α* verändern [de Boer et al., 2009]. Das gleiche trifft auch auf unterschiedliche Altersstufen von *D. melanogaster* zu [Ling und Salvaterra, 2011]. Interessanterweise hatte man schon vor über 20 Jahren im *EF1 α* -Gen beim Menschen Transkriptionsfaktorbindestellen (TATA-Box, Sp1 (Specificity protein 1)- und AP1 (Activator protein 1)-Bindestellen) gefunden, die üblicherweise bei Haushaltsgenen nicht vorhanden sind und auf eine aktivitätsabhängige Transkriptionsregulation hindeuten [Uetsuki et al., 1989]. Wie und wann diese Regulation stattfindet, ist jedoch unklar. Um dieser Spur weiter nach zu gehen, wurde für diese Arbeit die genomische Sequenz des *EF1 α* -Gens der Biene (NC_007074.3) *in silico* mit dem Programm Cister auf die oben erwähnten Bindestellen untersucht. Mit diesem Programm konnten für das *EF1 α* -Gen des Menschen die bereits erwähnten Bindestellen bestätigt werden. Jedoch konnte *in silico* weder eine TATA-Box noch die Bindestellen für Sp1 oder AP1 bei der Honigbiene identifiziert werden. Es wurde ein Cluster aus Bindestellen für NF-1 (Nuclear factor 1) und SRF (serum response factor) vorhergesagt. Diese beiden Transkriptionsfaktoren sind unter anderem an Prozessen der Neuroprotektion (NF-1) und Lernen und Gedächtnisbildung (SRF) beteiligt [Fancy et al., 2012; Knöll und Nordheim, 2009]. Desweiteren ist bekannt, dass *EF1 α* nicht nur an der Proteinbiosynthese beteiligt ist [Mateyak und Kinzy, 2010], sondern auch mit dem Zytoskelett interagiert und es umorganisieren kann [Gross und Kinzy, 2005; Munshi et al., 2001; Yang et al., 1990].

Somit lässt sich durch die in dieser Arbeit durchgeführten Expressionsanalysen, die schon bereits auf Grundlage der verringerten Histonacetylierung zu Anfang des Kapitels 4.4 geäußerte Theorie unterstützen, dass nach schwachem Training Prozesse in Gang gesetzt werden, die eine langzeitige Speicherung der gelernten Information aktiv unterdrücken. Es konnte sowohl eine verringerte Expressionsrate von *CBP* als auch von *EF1 α* gezeigt werden. Somit finden die Änderungen nicht nur auf Chromatinebene sondern auch auf DNA-Ebene statt. Eine Bestätigung, dass die Änderung der Chromatinmodifikation am *EF1 α* -Gen stattfindet und damit ursächlich an der veränderten Expressionrate beteiligt ist, muss jedoch noch durch ChIP-Experimente verifiziert werden.

4.5 TSA und Garcinol wirken auf unterschiedliche Targets

Der HDAC-Inhibitor TSA und der HAT-Inhibitor Garcinol wiesen das gleiche Wirkzeitspektrum bezüglich ihrer Effekte auf die Acetylierung von H3K18 auf. Die Effekte sowohl auf die Acetylierung als auch das Gedächtnis der Honigbiene gingen genau in die entgegengesetzte Richtung. Daher lag die Annahme nahe, dass beide Inhibitoren auch entgegengesetzte Effekte auf die acetylierungsabhängige Änderung der Expression derselben Gene haben. Aus der Literatur sind keine Experimente bekannt, in denen TSA und Garcinol gemeinsam zur Untersuchung von Lernen und Gedächtnisbildung verwendet wurden. In Lernexperimenten, in denen TSA eingesetzt wurde, konnte gezeigt werden, dass es zu einer erhöhten Expressionsrate von *BDNF*, ein bei Vertebraten gut untersuchtes gedächtnisrelevantes Gen, oder Transkriptionsfaktoren, deren Target *BDNF* ist, kommt [Fontán-Lozano et al., 2008; Tian et al., 2010; Wang et al., 2012]. Ein Homolog in der Biene ist nicht bekannt. Die einzige Arbeit, in der Garcinol zu Lernexperimenten verwendet und quantitative Messungen auf Proteinebene durchgeführt wurden, zeigt einen Einfluss des Inhibitors auf den Proteinlevel der HDAC2 [Zhao et al., 2012].

Überraschenderweise konnte durch TSA in dieser Dissertation auch ein Effekt auf das *EF1 α* -Gen beobachtet werden. Die mit TSA injizierten trainierten Bienen zeigten im Vergleich zu den mit Kontrolllösung injizierten trainierten Bienen eine signifikant erhöhte Expression von *EF1 α* . Dies ist ein weiteres Indiz dafür, dass eine lerninduzierte Regulation von *EF1 α* an der Gedächtnisbildung beteiligt sein könnte. Es ist jedoch unwahrscheinlich, dass der Effekt von TSA auf die Expression von *EF1 α* nach schwachem Training allein für die Gedächtnisverbesserung verantwortlich sein soll, da noch viele andere Gene betroffen sein können.

Für Garcinol konnten im gleichen Zeitfenster auf Transkriptionsebene keine Effekte auf *EF1 α* und die anderen getesteten Gene nachgewiesen werden. Es ist jedoch möglich, dass sich Garcinol-vermittelte Effekte auf die Expression der untersuchten Gene erst zu einem späteren Zeitpunkt etablieren. Der Markierungszeitraum, der in dieser Arbeit gewählt wurde, schließt zwar den Zeitpunkt der reduzierten Histonacetylierung nach Garcinolbehandlung ein, trotzdem könnten Expressionsänderungen der untersuchten Gene zeitlich weiter nach hinten verlagert sein. Eine jüngere Veröffentlichung deckt sogar noch einen neuen Aspekt zum Einfluss von Garcinol auf die Genregulation auf. Hier wurde nachgewiesen, dass Garcinol einen Einfluss auf ver-

schiedene microRNAs hat und somit posttranskriptionell Einfluss auf die Genexpression haben könnte [Parasramka et al., 2013].

Die zu Anfang des Kapitels geäußerte Hypothese, dass Garcinol und TSA entgegengesetzte Effekte auf die acetylierungsabhängige Expression derselben Gene haben könnten, wird somit nicht bestätigt.

4.5.1 TSA und Garcinol haben auch einen Einfluss auf die Acetylierung von Nichthistonproteinen

HATs und HDACs acetylieren bzw. deacetylieren auch Nichthistonproteine [Close et al., 2005; Spange et al., 2009]. Die Acetylierung von Proteinen dient der Stabilisierung, Aktivierung oder Komplexbildung von Proteinen [Caron et al., 2005; Sadoul et al., 2007]. Ein bisher gut untersuchtes Protein, welches über Acetylierung reguliert wird, ist α -Tubulin [McRae, 1997]. Die Acetylierung von α -Tubulin, aus denen neben β -Tubulin die Mikrotubuli aufgebaut sind, dient deren Stabilisierung. Die Mikrotubuli sind Teile des Zytoskeletts, an denen der Transport innerhalb der Zelle stattfindet. Um die Regulation der Acetylierung von α -Tubulin zu untersuchen, wurden auch schon HDAC- und HAT-Inhibitoren verwendet und gezeigt, dass diese den Acetylierungslevel beeinflussen können. Durch TSA, welches auch die HDAC6 inhibiert, die vorallem die Deacetylierung zytosolischer Proteine katalysiert, kommt es somit zu einer verstärkten Acetylierung von α -Tubulin [Brush et al., 2004] und einem erleichterten Transport innerhalb der Zelle. Bei den Experimenten zum Einfluss von HAT-Inhibitoren auf die Acetylierung von α -Tubulin wurde Garcinol nicht getestet. Es wurden jedoch zwei ähnlich wirkende Substanzen (Anacardinsäure, Curcumin) verwendet, die die gleiche Familie von HATs inhibieren. Hier wurde gezeigt, dass beide Inhibitoren die Acetylierung von α -Tubulin reduzieren [Mai et al., 2006].

Bei Lernen und Gedächtnisbildung müssen Signale schnell weitergeleitet werden, was den Transport von Proteinen, Cofaktoren (cAMP) und mRNAs voraussetzt.

Somit ist anzunehmen, dass die Effekte von TSA und Garcinol auf das Gedächtnis der Biene teilweise auch auf dem veränderten Acetylierungslevel zytosolischer Proteine, wie das genannte Beispiel α -Tubulin, aber auch anderer an der Gedächtnisbildung beteiligter Proteine, beruhen können.

4.6 Transkriptomanalyse EU-markierter RNA nach schwachem und starkem Training mittels RNA-Seq

Von den mittels real-time PCR untersuchten Genen (*auch EF1 α*) waren bei der Hochdurchsatz-Sequenzierung keine Transkripte identifiziert worden. Ein direkter Vergleich der beiden Experimente ist jedoch nicht einfach möglich, da bei den real-time Experimenten Gehirnproben aus Bienen nach schwachem Training mit untrainierten Bienen und bei der Hochdurchsatz-Sequenzierung Proben aus Bienen nach schwachem mit Bienen nach starkem Training verglichen werden. Nichts desto trotz konnten bei der Hochdurchsatz-Sequenzierung eine Vielzahl interessanter Gene identifiziert werden, deren Menge an Transkripten zwischen den beiden Gruppen (schwachem bzw. starkem Training) unterschiedlich war (Tab. 8). Nach der Einteilung der entsprechenden Gene nach biologischen Prozessen fiel auf, dass vor allem Unterschiede in der Transkriptmenge von Genen auftraten, die an transkriptioneller Regulation, synaptischer Transmission und an Signaltransduktion beteiligt sind (Abb. 52). Darunter wurden 22 Transkripte identifiziert, deren Menge nach schwachem Training mindestens doppelt so groß war wie nach starkem Training. Die Menge von 26 Transkripten war nach starkem Training mindestens doppelt so groß wie nach schwachem Training. Bei 14 Transkripten war die Menge an mRNA in beiden Gruppen etwa gleich.

4.6.1 Nach schwachem und starkem Training zeigen sich Unterschiede an Transkripten aus verschiedenen funktionellen Gruppen

Nach starkem Training wurden mehr neu synthetisierte Transkripte von Transkriptionsfaktoren identifiziert als nach schwachem Training. Nach schwachem Training wurde eine Erhöhung von Transkripten gefunden, die an synaptischer Transmission und Signaltransduktion beteiligt sind.

Es ist anzunehmen, dass nach starkem Training, welches zu einem stabilen Langzeitgedächtnis führt, viele Transkriptionsfaktoren benötigt werden, deren Zielgene für Proteine codieren, die dem Aufbau neuer synaptischer Verbindungen dienen. Bei den molekularen Prozessen, die durch schwaches Training induziert werden, dominiert die Signaltransduktion, die dazu führt, dass die Transmitterausschüttung an der Synapse erhöht wird. Somit werden vermehrt Proteine benötigt, die an Signalkaskaden und der Transmitterausschüttung beteiligt sind. Experimente, bei denen eine

Zunahme der entsprechenden Proteine zu den identifizierten Transkripten nachgewiesen werden kann, würden diese Annahme bestätigen.

4.6.2 Nach schwachem und starkem Training identifizierte Gene für weiterführende quantitative Expressionsanalysen

Eines der Gene, bei denen der Unterschied der gemessenen Reads am größten war, kodiert für das ELAV-Protein (embryonic-lethal abnormal visual system), welches bei *Drosophila* sehr gut untersucht ist. Hierbei handelt es sich um ein Protein, welches sich an der posttranskriptionellen Regulation der Genexpression beteiligt, in dem es auf die mRNA-Stabilität Einfluss nimmt [Hilgers et al., 2012; Yao et al., 1993]. Von diesem Gen wurden in der Probe nach schwachem Training weniger Reads gemessen als nach starkem Training.

Ein anderes Gen, bei dem der Unterschied der gemessenen Reads am größten war, kodiert für das an der Neurotransmitterfreisetzung beteiligte Protein Synapsin [Greengard et al., 1993]. Es ist an der Verschmelzung der Transmitter-gefüllten Vesikel mit der präsynaptischen Membran beteiligt. Beim Menschen sind drei verschiedene Synapsine (Synapsin1-3) bekannt. Bei der Biene bisher nur eins. Beim Lernen und der Gedächtnisbildung stellt die Kommunikation zwischen Nervenzellen eine Grundvoraussetzung dar und diese wird unter anderem über die Menge und Frequenz der Transmitterausschüttung reguliert [Hart et al., 2011; Michels et al., 2011; Specht und Triller, 2008]. Von diesem Gen wurden in der Probe nach starkem Training weniger Reads gemessen als nach schwachem Training.

Ein weiterer interessanter Kandidat ist *CCP1* (cytosolic carboxypeptidase 1), dessen Genprodukt an der Proteindegradation sowie der Prozessierung von α - und β -Tubulin und somit an der Neurodegeneration und dem axonalen Transport beteiligt ist [Berezniuk et al., 2012; Macrae, 1997; Rogowski et al., 2010]. Von diesem Gen wurden in der Probe nach schwachem Training weniger Reads gemessen als nach starkem Training.

Die drei erwähnten Gene stellen nur eine kleine Auswahl der in Tabelle 8 im Ergebnisteil aufgelisteten Kandidaten dar, worunter es noch weitere interessante Gene gibt, die in weiterführenden Experimenten auf eventuelle Unterschiede nach schwachem und starkem Training untersucht werden sollten. So lassen sich sicher weitere Hinweise finden, welche Gene an der Ausbildung eines transienten Gedächtnisses

nach schwachem und welche an der Ausbildung eines stabilen Gedächtnisses nach starkem Training beteiligt sind. Ebenso sollte bei allen Expressionsanalysen überprüft werden, ob sich die Effekte auch auf Proteineebene zeigen.

4.7 Fazit

Aufgrund der in dieser Dissertation veröffentlichten Ergebnisse und den dadurch neu gewonnenen Erkenntnissen über die molekularen Mechanismen bei der Speicherung gelernter Informationen, lässt sich zur Differenzierung zwischen dem transienten Gedächtnis nach schwachem und dem stabilen Gedächtnis nach starkem Training bei der Honigbiene eine neue Hypothese aufstellen (Abb. 54).

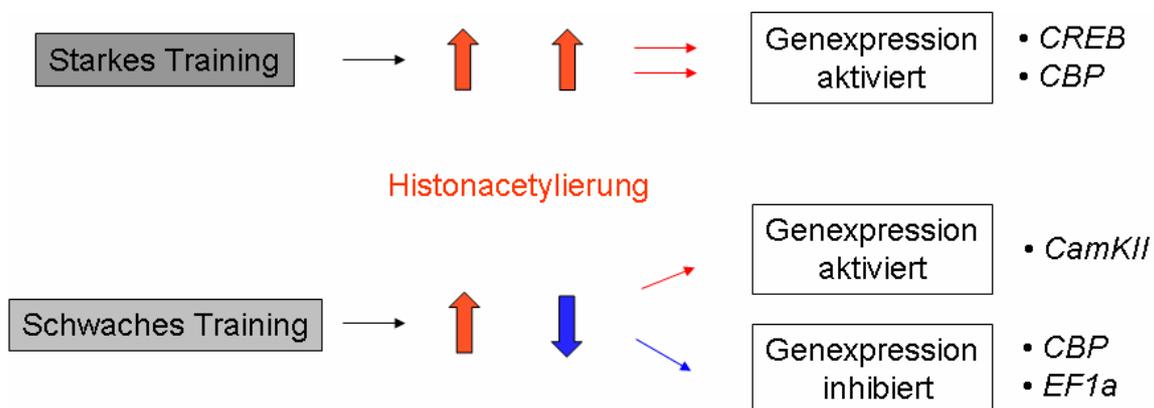


Abbildung 55: Schematische Darstellung der molekularen Prozesse bei der acetylierungsabhängigen Speicherung von Gedächtnisinhalten nach schwachem und starkem Training

Nach starkem Training kommt es, wie in vielen Spezies gezeigt, zu einer erhöhten Histonacetylierung, die in der Aktivierung der Expression gedächtnisrelevanter Gene (z.B. *CREB* und *CBP*) resultiert. Schwaches Training führt dazu, dass die Histonacetylierung zuerst erhöht und dann verringert wird. Dies führt dazu, dass Gene aktiviert werden (z.B. *CamKII*), um ein transientes Gedächtnis auszubilden. Andere Gene werden reprimiert, um zu verhindern, dass die gelernte Information langfristig gespeichert wird.

Die in der Biene etablierten und angewandten Methoden zur Quantifizierung des Acetylierungslevels spezifischer Modifikationsstellen an Histon H3 oder zur Analyse aktivitätsabhängiger Änderungen des Expressionslevels gedächtnisrelevanter Gene, eignen sich auch für Experimente in anderen Modellorganismen (wie z.B. *D.melanogaster*) und zur Untersuchung anderer Lernformen (z.B. aversive Lernformen). Es wäre sicherlich interessant, ob vergleichbare Experimente mit anderen

Spezies und anderen Lernformen zu vergleichbaren Ergebnissen führen. Für weiterführende Experimente, um der acetylierungsabhängigen Regulation der Genexpression bei der Gedächtnisbildung noch genauer auf den Grund zugehen, könnte man die Markierung und Quantifizierung neu synthetisierter RNA mit der ChIP-Technik (**ChromatinImmunoPräzipitation**) [Guan et al., 2002] kombinieren. So kann man gleichzeitig sowohl Änderungen der Histonacetylierung im Promotorbereich eines bestimmten Gens als auch Änderungen des *de novo* mRNA-Levels quantifizieren. Desweiteren könnte die in Zebrafischlarven angewandte Technik zur *in vivo* Markierung neu synthetisierter Proteine [Hinz et al., 2012] verwendet werden, um zu untersuchen, ob sich durch die acetylierungsabhängigen Prozesse auf Expressionsebene auch Veränderungen in der Menge translatierter Proteine zeigen.

5. Zusammenfassung

Abhängig von der Trainingsstärke werden unterschiedlich stabile Gedächtnisse induziert. In dieser Arbeit sollte geklärt werden, ob verschieden starke Trainingsprozesse zu unterschiedlichen lerninduzierten Histonacetylierungen und Transkriptionsprozessen führen. Mit immunologischen Nachweisverfahren konnte gezeigt werden, dass starkes und schwaches Training unterschiedliche dynamische Änderungen der Histonacetylierung induzieren. Die Rolle der unterschiedlichen Dynamik der Histonacetylierung beim Lernen konnte durch pharmakologische Manipulation chromatinmodifizierender Enzyme in Verhaltensexperimenten bestätigt werden. Mit einer in der Honigbiene neu etablierten Methode zur Markierung neu synthetisierter RNA *in vivo* konnte erstmalig gezeigt werden, dass es nach schwachem Training tatsächlich zu Veränderungen auf Expressionsebene kommt. Mittels Hochdurchsatz-Sequenzierung wurden Gene identifiziert, deren Expressionsmenge sich nach starkem und schwachem Training unterscheidet.

Insgesamt konnte gezeigt werden, dass durch schwaches Training transkriptionsabhängige Prozesse induziert werden, die eine langfristige Speicherung der gelernten Information aktiv verhindern.

6. Summary

Different training procedures induce memories which differ in their stability, correspondingly. Whether these training procedures induce differences in learning induced histone acetylation and transcription processes was to be clarified within this work. Using immunological assays it could be demonstrated that strong and weak training lead to different changes in histone acetylation. The contribution of the different learning induced dynamics in histone acetylation was demonstrated by pharmacological manipulation of chromatin modifying enzymes in behavioral experiments. The application of a newly established method to label *de novo* synthesized RNA in the honeybee *in vivo* demonstrated for the first time that weak training indeed causes changes at the level of gene expression. Furthermore, using high-throughput sequencing, “memory-genes” were identified that differ in their expression depending on training procedure.

Overall, it was shown that transcription dependent processes by weak training are induced to prevent a long term storage of learned information actively.

Literaturverzeichnis

1. Abe K, Ishigami T, Shyu AB, Ohno S, Umemura S, Yamashita A. (2012): *Analysis of interferon-beta mRNA stability control after poly(I:C) stimulation using RNA metabolic labeling by ethynyluridine*. *Biochem Biophys Res Commun* 428(1): 44-49.
2. Abel, T., Martin, K.C., Bartsch, D., Kandel, E.R. (1998): *Memory suppressor genes: inhibitory constraints on the storage of long-term memory*. *Science* 279(5349): 338-341.
3. Abel, T., Nguyen, P.V., Barad, M., Deuel, T.A.S., Kandel, E.R., Bourtchouladze, R. (1997): *Genetic demonstration of a role for PKA in the late phase of LTP and in hippocampus-based long-term memory*. *Cell* 88: 615–626
4. Alarcón, J.M., Malleret, G., Touzani, K., Vronskaya, S., Ishii, S., Kandel, E.R., Barco, A. (2004): *Chromatin acetylation, memory, and LTP are impaired in CBP^{+/-} mice: a model for the cognitive deficit in Rubinstein-Taybi syndrome and its amelioration*. *Neuron* 42(6): 947-959.
5. Allfrey VG, Faulkner R, Mirsky AE (1964): *Acetylation and methylation of histones and their possible role in the regulation of RNA synthesis*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 51: 786-794.
6. Allfrey VG (1970): *Changes in chromosomal proteins at times of gene activation*. *Fed Proc* 29(4): 1447-1460.
7. Allis, C.D., Chicoine, L.G., Richman, R., Schulman, I.G. (1985): *Deposition-related histone acetylation in micronuclei of conjugating Tetrahymena*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 82(23): 8048-8052.
8. Armitage, B.A. (2011): *Imaging of RNA in live cells*. *Curr Opin Chem Biol.* 15(6): 806-812.
9. Bacskai, B.J., Hochner, B., Mahaut-Smith, M., Adams, S.R., Kaang, B.K., Kandel, E.R., Tsien, R.Y. (1993): *Spatially resolved dynamics of cAMP and protein kinase A subunits in Aplysia sensory neurons*. *Science* 260(5105): 222-226.
10. Balasubramanyam, K., Swaminathan, V., Ranganathan, A., Kundu, T.K. (2003): *Small molecule modulators of histone acetyltransferase p300*. *J Biol Chem* 278(21): 19134-19140.
11. Balasubramanyam, K., Altaf, M., Varier, R.A., Swaminathan, V., Ravindran, A., Sadhale, P.P., Kundu, T.K. (2004): *Polyisoprenylated benzophenone, garcinol,*

- a natural histone acetyltransferase inhibitor, represses chromatin transcription and alters global gene expression.* J Biol Chem 279(32): 33716-33726.
12. Balasubramanyam, K., Varier, R.A., Altaf, M., Swaminathan, V., Siddappa, N.B., Ranga, U., Kundu, T.K. (2004): *Curcumin, a novel p300/CREBbinding protein- specific inhibitor of acetyltransferase, represses the acetylation of histone/nonhistone proteins and histone acetyltransferasedependent chromatin transcription.* J Biol Chem 279(49): 51163-51171.
 13. Bannister, A.J., Kouzarides, T. (1996): *The CBP co-activator is a histone acetyltransferase.* Nature 384(6610): 641-643.
 14. Bailey, C.H., Kandel, E.R. (1993): Structural changes accompanying memory storage. Annu Rev Physiol 55: 397-426.
 15. Barrett, R.M., Malvaez, M., Kramar, E., Matheos, D.P., Arrizon, A., Cabrera, S.M., Lynch, G., Greene, R.W., Wood, M.A. (2011): *Hippocampal focal knock-out of CBP affects specific histone modifications, long-term potentiation, and long-term memory.* Neuropsychopharmacology 36(8): 1545-1556. Becker, P.B., Hörz, W. (2002): *ATP-dependent nucleosome remodeling.* Annu Rev Biochem 71: 247-273.
 16. Berezniuk, I., Vu, H.T., Lyons, P.J., Sironi, J.J., Xiao, H., Burd, B., Setou, M., Angeletti, R.H., Ikegami, K., Fricker, L.D. (2012): *Cytosolic carboxypeptidase 1 is involved in processing α - and β -tubulin.* J Biol Chem 287(9): 6503-6517.
 17. Berger, S.L. (2007): *The complex language of chromatin regulation during transcription.* Nature 447(7143): 407-412.
 18. Berndsen, C.E., Albaugh, B.N., Tan, S., Denu, J.M. (2007): *Catalytic mechanism of a MYST family histone acetyltransferase.* Biochemistry 46(3): 623-629.
 19. Bernier, L., Castellucci, V.F., Kandel, E.R., Schwartz, J.H. (1982): *Facilitatory transmitter causes a selective and prolonged increase in adenosine 3':5'-monophosphate in sensory neurons mediating the gill and siphon withdrawal reflex in Aplysia.* J Neurosci 2(12): 1682-1691.
 20. Bevilaqua, L.R., Medina, J.H., Izquierdo, I., Cammarota, M. (2005): *Memory consolidation induces NMDA receptor- and CaMKII- dependent modifications in AMPA receptor properties.* Neuroscience 136(2): 397-403.
 21. Biederman, I. (1987): *Recognition-by-components: a theory of human image understanding.* Psychol Rev 94(2): 115-147.

22. Biel, M., Wascholowski, V., Giannis, A. (2005): *Epigenetics--an epicentre of gene regulation: histones and histone-modifying enzymes*. *Angew Chem Int Ed Engl* 44(21): 3186-3216.
23. Bitterman, M.E., Menzel, R., Fietz, A., Schäfer, S. (1983): *Classical conditioning of proboscis extension in honeybees (Apis mellifera)*. *J Comp Psychol* 97(2): 107-119.
24. Blokland, A., Schreiber, R., Prickaerts, J. (2006): *Improving memory: a role for phosphodiesterases*. *Curr Pharm Des* 12(20): 2511-2523.
25. Böhme, G.A., Bon, C., Lemaire, M., Reibaud, M., Piot, O., Stutzmann, J.M., Doble, A., Blanchard, J.C. (1993): *Altered synaptic plasticity and memory formation in nitric oxide synthase inhibitor-treated rats*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90(19):9191-9194.
26. Bolden, J.E., Peart, M.J., Johnstone, R.W. (2006): *Anticancer activities of histone deacetylase inhibitors*. *Nat Rev Drug Discov* 5(9): 769-784.
27. Bourtchuladze, R., Frenguelli, B., Blendy, J., Cioffi, D., Schutz, G., Silva, A.J. (1994): *Deficient long-term memory in mice with a targeted mutation of the cAMP-responsive element-binding protein*. *Cell* 79(1): 59-68.
28. Bourtchouladze, R., Lidge, R., Catapano, R., Stanley, J., Gossweiler, S., Romashko, D., Scott, R., Tully, T. (2003): *A mouse model of Rubinstein–Taybi syndrome: defective long-term memory is ameliorated by inhibitors of phosphodiesterase 4*. *Proc Natl Acad Sci USA* 100: 10518–10522.
29. Brady G., Iscove, N.N. (1993): *Construction of cDNA libraries from single cells*. *Methods Enzymol* 225: 611-623.
30. Bredy, T.W., Wu, H., Crego, C., Zellhoefer, J., Sun, Y.E., Barad, M. (2007): *Histone modifications around individual BDNF gene promoters in prefrontal cortex are associated with extinction of conditioned fear*. *Learn Mem* 14(4): 268-276.
31. Bredy, T.W., Barad, M. (2008): *The histone deacetylase inhibitor valproic acid enhances acquisition, extinction, and reconsolidation of conditioned fear*. *Learn Mem* 15(1): 39-45.

32. Brush, M.H., Guardiola, A., Connor, J.H., Yao, T.P., Shenolikar, S. (2004): *Deacetylase inhibitors disrupt cellular complexes containing protein phosphatases and deacetylases*. J Biol Chem 279(9): 7685-7691.
33. Bustin, S.A. (2002): *Quantification of mRNA using real-time reverse transcription PCR (RT-PCR): trends and problems*. J Mol Endocrinol 29(1): 23-39.
34. Byrne, J.H., Kandel, E.R. (1996): *Presynaptic facilitation revisited: state and time dependence*. J Neurosci 16(2):425-435.
35. Caron, C., Boyault, C., Khochbin, S. (2005): *Regulatory cross-talk between lysine acetylation and ubiquitination: role in the control of protein stability*. BioEssays 27: 408-415.
36. Castellucci, V.F., Kandel, E.R., Schwartz, J.H., Wilson, F.D., Naim, A.C., Greengard, P. (1980): *Intracellular injection of the catalytic subunit of cyclic AMP dependent protein kinase simulates facilitation of transmitter release underlying behavioral sensitization in Aplysia*. Proc Natl Acad Sci U S A 77(12): 7492-7496.
37. Chen, E., Proestou, G., Bourbeau, D., Wang, E. (2000): *Rapid up-regulation of peptide elongation factor EF-1alpha protein levels is an immediate early event during oxidative stress-induced apoptosis*. Exp Cell Res 259(1): 140-148.
38. Chen, G., Zou, X., Watanabe, H., van Deursen, J.M., Shen, J. (2010): *CREB binding protein is required for both short-term and long-term memory formation*. J Neurosci 30: 13066-13077.
39. Chen, H., Lin, R.J., Schiltz, R.L., Chakravarti, D., Nash, A., Nagy, L., Privalsky, M.L., Nakatani, Y., Evans, R.M. (1997): *Nuclear receptor coactivator ACTR is a novel histone acetyltransferase and forms a multimeric activation complex with P/CAF and CBP/p300*. Cell 90(3): 569-580.
40. Chevalier, J., Yi, J., Michel, O., Tang, X.M. (1997): *Biotin and digoxigenin as labels for light and electron microscopy in situ hybridization probes: where do we stand?* J Histochem Cytochem. 45(4): 481-491.
41. Chwang, W.B., O'Riordan, K.J., Levenson, J.M., Sweatt, J.D. (2006): *ERK/MAPK regulates hippocampal histone phosphorylation following contextual fear conditioning*. Learn Mem 13: 322–328.
42. Chwang, W.B., Arthur, J.S., Schumacher, A., Sweatt, J.D. (2007): *The nuclear kinase mitogen- and stress-activated protein kinase 1 regulates hippocampal chromatin remodeling in memory formation*. J Neurosci 27: 12732–12742.

43. Clements, A., Poux, A.N., Lo, W.S., Pillus, L., Berger, S.L., Marmorstein, R. (2003): *Structural basis for histone and phosphohistone binding by the GCN5 histone acetyltransferase*. Mol Cell 12(2): 461-473.
44. Close, P., Creppe, C., Gillard, M., Ladang, A., Chapelle, J.P., Nguyen, L., Charlot, A. (2010): *The emerging role of lysine acetylation of non-nuclear proteins*. Cell Mol Life Sci 67(8): 1255-1264.
45. Daujat, S., Bauer, U.M., Shah, V., Turner, B., Berger, S., Kouzarides, T. (2002): *Crosstalk between CARM1 methylation and CBP acetylation on histone H3*. Curr Biol 12(24): 2090-2097.
46. Dash, P.K., Hochner, B., Kandel, E.R. (1990): *Injection of the cAMP responsive element into the nucleus of Aplysia sensory neurons blocks long-term facilitation*. Nature 345(6277): 718-721.
47. Davie JR (1998): *Covalent modifications of histones: expression from chromatin templates*. Curr Opin Genet Dev 8:173-178.
48. de Boer, M.E., de Boer, T.E., Mariën, J., Timmermans, M.J., Nota, B., van Straalen, N.M., Ellers, J., Roelofs, D. (2009): *Reference genes for QRT-PCR tested under various stress conditions in Folsomia candida and Orchesella cincta (Insecta, Collembola)*. BMC Mol Biol 10: 54. doi: 10.1186/1471-2199-10-54.
49. de Forges, H., Bouissou, A., Perez, F. (2012): *Interplay between microtubule dynamics and intracellular organization*. Int J Biochem Cell Biol 44(2): 266-274.
50. Deguchi, T., Axelrod, J. (1972): *Induction and superinduction of serotonin N-acetyltransferase by adrenergic drugs and denervation in rat pineal organ*. Proc Natl Acad Sci U S A 69(8): 2208-2211.
51. DeLucca, F.L., Giorgini, J.F., Calabrese, A. (1974): *Effects of heat, urea and dimethylsulfoxide on ribosomal RNA of the honey bee (Apis mellifera L.)*. Experientia 30(2): 149-151.
52. Deisseroth, K., Bito, H., Tsien, R.W. (1996): *Signaling from synapse to nucleus: postsynaptic CREB phosphorylation during multiple forms of hippocampal synaptic plasticity*. Neuron 16(1): 89-101.
53. Dudai, Y., Jan, Y.N., Byers, D., Quinn, W.G., Benzer, S. (1976): *dunce, a mutant of Drosophila deficient in learning*. Proc Natl Acad Sci U S A 73(5): 1684-1688.

54. Ebbinghaus, H. (1885): *Über das Gedächtnis. Untersuchungen zur experimentellen Psychologie*. Duncker & Humblot
55. Fabian, M.R., Sonenberg, N. (2012): *The mechanics of miRNA-mediated gene silencing: a look under the hood of miRISC*. Nat Struct Mol Biol 19(6): 586-593.
56. Fancy, S.P., Glasgow, S.M., Finley, M., Rowitch, D.H., Deneen, B. (2012): *Evidence that nuclear factor IA inhibits repair after white matter injury*. Ann Neurol 72(2): 224-233.
57. Federman, N., Fustinana, M.S., Romano, A. (2009): *Histone acetylation is recruited in consolidation as a molecular feature of stronger memories*. Learn Mem 16: 600–606.
58. Federman, N., Fustinana, M.S., Romano, A. (2012): *Reconsolidation involves histone acetylation depending on the strength of the memory*. Neuroscience 219: 145-156.
59. Fin, C., da Cunha, C., Bromberg, E., Schmitz, P.K., Bianchin, M., Medina, J.H., Izquierdo, I. (1995): *Experiments suggesting a role for nitric oxide in the hippocampus in memory processes*. Neurobiol Learn Mem 63(2): 113-115.
60. Fioravante, D., Liu, R.Y., Byrne, J.H. (2008): *The ubiquitin-proteasome system is necessary for long-term synaptic depression in Aplysia*. J Neurosci 28: 10245–10256.
61. Fontán-Lozano, A., Romero-Granados, R., Troncoso, J., Múnera, A., Delgado-García, J.M., Carrión, A.M. (2008): *Histone deacetylase inhibitors improve learning consolidation in young and in KA-induced-neurodegeneration and SAMP-8-mutant mice*. Mol Cell Neurosci 39(2): 193-201
62. Friedrich, A., Thomas, U., Müller, U. (2004): *Learning at different satiation levels reveals parallel functions for the cAMP-protein kinase A cascade in formation of long-term memory*. J Neurosci 24(18): 4460-4468.
63. Garren, L.D., Howell, R.R., Tomkins, G.M., Crocco, R.M. (1984): *A paradoxical effect of Actinomycin D: The mechanism of regulation of enzyme synthesis by hydrocortisone*. Proc Natl Acad Sci U S A 52: 1121-1129.
64. Goldberg, I.H., Rabinowitz, M. (1962): *Actionmycin D inhibition of deoxyribonucleic acid-dependent synthesis of ribonucleic acid*. Science 136(3513): 315-316.
65. Gonzalez, G.A., Montminy, M.R. (1989): *Cyclic AMP stimulates somatostatin gene transcription by phosphorylation of CREB at serine 133*. Cell 59(4): 675-680.

66. Gräff, J., Kim, D., Dobbin, M.M., Tsai, L.H. (2011): *Epigenetic regulation of gene expression in physiological and pathological brain processes*. *Physiol Rev* 91(2): 603-649.
67. Grant, A.G., Flomen, R.M., Tizard, M.L., Grant, D.A. (1992): *Differential screening of a human pancreatic adenocarcinoma lambda gt11 expression library has identified increased transcription of elongation factor EF-1 alpha in tumour cells*. *Int J Cancer* 50(5): 740-745.
68. Gray, S.G., Ekström, T.J. (2001): *The human histone deacetylase family*. *Exp Cell Res* 262(2): 75-83.
69. Greengard, P., Valtorta, F., Czernik, A.J., Benfenati, F. (1993): *Synaptic vesicle phosphoproteins and regulation of synaptic function*. *Science* 259(5096): 780-785.
70. Gregoret, I.V., Lee, Y.M., Goodson, H.V. (2004): *Molecular evolution of the histone deacetylase family: functional implications of phylogenetic analysis*. *J Mol Biol* 338(1): 17-31.
71. Gross, S.R., Kinzy, T.G. (2005): *Translation elongation factor 1A is essential for regulation of the actin cytoskeleton and cell morphology*. *Nat Struct Mol Biol* 12(9): 772-778.
72. Grünbaum, L., Müller, U. (1998): *Induction of a specific olfactory memory leads to a long-lasting activation of protein kinase C in the antennal lobe of the honeybee*. *J Neurosci* 18: 4384-4392.
73. Guan, Z., Giustetto, M., Lomvardas, S., Kim, J.H., Miniaci, M.C., Schwartz, J.H., Thanos, D., Kandel, E.R. (2002): *Integration of long-term-memory-related synaptic plasticity involves bidirectional regulation of gene expression and chromatin structure*. *Cell* 111: 483-493.
74. Guan, J.S., Haggarty, S.J., Giacometti, E., Dannenberg, J.H., Joseph, N., Gao, J., Nieland, T.J., Zhou, Y., Wang, X., Mazitschek, R., Bradner, J.E., DePinho, R.A., Jaenisch, R., Tsai, L.H. (2009): *HDAC2 negatively regulates memory formation and synaptic plasticity*. *Nature* 459: 55-60.
75. Haberland, M., Montgomery, R.L., Olson, E.N. (2009): *The many roles of histone deacetylases in development and physiology: implications for disease and therapy*. *Nat Rev Genet* 10(1): 32-42.

76. Haider, S.R., Juan, G., Traganos, F., Darzynkiewicz, Z. (1997): *Immunoseparation and immunodetection of nucleic acids labeled with halogenated nucleotides*. Exp Cell Res 234(2): 498-506.
77. Hammer, M., Menzel, R. (1995): *Learning and memory in the honeybee*. J Neurosci 15(3 Pt 1): 1617-1630.
78. Haring, M., Offermann, S., Danker, T., Horst, I., Peterhansel, C., Stam, M. (2007): *Chromatin immunoprecipitation: optimization, quantitative analysis and data normalization*. Plant Methods 3:11.
79. Hart, A.K., Fioravante, D., Liu, R.Y., Phares, G.A., Cleary, L.J., Byrne, J.H. (2011): *Serotonin-mediated synapsin expression is necessary for long-term facilitation of the Aplysia sensorimotor synapse*. J Neurosci 31(50): 18401-18411.
80. Hawkins, R.D., Kandel, E.R., Bailey, C.H. (2006): *Molecular Mechanisms of Memory Storage in Aplysia*. Biol Bull 210(3): 174-191.
81. Hebb, D. (1949): *The Organization of Behavior: a neuropsychological approach*. New York: Wiley.
82. Hilgers, V., Lemke, S.B., Levine, M. (2012): *ELAV mediates 3' UTR extension in the Drosophila nervous system*. Genes Dev 26(20): 2259-2264.
83. Hinde, R. (1970): *Behavioral habituation* Cambridge Univ. Press (Short-Term Changes in Neural Activity and Behaviour): 3-41.
84. Holliday, R. (1999): *Is there an epigenetic component in long-term memory?* J Theor Biol 200(3): 339-341.
85. Honeybee Genome Sequencing Consortium (2006): *Insights into social insects from the genome of the honeybee Apis mellifera*. Nature 443(7114): 931-949.
86. Hubbert, C., Guardiola, A., Shao, R., Kawaguchi, Y., Ito, A., Nixon, A., Yoshida, M., Wang, X.F., Yao, T.P. (2002): *HDAC6 is a microtubule-associated deacetylase*. Nature 417(6887): 455-458.
87. Huggett, J., Dheda, K., Bustin, S., Zumla, A. (2005): *Real-time RT-PCR normalisation; strategies and considerations*. Genes Immun 6(4): 279-284.
88. Izquierdo, L.A., Barros, D.M., Vianna, M.R., Coitinho, A., deDavid e Silva, T., Choi, H., Moletta, B., Medina, J.H., Izquierdo, I. (2002): *Molecular pharmacological dissection of short- and long-term memory*. Cell Mol Neurobiol 22(3): 269-287.
89. Jao, C.Y., Salic, A. (2008): *Exploring RNA transcription and turnover in vivo by using click chemistry*. Proc Natl Acad Sci U S A 105(41): 15779-15784.

90. Jarvie, T., Harkins, T. (2008): *Transcriptome sequencing with the Genome Sequencer FLX system*. Nature Methods: 6-8
91. Jenuwein, T., Allis, C.D. (2001): *Translating the histone code*. Science 293(5532): 1074-1080.
92. Jin Q, Yu L, Wang L, Zhang Z, Kasper L et al. (2011) *Distinct roles of GCN5/PCAF mediated H3K9ac and CBP/p300-mediated H3K18/27ac in nuclear receptor transactivation*. EMBO 30: 249-262.
93. Kaang, B.K., Kandel, E.R., Grant, S.G. (1993): *Activation of cAMP responsive genes by stimuli that produce long-term facilitation in Aplysia sensory neurons*. Neuron 10(3): 427-435.
94. Kageyama, S., Nagata, M., Aoki, F. (2004): *Isolation of nascent messenger RNA from mouse preimplantation embryos*. Biol Reprod 71(6): 1948-1955.
95. Kamei, Y., Xu, L., Heinzl, T., Torchia, J., Kurokawa, R., Gloss, B., Lin, S.C., Heyman, R.A., Rose, D.W., Glass, C.K., Rosenfeld, M.G. (1996): *A CBP integrator complex mediates transcriptional activation and AP-1 inhibition by nuclear receptors*. Cell 85(3): 403-414.
96. Kandel, E.R., Spencer, W.A. (1968): *Cellular neurophysiological approaches in the study of learning*. Physiol Rev 48(1): 65-134.
97. Kandel, E.R., Squire, L.R. (1999): *Gedächtnis. Die Natur des Erinnerns*. Spektrum akademischer Verlag GmbH.
98. Kawasaki, H., Schiltz, L., Chiu, R., Itakura, K., Taira, K., Nakatani, Y., Yokoyama, K.K. (2000): *ATF-2 has intrinsic histone acetyltransferase activity which is modulated by phosphorylation*. Nature 405(6783): 195-200.
99. Kimble, G. A. *Hilgard and Marquis' Conditioning and Learning*. New York: AppletonCentury-Crofts, 1961.
100. Klein, M., Kandel, E.R. (1980): *Mechanism of calcium current modulation underlying presynaptic facilitation and behavioral sensitization in Aplysia*. Proc Natl Acad Sci USA 77(11): 6912-6916.
101. Knöll, B., Nordheim, A. (2009): *Functional versatility of transcription factors in the nervous system: the SRF paradigm*. Trends Neurosci 32(8): 432-442.
102. Kogan, J., Frankland, P.W., Blendy, J.B., Coblenz, J., Marowitz, Z., Schütz, G., Silva, A.J. (1996): *Spaced training induces normal long-term memory in CREB mutant mice*. Curr Biol 7: 1-11

103. Kornberg, R.D. (1974): *Chromatin structure: a repeating unit of histones and DNA*. Science 184(4139): 868-871.
104. Korzus, E., Rosenfeld, M.G., Mayford, M. (2004): *CBP histone acetyltransferase activity is a critical component of memory consolidation*. Neuron 42(6): 961-972.
105. Koshibu, K., Gräff, J., Beullens, M., Heitz, F.D., Berchtold, D., Russig, H., Farinelli, M., Bollen, M., Mansuy, I.M. (2009): *Protein phosphatase 1 regulates the histone code for long-term memory*. J Neurosci 29: 13079–13089.
106. Kovacs, J.J., Murphy, P.J., Gaillard, S., Zhao, X., Wu, J.T., Nicchitta, C.V., Yoshida, M., Toft, D.O., Pratt, W.B., Yao, T.P. (2005): *HDAC6 regulates Hsp90 acetylation and chaperone-dependent activation of glucocorticoid receptor*. Mol Cell 18(5): 601-607.
107. Krieg, P.A., Varnum, S.M., Wormington, W.M., Melton, D.A. (1989): *The mRNA encoding elongation factor 1-alpha (EF-1 alpha) is a major transcript at the mid-blastula transition in Xenopus*. Dev Biol 133(1): 93-100.
108. Kuo, M.H., Allis, C.D. (1998): *Roles of histone acetyltransferases and deacetylases in gene regulation*. Bioessays 20(8): 615-626.
109. Kurdistani SK, Tavazoie S, Grunstein M. (2004): *Mapping global histone acetylation patterns to gene expression*. Cell 117(6): 721-733.
110. Kuwabara, M. (1957): *Bildung des bedingten Reflexes von Pavlovs Typus bei der Honigbiene, Apis mellifica*. J Fac Sci Hokkaido Univ Ser VI Zool 13: 458-464.
111. Laird, P.W. (2003): *The power and the promise of DNA methylation markers*. Nat Rev Cancer 3(4): 253-266.
112. Lattal, K.M., Barrett, R.M., Wood, M.A. (2007): *Systemic or intrahippocampal delivery of histone deacetylase inhibitors facilitates fear extinction*. Behav Neurosci 121(5): 1125-1131.
113. Leipe, D.D., Landsman, D. (1997): *Histone deacetylases, acetoin utilization proteins and acetylpolyamine amidohydrolases are members of an ancient protein superfamily*. Nucleic Acids Res 25(18): 3693-3697.
114. Levenson, J.M., O’Riordan, K.J., Brown, K.D., Trinh, M.A., Molfese, D.L., Sweatt, J.D. (2004): *Regulation of histone acetylation during memory formation in the hippocampus*. J Biol Chem 279: 40545–40559.

115. Levenson, J.M., Sweatt, J.D. (2006): *Epigenetic mechanisms: a common theme in vertebrate and invertebrate memory formation*. Cell Mol Life Sci 63: 1009-1016.
116. Li, W., Tully, T., Kalderon, D. (1996): *Effects of a conditional Drosophila PKA mutant on olfactory learning and memory*. Learn Mem 2(6): 320-333.
117. Li, Y., Zhang, X., Polakiewicz, R.D., Yao, T.P., Comb, M.J. (2008): *HDAC6 is required for epidermal growth factor-induced beta-catenin nuclear localization*. J Biol Chem 283(19): 12686-12690.
118. Lin, S., Coutinho-Mansfield, G., Wang, D., Pandit, S., Fu, X.D. (2008): *The splicing factor SC35 has an active role in transcriptional elongation*. Nat Struct Mol Biol 15(8): 819-826.
119. Ling, D., Salvaterra, P.M. (2011): *Robust RT-qPCR data normalization: validation and selection of internal reference genes during post-experimental data analysis*. PLoS One 6(3): e17762. doi: 10.1371/journal.pone.0017762.
120. Liu, L., Scolnick, D.M., Trievel, R.C., Zhang, H.B., Marmorstein, R., Halazonetis, T.D., Berger, S.L. (1999): *p53 sites acetylated in vitro by PCAF and p300 are acetylated in vivo in response to DNA damage*. Mol Cell Biol 19(2): 1202-1209.
121. Livingstone, M.S., Sziber, P.P., Quinn, W.G. (1984): *Loss of calcium/calmodulin responsiveness in adenylate cyclase of rutabaga, a Drosophila learning mutant*. Cell 37(1): 205-215.
122. Lonze, B.E., Ginty, D.D. (2002): *Function and regulation of CREB family transcription factors in the nervous system*. Neuron 35(4): 605-623.
123. Lubin, F.D., Sweatt, J.D. (2007): *The I κ B kinase regulates chromatin structure during reconsolidation of conditioned fear memories*. Neuron 55: 942–957.
124. Luk, C.C., Naruo, H., Prince, D., Hassan, A., Doran, S.A., Goldberg, J.I., Syed, N.I. (2011): *A novel form of presynaptic CaMKII-dependent short-term potentiation between Lymnaea neurons*. Eur J Neurosci 34(4): 569-577.
125. MacRae, T.H. (1997): *Tubulin post-translational modifications--enzymes and their mechanisms of action*. Eur J Biochem 244(2): 265-278.
126. Mai, A., Rotili, D., Tarantino, D., Ornaghi, P., Tosi, F., Vicidomini, C., Sbardella, G., Nebbioso, A., Miceli, M., Altucci, L., Filetici, P. (2006): *Small-molecule inhibitors of histone acetyltransferase activity: identification and biological properties*. J Med Chem 49(23): 6897-6907.

127. Mansuy, I.M., Shenolikar, S. (2006): *Protein serine/threonine phosphatases in neuronal plasticity and disorders of learning and memory*. Trends Neurosci 29(12): 679-686.
128. Marmorstein, R. (2001): *Structure and function of histone acetyltransferases*. Cell Mol Life Sci 58(5-6): 693-703.
129. Marmorstein, R. (2004): *Biochemical and structural characterization of recombinant histone acetyltransferase proteins*. Methods Enzymol 376: 106-119.
130. Mateyak, M.K., Kinzy, T.G. (2010): *eEF1A: thinking outside the ribosome*. J Biol Chem 285(28): 21209-21213.
131. Matzke, M.A., Birchler, J.A. (2005): *RNAi-mediated pathways in the nucleus*. Nat Rev Genet 6: 24-35
132. Maurice, T., Duclot, F., Meunier, J., Naert, G., Givalois, L., Meffre, J., Célérier, A., Jacquet, C., Copois, V., Mechti, N., Ozato, K., Gongora, C. (2008): *Altered memory capacities and response to stress in p300/CBP-associated factor (PCAF) histone acetylase knockout mice*. Neuropsychopharmacology 33: 1584–1602.
133. Mayford, M., Siegelbaum, S.A., Kandel, E.R. (2012): *Synapses and memory storage*. Cold Spring Harb Perspect Biol 4(6)
134. McQuown, S.C., Barrett, R.M., Matheos, D.P., Post, R.J., Rogge, G.A., Alenghat, T., Mullican, S.E., Jones, S., Rusche, J.R., Lazar, M.A., Wood, M.A. (2011): *HDAC3 is a critical negative regulator of long-term memory formation*. J Neurosci 31(2): 764-774
135. McQuown, S.C., Wood, M.A. (2011): *HDAC3 and the molecular brake pad hypothesis*. Neurobiol Learn Mem 96(1): 27-34.
136. Menzel, R. (2001): *Searching for the memory trace in a mini-brain, the honeybee*. Learn Mem 8(2): 53-62.
137. Michels, B., Chen, Y.C., Saumweber, T., Mishra, D., Tanimoto, H., Schmid, B., Engmann, O., Gerber, B. (2011): *Cellular site and molecular mode of synapsin action in associative learning*. Learn Mem 18(5): 332-344.
138. Montarolo, P.G., Goelet, P., Castelucci, V.F., Morgan, J., Kandel, E.R., Schacher, S. (1986): *A critical period for macromolecular synthesis in long-term heterosynaptic facilitation in Aplysia*. Science 234: 1249–1254
139. Müller, U. (1996): *Inhibition of Nitric Oxide Synthase Impairs a Distinct Form of Long-Term Memory in the Honeybee, Apis mellifera*. Neuron 16(3): 541-549.

140. Müller, U. (2000): *Prolonged activation of cAMP-dependent protein kinase during conditioning induces long-term memory in honeybees*. *Neuron* 27(1): 159-168.
141. Munshi, R., Kandl, K.A., Carr-Schmid, A., Whitacre, J.L., Adams, A.E., Kinzy, T.G. (2001): *Overexpression of translation elongation factor 1A affects the organization and function of the actin cytoskeleton in yeast*. *Genetics* 157(4): 1425-1436.
142. Newton, R., Adcock, I.M., Barnes, P.J. (1996): *Superinduction of NF-kappa B by actinomycin D and cycloheximide in epithelial cells*. *Biochem Biophys Res Commun* 218(2): 518-23.
143. Nolan, T., Hands, R.E., Bustin, S.A. (2006): *Quantification of mRNA using real-time RT-PCR*. *Nat Protoc* 1(3): 1559-1582.
144. Ogryzko, V.V., Schiltz, R.L., Russanova, V., Howard, B.H., Nakatani, Y. (1996): *The transcriptional coactivators p300 and CBP are histone acetyltransferases*. *Cell* 87(5): 953-959.
145. Oike, Y., Hata, A., Mamiya, T., Kaname, T., Noda, Y., Suzuki, M., Yasue, H., Nabeshima, T., Araki, K., Yamamura, K., (1999): *Truncated CBP protein leads to classical Rubinstein–Taybi syndrome phenotypes in mice: implications for a dominant negative mechanism*. *Hum Mol Genet* 8: 387–396.
146. Oliveira, A.M., Wood, M.A., McDonough, C.B., Abel, T. (2007): *Transgenic mice expressing an inhibitory truncated form of p300 exhibit long-term memory deficits*. *Learn Mem* 14: 564–572.
147. Oyer, J.A., Yates, P.A., Godsey, S., Turker, M.S. (2011): *Aberrantly silenced promoters retain a persistent memory of the silenced state after long-term reactivation*. *Mutat Res* 706(1-2): 21-27.
148. Palmiter, R.D., Schimke, R.T. (1973): *Regulation of protein synthesis in chick oviduct. Mechanism of ovalbumin "superinduction" by actinomycin D*. *J Biol Chem* 248(5): 1502-1512.
149. Parasramka, M.A., Ali, S., Banerjee, S., Deryavoush, T., Sarkar, F.H., Gupta, S. (2013): *Garcinol sensitizes human pancreatic adenocarcinoma cells to gemcitabine in association with microRNA signatures*. *Mol Nutr Food Res* 57(2): 235-248
150. Paredes, E., Evans, M., Das, S.R. (2011): *RNA labeling, conjugation and ligation*. *Methods*. 54(2): 251-259.

151. Pavlov, I.P. (1927): *Conditioned Reflexes: An Investigation of the Physiological Activity of the Cerebral Cortex*. London: Oxford University Press.
152. Pittenger, C., Huang, Y.Y., Paletzki, R.F., Bourtchouladze, R., Scanlin, H., Vronskava, S., Kandel, E.R. (2002): *Reversible inhibition of CREB/ATF transcription factors in region CA1 of the dorsal hippocampus disrupts hippocampus-dependent spatial memory*. *Neuron* 34(3): p. 447-462.
153. Pham, H., Ferrari, R., Cokus, S.J., Kurdistani, S.K., Pellegrini, M. (2007): *Modeling the regulatory network of histone acetylation in Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Syst Biol* 3(153): 1-10.
154. Poux, A.N., Marmorstein, R. (2003): *Molecular basis for Gcn5/PCAF histone acetyltransferase selectivity for histone and nonhistone substrates*. *Biochemistry* 42(49): 14366-14374.
155. Rajendran, R., Garva, R., Krstic-Demonacos, M., Demonacos, C. (2011): *Sirtuins: Molecular Traffic Lights in the Crossroad of Oxidative Stress, Chromatin Remodeling, and Transcription*. *J Biomed Biotechnol*. doi:10.1155/2011/368276.
156. Rall, T.W., Sutherland, E.W. (1961): *The regulatory role of adenosine-3',5'-phosphate*. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 26: 347-354.
157. Robertson, K.D., Wolffe, A.P. (2000): *DNA methylation in health and disease*. *Nat Rev Genet* 1(1): 11-19.
158. Rogowski, K., van Dijk, J., Magiera, M.M., Bosc, C., Deloulme, J.C., Bosson, A., Peris, L., Gold, N.D., Lacroix, B., Grau, M.B., Bec, N., Larroque, C., Desagher, S., Holzer, M., Andrieux, A., Moutin, M.J., Janke, C. (2010): *A family of protein-deglutamylating enzymes associated with neurodegeneration*. *Cell* 143(4): 564-578.
159. Rojas, J.R., Trievel, R.C., Zhou, J., Mo, Y., Li, X., Berger, S.L., Allis, C.D., Marmorstein, R. (1999): *Structure of Tetrahymena GCN5 bound to coenzyme A and a histone H3 peptide*. *Nature* 401(6748): 93-98.
160. Rothberg, J.M., Leamon, J.H. (2008): *The development and impact of 454 sequencing*. *Nature Biotech* 26(10): 1117-1124.
161. Ruiz-Carrillo, A., Wangh, L.J., Allfrey, V.G. (1975): *Processing of newly synthesized histone molecules*. *Science* 190(4210): 117-128.
162. Russo, V.E.A., Martienssen, R.A., Riggs, A.D. (1996): *Epigenetic Mechanisms of Gene Regulation*. Cold Spring Harbour Laboratory Press

163. Sadoul, K., Boyault, C., Pabion, M., Khochbin, S. (2007): *Regulation of protein turnover by acetyltransferases and deacetylases*. Biochimie 90: 306-312.
164. Sajikumar, S., Li, Q., Abraham, W.C., Xiao, Z.C. (2009): *Priming of short-term potentiation and synaptic tagging/capture mechanisms by ryanodine receptor activation in rat hippocampal CA1*. Learn Mem 16(3): 178-186.
165. Sanders, J., Maassen, J.A., Möller, W. (1992): *Elongation factor-1 messenger-RNA levels in cultured cells are high compared to tissue and are not drastically affected further by oncogenic transformation*. Nucleic Acids Res 20(22): 5907-5910.
166. Schoppee Bortz, P.D., Wamhoff, B.R. (2011): *Chromatin immunoprecipitation (ChIP): revisiting the efficacy of sample preparation, sonication, quantification of sheared DNA, and analysis via PCR*. PLoS One 6(10): e26015. doi: 10.1371/journal.pone.0026015.
167. Schwärzel, M., Müller, U. (2006): *Dynamic memory networks: dissecting molecular mechanisms underlying associative memory in the temporal domain*. Cell Mol Life Sci 63(9): 989-998.
168. Sharma, S.K. (2010): *Protein acetylation in synaptic plasticity and memory*. Neurosci Biobehav Rev 34(8): 1234-1240.
169. Sherrington C.S. (1906) *The Integrative Action of the Nervous System* Charles Scribner's Sons
170. Siegelbaum, S.A., Camardo, J.S., Kandel, E.R. (1982): *Serotonin and cyclic AMP close single K⁺ channels in Aplysia sensory neurones*. Nature 299(5882): 413-417.
171. Silva, A.J., Kogan, J.H., Frankland, P.W., Kida, S. (1998): *CREB and memory*. Annu Rev Neurosci 21:127-148.
172. Spange S, Wagner T, Heinzl T, Krämer OH. (2009): *Acetylation of non-histone proteins modulates cellular signalling at multiple levels*. Int J Biochem Cell Biol 41(1): 185-198.
173. Specht, C.G., Triller, A. (2008): *The dynamics of synaptic scaffolds*. Bioessays 30(11-12): 1062-1074.
174. Squire L.R. (1986): *Mechanisms of memory*. Science 232(4758): 1612-1619.
175. Steinberg, R.A., Levinson, B.B., Tomkins, G.M. (1975): *"Superinduction" of tyrosine aminotransferase by actinomycin D: a reevaluation*. Cell 5(1): 29-35.

176. Sterner, D.E., Berger, S.L. (2000): *Acetylation of histones and transcription - related factors*. Microbiol Mol Biol Rev 64(2): 435-459.
177. Stimson, L., Rowlands, M.G., Newbatt, Y.M., Smith, N.F., Raynaud, F.I., Rogers, P., Bavetsias, V., Gorsuch, S., Jarman, M., Bannister, A., Kouzarides, T., McDonald, E., Workman, P., Aherne, G.W. (2005): *Isothiazolones as inhibitors of PCAF and p300 histone acetyltransferase activity*. Mol Cancer Ther 4(10):1521-1532.
178. Sutton, M.A., Masters, S.E., Bagnall, M.W., Carew, T.J. (2001): *Molecular mechanisms underlying a unique intermediate phase of memory in aplysia*. Neuron 31(1): 143-154.
179. Suzuki, A., Fukushima, H., Mukawa, T., Toyoda, H., Wu, L.J., Zhao, M.G., Xu, H., Shang, Y., Endoh, K., Iwamoto, T., Mamiya, N., Okano, E., Hasegawa, S., Mercaldo, V., Zhang, Y., Maeda, R., Ohta, M., Josselyn, S.A., Zhuo, M., Kida, S. (2011): *Upregulation of CREB-mediated transcription enhances both short- and long-term memory*. J Neurosci 31: 8786-8802.
180. Tabor, S., Boyle, A. (2001): *Enzymatic labeling of nucleic acids*. Curr Protoc Immunol. Chapter 10:Unit 10.10.
181. Temsamani, J., Agrawal, S. (1996): *Enzymatic labeling of nucleic acids*. Mol Biotechnol. 5(3): 223-232.
182. Thompson, P.R., Kurooka, H., Nakatani, Y., Cole, P.A. (2001): *Transcriptional coactivator protein p300. Kinetic characterization of its histone acetyltransferase activity*. J Biol Chem 276(36): 33721-33729.
183. Tsankova, N.M., Berton, O., Renthal, W., Kumar, A., Neve, R.L., Nestler, E.J. (2006): *Sustained hippocampal chromatin regulation in a mouse model of depression and antidepressant action*. Nat Neurosci 9(4): 519-525.
184. Tully, T., Preat, T., Boynton, S.C., Del Vecchio, M. (1994): *Genetic dissection of consolidated memory in Drosophila*. Cell 79(1): 35-47.
185. Turner BM (1991): *Histone acetylation and control of gene expression*. J Cell Sci 99: 13-20.
186. Uetsuki, T., Naito, A., Nagata, S., Kaziro, Y. (1989): *Isolation and characterization of the human chromosomal gene for polypeptide chain elongation factor-1 alpha*. J Biol Chem 264(10): 5791-5798.
187. VanGuilder, H.D., Vrana, K.E., Freeman, W.M. (2008): *Twenty-five years of quantitative PCR for gene expression analysis*. Biotechniques 44(5): 619-626.

188. Vecsey, C.G., Hawk, J.D., Lattal, K.M., Stein, J.M., Fabian, S.A., Attner, M.A., Cabrera, S.M., McDonough, C.B., Brindle, P.K., Abel, T., Wood, M.A. (2007): *Histone deacetylase inhibitors enhance memory and synaptic plasticity via CREB:CBP-dependent transcriptional activation*. J Neurosci 27: 6128–6140.
189. Voegel, J.J., Heine, M.J., Zechel, C., Chambon, P., Gronemeyer, H. (1996): *TIF2, a 160 kDa transcriptional mediator for the ligand-dependent activation function AF-2 of nuclear receptors*. EMBO J 15(14): 3667-3675.
190. Wang, H., Feng, R., Phillip Wang, L., Li, F., Cao, X., Tsien, J.Z. (2008): *CaMKII activation state underlies synaptic labile phase of LTP and short-term memory formation*. Curr Biol 18(20): 1546-1554.
191. Wang, W.S., Kang, S., Liu, W.T., Li, M., Liu, Y., Yu, C., Chen, J., Chi, Z.Q., He, L., Liu, J.G. (2012): *Extinction of aversive memories associated with morphine withdrawal requires ERK-mediated epigenetic regulation of brain-derived neurotrophic factor transcription in the rat ventromedial prefrontal cortex*. J Neurosci 32(40): 13763-13775.
192. Wang L, Ruiz-Carrillo A, Allfrey VG (1972): *Separation and analysis of histone subfractions differing in their degree of acetylation: some correlations with genetic activity in development*. Arch Biochem Biophys 150(1): 44-56.
193. Whitfield, C.W., Cziko, A., Robinson, G.E. (2003): *Gene Expression Profiles in the Brain Predict Behavior in Individual Honey Bees*. Science 302(5643): 296-299
194. Witthöft, W. (1967): *The total number and distribution of cellular elements in the brain of the honeybee*. Z Morph Tiere 61: 160-184.
195. Wood, M.A., Kaplan, M.P., Park, A., Blanchard, E.J., Oliveira, A.M., Lombardi, T.L., Abel, T. (2005): *Transgenic mice expressing a truncated form of CREB-binding protein (CBP) exhibit deficits in hippocampal synaptic plasticity and memory storage*. Learn Mem 12: 111–119.
196. Woolf, N.J. (2006): *Microtubules in the cerebral cortex: Role in memory and consciousness*. In: Tuszynski JA, editor. *The emerging physics of consciousness*. Springer Berlin Heidelberg: 49–94.
197. Wüstenberg, D., Gerber, B., Menzel, R. (1998): *Long- but not medium-term retention of olfactory memories in honeybees is impaired by actinomycin D and anisomycin*. Eur J Neurosci 10(8): 2742-2745.

198. Xu, W.S., Parmigiani, R.B., Marks, P.A. (2007): *Histone deacetylase inhibitors: molecular mechanisms of action*. *Oncogene* 26(37): 5541-5552.
199. Yan, Y., Harper, S., Speicher, D.W., Marmorstein, R. (2002): The catalytic mechanism of the ESA1 histone acetyltransferase involves a self-acetylated intermediate. *Nat Struct Biol* 9(11): 862-869.
200. Yang, F., Demma, M., Warren, V., Dharmawardhane, S., Condeelis, J. (1990): *Identification of an actin-binding protein from Dictyostelium as elongation factor 1a*. *Nature* 347(6292): 494-496.
201. Yao, K.M., Samson, M.L., Reeves, R., White, K. (1993): *Gene elav of Drosophila melanogaster: a prototype for neuronal-specific RNA binding protein gene family that is conserved in flies and humans*. *J Neurobiol* 24(6): 723-739.
202. Yin, J.C., Wallach, J.S., Vecchio, M.D., Wilder, E.L., Zhou, H., Quinn, W.G., Tully, T. (1994): *Induction of a dominant negative CREB transgene specifically blocks long-term memory in Drosophila*. *Cell* 79(1): 49-58.
203. Zhao, Z., Fan, L., Fortress, A.M., Boulware, M.I., Frick, K.M. (2012): *Hippocampal histone acetylation regulates object recognition and the estradiol-induced enhancement of object recognition*. *J Neurosci* 32(7): 2344-2351.
204. Zhou, X., Shen, Z., Li, D., He, X., Lin, B. (2007): *Study of interactions between actinomycin D and oligonucleotides by microchip electrophoresis and ESI-MS*. *Talanta* 72(2): 561-567

Abkürzungsverzeichnis

A	Ampere, Stromstärke
Abb.	Abbildung
ActD	Actinomycin D
apCAM	<i>Aplysia</i> cell adhesion molecule
ATF	activating transcription factor
ATP	Adenosintriphosphat
AZ	Adenylatzyklase
BSA	bovine serum albumin
Bp	Basenpaare
Ca ²⁺	Calcium-Ion
CamKII	Calcium/Calmodulin-abhängige Proteinkinase II
cAMP	cyklisches Adenosinmonophosphat
CBP	CREB binding protein
cDNA	copy deoxyribonucleic acid
CR	conditioned reaction – konditionierte Reaktion
CREB	cAMP response element binding protein
CS	conditioned stimulus – konditionierter Reiz
C _t	threshold cycle
Cy3	Carbocyanin 3
d	Tag/e
Da	Dalton
DNA	deoxyribonucleic acid – Desoxyribonukleinsäure
DNMT	DNA-Methyltransferase
dNTP	Nukleosidtriphosphat
E. coli	Escherichia coli
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EF1 α	Elongationsfaktor 1 alpha
emPCR	Emulsions-PCR
for	forward
g	9,81 m/s ² , Erdschwerebeschleunigung
g	Gramm
Gcn5	General control of amino acid synthesis protein 5

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

H ₂ O dest.	destilliertes Wasser
h	Stunde/n
H	Histon
HAT	Histonacetyltransferase
HDAC	Histondeacetylase
HRP	horseradish peroxidase
IgG	Immunglobulin G
IP	Immunopräzipitation
k	Kilo, 10 ³
K ⁺	Kalium-Ion
kUE	katalytische Untereinheit
l	Liter
LTM	long-term memory – Langzeitgedächtnis
LTP	long-term potentiation – Langzeitpotenzierung
μ	mikro, 10 ⁻⁶
m	milli, 10 ⁻³
M	molar
MAPK	mitogen activated proteine kinase
MEF	myocyte enhancer factor
min	Minute/n
mRNA	messenger RNA
n	Nano, 10 ⁻⁹
NCBI	National Center for Biotechnology Information
NO	Stickstoffmonoxid
NOS	Stickstoffmonoxid-Synthase
NTC	no template control
OD	optische Dichte
PBS	phosphate buffered saline
PCAF	p300/CBP associated factor
PCR	Polymerase Chain Reaction
PDE	Phosphodiesterase
PER	proboscis extension response, Rüsselreflex
PKA	Proteinkinase A
PP	Proteinphosphatase

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

rev	reverse
RNA	ribonucleic acid – Ribonukleinsäure
RNAi	RNA-Interferenz
rRNA	ribosomale RNA
rpm	Runden pro Minute
RT	Raumtemperatur
rUE	regulatorische Untereinheit
s	Sekunde/n
SAM	S-adenosylmethionin
SIRT	Sirtuin
SRC	steroid receptor coactivator
SSC	saline-sodium citrate
ssDNA	single-stranded DNA, Einzelstrang-DNA
STM	short-term memory – Kurzzeitgedächtnis
TAE	Tris-Acetat-EDTA
TAFII	TBP-associated factor
TBP	TATA binding protein
TE	Tris-EDTA
TIF	transcriptional intermediary factor
TSA	Trichostatin A
tRNA	transfer RNA
TUB	Tubulin
US	unconditioned stimulus – unconditionierter Reiz
UR	unconditioned reaktion – unconditionierte Reaktion
V	Volt, Spannung
VPA	Valproat
v/v	volume per volume, Volumenprozent
w/v	weight per volume, Gewichtsprozent
z.B.	zum Beispiel
Zn ²⁺	Zink-Ion
Z-Chem	Zentrales Chemikalienlager der Universität des Saarlandes

Danksagung

Zuerst möchte ich meinem Doktorvater Prof. Dr. Uli Müller danken, dass er mir die Möglichkeit gegeben hat, dieses interessante Thema während meiner Promotion bearbeiten zu können. Im Besonderen bedanke ich mich dafür, dass er stets ein offenes Ohr für auftretende Probleme bei der Arbeit hatte und mit Rat und Tat zur Seite stand. Was mir besonders viel bedeutet, ist die Tatsache, dass ich gelernt habe, mich von Misserfolgen nicht so schnell demotivieren zu lassen und dass ein guter Wissenschaftler sein eigenes Denken und Handeln immer wieder in Frage stellen sollte, um sich weiterzuentwickeln und gute Forschung zu betreiben.

Der nächste Dank geht an Herrn Prof. Dr. Manfred Schmitt für die Übernahme des Zweitgutachtens. Desweiteren möchte ich mich dafür bedanken, dass er über meine Doktorarbeit hinaus in meiner Rolle als Mitglied des Fachschafsrats stets als Ansprechpartner für studentische Angelegenheiten und Probleme zur Verfügung stand.

Ein besonderer Dank geht an meine ehemaligen Arbeitskollegen Bärbel und Fabian für ihre gewinnbringenden fachlichen Diskussionen an frischer Luft.

Bärbel möchte ich auch dafür danken, dass sie in guten wie in schlechten Zeiten für mich da war, bei privaten sowie beruflichen Angelegenheiten. Besonders die Pausen, die wir mit dem Feststellen der „generation zero“-Problematik verbracht haben, erleichterten mir so manche frustrierende Phasen während meiner Doktorarbeit.

Desweiteren möchte ich meinen ehemaligen Kollegen Andrea Jäckel, Thomas Läger, Jakob Hättig, Javaid Iqbal, Tina Martin, Iliana Nedewa, Kathy Rether und David Racuglia, die ebenfalls bei Prof. Uli Müller promoviert haben, für die schöne Zeit danken, die wir gemeinsam an der Universität hatten.

Meinen Kollegen Dr. Helmut Kallenborn, Angelika Gardezi, Iris Fuchs, Dr. Susanne Meuser, Michael Glander, Dr. Alfred Wisser, Jenny Folz und Julia Rennertz möchte ich für die angenehme Arbeitsatmosphäre danken. Dr. Helmut Kallenborn, Angelika Gardezi und Dr. Susanne Meuser gilt der Dank auch in Bezug auf die gemeinsame Betreuung von Studentenpraktika. Angelika Gardezi danke ich für die histologischen Untersuchungen und die Hilfe bei der Anfertigung von schönen und leicht verständlichen Abbildungen. Und natürlich auch für die Versorgung mit Schokolade!

Ich möchte auch den vielen Hiwis, Bachelor- und Masterstudenten (besonders Sven Kappel, Tobias Braun, Aline Löhfeld und Aureliën Strehl) danken, die den Arbeitsalltag abwechslungsreich gemacht und gute Arbeit geleistet haben. Die Betreuung von euch hat Spaß gemacht und ich hoffe, ihr konntet Einiges lernen. Das Gleiche gilt für meine äußerst fleißige Schülerpraktikantin Jasmin Heidtmann.

Bedanken möchte ich mich ebenfalls bei den Mitarbeitern der Botanik und Genetik, die mir ihre Geräte zur Verfügung gestellt haben und mit Rat und Tat zur Seite standen. Ein besonderer Dank gilt Jasmin Gries und Dr. Sascha Tierling für die Durchführung der FLX-Sequenzierung.

Meiner Mutter Susanne danke ich dafür, dass sie immer an mich geglaubt und unterstützt hat.

Meinen verstorbenen Großeltern Johanna und Richard möchte ich danken, dass sie meiner Mutter während meiner Kindheit geholfen haben, mich behütet aufzuziehen.

Meinem Lebenspartner Dominic danke ich dafür, dass er mich so liebt, wie ich bin und dass er in guten wie in schlechten Zeiten immer für mich da ist. Danke für die gemeinsamen Jahre. Ich hoffe, wir werden noch sehr lange viel Spaß zusammen haben und gemeinsam noch viel von der Welt sehen.

Meiner Schwester Natalie möchte ich danken, für den Spaß und den lehrreichen Geschwisterzoff während unserer gemeinsamen Kindheit.

Meiner Schwiegermutter Anette möchte ich danken, die mir immer mit Rat und Tat zur Seite steht und durch ihre Verkupplungskünste einige Menschen sehr glücklich gemacht hat.

Ein besonderer Dank geht an Kira. Sie ist mir seit sechs Jahren ein treuer Freund und schenkt mir tierisch viel Freude.

Lebenslauf und wissenschaftlicher Werdegang

Name: Katja Merschbächer

Geburtstag: 16.09.1976

Geburtsort: Saarbrücken

Schulbildung:

1983 - 1987 Grundschule Eschberg

1987 - 1997 Gymnasium am Rotenbühl

Berufsausbildung:

1998 - 2001 Ausbildung zur Bankkauffrau bei der Sparkasse Saarbrücken

Berufstätigkeit:

2001 - 2004 Bankkauffrau bei der Sparkasse Saarbrücken

Hochschulausbildung:

2004 - 2009 Studium der Human- und Molekularbiologie an der Universität des Saarlandes

Abschluss: Diplom, Thema: „Proteinacetylierung und die Rolle der Histonacetyltransferasen beim Lernen und der Gedächtnisbildung“

Wissenschaftlicher Werdegang:

2009 - 2013 Wissenschaftlicher Mitarbeiter am Institut für Biowissenschaften der Universität des Saarlandes in der Arbeitsgruppe von Prof.Dr.Uli Müller

2009 Beginn der Promotion am Institut für Biowissenschaften der Universität des Saarlandes in der Arbeitsgruppe von Prof.Dr.Uli Müller

Veröffentlichungen und Poster:

1. Merschbaecher, K., Mueller, U. (2013): *Bidirectional acetylation-mediated modulation of memory in the honeybee: search for the targeted genes*. 10th Göttingen Meeting of the German Neuroscience Society (Poster)

2. Merschbaecher, K., Haettig, J., Mueller, U. (2012): *Acetylation-mediated suppression of transcription-independent memory: bidirectional modulation of memory by acetylation*. PLoS One 7(9): e45131.
3. Merschbaecher, K., Mueller, U. (2011): *Acetylation-dependent modulation of memory in the honeybees: towards the identification of the regulated genes*. 9th Göttingen Meeting of the German Neuroscience Society (Poster)
4. Merschbaecher, K., Mueller, U. (2010): *Protein acetylation: a post-translational modification critical for associative learning and memory formation in honeybee*. 7th FENS Amsterdam (Poster)
5. Merschbaecher, K., Mueller, U. (2009): *Histone acetylation: a modulator of memory formation in honey-bee*. 20th Neuro-DoWO Würzburg (Vortrag)
6. Merschbaecher, K., Mueller, U. (2009): *Chromatin Remodelling: Protein Acetylation facilitates memory formation in honeybee*. 8th Göttingen Meeting of the German Neuroscience Society (Poster)