

Aus dem Fachbereich Medizin
der Johann Wolfgang Goethe-Universität
Frankfurt am Main

betreut am
Dr. Senckenbergische Anatomie
Institut für Anatomie III (Zelluläre und molekulare Anatomie)
Direktor: Prof. Dr. Jörg H. Stehle

Einfluss von Melatonin auf das hippocampale Lernen bei der Maus

Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades der Medizin
des Fachbereichs Medizin
der Johann Wolfgang Goethe-Universität
Frankfurt am Main

vorgelegt von
Lukas Benjamin Thomas

aus Dieburg

Frankfurt am Main, 2020

Dekan: Prof. Dr. Stefan Zeuzem
Referent: Prof. Dr. Jörg H. Stehle
Koreferent: Prof. Dr. Stefan Frank
Prüfungsdatum: 07.07.2020

Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis	VI
Tabellenverzeichnis	VIII
Abkürzungsverzeichnis	IX
1. Einleitung.....	1
1.1 Lernen und Gedächtnis	1
1.1.1 Überblick	1
1.1.2 Die Hippocampusformation	1
1.1.3 Langzeitpotenzierung und Langzeitgedächtnis	3
1.1.4 Epigenetik und Chromatinremodelling	5
1.1.4 a) Acetylierung.....	9
1.1.4 b) Methylierung.....	9
1.1.4 c) Phosphorylierung	10
1.2 Circadiane Rhythmik und Melatonin.....	11
1.2.1 Der Nucleus suprachiasmaticus, zentraler Taktgeber des Körpers	11
1.2.2 Das Hormon Melatonin	13
1.2.3 Melatoninrezeptoren.....	17
1.2.3 a) MT ₁	17
1.2.3 b) MT ₂	18
1.2.4 Rhythmus, Melatonin und Lernen	18
1.3 Verhaltensversuche	20
1.3.1 <i>Radial Arm Maze</i>	20
1.3.2 <i>Open Field Test</i>	20
1.4 Zielsetzung der Arbeit.....	21
2. Material und Methoden	22
2.1 <i>In-vivo</i> -Analysen.....	22
2.1.1 Versuchstiere	22
2.1.2 <i>Radial Arm Maze</i>	22
2.1.3 <i>Open Field Test</i>	24
2.2 <i>Ex-vivo</i> -Analysen.....	25
2.2.1 Präparation und Probenentnahme	25
2.2.2 Vorbereiten der Proben für die Genotypisierung	26
2.2.3 Genotypisierung mittels PCR	26

2.2.4	Ethidiumbromid-Gelelektrophorese	29
2.2.5	Aufbereiten der Gewebeproben für spezifische Proteinnachweise	30
2.2.6	SDS-Page Western Blot.....	30
2.2.7	Immunodetektion der Proteine	33
2.3	Auswertung und Statistik.....	36
2.3.1	Verwendete Software	36
2.3.2	Statistik	37
3.	Ergebnisse.....	38
3.1	<i>In-vivo</i> -Analysen.....	38
3.1.1	<i>Radial Arm Maze</i>	38
3.1.2	<i>Open Field Test</i>	39
3.2	<i>Ex-vivo</i> -Analysen.....	41
3.2.1	Genotypisierung.....	41
3.2.2	Proteinanalysen.....	42
3.2.2 a)	pCaMKII	43
3.2.2 b)	pPKA-Substrat	46
3.2.2 c)	pPKC-Substrat	49
3.2.2 d)	pMAPK	53
3.2.2 e)	pCREB	57
3.2.2 f)	H3K9ac	60
3.2.2 g)	H3K14ac	63
3.2.2 h)	H3K27me2	67
4.	Diskussion	70
4.1	Übersicht.....	70
4.2	Signaltransduktion über pCREB ins Genom	71
4.3	Melatonin – Modulator der molekularen Korrelate des Lernens.....	75
4.4	Verhaltensversuche – phänotypische Korrelate.....	80
4.5	Limitationen.....	81
4.6	Lernen als Zeitgeber	82
4.7	Fazit und Ausblick	83
5.	Zusammenfassung/Abstract.....	86
5.1	Zusammenfassung: Einfluss von Melatonin auf das hippocampale Lernen bei der Maus	86
5.2	Abstract: The influence of melatonin on hippocampal learning in mice.....	88

6. Literaturverzeichnis	90
7. Schriftliche Erklärung.....	109

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Der Hippocampus	2
Abb. 2: An LTP und Gedächtniskonsolidierung beteiligte Signalwege.....	5
Abb. 3: Strukturformel und Biosynthese von Melatonin	13
Abb. 4: Das Photoneuroendokrine System (PNS).....	16
Abb. 5: Versuchsaufbauten <i>Radial Arm Maze</i> und <i>Open Field Test</i>	24
Abb. 6: Knockout und PCR-Strategie, Beispielhaft für MT_2	27
Abb. 7: Prinzip SDS-Page und Western Blot.....	31
Abb. 8: Schematische Darstellung der Immunodetektion	34
Abb. 9: Verhalten im <i>Open Field Test</i>	40
Abb. 10: Exemplarisches PCR-Ergebnis.....	41
Abb. 11: pCaMKII im Hippocampus der C3H-Mäuse nach Training im Maze	44
Abb. 12: pCaMKII im Hippocampus der $MT_{1/2}^{-/-}$ -Mäuse nach Training im Maze	45
Abb. 13: pPKA-Substrat im Hippocampus der C3H-Mäuse nach Training im Maze	47
Abb. 14: pPKA-Substrat im Hippocampus der $MT_{1/2}^{-/-}$ -Mäuse nach Training im Maze	48
Abb. 15: pPKC-Substrat im Hippocampus der C3H-Mäuse nach Training im Maze	51
Abb. 16: pPKC-Substrat im Hippocampus der $MT_{1/2}^{-/-}$ -Mäuse nach Training im Maze	52
Abb. 17: pMAPK im Hippocampus der C3H-Mäuse nach Training im Maze	55
Abb. 18: pMAPK im Hippocampus der $MT_{1/2}^{-/-}$ -Mäuse nach Training im Maze	56
Abb. 19: pCREB im Hippocampus der C3H-Mäuse nach Training im Maze	58
Abb. 20: pCREB im Hippocampus der $MT_{1/2}^{-/-}$ -Mäuse nach Training im Maze.....	59
Abb. 21: H3K9ac im Hippocampus der C3H-Mäuse nach Training im Maze	61
Abb. 22: H3K9ac im Hippocampus der $MT_{1/2}^{-/-}$ -Mäuse nach Training im Maze.....	62
Abb. 23: H3K14ac im Hippocampus der C3H-Mäuse nach Training im Maze	65
Abb. 24: H3K14ac im Hippocampus der $MT_{1/2}^{-/-}$ -Mäuse nach Training im Maze.....	66
Abb. 25: H3K23me2 im Hippocampus der C3H-Mäuse nach Training im Maze	68
Abb. 26: H3K27me2 im Hippocampus der $MT_{1/2}^{-/-}$ -Mäuse nach Training im Maze	69

Abb. 27: Durch Lernen im <i>Radial Arm Maze</i> induzierte Phosphorylierung von MAPK und CREB in C3H-Mäusen.....	71
Abb. 28: Acetylierung von H3K9 und H3K14 sind bei C3H tagsüber durch Lernen induzierbar.....	73
Abb. 29: Aktivität von PKC und pCREB im Vergleich zwischen C3H und MT _{1/2} ^{-/-}	76
Abb. 30: Hippocampale Rhythmik von pCREB und H3K14ac	77
Abb. 31: Schematisches Erklärungsmodell des Melatonineinflusses auf das Lernen.....	79

Tabellenverzeichnis

Tab. 1: Einige Histonmodifikationen und ihre Wirkung auf die Transkription	11
Tab. 2: Primer der Genotypisierung	28
Tab. 3: Gebrauchslösungen zur PCR.....	28
Tab. 4: Verwendete Proteinmarker.....	32
Tab. 4: Gebrauchslösungen zum Western Blot	33
Tab. 6: Beim Western Blot verwendete Antikörper	35
Tab. 7: Übersicht über die Signifikanzgrade	37
Tab. 8: Verhalten im <i>Open Field Test</i>	40
Tab. 9: pCaMKII im Hippocampus der C3H-Mäuse nach Training im Maze.....	44
Tab. 10: pCaMKII im Hippocampus der MT _{1/2} ^{-/-} -Mäuse nach Training im Maze	45
Tab. 11: pPKA-Substrat im Hippocampus der C3H-Mäuse nach Training im Maze	47
Tab. 12: pPKA-Substrat im Hippocampus der MT _{1/2} ^{-/-} -Mäuse nach Training im Maze	48
Tab. 13: pPKC-Substrat im Hippocampus der C3H-Mäuse nach Training im Maze	51
Tab. 14: pPKC-Substrat im Hippocampus der MT _{1/2} ^{-/-} -Mäuse nach Training im Maze	52
Tab. 15: pMAPK im Hippocampus der C3H-Mäuse nach Training im Maze.....	55
Tab. 16: pMAPK im Hippocampus der MT _{1/2} ^{-/-} -Mäuse nach Training im Maze	56
Tab. 17: pCREB im Hippocampus der C3H-Mäuse nach Training im Maze.....	58
Tab. 18: pCREB im Hippocampus der MT _{1/2} ^{-/-} -Mäuse nach Training im Maze	59
Tab. 19: H3K9ac im Hippocampus der C3H-Mäuse nach Training im Maze	61
Tab. 20: H3K9ac im Hippocampus der MT _{1/2} ^{-/-} -Mäuse nach Training im Maze	62
Tab. 21: H3K14ac im Hippocampus der C3H-Mäuse nach Training im Maze	65
Tab. 22: H3K14ac im Hippocampus der MT _{1/2} ^{-/-} -Mäuse nach Training im Maze	66
Tab. 23: H3K27me2 im Hippocampus der C3H-Mäuse nach Training im Maze.....	68
Tab. 24: H3K27me2 im Hippocampus der MT _{1/2} ^{-/-} -Mäuse nach Training im Maze	69

Abkürzungsverzeichnis

5-HT	5-Hydroxytryptamin – Serotonin
AA-NAT	Aryl-Alkylamin- <i>N</i> -Acetyltransferase
AC	Adenylatcyclase
ADHS	Aufmerksamkeitsdefizit-Hyperaktivitäts-Syndrom
AMP	Adenosinmonophosphat
AMPA	<i>α</i> -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid
ANOVA	<i>Analysis of variance</i> – Varianzanalyse
ASD	<i>autism spectrum disorder</i> – Autismus-Spektrum-Störung
ASMT	Acetylserotonin- <i>O</i> -Methyltransferase →HIOMT
AVP	Arginin-Vasopressin
BGBI	Bundesgesetzblatt
Bmal1	Brain and Muscle ARNT-Like 1
CA	<i>Cornu ammonis</i>
CaM	Calmodulin
CaMKII	Ca ²⁺ /Calmodulin-abhängige Kinase II
CaMKIV	Ca ²⁺ /Calmodulin-abhängige Kinase IV
cAMP	cyclisches Adenosinmonophosphat
CBP	CREB-Bindeprotein
CCD	<i>Charge-coupled device</i>
Clock	<i>Circadian locomotor output cycles kaput</i>
CpG	Cytosin-Guanin-Dinucleotid
CRE	<i>cyclic AMP response element</i>
CREB	<i>cyclic AMP response element binding protein</i>
Cry1/2	<i>Cryptochrome 1/2</i>
CT	<i>circadian time</i>
DAG	Diacylglycerin
DD	Dauerdunkel
DDT	Dithiothreitol
DG	<i>Dentate gyrus</i> – Gyrus dentatus
DNA	<i>Desoxyribonucleic acid</i> – Desoxyribonucleinsäure
DNMT	DNA-Methyltransferase
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
E-LTP	<i>early LTP</i>
EDTA	Ethylendiaminetetracetat
EPM	<i>Elevated Plus Maze</i>
EPSP	exzitatorisches postsynaptisches Potential
ERK	<i>Extracellular signal-regulated kinase</i> →MAPK
GABA	<i>gamma amino butyric acid</i> – Gammaaminobuttersäure
GPR50	<i>G protein-coupled receptor 50</i> →Mel _{1c}
H2AK119ub	Ubiquitylierung von Histon H2A an Lysin 119

H3	Histon H3
H3K14ac	Acetylierung von Histon H3 an Lysin 14
H3K9ac	Acetylierung von Histon H3 an Lysin 9
H3K27me2	Dimethylierung von Histon H3 an Lysin 27
H3K9ac	Acetylierung von Histon H3 an Lysin 9
H3S10p	Phosphorylierung von Histon H3 an Serin 10
HAT	Histonacetyltransferase
HDAC	Histondeacetylase
HDM	Histondemethylase
HIOMT	Hydroxyindol-O-Methyltransferase →ASMT
HMT	Histonmethyltransferase
HP1	Heterochromatinprotein 1
HRP	<i>horse radish peroxidase</i> – Meerrettichperoxidase
IgG	Immunglobulin G
IMC	<i>Intermediolateral column</i> – Columna intermediolateralis
ipRGC	intrinsisch photorezeptive retinale Ganglienzellen
K	Lysin
kDa	Kilodalton
L-LTP	<i>late LTP</i>
LD	Licht/Dunkel
LDS	Lithiumdodecylsulfat
LTM	<i>long term memory</i> – Langzeitgedächtnis
LTP	<i>long term potetiation</i> – Langzeitpotenzierung
MEL	Melatonin
Mel _{1a}	Melatoninrezeptor 1a →MT ₁
Mel _{1b}	Melatoninrezeptor 1b →MT ₂
Mel _{1c}	Melatoninrezeptor 1c
MPAK	<i>Mitogen activated protein kinase</i> →ERK
mRNA	<i>messenger-RNA</i>
MT ₁	Melatoninrezeptor 1
MT ₂	Melatoninrezeptor 2
MTNR1A	Melatoninrezeptor 1a (Gen) →MT ₁
MTNR1B	Melatoninrezeptor 1b (Gen) →MT ₂
MW	<i>molecular weight</i> – Molekulargewicht
MWM	<i>Morris Water Maze</i>
NA	Noradrenalin
NEO	Neomycin
NMDA	<i>N-methyl-D-Aspartat</i>
OFT	<i>Open Field Test</i>
PACAP	<i>Pituitary adenylate cyclase activating polypeptide</i>
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i> – Polymerasekettenreaktion
pCREB	phosphoryliertes CREB

Per1/2/3	Period 1/2/3
PHD	<i>Plant homeodomain</i>
PIN	Pinealorgan
PK2	Prokineticin 2
PKA	Proteinkinase A
PKC	Proteinkinase C
PLC	Phospholipase C
PNS	Photoneuroendokrines System
PP1	Proteinphosphatase 1
PRC	<i>phase response curve</i> – Phasenantwortkurve
PVDF	Polyvinylidenflourid
PVN	<i>Paraventricular nucleus</i> – Nucleus paraventricularis
QR2	Chinonreduktase II
R	Arginin
RAM	<i>Radial Arm Maze</i>
rel. OD	relative optische Dichte
RET	Retina
RHT	<i>Retinohypothalamic tract</i> – Tractus retinohypothalamicus
RNA	<i>Ribonucleic acid</i> – Ribonucleinsäure
ROR α	<i>RAR-related orphan receptor α</i>
S	Serin
SCG	<i>Superior cervical ganglion</i> – Ganglion cervicale superius
SCN	<i>Suprachiasmatic nucleus</i> – Nucleus suprachiasmaticus
SDS-PAGE	<i>sodium dodecyl sulfate polyacrylamid gel electrophoresis</i>
SEM	<i>standard error of the mean</i> – Standardfehler
SIRT1	Sirtuin 1
T	Threonin
Taq	<i>Thermophilus aquaticus</i>
TBE	Tris-Borat-EDTA
TBS	<i>Tris-Buffered Saline</i>
TBST	<i>Tris-Buffered Saline and Tween 20</i>
TGF- α	<i>Transforming growth factor α</i>
TierSchG	Tierschutzgesetz
TIFF	<i>Tagged image file format</i>
VIP	Vasoaktives intestinales Peptid
Y	Thyrosin
ZT	<i>Zeitgeber time</i>
τ	Tau – Periodenlänge

1. Einleitung

1.1 Lernen und Gedächtnis

1.1.1 Überblick

Wer gut mit den Umweltbedingungen zurechtkommt, hat den größten Fortpflanzungserfolg und viele Nachkommen, von denen wiederum diejenigen mit den günstigsten Merkmalen erfolgreich sein werden. So findet evolutionäre Anpassung über viele Generationen statt. Enormen Vorteil bringt dabei aber auch die Fähigkeit, sich innerhalb der eigenen Lebenszeit anpassen und durch Verhaltensänderungen auf Umweltbedingungen einstellen zu können – mit anderen Worten, zu lernen, auf äußere Einflüsse zu reagieren. Lernen kann also weitläufig definiert werden als dauerhafte Anpassung von Verhalten an vorübergehende Umwelteinflüsse.¹ Nach der gängigen Auffassung unterscheidet man Gedächtnisakquisition und -konsolidierung.^{2,3} Ersteres bezeichnet das Aufnehmen neuer Information ins Kurzzeitgedächtnis, das Sekunden bis Stunden bestehen bleibt, letzteres das Übertragen in das Langzeitgedächtnis, welches über Stunden bis hin zu Jahren bestehen bleibt.² Diese Prozesse beruhen auf der Stärkung oder Abschwächung synaptischer Verbindungen zwischen einzelnen Neuronen, der synaptischen Plastizität.⁴ Der Hippocampusformation kommt bei der Konsolidierung eine essentielle Funktion zu, die außerdem im Gegensatz zur Akquisition von *de-novo*-Proteinbiosynthese⁵⁻⁷ und Chromatinremodelling⁸ abhängig ist. Plastizitätsassoziierte Gene werden aktiviert und führen zu andauernden Umbauten und Stärkung der beteiligten Synapsen. Grundlegende molekulare Mechanismen von Kurz- und Langzeitgedächtnis sind in der Phylogese konserviert und deklaratives wie prozedurales Gedächtnis beruhen auf den gleichen molekularen Vorgängen.⁷ Lernprozesse und deren dauerhafter Erfolg sind auch stark abhängig von exogenen zeitlichen Faktoren wie der Tageszeit und den endogenen Signalen der den meisten Organismen innewohnenden inneren Uhr, die auch ohne äußere Zeitgeber annähernd im 24-h-Rhythmus (= circadian, vgl. Abschnitt 1.2.1) weiterläuft. Daher sollen in dieser Arbeit einige Zusammenhänge zwischen beidem erforscht werden.

1.1.2 Die Hippocampusformation

Der Phantasie früherer Anatomen, die sich davon an ein Seepferdchen (lateinisch *hippocampus*) erinnert sahen, verdankt diese Hirnformation ihren Namen. Die Hippo-

campusformation stellt den medialen Abschnitt des Telencephalons dar und wölbt sich in den Seitenventrikel vor. Sie besteht aus *Hippocampus proprius* (Ammonshorn, *Cornu ammonis* – CA), *Gyrus dentatus*, *Cortex entorhinalis* sowie dem *Subiculum*, *Praesubiculum* und *Parasubiculum*.^A Der *Hippocampus proprius* ist unterteilt in die Subregionen CA1 bis CA3^B und bildet im Frontalschnitt die Form eines U, das den *Gyrus dentatus* umschließt. *Subiculum*, *Praesubiculum* und *Parasubiculum* stellen die Verbindung zum *Cortex entorhinalis* und über diesen zum Neocortex dar. Bei Nagetieren liegt der Hippocampus dorsomedial, im Primatengehirn kommt er durch die Hemisphärenrotation im medialen Temporallappen zum Liegen, wodurch er sich in der Frontalansicht umgekehrt darstellt.^{9,12} Er wird als evolutionär alt angesehen, der grundsätzliche Aufbau variiert wenig zwischen den Säugetierspezies. Die anderen Klassen der Wirbeltiere besitzen keinen Hippocampus, jedoch übernimmt das mediale Pallium als ihm homologe Vorläuferstruktur bereits ähnliche Aufgaben.¹³

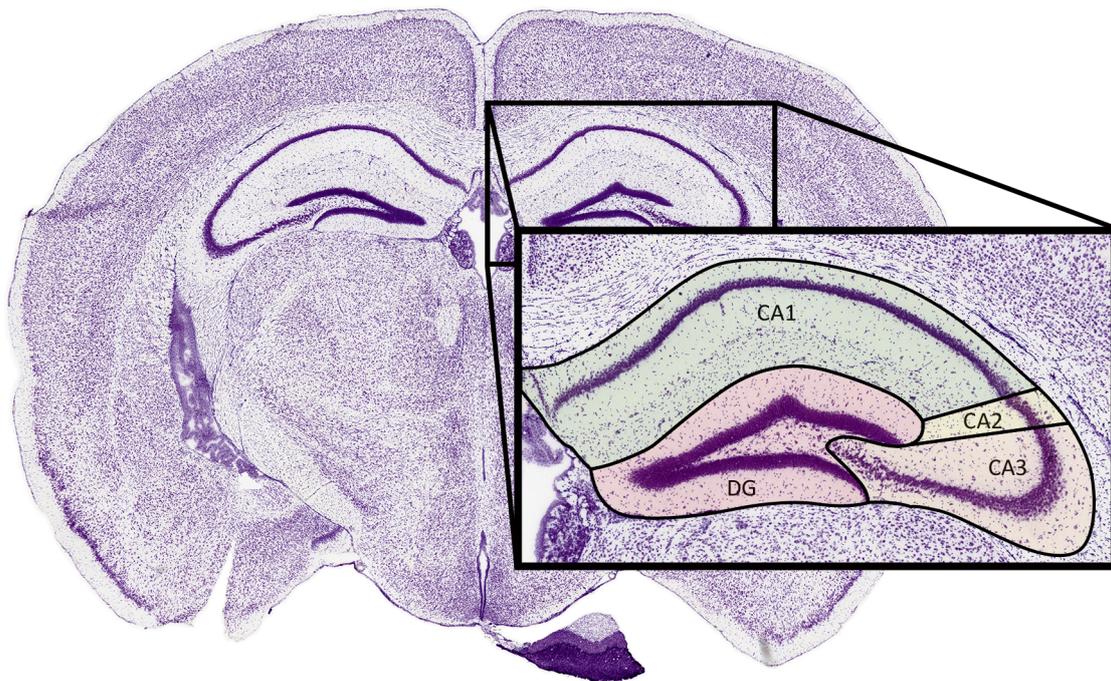


Abb. 1: Der Hippocampus

Coronarschnitt durch ein Mausgehirn auf Höhe des Hypophysenstiels. Beachte die beim Primatengehirn durch die Hemisphärenrotation umgekehrte Lage des Hippocampus. DG Gyrus dentatus; CA Cornu ammonis. Subiculum, Präsubiculum und Parasubiculum sind aufgrund ihrer weiter dorsalen Lage nicht in diesem Schnitt abgebildet. Abbildung nach Allen Institute.²⁶

^A Weitere Definitionen, welche Strukturen zum Hippocampus bzw. zur Hippocampusformation gezählt oder nicht gezählt werden, existieren. Vergleiche hierzu^{9(p37 ff.)}.

^B Die von Ramón y Cajal und Lorente de Nó definierte vierte Subregion CA4 wird nach heutigem Stand eher als Teil des Gyrus dentatus betrachtet.^{10,11}

Der Hippocampus spielt eine entscheidende Rolle beim räumlichen Lernen und der Erstellung einer kognitiven Karte der extraindividuellen Umgebung. So konnten »Ortszellen« identifiziert werden, die spezifisch immer dann vermehrt aktiv werden, wenn sich ein Versuchstier an einem bestimmten Ort aufhält.¹⁴ Sowohl zwischen verschiedenen Arten als auch innerhalb einer Spezies korreliert die relative Größe des Hippocampus mit Verhaltensweisen, die ein hohes Maß an räumlicher Orientierung erfordern, wie beispielsweise dem Anlegen von Nahrungsvorräten oder dem Steuern eines Londoner Taxis.¹⁵⁻¹⁷ An Personen mit Läsionen der Hippocampusformation (zum Beispiel dem berühmten Patienten H.M.^C) ließ sich beobachten, dass diese Defizite beim Erwerb neuer Erinnerungen im episodischen und semantischen Gedächtnis aufweisen.^{18,19} Bereits bestehende Erinnerungen hingegen bleiben weitestgehend intakt, das prozedurale Gedächtnis gänzlich unberührt. Der Hippocampus ist also eine wichtige Station bei der Gedächtniskonsolidierung, dem Übertragen neu erlernter Informationen vom Kurzzeit- in das Langzeitgedächtnis, aber nicht deren endgültiger Speicherort. Frisch erlernte Informationen sind verknüpft mit verstärkter Transkription plastizitätsassoziierter Gene und einer erhöhten Bildungsrate von Synaptic Spines im Hippocampus, ältere Erinnerungen dagegen mit verstärkter Transkription und erhöhter Anzahl von Synaptic Spines in einigen Cortexregionen.^{20,21} Auch für plastizitätsassoziierte Chromatinmodifikationen (u.a. Acetylierung von H3K14, Phosphorylierung von H3S10, vgl. Abschnitt 1.1.4) und DNA-Methylierung konnte gezeigt werden, dass diese nach Lernversuchen im Hippocampus vorübergehend induziert wurden, im Cortex jedoch erst verzögert auftreten und dort für bis zu 30 Tage anhalten.^{22,23} Nach der »Systems Consolidation Theory«²⁴ werden erlernte Inhalte im Hippocampus also nur temporär zwischengespeichert, um dann in den Cortex »heruntergeladen« und dauerhaft abgespeichert zu werden. Diese Inhalte werden dann auch als »remote memory« bezeichnet. Neben der Hippocampusformation sind auch der perirhinale und der parahippocampale Cortex an dieser Übertragung beteiligt und werden mithin zusammen mit dieser als »medial temporal lobe memory system«²⁵ bezeichnet.

1.1.3 Langzeitpotenzierung und Langzeitgedächtnis

Durch wiederholte elektrische Stimulation aktivierter Synapsen stärken diese ihre Verbindungen und zeigen auch nach einem Zeitraum von Stunden bis Tagen eine verstärkte

^C H.M. wurden 1953 in dem Versuch, seine therapierefraktäre Epilepsie zu lindern, beidseitig Hippocampus sowie einige weitere Strukturen des medialen Temporallappens entfernt.

Amplitude und Dauer von exzitatorischen postsynaptischen Potentialen (EPSP). Dies wird als Langzeitpotenzierung (LTP) bezeichnet.^{27,28} LTP gilt als elektrophysiologisches *in-vitro*-Modell für Lernprozesse.²⁹ In der Region CA1 wird LTP nach Stimulation des NMDA-Rezeptors durch Glutamat ausgelöst. Dessen Kanalpore ist im inaktiven Zustand durch ein Mg^{2+} -Ion verschlossen. Nur bei ausreichender Depolarisation der postsynaptischen Zellmembran durch wiederholte oder kumulative Stimulation entsteht ein ausreichendes EPSP, um dieses Mg^{2+} auszustoßen, wodurch es zum Einstrom von Calciumionen in die Zelle kommt.³⁰ Diese kumulative Stimulation durch gleichzeitig auftretende Reize bietet bereits ein mögliches zelluläres Modell für Lernen durch Verknüpfung verschiedener Stimuli. Die erhöhte intrazelluläre Ca^{2+} -Konzentration aktiviert die Ca^{2+} /Calmodulin-abhängige Kinase II (CaMKII), die sich bei ausreichender Stimulation autophosphoryliert und so Ca^{2+} -unabhängig konstitutiv aktiv wird.³¹ CaMKII phosphoryliert AMPA-Rezeptoren und sorgt so für deren verstärkten Einbau in die postsynaptische Membran und damit für eine erleichterte Reizbarkeit.^{32,33} Diese frühe Phase (E-LTP) ist von Proteinbiosynthese unabhängig und hält über 1-3 Stunden an.³⁴

Die späte Phase (L-LTP) hingegen hält über mindestens einen Tag bis hin zu Jahren an und ist auf Genexpression und *de-novo*-Synthese von Proteinen angewiesen, um Verbindungen neu auszubilden und dauerhaft zu stärken.⁷ L-LTP gilt als Korrelat des Langzeitgedächtnisses. Neben CaMKII wird durch den NMDA-Rezeptor auch der Signalweg über die Proteinkinase C (PKC) in Gang gesetzt sowie die Bildung von cyclischem Adenosinmonophosphat (cAMP) durch die Adenylatcyclase (AC) angeregt, welches die Proteinkinase A (PKA) aktiviert. Alle drei Wege sind für L-LTP essentiell^{35,36} und konvergieren bei der Mitogen-aktivierten Proteinkinase (MAPK). Nach Aktivierung von MAPK können ihre regulatorischen Untereinheiten in den Zellkern translozieren und dort das *cAMP-Responsive Element Binding Protein* (CREB) durch Phosphorylierung an Serin 133 aktivieren.³⁷ Phosphoryliertes CREB (pCREB) bindet an cAMP-responsive Elemente (CRE) der DNA und wirkt so als Transkriptionsfaktor.^{37,38} An der Transkriptionsaktivierung beteiligt sind noch weitere Co-Faktoren wie zum Beispiel das CREB-Bindeprotein (CBP), das in dieser Interaktion seine Histonacetyltransferaseaktivität entfalten kann,³⁹⁻⁴¹ die für die Genregulation und somit Ausbildung des Langzeitgedächtnisses entscheidend ist. Aufgrund seiner zentralen Stellung als Vermittler zwischen Signaltransduktion und Proteinbiosynthese gilt das *memory*

*molecule*⁴² CREB als Dreh- und Angelpunkt der synaptischen Plastizität und damit des Langzeitgedächtnisses⁴³ und ist essentielle Voraussetzung für dessen korrekte Formierung. CREB-Blockade oder -Knockout verhindern die dauerhafte Ausbildung langfristiger Erinnerung⁴⁴⁻⁴⁶; verminderte Funktionalität von CREB geht mit erheblichen Defiziten einher, die durch Verstärkung des Stimulus, also wiederholtes Üben, teilweise ausgeglichen werden können.⁴⁷ Seine Überexpression andererseits erleichtert die Festigung robuster Erinnerungen mitunter schon nach einer einzigen Trainingseinheit.^{48,49}

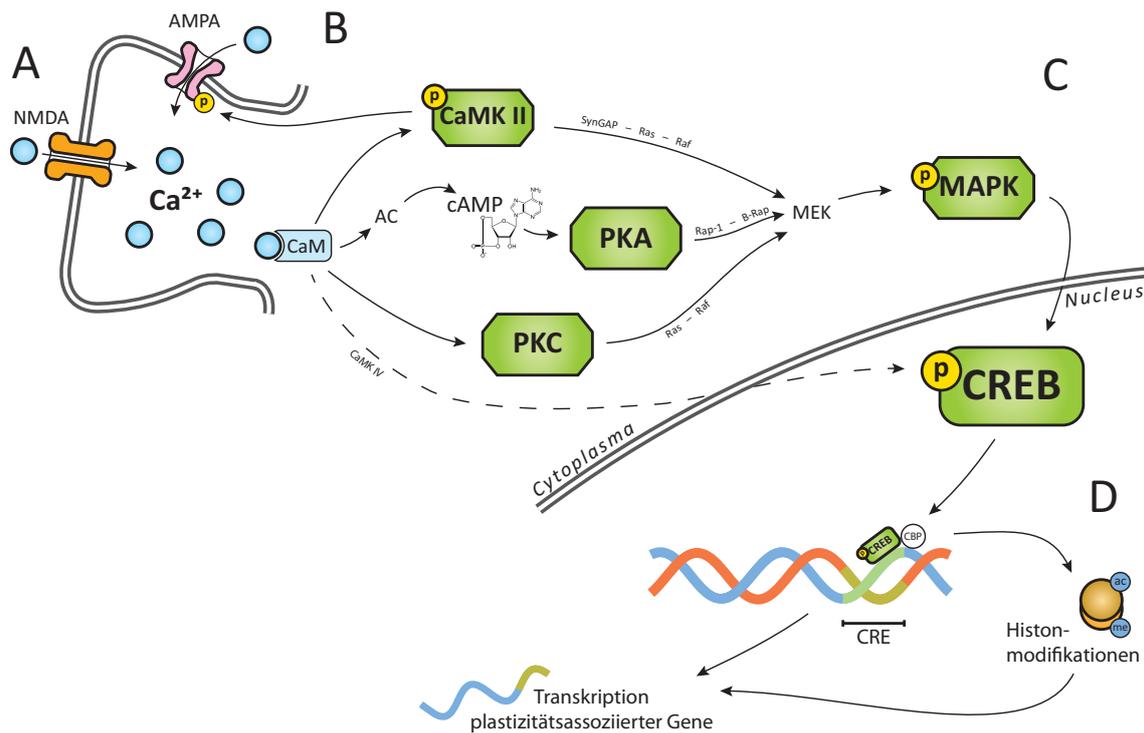


Abb. 2: An LTP und Gedächtniskonsolidierung beteiligte Signalwege

Vereinfachte Darstellung. **A** Stimulation des NMDA-Rezeptors durch Glutamat führt zum Calciumeinstrom **B** AMPA-Phosphorylierung und verstärkter Einbau in die postsynaptische Membran erhalten den Calciumeinstrom aufrecht **C** Konvergenz der Signaltransduktion über MAPK zu CREB **D** Rekrutierung weiterer Transkriptionsfaktoren sowie Histonmodifikationen führen zur Expression plastizitätsassoziierter Gene. *cAMP* zyklisches Adenosinmonophosphat; *CaM* Calmodulin; *AC* Adenylatcyclase; *CBP* CREB-Bindeprotein; *CRE* cAMP-responsive element; Abbildung modifiziert nach Levenson et al. sowie Walter und Weller.^{50,51}

1.1.4 Epigenetik und Chromatinremodelling

Aus der erheblichen Größe der eukaryontischen DNA-Moleküle einerseits – bei menschlichen Zellen im ausgerollten Zustand etwa 1,8 m Länge – und dem eng begrenzten Platz im Zellkern andererseits ergibt sich die Notwendigkeit, das Genom platzsparend zu verpacken. Daher liegt die DNA in den Zellen nicht frei vor, sondern mehr

oder weniger stark kondensiert als Chromatin (gr. *χρῶμα chrōma* – Farbe) vor. Chromatin bezeichnet den Komplex aus DNA und den mit ihr assoziierten Proteinen. Euchromatin, das eine aufgelockerte Struktur hat, nimmt beim Anfärben kaum Farbstoff auf. Heterochromatin ist die vollständig kondensierte Form und nimmt mehr Farbstoff auf, sodass es auch lichtmikroskopisch sichtbar wird. Das Vorliegen von DNA als Eu- oder Heterochromatin unterliegt einem dynamischen Wandel und steht im unmittelbaren Zusammenhang mit der Transkriptionsaktivität. Während der Metaphase der Mitose zum Beispiel liegt die DNA vollständig als Heterochromatin vor, in dieser maximal kondensierten Form ist sie von der Gentranskription weitgehend ausgeschlossen. Im aufgelockerten Euchromatin hingegen ist sie für RNA-Polymerasen gut zugänglich und kann in mRNA umgeschrieben werden. In welcher Form das Chromatin vorliegt und damit wie zugänglich es ist, wird durch epigenetische Modifikationen bestimmt.

Eine für die Struktur des Chromatins entscheidende Rolle spielen die sogenannten Histone. Diese gehören zu den bei allen Eukaryonten am höchsten konservierten Proteinen^{52,53} und sind außergewöhnlich reich an den basischen Aminosäuren Arginin und Lysin. Man unterscheidet fünf Klassen von Histonen, die vier *core*-Histone H2A, H2B, H3 und H4, sowie das *linker*-Histon H1. Aus der Beobachtung, dass die *core*-Histone immer in gleicher Anzahl vorliegen und immer auf jeweils etwa 100 Basenpaare je eines dieser Proteine kommt, konnte in den 1970er Jahren die Struktur des sogenannten Nukleosoms abgeleitet⁵⁴ und später durch Röntgenstrukturanalysen bestätigt werden. Dabei bilden je zwei H2A/H2B- und H3/H4-Heterodimere ein Histonoktamer, um welches stets 146 – 147 Basenpaare der DNA wie auf eine Spule aufgewickelt sind.^{55,56} Diese als Nukleosomen bezeichneten Komplexe sind wie Perlen an einer Schnur an der DNA aufgereiht mit je etwa 50 Bp Abstand. Das *linker*-Histon H1 maskiert die freien DNA-Bereiche⁵⁷ und trägt zur Stabilisierung der Nukleosomen und zur Bildung höherer Strukturebenen des Chromatins bei. Durch das häufige Vorkommen positiver Ladungen in den Histonen wird das polyanionische DNA-Rückgrat neutralisiert und so eine besonders enge Packung des Heterochromatins ermöglicht.⁵⁸ Dadurch wird es zum einen auf sehr kleinem Raum komprimiert und kann im Zellkern Platz finden, zum anderen wird die Interaktion mit Regulationsfaktoren und RNA-Polymerasen erschwert und so die Transkription verhindert. Alle *core*-Histone verfügen über eine globuläre Hauptdomäne, die mit der DNA interagiert, sowie eine N-terminale (H2A zusätzlich

über eine weitere, C-terminale) Schwanzdomäne, die nach außen weist und an der ein Großteil der kovalenten Histonmodifikationen stattfindet.

Der Begriff Epigenetik bezeichnet Vorgänge, die außerhalb des eigentlichen DNA-Codes stattfinden, aber an der Genregulation und -expression beteiligt sind. Dabei sind die beiden wichtigsten Mechanismen die Methylierung der DNA und die reversible, kovalente Modifikation von Histonseitenketten. Beide haben entscheidenden Einfluss auf die synaptische Plastizität und damit auf Gedächtnisbildung und -konsolidierung.^{8,23,59-63} DNA-Methylierung findet in Eukaryonten fast ausschließlich an den Cytosinbasen von palindromischen CpG-Dinukleotiden statt, die gehäuft gruppiert als CpG-Inseln in regulatorischen 5'-Bereichen vieler Gene vorkommen, und wird durch DNA-Methyltransferasen (DNMT) katalysiert.^{58,64} Methylierungen am einen Strang werden durch spezialisierte DNMTs erkannt und auf das korrespondierende Cytosin des komplementären Stranges übertragen,⁶⁵ wodurch aus der Methylierung eine dauerhafte Veränderung wird, die auch über die Zellteilung hinweg beständig bleibt. An methylierten CpG-Inseln wird durch Bindung von Proteinen der Histonmodifikation wie zum Beispiel Histondeacetylasen (HDAC) eine inaktive Chromatinstruktur hergestellt und so die Transkription verhindert.⁶⁶⁻⁶⁸ DNA-Methylierung tritt durch äußere Signale reguliert und hochgradig ortsspezifisch auf.^{61,69} So konnte gezeigt werden, dass es nach Trainingsreizen im Hippocampus der Ratte zu einer allgemein erhöhten DNMT-Aktivität kommt.^{62,69} Dabei liegt die verstärkte Methylierung der DNA aber spezifisch an der Promotorregion des Memory-Suppressor-Gens *protein phosphatase 1* (PP1) vor, der Promotor von *reelin*, einem plastizitätsassoziierten Gen, hingegen ist vermindert methyliert.⁶² Es werden also gezielt plastizitätsassoziierte Gene angeschaltet und Memory-Suppressor-Gene deaktiviert. Durch welche Mechanismen diese Spezifität vermittelt wird, ist bisher unklar. Diskutiert wird einerseits, dass DNMT kaum eigene Sequenzspezifität haben und ihnen Transkriptionsfaktoren als Plattform dienen, an die sie andocken. Andere Ergebnisse weisen darauf hin, dass möglicherweise auch DNA-eigene Merkmale wie zum Beispiel Abstände und Frequenz von CpG-Dinukleotiden innerhalb von CpG-Inseln eine Rolle spielen könnten.⁷⁰ Die Entfernung von Methylgruppen von der DNA erfolgt durch DNA-Demethylasen.⁷¹ Allerdings sind möglicherweise auch manche DNMTs nicht nur an Methylierung, sondern auch an der Demethylierung von CpG-Dinukleotiden beteiligt, so wurden bereits Isoformen beschrieben,

deren Aktivität positiv mit verstärkter Transkription korreliert⁷² und die positiv mit der Gedächtnisbildung verknüpft sind.

Die postrationalen Modifikationen der Histone finden hauptsächlich an den Seitenketten der Aminosäuren Lysin (K), Arginin (R), Serin (S), Thyrosin (Y) und Threonin (T) in den N-terminal gelegenen Schwanzdomänen statt^{73,74} (nur Histon H2A verfügt über eine weitere, C-terminal gelegene Schwanzdomäne), wobei gelegentlich auch regulatorische Modifikationen der globulären Hauptdomäne vorkommen können.⁷⁵ Derzeit sind zahlreiche verschiedene Histonveränderungen bekannt, darunter Acetylierung, Methylierung, Phosphorylierung, Ubiquitinierung, Citrullinierung, SUMOylierung oder ADP-ribosylierung.^{74,76} Die Effekte der einzelnen Modifikationen sind verschieden und teilweise widersprüchlich, nur in einem Teil der Fälle lassen sich ihnen bestimmte Wirkungen eindeutig zuordnen (Tab. 1). Die Acetylierung von Lysinresten beispielsweise ist im allgemeinen mit Dekondensation des Chromatins und erhöhter Transkription verbunden,⁷⁷ während Methylierungen an Lysin- oder Argininresten je nach Position und Anzahl der Methylgruppen sowie abhängig vom Kontext sowohl transkriptionsaktivierend als auch -hemmend wirken können.^{73,78,79} Postrationale Histonmodifikationen üben ihre Wirkung auf zwei Weisen aus: (I) Funktionelle Gruppen können die Ladung und damit die DNA-Bindungseigenschaften der Histone verändern⁸⁰ und führen so zu strukturellen Veränderungen am Chromatingerüst. (II) Außerdem dienen sie als Plattform für DNA-assoziierte nicht-Histon-Proteine, die die Transkription weiter beeinflussen. Dabei finden die verschiedenen Modifikationen nicht unabhängig voneinander statt, sondern bestimmte Muster tauchen gehäuft gemeinsam auf. Auch beeinflussen die Modifikationen einander syn- und antagonistisch,^{76,81} und die Reihenfolge, in der sie erfolgen, scheint eine Rolle für ihre Wirkung zu spielen.⁸² Diese Erkenntnisse führten zu der Hypothese, dass sich aus der Kombination und Verteilung der verschiedenen Modifikationen eine eigene komplexe Sprache, der Histoncode, ergibt,^{74,83,84} die eine diverse und hochspezifische Regulation der Transkription ermöglicht. Epigenetischen Modifikationen kommt also offenbar eine duale Bedeutung zu: auf der einen Seite das Etablieren von stabilen, über Zellteilung und Generationen von Individuen hinweg vererbten Mustern der Genexpression, auf der anderen Seite die hochdynamischen, orts- und zeitspezifischen Prozesse, die Anpassungen an akute Umwelteinflüsse ermöglichen.⁸⁵ In Überlappung beider Rollen kann sogar aus erlernter

Erfahrung eine über Generationen weitervererbte Eigenschaft^D werden.⁸⁶ Die Stimulation des MAPK-Signalweges durch Lernstimuli führt zu gen- und histonspezifischen Chromatinmodifikationen.⁵⁰ Auf einige der wichtigsten Typen von Histonmodifikationen soll im Folgenden näher eingegangen werden.

1.1.4 a) Acetylierung

Die Acetylierung war die erste Histonmodifikation, für die ein Zusammenhang mit Transkriptionsaktivität postuliert wurde.⁸⁷ Sie wirkt im allgemeinen transkriptionsfördernd.⁸⁸ Histonacetyltransferasen (HAT) übertragen Acetylgruppen auf die ϵ -Aminogruppe von Lysinen.^{89,90} Durch die Acetylgruppe wird die positive Ladung des Lysins neutralisiert, was die Affinität des Histons zur DNA verringert.^{80,91} Als Folge ändert sich die Konformation der Nukleosomen⁹² und die Chromatinstruktur lockert auf, was wiederum transkriptionsregulierenden Faktoren den Zugang zur DNA ermöglicht.⁹³ Außerdem können acetylierte Lysinreste die Interaktion mit nicht-Histon-Proteinen über deren Bromodomänen induzieren.⁹⁴ Histondeacetylasen (HDAC) können die Acetylgruppen vom Histon wieder entfernen und wirken so inhibierend auf die Transkription.^{95,96} Die Acetylierungen der Lysine 9 und 14 von Histon H3 (H3K9ac bzw. H3K14ac) stehen prototypisch für Genaktivierung⁹⁷ und sind an der Regulation von synaptischer Plastizität im Hippocampus und anderen Hirnarealen beteiligt.^{22,50}

Durch bestimmte HAT kann auch die Demethylierung der DNA vermittelt und so die Repression der betroffenen Gene verhindert werden.⁹⁸ Die beiden antagonistisch wirkenden Prozesse Histonacetylierung und DNA-Methylierung hemmen einander also gegenseitig.

1.1.4 b) Methylierung

Histonmethylierung findet an Lysin- und Argininresten statt. Dabei übertragen Histonmethyltransferasen (HMT) bis zu drei Methylgruppen vom Donormolekül *S*-Adenosylmethionin auf die Aminosäureseitenkette. Über lange Zeit war umstritten, ob Histonmethylierungen überhaupt grundsätzlich reversibel sind oder dauer-

^D Klassische (Angst-)Konditionierung männlicher Mäuse auf einen neutralen, zuvor unbekanntem Geruch löst auch in der F2-Generation noch eine stabile Angstreaktion aus, auch wenn die Konzeption *in vitro* stattgefunden hatte und die Nachkommen durch nichtverwandte Kontrolltiere aufgezogen wurden. An der Vererbung ist eine CpG-Hypomethylierung im Gen des beteiligten Geruchsrezeptors beteiligt.⁸⁶

haft bestehen bleiben, bis 2004 die erste Histondemethylase (HDM) entdeckt wurde.⁹⁹ Inzwischen sind zahlreiche weitere HDM beschrieben.¹⁰⁰ Im Gegensatz zur Acetylierung verändert die Methylierung die Ladung des Histons nicht und beeinflusst so auch seine Affinität zur DNA nicht. Vielmehr erfolgt die Wirkung durch Bindung von weiteren Faktoren, die über stark konservierte Domänen an die modifizierten Aminosäuren binden, darunter Chromo-,^{101,102} Tudor-¹⁰³ und PHD-Domänen.¹⁰⁴ Das Zusammenspiel dieser Faktoren ist derart komplex, dass sich keine bestimmte Wirkung der Methylierung voraussagen lässt. Sie kann sowohl transkriptionshemmend als auch -fördernd sein, wobei die Position der modifizierten Aminosäure und die Anzahl der angehängten Methylgruppen eine Rolle spielen.⁷⁸ Die Methylierung von Histon H3 an Lysin 4 beispielsweise wird als transkriptionsfördernd angesehen,¹⁰⁵ während die Methylierung von Lysin 9 transkriptionshemmend wirkt.¹⁰⁶ An Lysin 27 wiederum gilt die Monomethylierung als Marker für Genaktivierung, Di- und Trimethylierung jedoch führen zu Genrepression.^{78,79} Ausserdem ist die Wirkung abhängig vom Kontext, denn verschiedene Modifikationen beeinflussen einander gegenseitig. So kann H3K9me die Phosphorylierung von Serin 10 verhindern, möglicherweise, indem die Methylgruppen benachbarte Reste überdecken und unzugänglich machen, oder durch die Änderung des spezifischen Substrats der beteiligten Enzyme.¹⁰⁷ H3K9me selbst wird im Gegenzug durch weitere vorbestehende Modifikationen beeinflusst.

1.1.4 c) Phosphorylierung

Phosphorylierung von Histonen kann an allen Hydroxylgruppen tragenden Aminosäureresten erfolgen, also Serin-, Threonin und Tyrosinresten. Sie können, ausgelöst durch extra- und intrazelluläre Stimuli, durch eine ganze Reihe von Kinasen katalysiert werden, darunter PKA und MAPK.^{108,109} Im Allgemeinen wirken Histonphosphorylierungen transkriptionsaktivierend, wobei aber auch gegensätzliche Wirkungen beschrieben sind.⁸¹ Wie bei der Acetylierung wird vermutet, dass das Hinzufügen negativer Ladungen durch die Phosphatgruppen zur Minderung der Bindungsneigung des Histons an das DNA-Rückgrat führt. Weiter gibt es auch hier spezifische Interaktionen phosphorylierter Histonreste mit anderen Proteinkomplexen. Inzwischen wurden mehrere Kandidaten für solche Interaktionen identifiziert. Einige Isoformen aus der 14-3-3-Familie scheinen spezifisch an

H3S10p zu binden.¹¹⁰ Die HAT Gcn5, die unter anderem H3K9 acetyliert, zeigt zehnfache Substratpräferenz für H3S10p gegenüber der unmodifizierten Form.⁸¹ So erlaubt H3S10p eine Verstärkung von H3K9ac und Hemmung von H3K9me und wirkt damit transkriptionsfördernd. Indessen kann ein erhöhter Phosphorylierungsgrad von H3S10, gemeinsam mit H3S28p, auch während der Mitose nachgewiesen werden.^{81,111} Hier wird die Modifikation durch Aurora-Kinasen¹¹² katalysiert und führt zur Kondensation des Chromatins. Offenbar hat also auch die Phosphorylierung der Histone facettenreiche Wirkungen, die abhängig vom Kontext sind.

Tab. 1: Einige Histonmodifikationen und ihre Wirkung auf die Transkription

K Lysin; *R* Arginin; *S* Serin; *ac* Acetylierung; *me* Methylierung; *me2* Dimethylierung; *me3* Trimethylierung; *ub* Ubiquitinylierung; ↑ Transkriptionsaktivierung; ↓ Transkriptionsrepression

Modifikation	Histon/Position	Wirkung
Acetylierung	H3K14ac	↑ Bildung von Euchromatin ⁸¹
	H3K9ac	↑ Bildung von Euchromatin ⁸¹
Methylierung	H3K9me	↓ Heterochromatin, Bindung des Transkriptionsrepressors HP1 ¹⁰⁶
	H3K4me	↑ Initiation, gehäuftes Auftreten in aktiven Promotorregionen ¹⁰⁵
	H3K27me	↑ Gehäuftes Auftreten in aktiven Promotorregionen ^{78,79}
	H3K27me2 K3K27me3	↓ Vorkommen hauptsächlich in inaktiven Genloci, H3K27me3 beteiligt an der Inaktivierung des X-Chromosoms ^{78,79,113}
	H3K79me	↓ gehäuft in Eu-, Hypomethyliert in Heterochromatin, Zellzyklusregulation, katalysiert durch H3K79-spezifische HMT (Dot1L) ¹¹⁴
	H4R3me	↑ aktive Transkription ⁷³
Phosphorylierung	H3S10p	↑ fördert H3K9ac und H3K14ac ^{81,115}
Ubiquitinylierung	H2AK119ub	↓ korreliert mit inaktiven Genen ⁷³
	H2BK120ub	↑ korreliert mit aktiver Transkription ⁷³

1.2 Circadiane Rhythmik und Melatonin

1.2.1 Der Nucleus suprachiasmaticus, zentraler Taktgeber des Körpers

Biologische Rhythmen, die auch ohne exogenen Zeitgeber fortbestehen, sind mindestens seit dem frühen 18. Jahrhundert¹¹⁶ in der Wissenschaft bekannt. Die Fähigkeit, den

ständigen Wechsel zwischen Tag und Nacht zu antizipieren – und die daraus resultierenden rhythmischen Schwankungen von Licht, Wärme, Nahrungsangebot oder der Aktivität von Fressfeinden und Artgenossen und damit des eigenen Fortpflanzungserfolgs – stellt einen klaren Selektionsvorteil dar. Inzwischen wurden in beinahe allen Lebewesen der Erde – von Cyanobakterien¹¹⁷ bis zu den Wirbeltieren und dem Menschen – eigene endogene Uhren entdeckt. Je nach Spezies variiert die Periodenlänge dieser Uhren und weicht mehr oder weniger stark von 24 Stunden ab, weshalb der Begriff circadian (von *circa* – ungefähr und *dies* – Tag) geprägt wurde.¹¹⁸ Beim Menschen beträgt die circadiane Periodenlänge etwa 25 Stunden.¹¹⁹

Bei Säugetieren erzeugen viele Gewebe eigene circadiane Rhythmen, müssen aber von einem zentralen Taktgeber synchronisiert werden. Auf der Suche nach diesem entdeckten 1972 zwei Arbeitsgruppen, dass eine gezielte Zerstörung des hypothalamischen Nucleus suprachiasmaticus (*suprachiasmatic nucleus* – SCN) die motorische Aktivität von Ratten¹²⁰ und deren Cortisolausschüttung¹²¹ arrhythmisch werden lässt. Erst deutlich später konnte gezeigt werden, dass der SCN tatsächlich alleiniger Generator des übergeordneten Masterrhythmus ist: Hamster, die die sogenannte τ -Mutation tragen, haben eine gegenüber dem Wildtyp (24 h) deutlich verkürzte Periodenlänge von 20 h (homozygote Träger) bzw. 22 h (heterozygote Träger).¹²² Tieren mit SCN-Läsionen wurde intaktes SCN-Gewebe von Tieren des mutierten Genotyps übertragen, was ihren Aktivitätsrhythmus wiederherstellte, und zwar stets mit der Periodenlänge des Donortiers, unabhängig vom Genotyp des Empfängers.¹²³

Im SCN werden sogenannte Uhrengene (*Clock*, *Bmal1*, *Per1* bis *Per3*, *Cry1* und *Cry2*) zyklisch exprimiert. Produkte dieser Gene sind Transkriptionsfaktoren, die über translationale und transkriptionale Rückkopplungsmechanismen ihre eigene Synthese und die der anderen Uhrengene fördern bzw. hemmen¹²⁴ und so einen Rhythmus erzeugen. Der Knockout von *Per1* führt zu einem Verlust des Rhythmus.¹²⁵ Durch externe Zeitgeber, insbesondere durch Licht, wird der endogene Rhythmus kontinuierlich resynchronisiert und den Umweltverhältnissen angepasst. Seine Botschaft an die restlichen Körpergewebe sendet der SCN auf neuronalem und humoralem Weg aus. Die neuronalen Projektionen enden größtenteils im Hypothalamus und erreichen über Zwischenstufen andere Bereiche, zum Beispiel den Nucleus praeopticus ventrolateralis, der entscheidende Funktion beim Umschalten zwischen Wachzustand und Schlaf hat.¹²⁶

Transmitter sind zum Beispiel GABA und Neuropeptide wie VIP (Vasoaktives intestinales Peptid), AVP (Arginin-Vasopressin) oder Somatostatin.¹²⁷ Humorale Signale werden übermittelt sowohl durch im SCN selbst sezernierte Stoffe wie z.B. *transforming growth factor alpha* (TGF- α)¹²⁸ oder Prokineticin 2 (PK2)¹²⁹ als auch durch Signalmoleküle entfernt liegender Gewebe wie Glucocorticoide oder Melatonin, deren zyklische Synthese von Efferenzen des SCN reguliert wird.

Angaben zur Tageszeit und Rhythmik erfolgen üblicherweise als *zeitgeber time* (ZT00 bis ZT24) bzw. bei Arbeiten unter circadianen Bedingungen unter Ausschaltung externer Hinweise auf die Zeit als *circadian time* (CT00 bis CT24).

1.2.2 Das Hormon Melatonin

Melatonin (*N*-acetyl-5-Methoxytryptamin)¹³⁰ wird durch Acetylierung und Methylierung aus Serotonin (5-HT, 5-Hydroxytryptamin) hergestellt, das selbst wiederum aus der essentiellen Aminosäure Tryptophan entsteht (Abb. 3).⁵⁸ Melatonin unterliegt einer rhythmischen Synthese mit erhöhter Produktion während der Nacht, unabhängig vom Aktivitätsprofil des untersuchten Tiers.^{131,132}

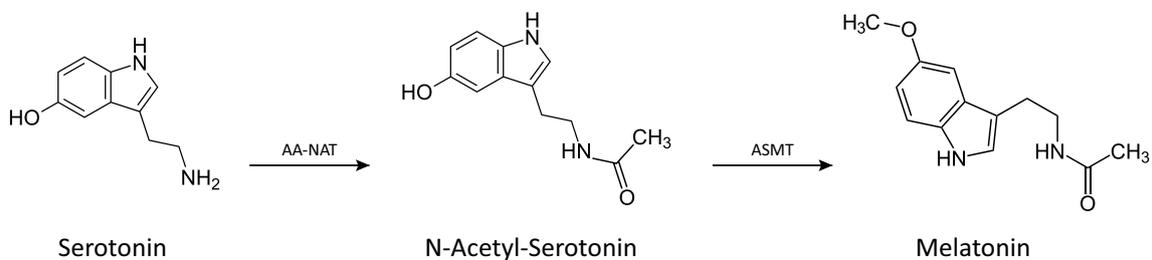


Abb. 3: Strukturformel und Biosynthese von Melatonin

Aus Serotonin (5-Hydroxytryptamin) wird durch N-Acetylierung und anschließend Methylierung Melatonin hergestellt. Geschwindigkeitsbestimmend ist der erste Schritt. *AA-NAT* Arylalkylamin-N-Acetyltransferase; *ASMT* Acetylserotonin-O-Methyltransferase

Neunaugen, die stammesgeschichtlich einfachsten Wirbeltiere, sowie einige weitere Fisch-, Reptilien- und Amphibienarten besitzen auf der Oberseite des Schädels ein medianes »drittes Auge«.¹³³ das sogenannte Parietalaug, das sowohl direkt lichtsensibel ist als auch eine eigene endogene circadiane Uhr enthält.¹³⁴ Die hier stattfindende Melatoninsynthese wird durch Licht gehemmt und durch Dunkelheit gefördert. Über die rhythmische Ausschüttung von Melatonin werden die äußeren Lichtverhältnisse in eine

humorale Botschaft verwandelt, die den peripheren Geweben und Organen Hinweise über die Tages- und Jahreszeit gibt. Mit dem Parietalaugenzellen verwandt ist das epithalamische Pinealorgan der höheren Wirbeltiere, dessen Pinealozyten keine eigene Lichtsensibilität mehr besitzen.^E Hier müssen Lichtreize erst aus dem Auge zum Pinealorgan übermittelt werden. Neben Zapfen und Stäbchen nehmen in der Netzhaut des Auges auch intrinsisch photosensitive retinale Ganglienzellen (ipRGC) mit dem Pigment Melanopsin (Absorptionsmaximum bei 480 nm, also im blauen Bereich)^{137,138} Licht wahr und projizieren über den Tractus retinohypothalamicus (RHT) in den dorsalen SCN.¹³⁹ Von dort werden über Verschaltungen im Nucleus paraventricularis (PVN) sympathische Wurzelzellen in der Columna intermediolateralis (IMC) des oberen Halsmarkes erreicht, die ihrerseits im Ganglion cervicale superius (SCG) auf postsynaptische sympathische Neurone umschalten. Deren Axone gelangen schließlich über den Halsgrenzstrang zum Pinealorgan¹⁴⁰ und schütten während der Dunkelheit Noradrenalin (NA) aus, das die Melatoninsynthese über die Regulation der Enzyme Arylalkylamin-*N*-Acetyltransferase (AA-NAT) und Acetylserotonin-*O*-methyltransferase (ASMT)^F anregt. Bei Nagetieren wird über cAMP, PKA und CREB-Phosphorylierung die Transkription der geschwindigkeitsbestimmenden AA-NAT induziert, während in den meisten anderen Säugetiergruppen AA-NAT von PKA direkt phosphoryliert und so vor dem Abbau bewahrt wird.¹³⁵ Am Tag entfällt die Stimulation durch NA und die Melatoninsynthese fällt auf ein Minimum, und auch während der Nacht lässt sich die Produktion durch Licht effektiv unterdrücken.¹⁴¹ Somit kann Melatonin als Hormon der Dunkelheit bezeichnet werden. Nicht nur die Tageszeit wird dadurch enkodiert, denn die Länge der Melatoninausschüttung zeigt die Länge der Dunkelphase und damit auch die Jahreszeit an. Bei den höheren Vertebraten sind also Lichtrezeption, innere Uhr und Melatoninsynthese auf die drei unterschiedlichen, miteinander komplex verschalteten und rückkoppelnden Hirnstrukturen ipRGC, SCN und Pinealorgan verteilt. Diese bilden das photoneuroendokrine System (PNS, Abb. 4),^{142,143} dessen Aufgabe es ist, intrinsische und extrinsische Zeithinweise zu integrieren und allen Körpersystemen auf humoralem und neuronalem Weg mitzuteilen, um ihre Tätigkeiten entsprechend zu steuern. So können wichtige Körperfunktionen wie Aktivität, Futtersuche, Reproduktion, Winterschlaf

^E Als Indiz ihrer Abstammung exprimieren aber auch die Pinealozyten von Säugetieren, obwohl »lichtblind«, noch Photorezeptorproteine.¹³⁵ Werden die Pinealorgane neugeborener Ratten *in vitro* gehalten, entwickeln diese sogar wieder photosensitive Eigenschaften. So konnte nach 7 Tagen in Kultur die durch Noradrenalin ausgelöste Melatoninsynthese durch Licht vollständig supprimiert werden.¹³⁶

^F Synonym verwendet wird Hydroxyindol-*O*-Methyltransferase (HIOMT).

etc. der Tages- und Jahreszeit entsprechend reguliert und optimal aufeinander abgestimmt werden.

Melatonin ist dabei nicht nur ein Effektorsignal, es wirkt auch rückkoppelnd auf die innere Uhr und kann diese synchronisieren und ihre Phasenlage verschieben. Es dämpft die spontane elektrische Aktivität von Neuronen des SCN¹⁴⁴ und vermindert die Phosphorylierung von CREB, die durch PACAP, den Transmitter des RHT, vermittelt wird.¹⁴⁵ Bei Ratten, die im Dauerdunkel gehalten werden und einen freilaufenden Rhythmus zeigen, führt eine regelmäßige Melatoningabe dazu, dass sich wieder ein exakter 24-h-Rhythmus einstellt.¹⁴⁶ Auch bei augenlosen blinden Menschen, denen also jegliche Lichtwahrnehmung auch über ipRGC fehlt, kann der endogene Rhythmus durch Melatonin wiederhergestellt werden, sodass Schlaf, Körpertemperatur und Cortisolspiegel einem 24-stündigen Verlauf folgen.¹⁴⁷ Dabei ist der Applikationszeitpunkt entscheidend: Am Beginn des subjektiven Tages zu CT02 angewendet, verursacht Melatonin eine Phasenverzögerung. Wenn es jedoch kurz vor Beginn der Nacht verabreicht, der endogen erhöhte Hormonspiegel also vorverschoben wird, beschleunigt sich auch die Phase^G der Uhr.^{148,149} Die gleiche hormonelle Botschaft erzeugt also je nach Tageszeit entgegengesetzte Effekte. Tagsüber appliziert wirkt Melatonin sedierend und schlaffördernd bei Mäusen¹⁵² und Menschen,¹⁵³ bei Anwendung während der Nacht zeigt sich gar kein Effekt. Trägt man die Stärke der Wirkung (Phasenbeschleunigung oder -verzögerung) gegen den Zeitpunkt der Applikation auf, erhält man die Phasenantwortkurve (PRC) für Melatonin. Auch durch Lichtpulse lassen sich Phasenverschiebungen erzeugen, die PRC von Licht ist der von Melatonin genau entgegengesetzt.¹⁵⁴ Diese Wirkungen sind identisch bei tag- und bei nachtaktiven Tieren und unterstreichen die Bedeutung von Melatonin als Hormon der Dunkelheit. Bereits intrauterin kommuniziert die schwangere Mutter mit dem Feten durch das plazentagängige Melatonin¹⁵⁵ und trainiert und synchronisiert so dessen noch unreifes eigenes circadianes System mit dem ihren.^{156,157} Mit steigendem Alter wird der nächtliche Anstieg des Melatonins bei Menschen zunehmend kleiner, oft verbunden mit tagsüber gesteigerten Spiegel. Somit flacht die Amplitude des Melatoninrhythmus im Alter ab, eventuell verursacht durch Alterungsprozesse im SCN und damit verminderte noradrenerge Innervation der Pi-

^G Die phasenverschiebende Wirkung von Melatonin hat dazu geführt, dass es inzwischen bei transmeridianen Flugreisen eingesetzt wird, um den Jetlag durch die Zeitverschiebung abzumildern. Forschungsergebnisse hierzu sind umstritten und recht unterschiedlich. Dabei hat sich gezeigt, dass am ehesten ein positiver Effekt erzielt werden kann bei ostwärts gerichteten Reisen über fünf und mehr Zeitzonen.^{150,151}

nealozysten.¹⁵⁸ Damit einher gehen häufig ein veränderter Biorhythmus und Schlafstörungen.

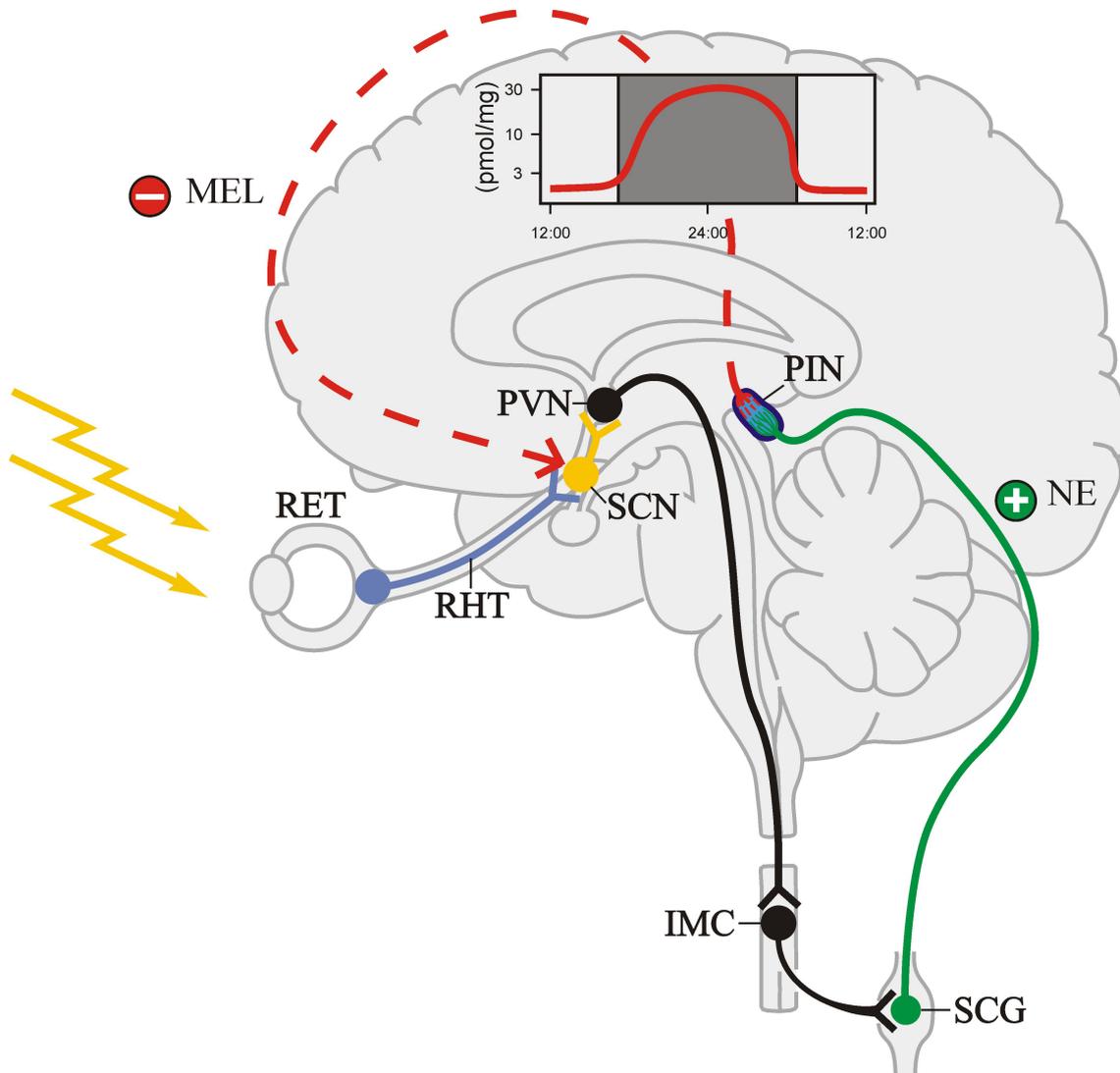


Abb. 4: Das Photoneuroendokrine System (PNS)

Die ipRGC leiten den Lichtreiz zum SCN, dem Ort des zentralen circadianen Oszillators. Von dort wird er multisynaptisch zum Pinealorgan weitergeleitet, dem Syntheseort von Melatonin, das rückkoppelnd auf den SCN wirkt. Der eingeschobene Graph zeigt die Melatoninproduktion des humanen Pinealorgans an. *RET* Retina; *RHT* Tractus retinohypothalamicus; *SCN* Nucleus suprachiasmaticus; *PVN* Nucleus paraventricularis; *IMC* Columna intermediolateralis; *SCG* Ganglion cervicale superius; *NA* Noradrenalin; *PIN* Pinealorgan; *MEL* Melatonin.¹³⁵

Systemische Wirkungen von Melatonin werden über spezifische Membranrezeptoren (vgl. Abschnitt 1.2.3) und möglicherweise auch nukleäre Rezeptoren^{159,160} vermittelt und sind vielfältig. Melatonin ist in pharmakologischer, überphysiologischer Konzentration ein Antioxidans,¹⁶¹ und man vermutet, dass diese Wirkung in einfachen Organismen und möglicherweise in Pflanzen seine Hauptaufgabe darstellt. Durch Modulation

der Hypophysen-Gonadenachse beeinflusst es die saisonale Reproduktion.¹⁶² Eine Rolle in der metabolischen Regulation wird vermutet,^{163,164} Rezeptor-Mutationen im Zusammenhang mit Diabetes mellitus,¹⁶⁵ ADHS¹⁶⁶ oder Autismus¹⁶⁷ sind beschrieben. Zahlreiche weitere unterschiedlich gut belegte Wirkungen und therapeutische Implikationen werden dem Hormon des Pinealorgans zugeschrieben, bis hin zu angeblicher positiver Wirkung bei Krebserkrankungen,¹⁶⁸ Gallensteinen¹⁶⁹ oder Tinnitus.¹⁷⁰

1.2.3 Melatoninrezeptoren

Zwischen der Beschreibung des Melatonins und der Charakterisierung seiner Rezeptoren vergingen mehrere Jahrzehnte. Anfang der Achtzigerjahre legten Ligandenstudien mit radioaktiv markiertem Melatonin nahe, dass zwei verschiedene Membranrezeptoren existieren,^{171,172} bei denen es sich jeweils um pertussistoxinsensible G-Protein-gekoppelte Rezeptoren handelt.¹⁷³ Beide werden in den verschiedensten nicht-neuronalen und neuronalen Geweben, u.a. dem SCN, exprimiert. Der erste Melatoninrezeptor, der 1994 aus den Melanophoren aus der Haut des Krallenfrosches *Xenopus laevis* kloniert werden konnte, war der Mel_{1c}-Rezeptor.¹⁷⁴ Dieser kommt, wie sich später herausstellte, nur bei Fischen, Amphibien und Vögeln vor.^H Wenig später wurden dann bei Säugetieren die beiden Rezeptoren Mel_{1a} (später neu benannt in MT₁) und 1995 Mel_{1b} (MT₂) kloniert und charakterisiert.¹⁷⁶⁻¹⁷⁸ Beide Gene bestehen aus je zwei Exons (MT₂ bei Ratten ausnahmsweise aus drei Exons), die von einem etwa 13 kBp großen Intron getrennt werden. Sie kodieren für zwei jeweils etwa 40 kDa schwere Proteine mit sieben Transmembrandomänen, die in die Familie der Rhodopsin-ähnlichen G-Protein-gekoppelten Rezeptoren eingeordnet werden.¹⁷²

1.2.3 a) MT₁

Der MT₁-Rezeptor ist an ein inhibitorisches G-Protein (G_{i/o}) gekoppelt. Über die Hemmung der Adenylatcyclase wird cAMP verringert und die Aktivität von PKA und die Phosphorylierung von CREB vermindert. In nicht-neuronalen Zellen aktiviert MT₁ auch den ERK1/2-Signalweg, außerdem können durch MT₁ verschiedene Ionenkanäle für Ca²⁺ und K⁺ geöffnet werden. Durch MT₁ werden die spontane Feuerrate von SCN-Neuronen und die PACAP-vermittelte CREB-Phosphorylierung vermindert, beide Effekte traten in MT₁-knockout-Mäusen nicht auf.^{145,179}

^H Inzwischen konnte der nur bei den Plazentatieren vorkommende Orphan-Rezeptor GPR50, der keine Melatonin-affinität mehr aufweist, als Homolog zu Mel_{1c} identifiziert werden.¹⁷⁵

MT₁ könnte auch verantwortlich sein für Melatonin-vermittelte Effekte auf saisonales Reproduktionsverhalten. Dafür spricht, dass der sibirische Hamster, der von Natur aus keinen funktionalen MT₂-Rezeptor exprimiert, sich unbeeinträchtigt saisonal fortpflanzt.¹⁸⁰

1.2.3 b) MT₂

Auch der MT₂-Rezeptor ist G_{i/o}-gekoppelt und inhibiert die Bildung von cAMP und cGMP. Außerdem stimuliert er PKC und wirkt möglicherweise über den PLC/DAG-Signalweg.¹⁷² Außerdem scheint MT₂ eine wichtige Rolle beim hippocampusabhängigen Lernen zu spielen. Bei Mäusen ohne MT₂ fehlte die durch Melatonin vermittelte Hemmung von LTP in Hippocampus-Slices.¹⁸¹

Der phasenmodulierenden Wirkung von Melatonin auf den SCN liegt anhand von Knockout-Studien *in vitro* vornehmlich MT₂ zugrunde. *In vivo* scheint allerdings auch MT₁ eine wichtige Rolle zu spielen, sodass möglicherweise auch ein gewisse Redundanz besteht.^{172,179}

Ein zwischenzeitlich aufgrund von Radioligandenstudien postulierter weiterer membranständiger Rezeptor (MT₃ oder auch ML₂) konnte inzwischen als das Protein Chinonreduktase II (QR2) identifiziert werden.¹⁸² Als potentielle nukleäre Melatoninrezeptoren wurde die Orphan-Rezeptorfamilie RZR/ROR, insbesondere ROR α , vorgeschlagen.¹⁵⁹

1.2.4 Rhythmus, Melatonin und Lernen

Es besteht ein hohes Maß an Übereinstimmung zwischen den Signalkaskaden in der Regulation circadianer Rhythmik und denen bei der Gedächtnisbildung.^{183,184} Im Hippocampus konnten beispielsweise periodische Schwankungen von Uhrengenen¹⁸⁵ sowie von cAMP und der Aktivität von MAPK¹⁸⁶ nachgewiesen werden. Lernprozesse und sowohl das Formieren als auch das Abrufen von Erinnerungen sind stark vom circadianen Rhythmus abhängig. Disruptionen dieses Rhythmus können die Gedächtnisleistung schwer beeinträchtigen.^{184,187} Beispielsweise verursacht eine Phasenverschiebung bei Ratten eine retrograde Amnesie für *active/passive avoidance conditioning*.¹⁸⁸ Auch bei Aufgaben des räumlichen Lernens zeigen sich Defizite, wobei weniger das initiale Erlernen neuer Information betroffen ist als die Konsolidierung dieser Erinnerungen.¹⁸⁹ Es scheinen also vor allem das »Herunterladen« aus dem Arbeitsgedächtnis und die

Überführung in das Langzeitgedächtnis, typische Prozesse des Hippocampus, betroffen zu sein. Mäuse mit einem Knockout des Uhrengens *Per1* zeigen schwere Lerndefizite bei hippocampusabhängigen Aufgaben.¹⁸⁵ Lernprozesse sind aber auch prinzipiell von der Tageszeit abhängig. Mäuse, zumindest unter Laborbedingungen nachtaktive Tiere, zeigen in Lernversuchen bessere Ergebnisse, wenn diese am Tag durchgeführt wurden, also während ihrer eigentlich inaktiven Phase.^{186,190} Der Effekt besteht einheitlich über die verschiedensten Spezies hinweg, und zwar unabhängig von der Aktivitätsphase des Tieres. Sowohl bei dem Mollusken *Aplysia californica*,¹⁹¹ dem Zebrafisch *Danio rerio*¹⁹² (beide tagaktiv) als auch in nachtaktiven Säugetieren¹⁹⁰ wurde ein verbessertes Lernen während des subjektiven Tages nachgewiesen. Zumindest bei Mäusen¹⁹⁰ und *Danio rerio*¹⁹² besteht diese Präferenz für den subjektiven Tag (wenn auch etwas flacher) auch bei unter Dauerdunkel gehaltenen Tieren fort. Dabei ist der Zeitpunkt des Trainings (*Acquisition*) entscheidend, nicht der Zeitpunkt, zu dem der Lernerfolg überprüft wird (*Retrieval*).¹⁹² In der Vermittlung dieses Effektes spielt Melatonin (endogen oder exogen zugeführt) eine entscheidende Rolle, und zwar bei verschiedenen Arten des Lernens. Bei Mäusen inhibiert es den Erfolg klassischer Konditionierung,¹⁹³ beim Zebrafisch wird das räumliche Lernen unterdrückt.¹⁹² Wird seine Wirkung durch Entfernen des Pinealorgans oder Behandlung mit Melatonin-Antagonisten aufgehoben, so bleibt die Lernleistung tagsüber unbeeinflusst, während sie in der Nacht das gleiche Niveau wie am Tag erreicht.¹⁹²

Im Hippocampus kann Melatonin konzentrationsabhängig sowohl evozierte Potentiale^{194,195} als auch LTP¹⁸¹ unterdrücken, was sich durch den selektiven MT₂-Antagonisten 4P-PDOT oder den Knockout von MT₂ aufheben lässt. Der PKA-Inhibitor 5-Isochinosulfonamid (H-89) hat die gleiche inhibierende Wirkung wie Melatonin, die sich durch Forskolin, einen Stimulator der cAMP-Synthese, wieder aufheben lässt.¹⁹⁶ Somit scheint diese Wirkung im Hippocampus durch MT₂ und PKA vermittelt zu sein. MT₂^{-/-}-Mäuse zeigen jedoch keinesfalls eine verbesserte Gedächtnisleistung, sondern im Vergleich zum Wildtyp sowohl generell abgeschwächte hippocampale LTP als auch *in vivo* schlechtere Memoryperformance. Dies äußert sich beispielsweise in der verlängerten Latenz, im *Elevated Plus Maze* (EPM) einen der geschlossenen Arme aufzusuchen.¹⁹⁷

Die in der L-LTP zentrale MAPK ihrerseits phosphoryliert mit BMAL1 das Produkt des für die circadiane Rhythmik essentiellen Uhrgens *Bmal1* und gibt so negatives Feedback an die Uhr.¹⁹⁸ Somit ist das Lernen nicht nur zeitabhängig, sondern kann möglicherweise seinerseits auch selbst als Zeitgeber fungieren.¹⁹⁹

1.3 Verhaltensversuche

1.3.1 *Radial Arm Maze*

Für Untersuchungen zum räumlichen Lernen sind verschiedene Versuchsaufbauten wie *Morris Water Maze* (MWM), EPM oder *Radial Arm Maze* (RAM) gängig und gut etabliert. Teilweise nehmen in diesen Aufbauten jedoch auch weitere Faktoren wie zum Beispiel Stress deutlichen Einfluss auf den Lernerfolg.²⁰⁰ So können in dem weit verbreiteten MWM – das ursprünglich für Ratten entwickelt wurde²⁰¹ – auch Mäuse mit beidseitiger Ablation des Hippocampus ihre Leistung über die Zeit noch verbessern,^{200,202} was nahelegt, dass in dem Versuch auch eine nichthippocampale Komponente eine Rolle spielt. In der Tat bewohnen Mäuse normalerweise trockene Lebensräume und das unfreiwillige Schwimmtraining dürfte für sie erheblichen Stress darstellen. Im Gegensatz dazu gilt das *Radial Arm Maze* als weitgehend frei von solchen Störfaktoren und wird daher als spezifischer und besonders gut geeignet zur Evaluation von räumlichem Lernen angesehen.²⁰⁰

In den beschriebenen Paradigmen wird der Versuch üblicherweise an z.B. fünf aufeinanderfolgenden Tagen durchgeführt, um dann anhand der Fehlerzahlen den Lernfortschritt zu bewerten. In der vorliegenden Arbeit sollten jedoch die frühen und unmittelbaren Vorgänge beim Erlernen neuer Information untersucht werden, daher wurde der Versuch an nur einem Tag ausgeführt und unmittelbar im Anschluss daran die Gewebeproben entnommen.

1.3.2 *Open Field Test*

Der *Open Field Test* (OFT) ist eine Versuchsanordnung, die ursprünglich entwickelt wurde, um die Ausscheidungen von Tieren einfach quantifizieren zu können und daraus auf deren Erregungszustand rückzuschließen.²⁰³ Er ist einfach in Aufbau und Anwendung und hat dadurch weite Verbreitung gefunden und wird zur Evaluation zahlreicher Parameter als Ausdruck von Erregung und Angst, Gesamtaktivität und anderer Verhaltensmuster verwendet. Es ist aber kaum standardisiert, worauf neben der unzureichen-

den Validierung vieler verwendeter Erhebungsparameter die Hauptkritik an seiner Verwendung gründet.^{204–206} Stress bzw. Angstverhalten stellt immer einen möglichen Störfaktor von Verhaltensuntersuchungen dar, die zwangsläufig einen mehr oder weniger starken Eingriff ins natürliche Umfeld und Verhalten des Versuchstieres bedeuten. Um diesen Störfaktor zu quantifizieren wurde der OFT durchgeführt. Beruhend auf dem natürlichen Verhalten von Mäusen, offene Räume zu meiden und sich präferentiell in der Nähe der Wände als Deckung aufzuhalten, wird die Häufigkeit des Betretens des zentralen Bereichs bzw. die dort insgesamt verbrachte Zeit als umgekehrt mit Angstverhalten korrelierend gewertet. Dies und die Latenzzeit bis zum Beginn von Bewegungsaktivität sind die am besten validierten Parameter,²⁰⁵ auf deren Erhebung sich daher beschränkt wurde.

1.4 Zielsetzung der Arbeit

Lern- und Gedächtnisprozesse sowie deren zelluläres Korrelat, die Langzeitpotenzierung, hängen von der Tageszeit ab und sind auf afferente Signale einer intakten inneren Uhr angewiesen. Bei den molekularen Vorgängen der Gedächtnisengrammierung spielen der cAMP/PKA/MAPK/CREB-Signaltransduktionsweg und epigenetische Modifikationen (Acetylierung, Methylierung, Phosphorylierung) von DNA und deren Histonen eine wichtige Rolle. Darüber hinaus ist eine hormonelle Beeinflussung von Gedächtnisleistungen durch Melatonin vielfach belegt.

Ziel der vorliegenden Arbeit ist es, Veränderungen des cAMP-Signalweges und einiger mit synaptischer Plastizität assoziierter Histonmodifikationen nach dem Erlernen neuer Information zu unterschiedlichen Tages- und Nachtzeiten zu beleuchten. Darüber hinaus soll der Einfluss von Melatonin bei diesen Vorgängen analysiert werden. Lernstimulus ist hierzu ein Versuchsparadigma für räumliches Lernen, das *Radial Arm Maze*, in dem Wildtyp-Mäuse sowie melatoninrezeptordefiziente Mäuse zu unterschiedlichen Tageszeiten trainiert wurden und anschließend an entnommenem Hippocampusgewebe der Tiere die entsprechenden molekularbiologischen Analysen durchgeführt wurden.

2. Material und Methoden

2.1 *In-vivo*-Analysen

2.1.1 Versuchstiere

Haltung und Versuche standen in Einklang mit dem Tierschutzgesetz der Bundesrepublik Deutschland (TierSchG der Fassung vom 18. Mai 2006 (BGBl. I S. 1206, 1313), geändert durch Artikel 1 des Gesetzes vom 4. Juli 2013 (BGBl. I S. 2182)) sowie der europäischen Tierschutzrichtlinie (Richtlinie 2010/63/EU vom 22. September 2010).

Verwendet wurden ausschließlich männliche Mäuse (*Mus musculus*) des Stammes C3H (Charles River, Sulzfeld, Deutschland) sowie MT_{1/2}-Doppel-KO (MT_{1/2}^{-/-}) mit C3H-Hintergrund aus eigener Zucht. Diese waren zuvor durch Kreuzen von MT₁-KO¹⁷⁹ mit MT₂-KO²⁰⁷ und Verpaarung der Nachkommen für mindestens zehn Generationen erzeugt worden.²⁰⁸ C3H wurden ausgewählt, da diese im Gegensatz zu vielen anderen häufig verwendeten Stämmen von Labormäusen über eine rhythmische Melatoninproduktion verfügen.^{209,210} Zum Versuchszeitpunkt hatten alle Tiere ein Alter zwischen 12 und 16 Wochen. Die Tiere wurden in herkömmlichen Polycarbonatkäfigen einzeln (Eurostandard Typ II, 267 x 207 x 140 mm) oder in Gruppen mit bis zu fünf Individuen (Eurostandard Typ III, 425 x 266 x 255 mm) gehalten; im Käfig wurde Einstreu (Lignocel, Hygienic Animal Bedding, Rettenmaier & Söhne GmbH & Co. KG, Rosenberg, Deutschland) verwendet, Futter (Altromin 1324, Altromin Spezialfutter GmbH & Co. KG, Lage, Deutschland) und Wasser standen *ad libitum* zur Verfügung. Im Tierstall herrschten eine konstante Temperatur von 20 ± 2 °C und ein Licht/Dunkel-Rhythmus von 12 Stunden Licht und 12 Stunden Dunkelheit (LD 12/12). Der Zeitpunkt des Lichteinschaltens wurde als ZT00 definiert und lag um 7:00 Uhr (Versuch zu ZT02) bzw. 19:00 Uhr (Versuch zu ZT14). Vor Versuchsbeginn wurden sämtliche Tiere für mindestens zwei Wochen im entsprechenden Rhythmus gehalten, um eine ausreichende Synchronisation der inneren Uhr zu erlauben.²¹¹ Alle Tiere wurden routinemäßig gewogen und auf ihre allgemeine Konstitution untersucht.

2.1.2 *Radial Arm Maze*

Als Versuchsapparatur für diesen Versuch wurde ein achtarmiges, nach oben offenes Labyrinth (Radial Arm Maze, TSE Systems GmbH, Bad Homburg, Deutschland) ver-

wendet.^{212,213,185} Es bestand aus einer zentralen oktogonalen Plattform aus grauem PVC, von welcher die acht Arme (300 x 50 x 150 mm) aus transparentem Acrylglas abzweigten (Abb. 5 A). Am Ende jedes Armes befand sich eine Belohnung in Form eines kleinen Futterpellets in einem kleinen Trog, sodass es von der Maus nicht gesehen werden konnte. Als Belohnung während des *Radial Arm Maze* diente handelsüblicher Zwieback (Markenzwieback, Brandt Zwieback-Schokoladen GmbH + Co. KG, Hagen, Deutschland). Nach jedem Durchlauf wurden Kot und Urin entfernt und der gesamte Aufbau mit Ethanol 70 % gereinigt. Die gesamte Versuchsanordnung wurde nach jedem Tag um einen Arm, also 45 °, weitergedreht, um eine Orientierung an Duftmarken auszuschließen. Außerhalb des Labyrinthes wurden verschiedene Gegenstände als externe Orientierungshilfen aufgestellt, deren Positionen im Verlauf des gesamten Versuches nicht verändert wurden.

Vor Versuchsbeginn wurden die Tiere zunächst gewogen und separiert. Dann folgte eine zweitägige Habituationsphase, während derer den Tieren einmal pro Tag immer zur gleichen Zeit (der späteren Versuchszeit) gestattet wurde, das Labyrinth für jeweils zehn Minuten frei zu erkunden; am Ende jedes Armes befand sich ein großes Futterpellet. Während dieser Habituationsphase wurde die Verfügbarkeit von Futter auf eine gewichtsadaptierte Menge pro Tag verringert, um eine Reduktion des Körpergewichtes auf 85–90% des Ausgangswertes zu erreichen. Am dritten Tag wurde der eigentliche Versuch bei einer Gruppe Tiere zwei Stunden nach Tagesanbruch (ZT02), bei einer weiteren Gruppe zwei Stunden nach Beginn der Dunkelphase (ZT14) durchgeführt. Versuch wie auch Habituation erfolgten unter den dem jeweiligen Rhythmus entsprechenden Lichtbedingungen: zu ZT02 unter hellem weißem Licht (250 lux), zu ZT14 unter Rotlicht (<10 lux, >680 nm Wellenlänge), um eine Desynchronisation der inneren Uhr zu vermeiden. Ziel des Versuches war, im Labyrinth die kleine Futterbelohnung (etwa 10 mg) am Ende jedes Armes zu finden. Notiert wurden die folgenden Parameter:

- a) Die Anzahl und Reihenfolge der betretenen Arme. Ein Arm wurde dann als betreten gewertet, wenn sich die Maus mit allen vier Pfoten in seinem Inneren befand.
- b) Die Zeit, bis alle Belohnungen gefressen waren.

- c) Die Anzahl der Fehler. Als Fehler wurde das Betreten eines Armes ohne Fressen der Futterbelohnung gewertet sowie ein Wiederbetreten von Armen, in denen die Belohnung bereits verzehrt worden war.

Der Versuch wurde beendet, wenn alle acht Belohnungen gefunden waren, spätestens aber nach 15 Minuten. Danach wurde die Maus in ihren Heimkäfig zurückgebracht. Zu den vier definierten Zeitpunkten (30 min, 1 h, 4 h, 6 h nach Versuchsabschluss) erfolgte anschließend wie unter 2.2.1 beschrieben die Entnahme der Hippocampi jeweils dreier Versuchstiere sowie zeitgleich dreier Mäuse aus der Kontrollgruppe, die den Versuch nicht durchlaufen hatten, ansonsten aber gleichen Bedingungen bezüglich Futter, Handling, etc. ausgesetzt waren.

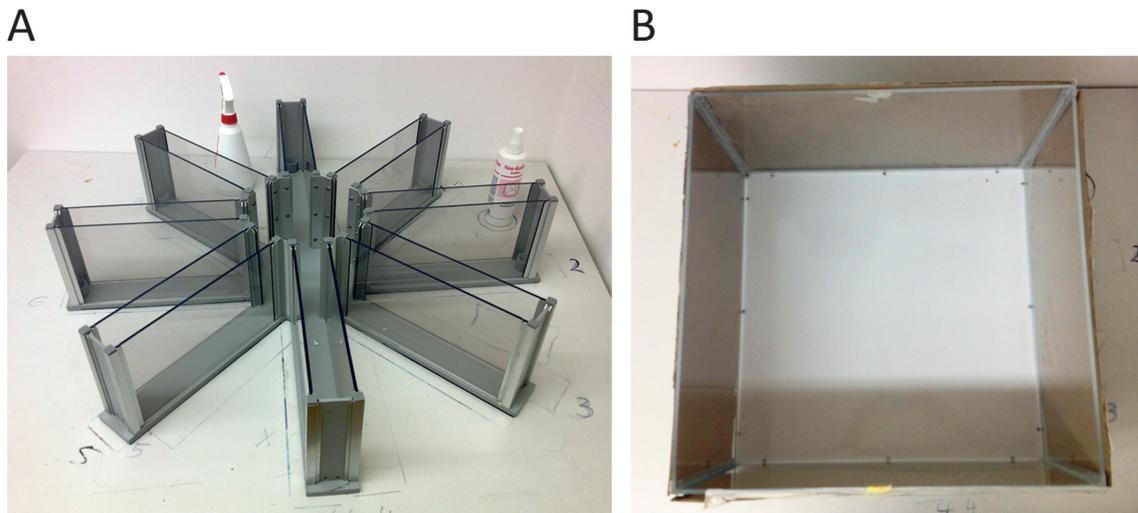


Abb. 5: Versuchsaufbauten *Radial Arm Maze* und *Open Field Test*

A *Radial Arm Maze*: oktagonale Mittelplattform mit acht identischen Armen aus transparentem Acrylglas, an ihrem Ende jeweils ein kleiner Futtertrog. Außerhalb des Labyrinths zwei Sprühflaschen als Landmarken zur Orientierung (Weitere Orientierungshilfen wurden zur besseren Übersichtlichkeit im Foto entfernt). **B** *Open Field Test*: leere quadratische Plattform, transparente Wände für diesen Versuch blickdicht beklebt. Aufnahme aus der Perspektive der Auswertungskamera.

2.1.3 *Open Field Test*

Für den *Open Field Test* diente als Versuchsaufbau eine quadratische Plattform aus weißem Acrylglas mit Wänden aus transparentem Acrylglas mit den Abmessungen 600 x 600 x 400 mm (Abb. 5B). Die Wände wurden für diesen Versuch blickdicht beklebt. Senkrecht oberhalb der Versuchsanordnung befanden sich ein Infrarotstrahler für die Beleuchtung und eine Infrarotkamera, fernsteuerbar aus dem benachbarten Raum, in dem auch der Computer zur Datenaufzeichnung stand.

Vor Versuchsbeginn wurden die Tiere zunächst einzeln in Käfige gesetzt, gewogen und in den Versuchsraum verbracht, anschließend folgte eine Habituationsphase von mindestens drei Tagen. Die Messungen erfolgten an drei aufeinander folgenden Tagen jeweils zu ZT16 unter Rotlicht, da der endogene Melatoninspiegel bei C3H-Mäusen in der zweiten Hälfte der Nacht am höchsten ist.^{210,214,215} Die Tiere wurden in die Mitte des Open Field gesetzt, der Tester verließ den Raum und startete ferngesteuert die Aufzeichnung. Nach 30 Minuten Testzeit wurde die Maus in ihren Heimkäfig zurückgesetzt, Kot und Urin aus dem Open Field entfernt und dieses gründlich mit Ethanol 70% gereinigt. Die Videodateien wurden mit zufällig vergebenen Zahlencodes benannt, um später eine in Bezug auf den Genotyp verblindete Auswertung der Daten zu erlauben. Dazu verwendet wurde die Software EthoVision XT (Noldus Information Technology, Wageningen, Niederlande). Aufgezeichnet wurden folgende Parameter:

- a) Die Latenzzeit bis zum Aktivitätsbeginn (erster Wechsel in den Randbereich)
- b) Die Anzahl der Übertritte von einem Bereich in einen anderen sowie die Anzahl der Eintritte in den zentralen Bereich
- c) Die insgesamt im zentralen Bereich verbrachte Zeit

2.2 *Ex-vivo*-Analysen

2.2.1 Präparation und Probenentnahme

Zu vier definierten Zeitpunkten (30 min, 1 h, 4 h, 6 h) nach Abschluss des Trainings im *Radial Arm Maze* erfolgte die Präparation der Hippocampi. Zunächst wurden die Tiere durch Dislokation des Atlantooccipitalgelenks getötet, dann decapitiert und die Schädelkalotte abgelöst. Der Bulbus olfactorius wurde abgelöst und der caudale Anteil des Gehirns, der die Hippocampi enthält, an der Medulla oblongata angehoben, sodass die Nervi optici rostral des Chiasma opticum durchtrennt werden konnten. Sodann konnte das Gehirn komplett aus der Schädelbasis gehoben werden. Um die Hippocampi freizulegen, wurden die Hemisphären des Großhirns mit einem feinen Spatel vorsichtig auseinander geschoben, schließlich wurde jeweils der rechte Hippocampus entnommen und bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ auf Trockeneis tiefgefroren.

Für die Gewinnung der Schwanzbiopsien für die Genotypisierung wurde den bereits toten Tieren ein etwa 5 – 10 mm langes Stück vom Ende des Schwanzes abgeschnitten.

Dieses wurde dann ebenfalls auf Trockeneis tiefgefroren und bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ für die spätere Verarbeitung konserviert.

2.2.2 Vorbereiten der Proben für die Genotypisierung

Um die gewonnenen Schwanzbiopsien für die Genotypisierung vorzubereiten, wurde zunächst ein Gewebeverdauer mit Proteinase K durchgeführt.²¹⁶ Hierzu wurde ein etwa 5 mm langes Stück des Schwanzes zusammen mit 200 μl eines Lysereagens (DirectPCR Lysis Reagent Tail, Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen, Deutschland) und 2,5 μl Proteinase K (peqGOLD Proteinase K, Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen, Deutschland) für etwa 3 Stunden bei $55\text{ }^{\circ}\text{C}$ auf einer Schüttelplattform inkubiert, bis sämtliches Gewebe aufgelöst war. Danach erfolgte für 45 Minuten ein Erhitzen auf $85\text{ }^{\circ}\text{C}$, um die Proteinase zu deaktivieren. Das so erhaltene Lysat kann direkt und ohne vorheriges Ausfällen und Isolieren der DNA für die Amplifikation eingesetzt werden, da Proteinase K im Gewebe enthaltene Nukleasen zersetzt und das Lysereagenz entsprechend zusammengesetzt ist, um weitere Störfaktoren bei der PCR zu inhibieren. Anschließend wurden die Proben wieder auf Eis gekühlt.

2.2.3 Genotypisierung mittels PCR

Bei der Polymerasekettenreaktion (*polymerase chain reaction*, PCR) findet mithilfe zweier spezifischer Primer, die den gesuchten DNA-Abschnitt flankieren, eine gezielte, exponentielle Vermehrung der Sequenz statt.²¹⁷ Der Forward-Primer ist komplementär zum Matrizenstrang der DNA und stellt damit das 5'-Ende der Zielsequenz dar, der Reverse-Primer ist komplementär zum kodierenden Strang und markiert das 3'-Ende der Sequenz. Zunächst muss die DNA auf $94\text{ }^{\circ}\text{C}$ erhitzt werden, um eine Denaturierung und Trennung des Doppelstrangs zu erreichen. Anschließend wird für die Primerhybridisierung die Temperatur auf $60\text{ }^{\circ}\text{C}$ gesenkt. Im dritten Schritt findet bei $72\text{ }^{\circ}\text{C}$, dem Temperaturoptimum der Polymerasereaktion, die Elongation der neuen Stränge statt. Bei jedem Zyklus der Reaktion wird so der Genabschnitt zwischen den beiden Primern kopiert; es verdoppelt sich also jedes Mal die Anzahl an DNA-Molekülen. Durch die Verwendung einer temperaturstabilen Polymerase aus dem Bakterium *Thermophilus aquaticus* (*Taq*-Polymerase), die auch bei den verwendeten hohen Temperaturen nicht denaturiert,²¹⁸ wird eine Automatisierung der Reaktion möglich, da nicht nach jedem Zyklus neue Polymerase zugesetzt werden muss.

In dieser Arbeit wurde für die Genotypisierung ein Cocktail aus drei verschiedenen Primern (Tab. 2) verwendet: Ein gemeinsamer Forward-Primer (F), ein Reverse-Primer (R) aus dem Intron 1 des Gens sowie ein Reverse-Primer, der innerhalb der eingefügten Knockout-Kassette bindet (NEO). Auf diese Weise ließ sich in einer einzigen Reaktion das Vorhandensein sowohl des Wildtyp- als auch des Knockout-Allels prüfen. Die Primer F und R erzeugen ein wildtypspezifisches Amplifikationsprodukt von 480 (MT₁) bzw. 272 (MT₂) Basenpaaren Länge, die Primer F und NEO ein knockoutspezifisches von 240 (MT₁) bzw. 550 (MT₂) Basenpaaren Länge (Abb. 6). Das Auftreten zweier Banden spricht also für einen heterozygoten Genotyp, da beide Allele vorhanden sind.

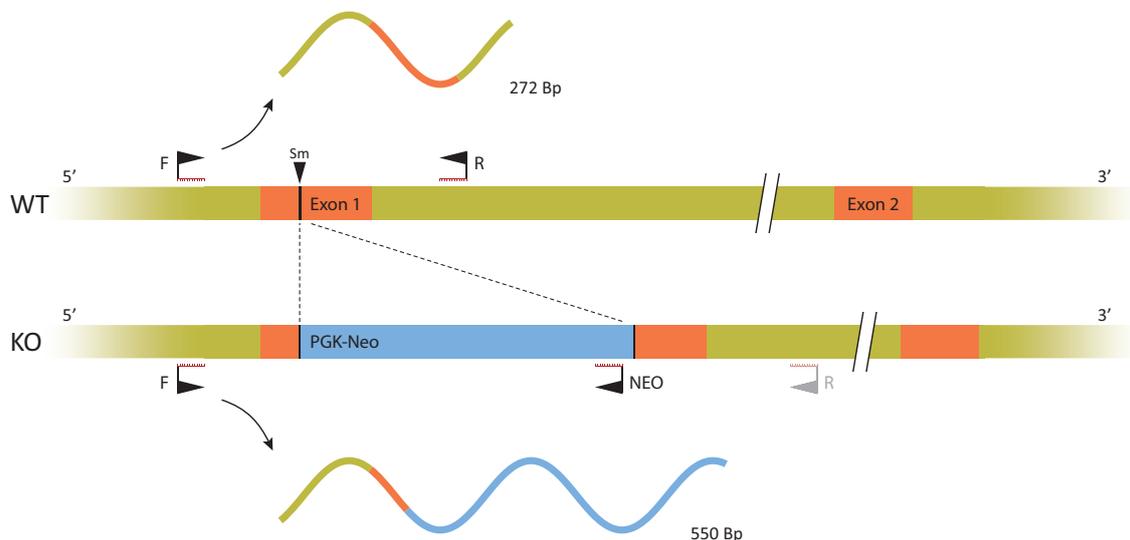


Abb. 6: Knockout und PCR-Strategie, Beispielhaft für MT₂

MT₂-Knockout: In Exon 1 des MT₂-Gens (*MTNR1B*) wurde ein Neomycinresistenzgen mit Phosphoglyceratkinase-Promotor eingefügt. Forward- und Reverse-Primer amplifizieren ein 272-Bp-Fragment, Forward- und Neo-Primer ein 550-Bp-Fragment. Vorgehen für MT₁ analog. *WT* Wildtyp; *KO* Knockout; *PGK* Phosphoglyceratkinase; *F* Forward; *R* Reverse; *NEO* Neomycinresistenz; *Sm* SmaI-Restriktionsstelle. Abbildung nach Jin et al.²⁰⁷

Zu je 3 µl des Zell-Lysats wurden 25 µl eines Reaktionsgemisches pipettiert (Tab. 3), das alle Primer, einen Puffer, Desoxynukleosidtriphosphate (dNTPs) und *Taq*-Polymerase enthielt sowie Mg²⁺-Ionen, die für die Funktion der Polymerase essentiell sind. In einem Thermocycler (Mastercycler egradient S, Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland) fand die Reaktion nach einer initialen Denaturierungsphase von 3 min bei 94 °C in je 35 Zyklen unter folgenden Konditionen statt:

MT₁: 45 s Denaturierung, 45 s Hybridisierung, 3 min Elongation¹⁷⁹

MT₂: 30 s Denaturierung, 30 s Hybridisierung, 1 min Elongation²⁰⁷

Anschließend erfolgten Auftrennung und Nachweis der DNA-Stücke durch Gelelektrophorese.

Tab. 2: Primer der Genotypisierung

Zielgen	Primer	Sequenz	Position
<i>MTNR1A</i> (MT ₁)	Forward	5'-GAG TCC AAG TTG CTG GGC AGT GGA-3'	754 – 777
	Reverse	5'-GAA GTT TTC TCA GTG TCC CGC AAT GG-3'	1231 – 1256
	NEO	5'-CCA GCT CAT TCC TCC ACT CAT GAT CTA-3'	
<i>MTNR1B</i> (MT ₂)	Forward	5'-CCA GGC CCC CTG TGA CTG CCC GGG-3'	179 – 202
	Reverse	5'-CCT GCC ACT GAG GAC AGA ACA GGG-3'	427 – 450
	NEO	5'-TGC CCC AAA GGC CTA CCC GCT TCC-3'	

Tab. 3: Gebrauchslösungen zur PCR

Lösung	Inhaltsstoffe	Menge	Hersteller
8x PCR-Reaktionsansatz	MyTaq DNA Polymerase	4 µl	Bioline GmbH, Luckenwalde, Deutschland
	MyTaq Reaction Buffer (enthält dNTPs und MgCl ₂)	40 µl	
	Primer Forward	4 µl	Thermo Fisher Scientific Inc., Rockford, USA
	Primer Reverse	4 µl	
	Primer NEO	4 µl	
	Nukleasefreies Wasser	144 µl	Fermentas UAB, Vilnius, Litauen
0,5x TBE	Tris-Base	5,4 g (44,5 mmol)	Aplichem GmbH, Darmstadt, Deutschland
	Borsäure	2,75 g (44,5 mmol)	MP Biomedicals GmbH, Eschwege, Deutschland
	0,5 M EDTA-Lösung pH 8	2 ml (1 mmol)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
	Deionisiertes H ₂ O	ad 1 l	

2.2.4 Ethidiumbromid-Gelelektrophorese

Bei der Elektrophorese werden geladene Moleküle durch Einwirken einer elektrischen Spannung bewegt. Die DNA trägt an ihren Phosphatresten negative Ladungen und bewegt sich daher im elektrischen Feld von der Kathode zur Anode. Da im DNA-Strang jedoch jeder Phosphatrest genau eine negative Ladung trägt, besitzen die Moleküle relativ zu ihrer Masse immer dieselbe Ladungsdichte, sie würden sich also bei Verwendung eines flüssigen Mediums mit genau gleicher Geschwindigkeit bewegen. Um eine Auftrennung von DNA-Fragmenten unterschiedlicher Größe zu erreichen, verwendet man poröse Matrizen, die die Moleküle passieren müssen und durch die sie abhängig von ihrer Größe unterschiedlich stark in der Wanderungsgeschwindigkeit gehemmt werden. Die Größe der Poren ist also entscheidend für die Trennschärfe und wird durch die Konzentration des Gels bestimmt. Man verwendet in der Regel Gele aus Polyacrylamid oder Agarose, in der vorliegenden Arbeit wurden 1,5-prozentige Agarosegele verwendet. Um die Detektion der DNA-Fragmente nach der Elektrophorese zu erlauben, wurde zusätzlich Ethidiumbromid in das Gel gegeben. Ethidiumbromid interkaliert zwischen den Basen der DNA und wird bei der Elektrophorese mittransportiert, so akkumuliert es am gleichen Ort wie die DNA. Bei Bestrahlung mit ultraviolettem Licht fluoresziert es rosa- bis lilafarben und zeigt so an, an welcher Stelle sich DNA befindet.

Für die Herstellung der Gele wurden 1,5 g Agarose (Carl Roth GmbH und Co. KG, Karlsruhe, Deutschland) in 100 ml 0,5-fachem Tris-Borat-EDTA-Puffer (0,5x TBE, siehe Tab. 3) gegeben und aufgeköcht, bis die Agarose vollständig gelöst war. Sodann wurden 2 µl einer 1-prozentigen Ethidiumbromidlösung (Carl Roth GmbH und Co. KG, Karlsruhe, Deutschland) hinzugegeben und hieraus das Gel direkt in die Elektrophoresekammer gegossen. Nach dem Aushärten wurden in die erste Tasche des Gels 7 µl eines DNA-Markers (GeneRuler 1kb DNA Ladder, Fermentas UAB, Vilnius, Litauen) und in die restlichen Taschen gleiche Volumina der amplifizierten DNA geladen. Zuvor waren zu jeder Probe 4 µl Orange Loading Dye (Fermentas UAB, Vilnius, Litauen) gegeben worden. Darin sind Glycerol und die zwei Farbstoffe Xylencyanol und Orange G enthalten, die eine visuelle Kontrolle des Fortschrittes der Elektrophorese erlauben; außerdem stellt Glycerol durch seine höhere Dichte sicher, dass die DNA in der Probe im Gel nach unten sinkt. Für eine gleichmäßige Spannungsübertragung wurde die Elektrophoresekammer mit 0,5x TBE umgeben, in dem die Elektroden platziert wurden. Sodann wurde eine Spannungsquelle (Power Pac HC, Bio-Rad Laboratories Inc., Her-

cules, USA) angeschlossen und für 30 bis 60 Minuten eine konstante Spannung von 80 V angelegt. Die Elektrophorese wurde beendet, wenn der gelbe Farbstoff Orange G, der mit der gleichen Geschwindigkeit wie DNA-Fragmente von etwa 50 Basenpaaren Länge wandert, das Ende des Gels erreicht hatte.

Um die DNA sichtbar zu machen, wurde das System ChemiDoc XRS (Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules, USA) verwendet. In einer Dunkelkammer wird das Gel mit UV-Licht bestrahlt, eine integrierte Kamera hält die resultierende Fluoreszenz auf einem Bild fest, auf dem dann anhand der mitgelaufenen DNA-Leiter eine relative Größenbestimmung der amplifizierten Fragmente vorgenommen werden kann.

2.2.5 Aufbereiten der Gewebeproben für spezifische Proteinnachweise

Für die Auftrennung der enthaltenen Proteine per Elektrophorese und das Übertragen auf eine Membran mittels Western Blot mussten die entnommenen Gewebe zunächst aufbereitet werden. Dazu wurden die Hippocampi mit jeweils 400 µl Probenpuffer (Tab. 5) versetzt und mit einem Ultraschallprozessor (UP200s, Hielscher Ultrasonics GmbH, Teltow, Deutschland) unter kontinuierlicher Bewegung homogenisiert. Eine zehnmütige Erhitzungsphase zur Proteindenaturierung bei 70 °C schloss sich an. Das im Probenpuffer enthaltene Dithiothreitol (DTT) wirkt hierbei als starkes Reduktionsmittel, das Disulfidbrücken zwischen einzelnen Aminosäureresten spaltet; das Detergens Lithiumdodecylsulfat (LDS) solubilisiert und denaturiert die Proteine und hält die lineare Struktur aufrecht. Außerdem enthält der Probenpuffer den anionischen Farbstoff Coomassie G250, der mit der Ionenfront wandert und eine Beurteilung über den Fortschritt der Elektrophorese erlaubt. Nach der Denaturierungsphase wurden die Proben wieder bei -80 °C konserviert.

2.2.6 SDS-Page Western Blot

Bei einer nativen Elektrophorese wandern bei Anlegen einer elektrischen Spannung ausschließlich hydrophile Proteine entsprechend ihrer Eigenladung entweder in Richtung der Kathode oder der Anode. Um auch hydrophobe Proteine nachweisen zu können, wird ein Detergens zugesetzt. In der vorliegenden Arbeit wurde das anionische Lithiumdodecylsulfat (LDS) verwendet, das außerdem stöchiometrisch an die Aminosäureseitenketten bindet und so deren Eigenladungen überdeckt und ein gleichmäßiges Masse-Ladung-Verhältnis herstellt. So wandern bei dieser als SDS-Page bezeichneten

Methode (*sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis*, in diesem Fall müsste aufgrund des anstelle von Natrium verwendeten Lithium eigentlich von LDS-Page gesprochen werden) alle Proteine mit zu ihrer Masse umgekehrt proportionaler Geschwindigkeit in Richtung der Anode.²¹⁹ Um eine bessere Trennschärfe zu erhalten, kamen außerdem Gradientengele zum Einsatz, deren Konzentration an Acrylamid im Verlauf zunimmt. Die Größe der Poren nimmt also ab, was vor allem bei kleinen Proteinen die Auftrennung noch verbessert.

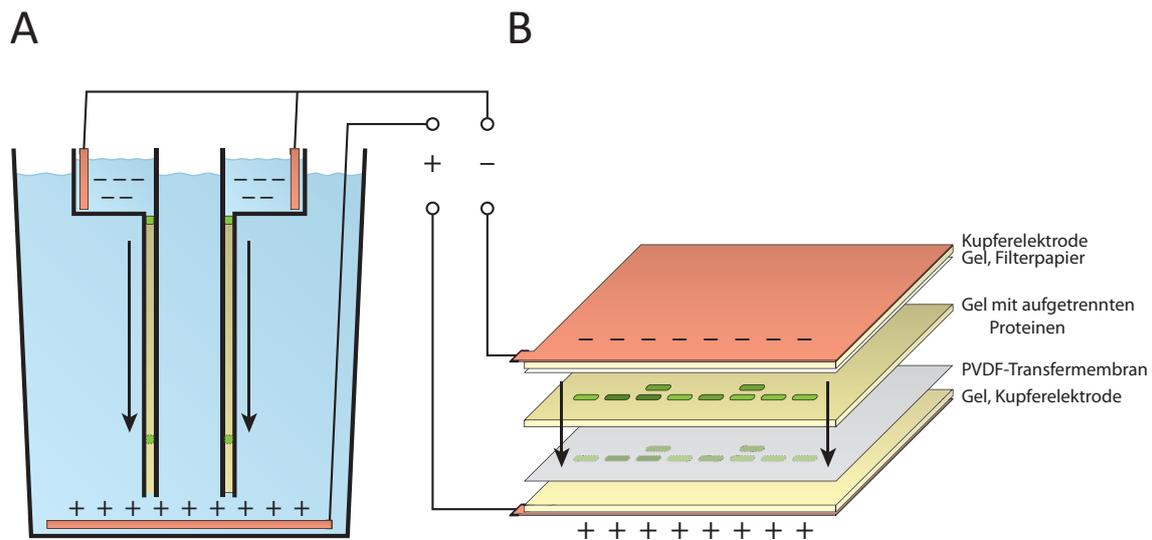


Abb. 7: Prinzip SDS-Page und Western Blot

A SDS-Page: Proteine wandern entlang des elektrischen Feldes von Kathode Richtung Anode durch das Gel. **B** Western Blot, durchgeführt als Dry Blot: Übertragen der Proteine auf die PVDF-Membran entlang des elektrischen Feldes.

Es wurden 1,0 mm starke Fertiggele (NuPAGE® Novex 4-12% Bis-Tris Midi Gel, Invitrogen, Carlsbad, USA) mit 26 Taschen verwendet. Zunächst wurde auf das Gel ein Adapter (Novex Midi-Gel Adapter, Invitrogen, Carlsbad, USA) aufgesetzt, der die obere Pufferkammer bildet, und dann beides zusammen in der Elektrophoresekammer (BioRad Criterion Cell, Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules, USA) fixiert (zum schematisierten Aufbau der Elektrophoresekammer siehe Abb. 7A). Obere und untere Pufferkammer wurden mit Elektrolytlösung (NuPAGE® MES SDS Running Buffer, Invitrogen, Carlsbad, USA) gefüllt und in Tasche 1 des Gels ein Proteinmarker (verwendete Marker siehe Tab. 4), in die restlichen Taschen gleiche Volumina der jeweiligen Proben geladen. Der Marker enthält verschiedene Proteine definierter Molekülmassen, die als Maßstab dienen und anhand derer später eine relative Molekülmassenbestimmung der aus der Probe aufgetrennten Proteine möglich ist. Die Elektrophorese-

kammer befand sich zur Kühlung in einem Eisbad; in der oberen Pufferkammer wurde die Kathode, in der unteren Pufferkammer die Anode platziert und über eine Spannungsquelle (Power Pac HC, Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules, USA) für 45 min eine konstante Spannung von 200 V angelegt.

Im Anschluss erfolgte der Transfer der aufgetrennten Proteine auf eine Membran. Dieser erfolgte als Dry Blot in einer Modifikation der von Towbin^{220,221} zuerst beschriebenen und später als »Western Blot« bezeichneten Methode (Abb. 7B). Der Dry Blot bietet gegenüber dem Tank Blot den Vorteil, dass die Transferzeit erheblich verkürzt wird und Luftblasen leicht entfernt werden können, womit Artefakte verhindert werden. Außerdem wird bei diesem System an der Anode kein Sauerstoff durch Elektrolyse des Wassers freigesetzt, der die Qualität des Blottes beeinträchtigen könnte. Verwendet wurden fertige Transfersets (iBlot® Transfer Stack PVDF, Invitrogen, Carlsbad, USA), die sowohl zwei in elektrolythaltiges Gel eingebettete Kupferelektroden als auch eine bereits auf der Anode platzierte Membran aus Polyvinylidenfluorid (PVDF) enthalten. Diese bietet gegenüber Membranen aus Nitrocellulose den Vorteil, dass sie beständiger gegen die verwendeten Chemikalien ist und mehrfach verwendet werden kann (d. h. auf derselben Membran können nacheinander mehrere Nachweisreaktionen für verschiedene Proteine ausgeführt werden.). Das Gel wurde auf Anode und PVDF-Membran platziert, mit einem angefeuchteten Filterpapier bedeckt und die Kathode obenauf gelegt. Dieses »Sandwich« wurde nun in der Dry-Blotting-Apparatur (iBlot® Gel Transfer Device, Invitrogen, Carlsbad, USA) fixiert und das Blotprogramm gestartet, in dem durch eine für 7 min angelegte Spannung von 20 V der Transfer ausgeführt wurde. Wieder wandern die Protein-LDS-Komplexe in Richtung der Anode und werden so auf die Membran übertragen, an die sie aufgrund hydrophober und polarer Wechselwirkungen unspezifisch binden und so an ihrem Ort fixiert werden.

Tab. 4: Verwendete Proteinmarker

Marker	Molekülmassenspanne	Menge	Hersteller
Magic Mark XP Western Protein Standard	20 - 220 kDa	2 µl	Invitrogen, Carlsbad, USA
Precision Plus Protein™ Kaleidoscope Standards	10 - 250 kDa	7,5 µl	Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules, USA
Spectra Multicolor Broad Range Protein Ladder	10 - 260 kDa	7,5 µl	Fermentas UAB, Vilnius, Litauen

Tab. 5: Gebrauchslösungen zum Western Blot

Lösung	Inhaltsstoffe	Menge	Hersteller
SDS-Page Probenpuffer	NuPAGE® LDS Sample Buffer	5 ml	Invitrogen, Carlsbad, USA
	1 M Dithiothreitol-Lösung	1 ml	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
	Deionisiertes H ₂ O	4 ml	
TBS 10x	Tris-Base	24,2 g (0,2 mol)	Aplichem GmbH, Darmstadt, Deutschland
	NaCl	80 g (1,37 mol)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
	Deionisiertes H ₂ O	<i>ad 1 l</i>	
	HCl	Einstellen auf pH 7,6	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
TBST	TBS 10x	100 ml	
	Tween 20	1 ml (0,9 mmol)	Carl Roth GmbH und Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
	Deionisiertes H ₂ O	<i>ad 1 l</i>	
1x Laufpuffer	NuPAGE® MES SDS Running Buffer (20x)	50 ml	Invitrogen, Carlsbad, USA
	Deionisiertes H ₂ O	<i>ad 1 l</i>	
1x Roti-Block	10x Roti-Block	5 ml	Carl Roth GmbH und Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
	Deionisiertes H ₂ O	<i>ad 50 ml</i>	

2.2.7 Immunodetektion der Proteine

Für Nachweis und Quantifizierung spezifischer Proteinbanden auf der Membran wurde ein indirektes Verfahren mithilfe zweier Antikörper gewählt: Ein Primärantikörper bindet zunächst an das gesuchte Protein, danach wird ein mit einem Enzym gekoppelter zweiter Antikörper zugesetzt, der spezifisch an die F_c-Domäne von Immunglobulinen der Wirtspezies des verwendeten Primärantikörpers bindet. Dieser Sekundärantikörper ist mit einem Enzym gekoppelt, dass bei Zugabe des entsprechenden Substrats durch eine Farb- oder Chemilumineszenzreaktion den Nachweis der Komplexe aus Antigen, Primärantikörper und Sekundärantikörper möglich macht (Abb. 8). Der Einsatz dieses indirekten Verfahrens bietet den Vorteil, dass nur ein enzymgekoppelter Sekundärantikörper vorgehalten werden muss, der bei sämtlichen Nachweisreaktionen eingesetzt

werden kann. Für diese Arbeit wurden mit dem Enzym Meerrettichperoxidase (*horse radish peroxidase*, HRP) gekoppelte Antikörper verwendet. Bei Zugabe von Luminol und Wasserstoffperoxid katalysiert es die Oxidation von Luminol zu 3-Aminophtalat, bei der bläuliches Licht im Spektralbereich um 425 nm^{222} emittiert wird.

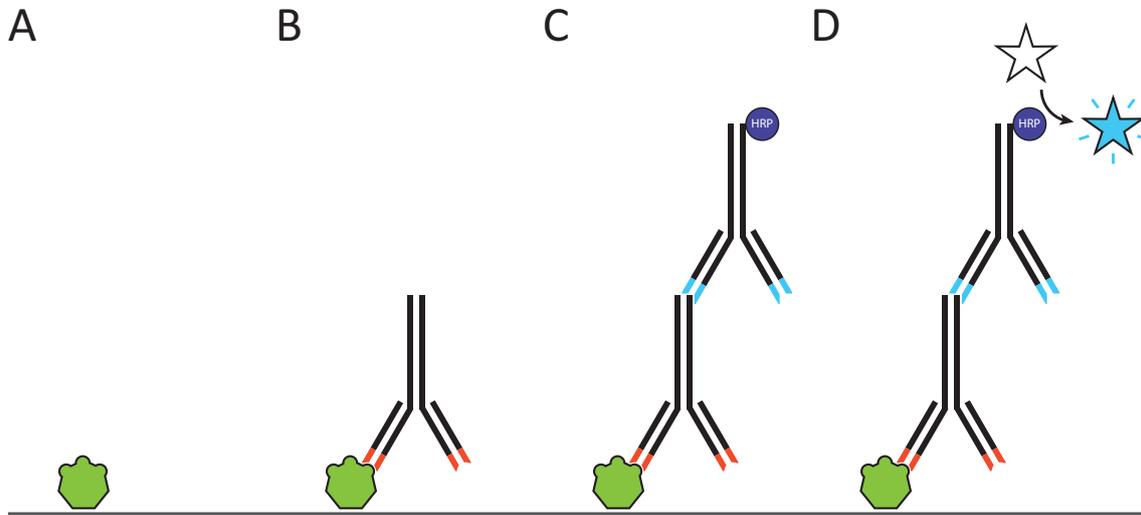


Abb. 8: Schematische Darstellung der Immunodetektion

A Membrangebundenes Antigen **B** Primärantikörper bindet spezifisch an Antigen **C** HRP-gekoppelter Sekundärantikörper bindet an den Primärantikörper **D** Farbreaktion von Luminol zeigt gebundene Sekundärantikörper an. *HRP* Meerrettichperoxidase

Um die Bindung spezifischer Antikörper an die gesuchten Proteine zu ermöglichen, muss zunächst deren Sekundär- und Tertiärstruktur wiederhergestellt werden. Dazu wurden die denaturierenden Reagenzien DTT und LDS mit *Tris-Buffered Saline and Tween 20* (TBST, siehe Tab. 5) in zwei Waschschritten à 3 min ausgewaschen. Tween 20 (Polysorbat 20) ist ein nicht-denaturierendes Detergens, das ungebundene Proteine herauszulösen hilft. Anschließend wurde die Membran unter ständiger Agitation für eine Stunde bei Raumtemperatur in Roti-Block-Lösung (Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland) inkubiert. Diese Lösung enthält ein Polymer, das Bindungsstellen auf der Membran überall dort sättigt, wo keine Proteine vorliegen. So werden unspezifische Interaktionen der Antikörper mit der Membran verhindert und Hintergrundrauschen in der Nachweisreaktion reduziert. Danach erfolgte über Nacht bei 4 °C die Inkubation mit dem ebenfalls in Roti-Block gelösten Primärantikörper (Tab. 6). Bei den Primärantikörpern handelte es sich um monoklonale Antikörper, die jeweils spezifisch an ein bestimmtes Epitop des zu untersuchenden Proteins binden. Am folgenden Tag wurde zunächst wieder dreimal je 5 min mit TBST gewaschen, um überschüssige und

unspezifisch gebundene Antikörpermoleküle zu entfernen. Dann folgte die Inkubation der Membran für eine Stunde bei Raumtemperatur mit dem in Roti-Block gelösten, HRP-gekoppelten polyklonalen Sekundärantikörper und danach erneutes Waschen für fünfmal je 3 min.

Schließlich wurden je 1 ml Luminol als Substrat und Wasserstoffperoxidlösung (Immobilon Chemiluminescent HRP Substrate, Millipore, Billerica, USA) als Oxidationsmittel vermischt und auf den Blot gegeben. In der Dunkelkammer eines Imager-Systems (Chemidoc XRS, Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules, USA bzw. Fusion SL Advance 4.2MP, Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen, Deutschland) konnte das emittierte Licht detektiert und als Bild gespeichert werden.

Tab. 6: Beim Western Blot verwendete Antikörper

MW Molekulargewicht; *Konz.* Eingesetzte Verdünnung

Zielstruktur	MW Ziel	Wirtsspezies	Konz.	Hersteller
Primärantikörper (monoklonal)				
pCaMKII	52 kDa	Maus	1:5000	Biomol GmbH, Hamburg, Deutschland
pCREB	43 kDa	Kaninchen	1:1000	Merck Millipore, Billerica, USA
p44/42-MAPK	44/42 kDa	Kaninchen	1:1000	Cell Signaling Technology Inc., Danvers, USA
pPKA-Substrat	*)	Kaninchen	1:2500	
pPKC-Substrat	*)	Kaninchen	1:2500	
H3K9ac	17 kDa	Kaninchen	1:2500	
Zielstruktur				
H3K14ac	17 kDa	Kaninchen	1:5000	Cell Signaling Technology Inc., Danvers, USA
H3K27me2	17 kDa	Kaninchen	1:5000	
β-Actin	42 kDa	Maus	1:40000	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
Sekundärantikörper (polyklonal)				
rabbit-IgG, HRP-konjugiert		Ziege	1:30000	Santa Cruz Biotechnology inc., Dallas, USA
rabbit-IgG, HRP-konjugiert		Ziege	1:30000	DAKO Denmark A/S, Glostrup, Dänemark
mouse-IgG/M/A, HRP-konjugiert		Ziege	1:30000	

*) Substratantikörper, daher zahlreiche Zielstrukturen verschiedener Molekulargewichte

2.3 Auswertung und Statistik

2.3.1 Verwendete Software

Digitale Bilder der Western Blots wurden mit den Chemilumineszenzsystemen ChemiDoc XRS und Fusion SL Advance 4.2MP erstellt. Beide Systeme besitzen integrierte CCD-Kameras mit 16 Bit Pixeltiefe. Das System ChemiDoc XRS wurde mit der Software Quantity One, Version 4.6.3 (Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules, USA) gesteuert. Aus einer Serie von Bildern mit steigender Belichtungszeit wurde jeweils dasjenige Bild ausgewählt, auf dem die Banden des gesuchten Proteins gerade noch nicht überbelichtet waren. Die Software FusionCapt, Version 16.03 (Vilber, Sud Torcy, Frankreich) des Systems Fusion SL Advance 4.2MP hingegen determiniert die Belichtungszeit automatisch, sodass keine Bande überbelichtet ist. Die Aufnahmen wurden als Dateien im TIFF-Format mit einer Farbtiefe von 16 Bit (entspricht $2^{16} = 65536$ möglichen Graustufen) und linearem Dynamikbereich exportiert,²²³ anschließend erfolgte die semi-quantitative Auswertung der Western Blots mit der Software ImageJ, Version 1.44o (Wayne Rasband, National Institute of Health, Bethesda, USA): Die optische Dichte wurde bestimmt als das Integral des Helligkeitsprofils der gesuchten Bande mit für jede Spur individueller Hintergrundkorrektur.^{223,224} Der gewonnene Wert wurde dividiert durch die auf gleiche Art und Weise ermittelte optische Dichte der Bande des Proteins β -Actin vom selben Blot. β -Actin wurde gewählt, da es als Protein des Cytoskeletts konstitutiv exprimiert wird und daher davon ausgegangen werden kann, dass es in allen Zellen in gleicher Konzentration vorliegt. So konnten etwaige Unterschiede des absoluten Proteingehalts der Proben ausgeglichen werden. Dargestellt wurde stets dieser Quotient aus gesuchtem Protein und β -Actin als relative optische Dichte (rel OD).

Erfassung und Auswertung der Bewegungen im Open Field erfolgten mit der Software EthoVision XT (Noldus Information Technology, Wageningen, Niederlande). Die statistische Auswertung erfolgte mit Microsoft Excel (Microsoft Office:mac 2011, Microsoft Corporation, Redmond, USA) und GraphPad Prism 6 (GraphPad Software, Inc., La Jolla, USA). Alle Graphen und Abbildungen wurden mit Adobe Illustrator Version 15.0.0 (Adobe Systems Inc., San José, USA) erstellt.

2.3.2 Statistik

Sämtliche Ergebnisse sind als Mittelwert \pm Standardfehler ($\bar{x} \pm \text{SEM}$, *standard error of the mean*) dargestellt. Zur Beurteilung der Unterschiede zwischen trainierten Tieren und Kontrollgruppe zu jeweils gleichen Zeitpunkten wurde, sofern nicht anders angegeben, die zweifaktorielle Varianzanalyse (*analysis of variance*, ANOVA) mit Bonferroni-Korrektur herangezogen. Innerhalb jeder Versuchs- bzw. Kontrollgruppe wurden Unterschiede zwischen den Zeitpunkten mithilfe der einfaktoriellen Varianzanalyse mit Bonferroni-Korrektur evaluiert. Als Signifikanzniveau wurde $\alpha = 5\%$ festgesetzt, bei $P \leq 0,05$ wurden also Unterschiede als signifikant angesehen und die Nullhypothese (»Die Mittelwerte beider Grundgesamtheiten unterscheiden sich nicht voneinander«) verworfen. In der graphischen Darstellung sind Signifikanzen stets durch *-Symbole hervorgehoben, Tab. 7 zeigt die verwendeten Definitionen und Symbole der verschiedenen Abstufungen des Signifikanzgrades.

Tab. 7: Übersicht über die Signifikanzgrade
Grenzen der *P*-Werte sowie verwendete Symbole

<i>P</i>-Wert	Symbol
$P \leq 0,0001$	****
$0,0001 < P \leq 0,001$	***
$0,001 < P \leq 0,01$	**
$0,01 < P \leq 0,05$	*
$P > 0,05$	ns

3. Ergebnisse

3.1 *In-vivo*-Analysen

3.1.1 *Radial Arm Maze*

Die Radial-Arm-Maze-Versuche wurden mit jeweils einer Gruppe Tiere beider Genotypen zu den Zeitpunkten ZT02 oder ZT14 durchgeführt. In den beschriebenen Paradigmen wird der Versuch üblicherweise z. B. an fünf aufeinander folgenden Tagen durchgeführt, um dann anhand der Fehlerzahlen den Lernfortschritt zu bewerten.¹⁸⁵ In der vorliegenden Arbeit sollten jedoch die frühen und unmittelbaren Vorgänge beim Erlernen neuer Information untersucht werden, daher wurde der Versuch an nur einem Tag ausgeführt und unmittelbar im Anschluss die Gewebeprobe entnommen. Dennoch wurden die üblichen Parameter (siehe Abschnitt 2.1.2) erhoben und miteinander verglichen.

Es zeigt sich, dass die Mäuse des Stammes C3H sowohl zum Trainingszeitpunkt am frühen Tag (ZT02) mit durchschnittlich 23,8 (\pm 4,4) Fehlern deutlich mehr Fehler begingen als die $MT_{1/2}^{-/-}$ -Tiere mit 9,1 (\pm 2,4) Fehlern, als auch in der frühen Nacht (ZT14) mit 50,3 (\pm 6,6) Fehlern bei C3H gegenüber 32,3 (\pm 3,4) Fehlern bei $MT_{1/2}^{-/-}$. Beide Unterschiede erreichen Signifikanz auf dem Fünfprozentniveau ($P = 0,047$ bzw. $P = 0,013$, zweifaktorielle ANOVA mit Bonferroni-Korrektur). Betrachtet man jedoch die Aktivität beider Mäusestämme in Form der pro Zeit betretenen Arme, so fällt auch hier zu beiden Zeitpunkten ein Unterschied auf, der zu ZT02 hochsignifikant ist ($P < 0,0001$, zweifaktorielle ANOVA mit Bonferroni-Korrektur). Hier betraten die $MT_{1/2}^{-/-}$ -Tiere im Schnitt 1,04 (\pm 0,20) Arme pro Minute, die C3H-Mäuse hingegen waren mit 2,97 (\pm 0,31) Armen pro Minute beinahe dreimal so aktiv, sodass eine Berechnung der Fehler bezogen auf die Aktivität annähernd gleiche Werte ergibt. Im zu ZT14 durchgeführten Versuchsdurchlauf fiel der Unterschied in der Aktivität mit 4,39 (\pm 0,40) Armen pro Minute (C3H) zu 4,10 (\pm 0,19) Armen pro Minute ($MT_{1/2}^{-/-}$) gering und nicht signifikant aus, auch in der Berechnung der Fehler bezogen auf die Aktivität ergibt sich kein signifikanter Unterschied.

Das Verhalten der Tiere beider Genotypen unterschied sich also deutlich in Bezug auf die Gesamtaktivität, nicht aber in Bezug auf die Fehlerrate, das heißt in der Zahl der Fehler bezogen auf die Gesamtaktivität.

Um den möglichen Einfluss einschätzen zu können, den mangelnde Motivation zur Futtersuche aufgrund fehlenden Hungers auf die Aktivität der Tiere gehabt haben könnte, wurden die reduzierten Körpergewichte der Tiere am Versuchstag mit den Ausgangsgewichten vor der Habituationsphase verglichen. Die zu ZT02 trainierten C3H-Mäuse hatten ihr Körpergewicht im Mittel auf 90,6 % ($\pm 0,82$ %) des Ausgangswertes gesenkt, die zur selben Tageszeit trainierten $MT_{1/2}^{-/-}$ -Tiere sogar auf im Mittel 86,0 % ($\pm 0,64$ %) des ursprünglichen Wertes. Die C3H-Tiere, die zu ZT14 trainiert wurden, hatten nach der Habituationsphase im Mittel noch 87,9% ($\pm 1,16$ %) ihres Anfangsgewichtes, bei den zur selben Tageszeit trainierten $MT_{1/2}^{-/-}$ -Tieren lag das reduzierte Gewicht durchschnittlich sogar bei nur 84,7 % ($\pm 0,73$ %). Alle vier Unterschiede zwischen dem Ausgangsgewicht und dem Gewicht unmittelbar vor dem Versuch sind hochgradig signifikant ($P < 0,0001$, abhängiger, zweiseitiger t-Test) angesehen werden. Bei den Versuchsdurchgängen zu beiden Tageszeiten hatten also die $MT_{1/2}^{-/-}$ -Tiere im Vorlauf prozentual mehr Körpergewicht verloren als die C3H-Tiere.

Zusätzlich fällt bei Betrachtung der Körpergewichte der Versuchstiere auf, dass die $MT_{1/2}^{-/-}$ -Mäuse mit 29,4 g ($\pm 0,58$ g) bei gleichem Alter im Mittel um etwa 10 % schwerer sind als die C3H-Tiere mit 26,7 g ($\pm 0,2$ g). Auch hier liegt ein auf dem Fünfprozentniveau signifikanter Unterschied vor ($P = 0,0001$, unabhängiger, zweiseitiger t-Test).

3.1.2 *Open Field Test*

Anders als im *Radial Arm Maze* konnte im *Open Field Test* an keinem der Versuchstage ein signifikanter Unterschied in der Gesamtaktivität der C3H- und $MT_{1/2}^{-/-}$ -Mäuse beobachtet werden: Weder die Zahl der Eintritte in das zentrale Feld noch die Gesamtzahl der Übertritte in eines der angrenzenden Felder unterschieden sich zwischen den beiden Stämmen. Auch die insgesamt im Zentrum verbrachte Zeit unterschied sich nicht zwischen beiden Gruppen. Lediglich bei der Latenzzeit bis zum Beginn der Aktivität zeigte sich am ersten Tag ein Unterschied. Während die C3H-Mäuse im Schnitt nach 29,0 s ($\pm 4,5$ s) zum ersten Mal ein angrenzendes Feld betraten, dauerte dies bei den $MT_{1/2}^{-/-}$ -Mäusen im Schnitt nur 10,8 s ($\pm 2,9$ s) ($P < 0,0087$, einfaktorielle ANOVA mit Bonferroni-Korrektur). Bereits ab dem zweiten Versuchstag unterschieden sich die beiden Gruppen nicht mehr, die C3H-Mäuse brauchten nun kürzer und vergleichbar lang bis zum Aktivitätsbeginn wie die $MT_{1/2}^{-/-}$ -Mäuse.

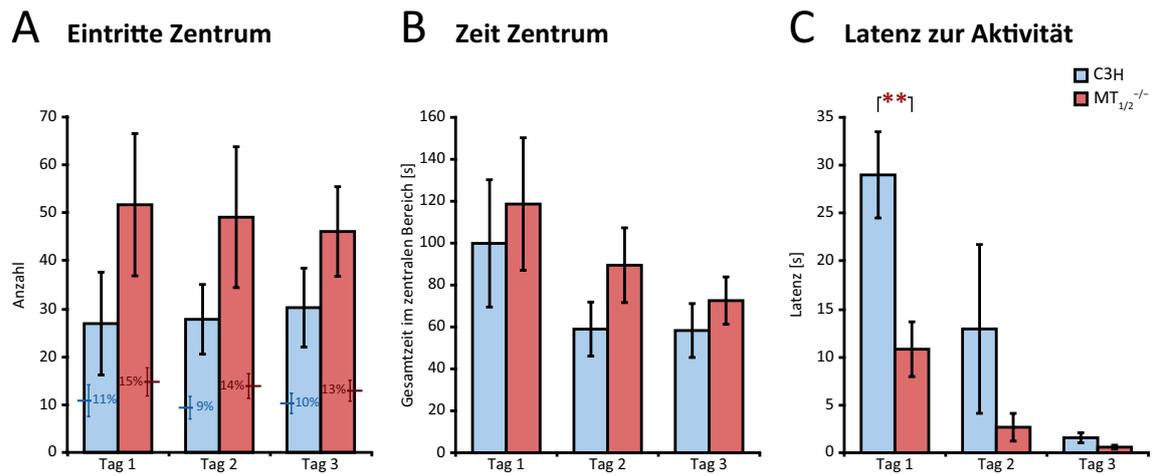


Abb. 9: Verhalten im Open Field Test

A Eintritte ins zentrale Feld des Open Field als absolute Anzahl sowie anteilig bezogen auf die Gesamtaktivität als Gesamtzahl der Übertritte in eines der angrenzenden Felder. **B** Insgesamt im zentralen Feld verbrachte Zeit. **C** Latenzzeit bis zur ersten Bewegung (erster Übertritt in ein angrenzendes Feld). Genaue Werte siehe Tab. 8. C3H-Tiere ■, MT_{1/2}^{-/-}-Tiere ■, Dargestellt sind Mittelwerte \pm SEM sowie Signifikanzen (einfaktorielle ANOVA mit Bonferroni-Korrektur, * $P \leq 0,05$; ** $P \leq 0,01$)

Tab. 8: Verhalten im Open Field Test

Mittelwerte \pm SEM, P -Werte und Signifikanzen (einfaktorielle ANOVA mit Bonferroni-Korrektur, ns $P > 0,5$; * $P \leq 0,05$; ** $P \leq 0,01$).

	Tag	C3H ($\bar{x} \pm$ SEM))	MT _{1/2} ^{-/-} ($\bar{x} \pm$ SEM)	P-Wert	
Eintritte Zentrum	1	26,9 \pm 10,7	51,7 \pm 14,9	> 0,05	ns
	2	27,8 \pm 7,3	49,1 \pm 14,7	> 0,05	ns
	3	30,2 \pm 8,2	46,1 \pm 9,4	> 0,05	ns
Gesamtaktivität	1	202,3 \pm 35,8	296,4 \pm 48,7	> 0,05	ns
	2	281,8 \pm 20,7	303,8 \pm 53,8	> 0,05	ns
	3	266,3 \pm 21,0	369,1 \pm 51,1	> 0,05	ns
Zeit Zentrum [s]	1	99,9 \pm 30,4	118,7 \pm 31,6	> 0,05	ns
	2	59,0 \pm 12,9	89,5 \pm 17,8	> 0,05	ns
	3	58,3 \pm 12,9	72,6 \pm 11,3	> 0,05	ns
Latenz [s]	1	29,0 \pm 4,5	10,8 \pm 2,9	0,0087	**
	2	12,9 \pm 8,8	2,7 \pm 1,4	> 0,05	ns
	3	1,6 \pm 0,5	0,6 \pm 0,2	> 0,05	ns

3.2 *Ex-vivo*-Analysen

3.2.1 Genotypisierung

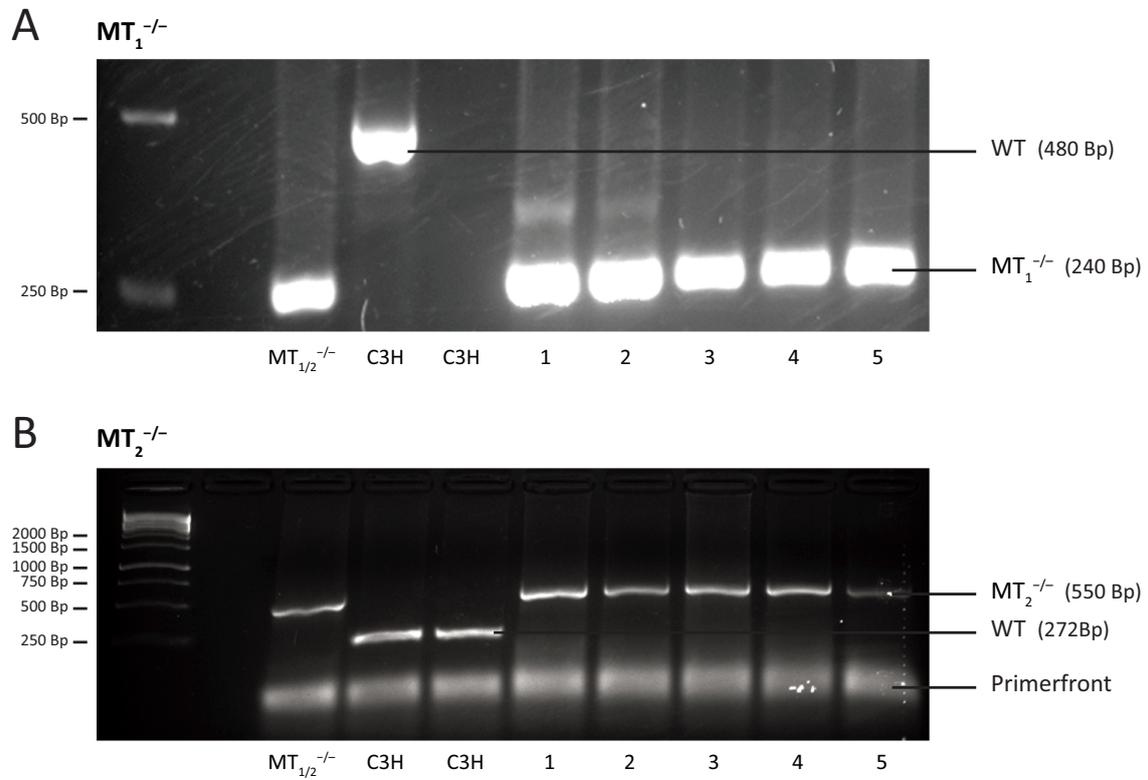


Abb. 10: Exemplarisches PCR-Ergebnis

A PCR-Ergebnis für den MT_1 -Rezeptor (MTNR1A). Links eine $MT_{1/2}^{-/-}$ -Kontrolle, dann zwei Wildtypkontrollen, dann fünf untersuchte transgene Tiere. Die lange Bande (480 Bp) entspricht dem Wildtypallel, die kürzere Bande (240 Bp) dem Knockout-Allel. **B** PCR-Ergebnis für den MT_2 -Rezeptor (MTNR1B). Links eine $MT_{1/2}^{-/-}$ -Kontrolle, dann zwei Wildtypkontrollen, dann die gleichen fünf untersuchten transgenen Tiere wie in A. Die kleine Bande (272 Bp) entspricht dem Wildtypallel, die größere Bande (550 Bp) dem Knockout-Allel.

Die Genotypen der für die Versuche verwendeten $MT_{1/2}^{-/-}$ -Tiere wurden mittels PCR und Ethidiumbromid-Gelelektrophorese kontrolliert. Abb. 10 zeigt exemplarisch das Ergebnis einer Elektrophorese für (A) das MTNR1A- (MT_1 -) und (B) das MTNR1B- (MT_2 -)Gen: Proben von fünf transgenen Mäusen wurden jeweils gegen eine $MT_{1/2}^{-/-}$ - und zwei Wildtypkontrollen aufgetragen. Alle fünf untersuchten Proben zeigen nur eine Bande, die anhand der DNA-Leiter als Fragment von etwa 240 bzw. 550 Basenpaaren Länge quantifiziert werden kann. Beide Male liegt diese Bande auch bei der $MT_{1/2}^{-/-}$ -Kontrolle vor und entspricht dem Knockoutallel. Bei den Wildtypkontrollen taucht eine weitere Bande (480 bzw. 272 Bp) auf, die dem Wildtypallel entspricht und bei den untersuchten Versuchstieren 1 – 5 fehlt.

Für alle genotypisierten Tiere konnte so Homozygotie für die Knockout-Allele beider Melatoninrezeptoren nachgewiesen werden.

3.2.2 Proteinanalysen

Die Proteinanalysen wurden an Mäusen der Stämme C3H sowie $MT_{1/2}^{-/-}$ durchgeführt. Pro Stamm wurden zu den vier Zeitpunkten 30 min, 1 h, 4 h und 6 h nach Abschluss des Radial-Arm-Maze-Versuchs je drei der Versuchstiere und zeitgleich drei Tiere der Kontrollgruppe getötet und die Hippocampi präpariert. Durch Western Blot wurde die Konzentration folgender Proteine bestimmt:

- a) pCaMKII: phosphorylierte Calcium-Calmodulin-abhängige Proteinkinase II
- b) pPKA-Substrat: phosphorylierte Substrate der Proteinkinase A. Der Antikörper bindet an alle Proteine, die eine Phosphatgruppe am Angriffsmotiv der PKA tragen
- c) pPKC-Substrat: phosphorylierte Substrate der Proteinkinase C. Der Antikörper bindet an Protein mit einer Phosphatgruppe am Angriffsmotiv der PKC.
- d) p44/42-MAPK: an Threonin 202 und Tyrosin 204 doppelt bzw. an Threonin einfach phosphorylierte p44-MAP-Kinase und an Threonin 185 und Tyrosin 187 doppelt bzw. an Threonin 185 einfach phosphorylierte p42-MAP-Kinase
- e) pCREB: an Serin 133 phosphoryliertes CREB

Diese Moleküle stellen wichtige Zwischenschritte in den verschiedenen Signalwegen des NMDA-Rezeptors dar (vgl. Abb. 2). Außerdem wurden die folgenden Modifikationen der Histon-H3-Proteine analysiert:

- f) H3K9ac: Acetylierungen an Lysin 9
- g) H3K14ac: Acetylierung an Lysin 14
- h) H3K27me2: Dimethylierung an Lysin 27

Diese Histonmodifikationen stehen exemplarisch für die epigenetischen Mechanismen nach Aktivierung des NMDA-Signalweges (vgl. Abb. 2).

Im Sinne der Übersichtlichkeit wurde für die Darstellung der Ergebnisse eine einheitliche Farbgebung gewählt: Blau steht stets für C3H-Tiere, rot für $MT_{1/2}^{-/-}$; gelb zeigt ZT02, grün ZT14 als Versuchszeit an.

3.2.2 a) pCaMKII

In Abb. 11 sind die Mittelwerte der relativen optischen Dichte (rel OD) von phosphorylierter CaM-Kinase II im Hippocampus der C3H-Mäuse dargestellt. Hier kommt es nach dem zu ZT02 durchgeführten Versuch weder bei den trainierten Tieren noch in der Kontrollgruppe zu signifikanten Änderungen. Allerdings ist der Gehalt an pCaMKII ausgesprochen variabel und interindividuell verschieden. Im Vergleich zwischen der Kontrollgruppe und den trainierten Tieren sind keine Unterschiede erkennbar.

Wurde der Versuch zu ZT14 ausgeführt, ist das Bild ähnlich, der Gehalt an pCaMKII ist interindividuell sehr variabel und keine signifikanten Veränderungen werden bei den trainierten Tieren sichtbar. Auch in der Kontrollgruppe findet sich keine Dynamik, und im Vergleich zwischen beiden Gruppen liegen keine signifikanten Unterschiede vor.

Anders ist das Bild bei für pCaMKII im Hippocampus der $MT_{1/2}^{-/-}$ -Tiere (Mittelwerte in Abb. 12). 6 h nach dem zu ZT02 durchgeführten Training kommt es zum Anstieg der Phosphorylierung der CaMKII auf einen Hochpunkt, der gegenüber den Zeitpunkten 30 min ($P = 0,004$) und 4 h ($P = 0,002$) nach Training signifikant unterschiedlich ist. In der Kontrollgruppe bleiben die Werte auf gleichem Niveau. Vergleicht man Maze- und Kontrollgruppe miteinander, zeigen sich keine signifikanten Unterschiede.

Wurde der Versuch zu ZT14 durchgeführt, ergibt sich eine sehr deutliche Dynamik der Werte von pCaMKII. Der nach 30 min hohe Wert hat sich 1 h nach dem Versuch bereits halbiert ($P = 0,002$). Nach 4 h ist der Wert erneut um die Hälfte abgefallen ($P < 0,0001$ gegenüber 30 min, $P = 0,025$ gegenüber 1 h) und bleibt auch 6 h nach dem Versuch weiter tief ($P < 0,0001$ gegenüber 30 min, $P = 0,015$ gegenüber 1 h). Bei Betrachtung der Kontrollgruppe zeigt sich der gleiche Verlauf der Phosphorylierung der CaMKII. Nach 1 h ist der Wert gegenüber 30 min bereits signifikant ($P = 0,017$) vermindert. Nach 4 h hat er weiter abgefallen ($P = 0,0002$ gegenüber 30 min, $P = 0,015$ gegenüber 1 h) und erreicht nach 6 h den tiefsten gemessenen Wert von etwa einem Drittel des 30-min-Wertes ($P < 0,0001$ gegenüber 30 min, $P = 0,034$ gegenüber 1 h). Somit

sind im direkten Vergleich zwischen Maze- und Kontrollgruppe keine signifikanten Unterschiede erkennbar.

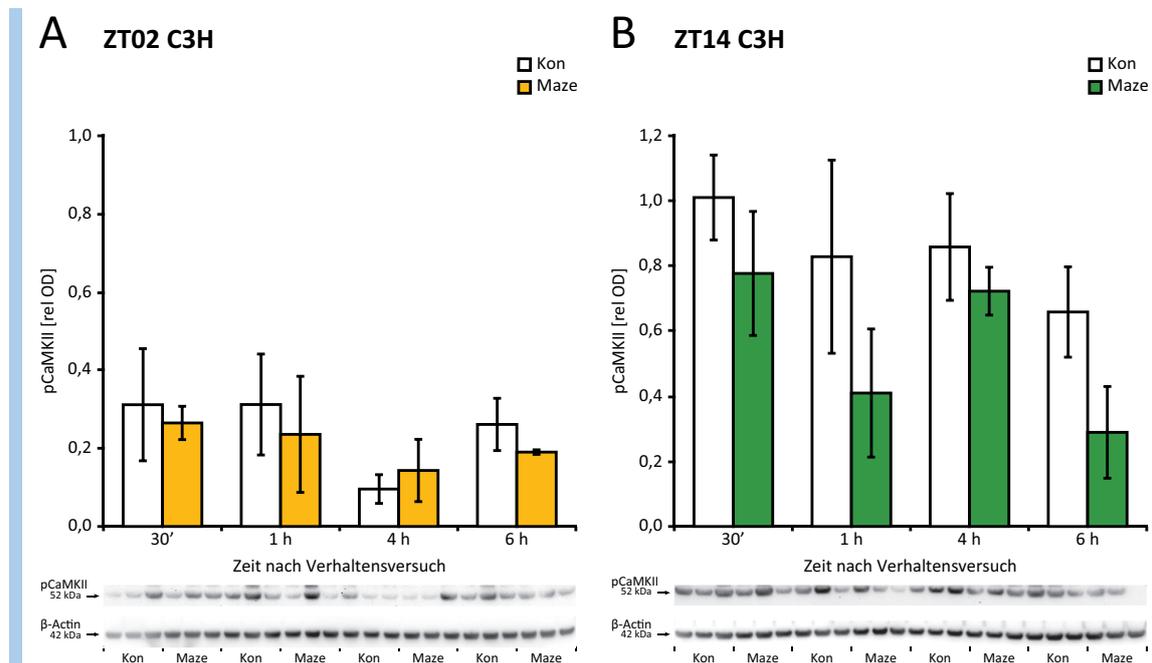


Abb. 11: pCaMKII im Hippocampus der C3H-Mäuse nach Training im Maze

Beachte die relative Achsenskalierung. Genaue Werte siehe Tab. 9. **A** ZT02: trainierte C3H-Tiere (Maze) ■; Kontrollgruppe (Kon) □. **B** ZT14: trainierte C3H-Tiere (Maze) ■; Kontrollgruppe (Kon) □. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SEM der relativen optischen Dichte (rel OD) der im Western Blot gefundenen und quantifizierten Banden.

Tab. 9: pCaMKII im Hippocampus der C3H-Mäuse nach Training im Maze

Dargestellt sind Mittelwerte \pm SEM der rel OD von pCaMKII im Western Blot sowie der erreichte Anteil am Maximalwert innerhalb der jeweiligen Trainings- (Maze) bzw. Kontrollgruppe (Kon). *P*-Werte und Signifikanzen der Vergleiche zwischen beiden Gruppen zu den einzelnen Zeitpunkten sind angegeben (zweifaktorielle ANOVA mit Bonferroni-Korrektur, *ns* $P > 0,5$).

	Zeitpunkt	Kon ($\bar{x} \pm \text{SEM}$)	%-Max	Maze ($\bar{x} \pm \text{SEM}$)	%-Max	<i>P</i> -Wert	
ZT02	30 min	0,312 \pm 0,144	100 %	0,265 \pm 0,043	100 %	> 0,05	ns
	1 h	0,312 \pm 0,129	100 %	0,236 \pm 0,149	89 %	> 0,05	ns
	4 h	0,096 \pm 0,037	31 %	0,143 \pm 0,080	54 %	> 0,05	ns
	6 h	0,261 \pm 0,067	84 %	0,190 \pm 0,006	72 %	> 0,05	ns
ZT14	30 min	1,010 \pm 0,131	100 %	0,777 \pm 0,191	100 %	> 0,05	ns
	1 h	0,829 \pm 0,297	82 %	0,410 \pm 0,197	53 %	> 0,05	ns
	4 h	0,859 \pm 0,164	85 %	0,723 \pm 0,074	93 %	> 0,05	ns
	6 h	0,659 \pm 0,139	65 %	0,289 \pm 0,141	37 %	> 0,05	ns

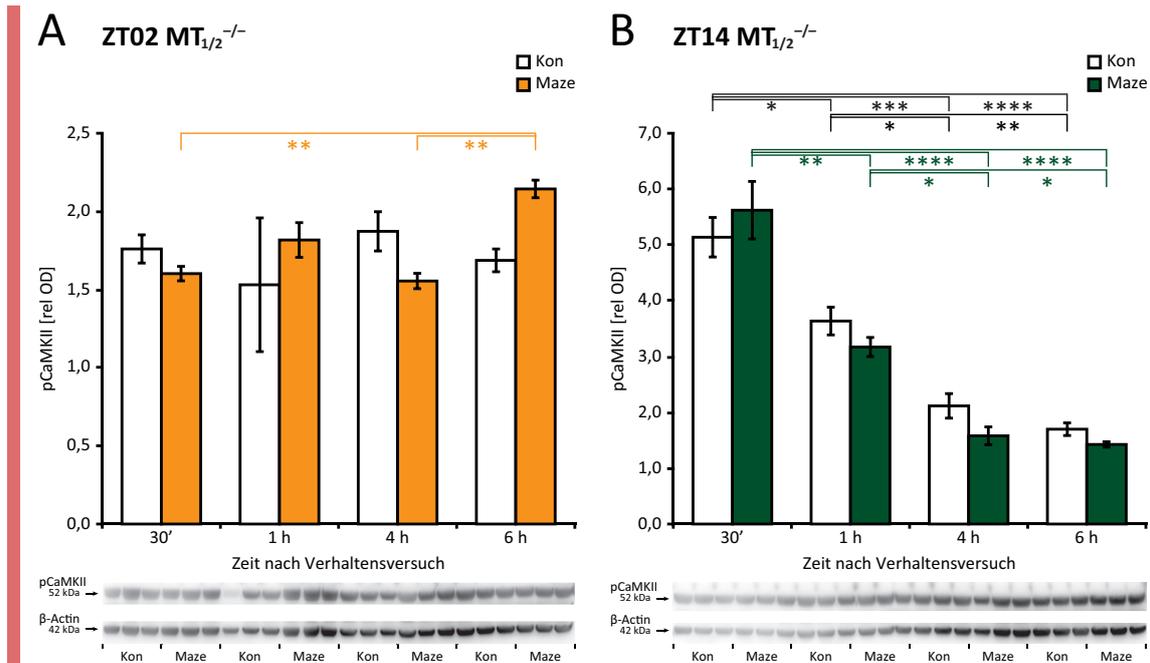


Abb. 12: pCaMKII im Hippocampus der $MT_{1/2}^{-/-}$ -Mäuse nach Training im Maze

Signifikanzen innerhalb jeder Gruppe (einfaktorielle ANOVA mit Bonferroni-Korrektur), verdeutlicht durch Klammern und *-Symbole (* $P \leq 0,05$; ** $P \leq 0,01$; *** $P \leq 0,001$; **** $P \leq 0,0001$). Beachte die relative Achsenskalierung. Genaue Werte siehe Tab. 10. **A** ZT02: trainierte transgene $MT_{1/2}^{-/-}$ -Tiere (Maze) ■; Kontrollgruppe (Kon) □. **B** ZT14: trainierte $MT_{1/2}^{-/-}$ -Tiere (Maze) ■; Kontrollgruppe (Kon) □. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SEM der relativen optischen Dichte (rel OD) der im Western Blot gefundenen und quantifizierten Banden.

Tab. 10: pCaMKII im Hippocampus der $MT_{1/2}^{-/-}$ -Mäuse nach Training im Maze

Dargestellt sind Mittelwerte \pm SEM der rel OD von pCaMKII im Western Blot sowie der erreichte Anteil am Maximalwert innerhalb der jeweiligen Trainings- (Maze) bzw. Kontrollgruppe (Kon). P -Werte und Signifikanzen der Vergleiche zwischen beiden Gruppen zu den einzelnen Zeitpunkten sind angegeben (zweifaktorielle ANOVA mit Bonferroni-Korrektur, ns $P > 0,5$).

	Zeitpunkt	Kon ($\bar{x} \pm SEM$)	%-Max	Maze ($\bar{x} \pm SEM$)	%-Max	P -Wert	
ZT02	30 min	1,760 \pm 0,090	94 %	1,602 \pm 0,046	75 %	> 0,05	ns
	1 h	1,531 \pm 0,428	82 %	1,817 \pm 0,111	85 %	> 0,05	ns
	4 h	1,873 \pm 0,126	100 %	1,555 \pm 0,049	73 %	> 0,05	ns
	6 h	1,687 \pm 0,073	90 %	2,144 \pm 0,056	100 %	> 0,05	ns
ZT14	30 min	5,138 \pm 0,354	100 %	5,622 \pm 0,516	100 %	> 0,05	ns
	1 h	3,636 \pm 0,248	71 %	3,171 \pm 0,171	56 %	> 0,05	ns
	4 h	2,116 \pm 0,220	41 %	1,580 \pm 0,160	28 %	> 0,05	ns
	6 h	1,699 \pm 0,113	33 %	1,425 \pm 0,048	25 %	> 0,05	ns

3.2.2 b) pPKA-Substrat

Die Mittelwerte der rel OD von pPKA-Substrat im Hippocampus der C3H-Mäuse sind in Abb. 13 dargestellt. Nach dem zu ZT02 durchgeführten Versuch im Maze zeigen sich weder in der Maze- noch in der Kontrollgruppe Schwankungen von pPKA-Substrat, die die Signifikanzgrenze von 5 % erreichen. Auch zwischen beiden Gruppen unterscheiden sich die Werte zu keinem Zeitpunkt voneinander.

Fand das Training zu ZT14 statt, so sind auch hier in der Versuchsgruppe keine signifikanten Schwankungen zu finden. Allerdings liegt in der Kontrollgruppe nach 30 min ein höherer Wert vor, der nach 4 h auf einen Tiefpunkt von etwa der Hälfte signifikant ($P = 0,003$) abgefallen ist. Bei den trainierten Tieren fehlt diese Dynamik, die Kurve ist abgeflacht. Damit liegt der Wert 30 min nach dem Versuch signifikant ($P = 0,017$) tiefer als in der Kontrollgruppe.

In Abb. 14 sind die Mittelwerte von pPKA-Substrat bei den $MT_{1/2}^{-/-}$ -Tieren zu sehen. Bei den zu ZT02 trainierten Tieren zeigt sich ein Minimum 4 h nach dem Versuch, das signifikant ($P = 0,029$) vom Maximum nach 1 h verschieden ist. In der Kontrollgruppe tritt der höchste Wert bereits nach 30 min auf. Nach 4 h ist ebenfalls ein Tiefpunkt vorhanden, der sich vom 30-min-Wert signifikant ($P = 0,028$) unterscheidet. Im Vergleich zwischen beiden Gruppen fällt auf, dass der Verlauf der Phosphorylierung der PKA-Substrate bei den trainierten Tieren gegenüber der Kontrollgruppe abgeflacht ist. Der Wert 30 min nach dem Training liegt signifikant ($P = 0,004$) vermindert bei der Hälfte des Wertes der Kontrollgruppe. Danach folgen die Werte beider Gruppen dem gleichen Verlauf.

Nach dem zu ZT14 durchgeführten Versuch zeigt sich bei den $MT_{1/2}^{-/-}$ -Tieren ein zu den Wildtypen ähnliches Bild: Bei den trainierten Tieren ist der Verlauf abgeflacht und es sind keine signifikanten Schwankungen nachweisbar, bei der Kontrollgruppe liegt das Maximum nach 30 min und ist nach 4 h signifikant ($P = 0,013$) abgefallen. Im Vergleich zwischen trainierten Tieren und Kontrollgruppe ergeben sich hier trotz des abgeflachten Verlaufes keine signifikanten Unterschiede.

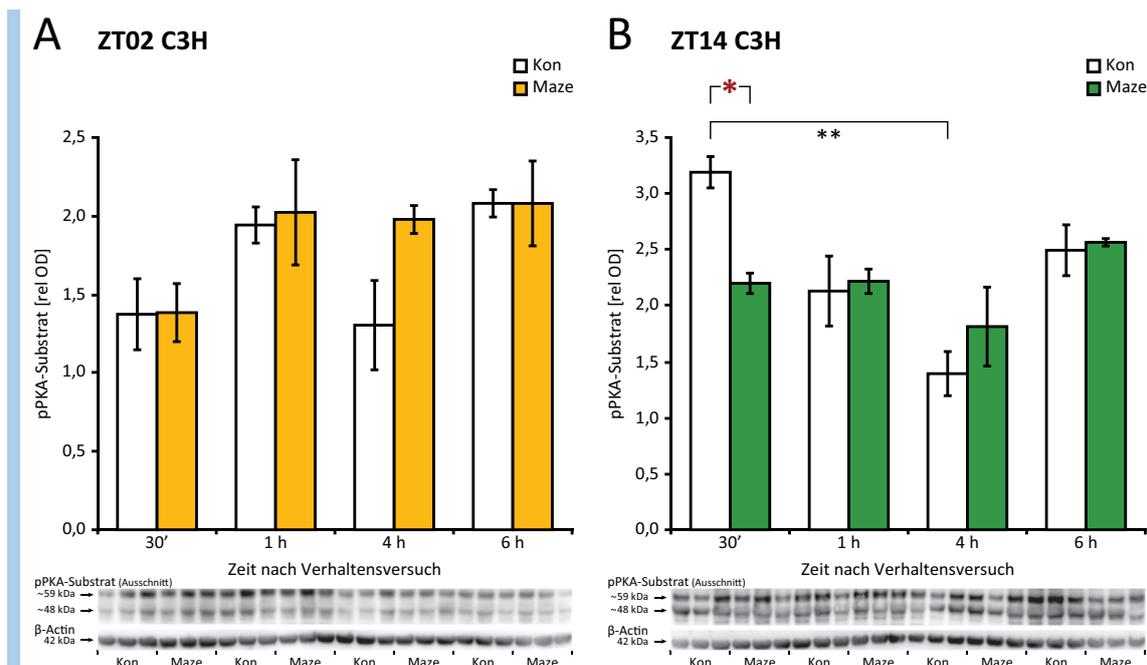


Abb. 13: pPKA-Substrat im Hippocampus der C3H-Mäuse nach Training im Maze

Signifikanzen innerhalb jeder Gruppe (einfaktorielle ANOVA mit Bonferroni-Korrektur), verdeutlicht durch Klammern und *-Symbole (* $P \leq 0,05$; ** $P \leq 0,01$). Beachte die relative Achsenskalierung. Genaue Werte siehe Tab. 11. **A** ZT02: trainierte C3H-Tiere (Maze) ■; Kontrollgruppe (Kon) □. **B** ZT14: trainierte C3H-Tiere (Maze) ■; Kontrollgruppe (Kon) □. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SEM der relativen optischen Dichte (rel OD) der im Western Blot gefundenen und quantifizierten Banden.

Tab. 11: pPKA-Substrat im Hippocampus der C3H-Mäuse nach Training im Maze

Dargestellt sind Mittelwerte \pm SEM der rel OD von pPKA-Substrat im Western Blot sowie der erreichte Anteil am Maximalwert innerhalb der jeweiligen Trainings- (Maze) bzw. Kontrollgruppe (Kon). P -Werte und Signifikanzen der Vergleiche zwischen beiden Gruppen zu den einzelnen Zeitpunkten sind angegeben (zweifaktorielle ANOVA mit Bonferroni-Korrektur, *ns* $P > 0,5$; * $P \leq 0,05$).

	Zeitpunkt	Kon ($\bar{x} \pm \text{SEM}$)	%-Max	Maze ($\bar{x} \pm \text{SEM}$)	%-Max	P -Wert	
ZT02	30 min	1,374 \pm 0,226	66 %	1,384 \pm 0,185	67 %	> 0,05	ns
	1 h	1,942 \pm 0,115	93 %	2,023 \pm 0,335	97 %	> 0,05	ns
	4 h	1,304 \pm 0,285	63 %	1,978 \pm 0,090	95 %	> 0,05	ns
	6 h	2,080 \pm 0,087	100 %	2,080 \pm 0,271	100 %	> 0,05	ns
ZT14	30 min	3,190 \pm 0,140	100 %	2,199 \pm 0,091	86 %	0,017	*
	1 h	2,130 \pm 0,312	67 %	2,217 \pm 0,109	86 %	> 0,05	ns
	4 h	1,393 \pm 0,197	44 %	1,813 \pm 0,352	71 %	> 0,05	ns
	6 h	2,494 \pm 0,227	78 %	2,565 \pm 0,033	100 %	> 0,05	ns

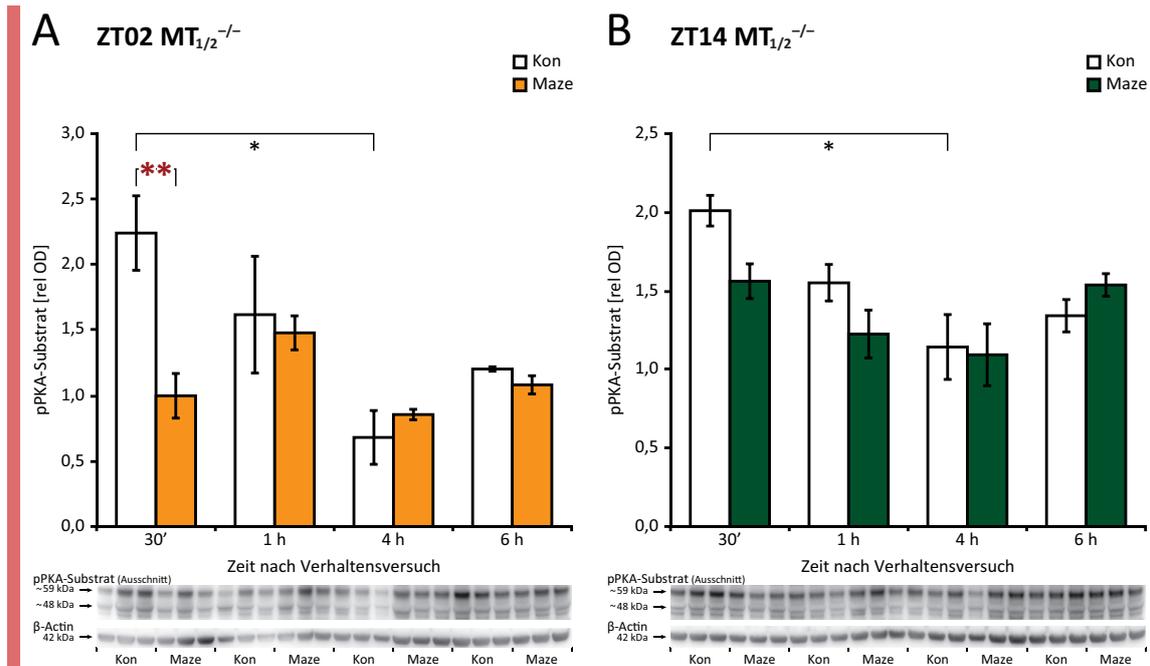


Abb. 14: pPKA-Substrat im Hippocampus der $MT_{1/2}^{-/-}$ -Mäuse nach Training im Maze
 Signifikanzen innerhalb jeder Gruppe (einfaktorielle ANOVA mit Bonferroni-Korrektur), verdeutlicht durch Klammern und *-Symbole (* $P \leq 0,05$; ** $P \leq 0,01$). Beachte die relative Achsenskalierung. Genaue Werte siehe Tab. 12. **A** ZT02: trainierte transgene $MT_{1/2}^{-/-}$ -Tiere (Maze) ■; Kontrollgruppe (Kon) □. **B** ZT14: trainierte $MT_{1/2}^{-/-}$ -Tiere (Maze) ■; Kontrollgruppe (Kon) □. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SEM der relativen optischen Dichte (rel OD) der im Western Blot gefundenen und quantifizierten Banden.

Tab. 12: pPKA-Substrat im Hippocampus der $MT_{1/2}^{-/-}$ -Mäuse nach Training im Maze
 Dargestellt sind Mittelwerte \pm SEM der rel OD von pPKA-Substrat im Western Blot sowie der erreichte Anteil am Maximalwert innerhalb der jeweiligen Trainings- (Maze) bzw. Kontrollgruppe (Kon). P -Werte und Signifikanzen der Vergleiche zwischen beiden Gruppen zu den einzelnen Zeitpunkten sind angegeben (zweifaktorielle ANOVA mit Bonferroni-Korrektur, *ns* $P > 0,5$; * $P \leq 0,05$; ** $P \leq 0,01$).

	Zeitpunkt	Kon ($\bar{x} \pm \text{SEM}$)	%-Max	Maze ($\bar{x} \pm \text{SEM}$)	%-Max	P -Wert	
ZT02	30 min	2,241 \pm 0,284	100 %	0,998 \pm 0,171	67 %	0,004	**
	1 h	1,618 \pm 0,446	72 %	1,479 \pm 0,130	100 %	> 0,05	ns
	4 h	0,680 \pm 0,205	30 %	0,885 \pm 0,040	58 %	> 0,05	ns
	6 h	1,203 \pm 0,017	54 %	1,082 \pm 0,070	73 %	> 0,05	ns
ZT14	30 min	2,010 \pm 0,098	100 %	1,561 \pm 0,111	100 %	> 0,05	ns
	1 h	1,552 \pm 0,116	77 %	1,225 \pm 0,152	78 %	> 0,05	ns
	4 h	1,142 \pm 0,206	57 %	1,093 \pm 0,197	70 %	> 0,05	ns
	6 h	1,341 \pm 0,103	67 %	1,537 \pm 0,072	98 %	> 0,05	ns

3.2.2 c) pPKC-Substrat

In Abb. 15 ist der Verlauf der Konzentration von pPKC-Substrat im Hippocampus der C3H-Mäuse nach Training dargestellt. Bei den zum Zeitpunkt ZT02 trainierten Tieren unterliegen die Mittelwerte signifikanten Schwankungen. Der höchste Wert wird 1 h nach Abschluss des Trainings erreicht, danach fallen die Werte ab. 6 h nach Versuchsende ist die Phosphorylierung der PKC-Substrate auf etwa ein Drittel des Maximums signifikant ($P = 0,011$) abgefallen ist. In der entsprechenden Kontrollgruppe fällt der Abfall allerdings noch deutlicher auf. Der Maximalwert wurde hier bereits nach 30 min gemessen, nach 4 h findet sich bereits ein signifikanter ($P = 0,045$) Abfall auf etwa die Hälfte des Maximums. Der Trend setzt sich fort, nach 6 h ist eine weitere Verringerung auf ein Viertel des 30-min-Wertes ($P = 0,009$) zu sehen, die auch gegenüber 1 h signifikant ($P = 0,025$) ist. Im Vergleich von Maze- und Kontrollgruppe fällt auf, dass die Konzentrationen von pPKC-Substrat in beiden Gruppen mit der Zeit abfallen. Der frühe Wert 30 min nach dem Versuch ist jedoch bei den trainierten Tieren nur etwa halb so hoch wie in der Kontrollgruppe. Dieser Unterschied ist signifikant ($P = 0,033$). Danach folgen die Werte beider Gruppen einem annähernd gleichen Verlauf.

Wurde das Training im Maze zum Zeitpunkt ZT14 durchgeführt, ergibt sich ein Bild mit kontinuierlich abfallenden Werten bei den trainierten Tieren. Der höchste Wert wurde 30 min nach dem Versuch gemessen, nach 4 h hat sich der Gehalt an phosphorylierten Substraten der PKC auf ein Drittel signifikant ($P = 0,027$) verringert. 6 h nach Versuchsende bleibt der Wert gleich tief ($P = 0,024$ gegenüber 30 min). Die Kontrollgruppe zeigt keine Unterschiede über die Untersuchungszeitpunkte. Im Vergleich zwischen beiden Gruppen liegen keine Unterschiede vor, die die Signifikanzgrenze erreichen.

Abb. 16 zeigt die Mittelwerte der rel OD der phosphorylierten PKC-Substrate im Hippocampus der im Maze trainierten Mäuse vom $MT_{1/2}^{-/-}$ -Genotyp. Wurden die Tiere zu ZT02 trainiert, so zeigt sich ein zu den Wildtypen gegenläufiges Verhalten der Werte. Diese steigen nach einer frühen flachen Phase zu den späteren Untersuchungszeitpunkten hin an, sodass der Mittelwert 6 h nach dem Versuch auf das Doppelte der Werte bei 30 min ($P = 0,023$) und 1 h ($P = 0,030$) erhöht ist. Die Tiere gleichen Genotyps aus der Kontrollgruppe, die nicht am Training teilgenommen hatten, zeigten hingegen keinerlei signifikante Fluktuationen von pPKC-Substrat, die Werte liegen gleichförmig etwa auf

der Höhe des Maximalwertes der Mazegruppe. Dementsprechend zeigen sich auch zu den beiden frühen Messzeitpunkten die Werte im Vergleich zwischen beiden Gruppen verschieden: 30 min und nach 1 h nach dem Training ist die Menge der phosphorylierten PKC-Substrate bei den trainierten Tieren signifikant ($P = 0,027$ bzw. $P = 0,033$) geringer als in der Kontrollgruppe. Zu den späteren Zeitpunkten hin gleichen sich die Werte beider Gruppen aneinander an.

Bei den $MT_{1/2}^{-/-}$ -Tieren, die in der frühen Nacht zu ZT14 den Mazeversuch durchlaufen hatten, fällt eine zu ZT02 ganz ähnliche Dynamik der Mittelwerte von pPKC-Substrat auf, auch hier kommt es nach einer anfänglichen flachen Phase nach 6 h zum starken Anstieg auf etwa das Dreifache im Vergleich zu den restlichen Werten. Dieses Maximum ist signifikant verschieden zu den Werten bei 30 min ($P = 0,0002$), 1 h ($P = 0,0003$) und 4 h ($P = 0,0007$). Auch in der Kontrollgruppe findet sich ein ähnlicher Verlauf mit einem Anstieg nach 6 h, der gegenüber 1 h ($P = 0,008$) und 4 h ($P = 0,014$) signifikant ist. Vergleicht man die Werte beider Gruppen miteinander, so zeigt sich 30 min nach dem Mazeversuch ein signifikanter Unterschied, hier ist die Phosphorylierung der PKC-Substrate bei den trainierten Tieren gegenüber den Tieren der Kontrollgruppe vermindert ($P = 0,021$). Zu den anderen untersuchten Zeitpunkten unterscheiden sich die beiden Gruppen nicht signifikant voneinander.

Die Dynamik der Phosphorylierung der PKC-Substrate im Hippocampus der $MT_{1/2}^{-/-}$ -Mäuse ist also ganz ähnlich, wenn der Versuch im Maze am frühen Tag oder in der frühen Nacht stattgefunden hatte; es tritt jeweils 6 h nach dem Ende des Trainings ein Anstieg der Werte auf. In der Nacht tritt dieser Anstieg jedoch auch in der Kontrollgruppe auf, am Tag nicht. Hier liegen die Werte in der Kontrollgruppe bereits von Anfang an auf gleichbleibend höherem Niveau. Auch scheint sich das Training zu beiden Zeitpunkten zunächst inhibitorisch, später nicht mehr auf die Phosphorylierung der PKC-Substrate auszuwirken, wobei die Inhibition am Tag weniger lange andauert.

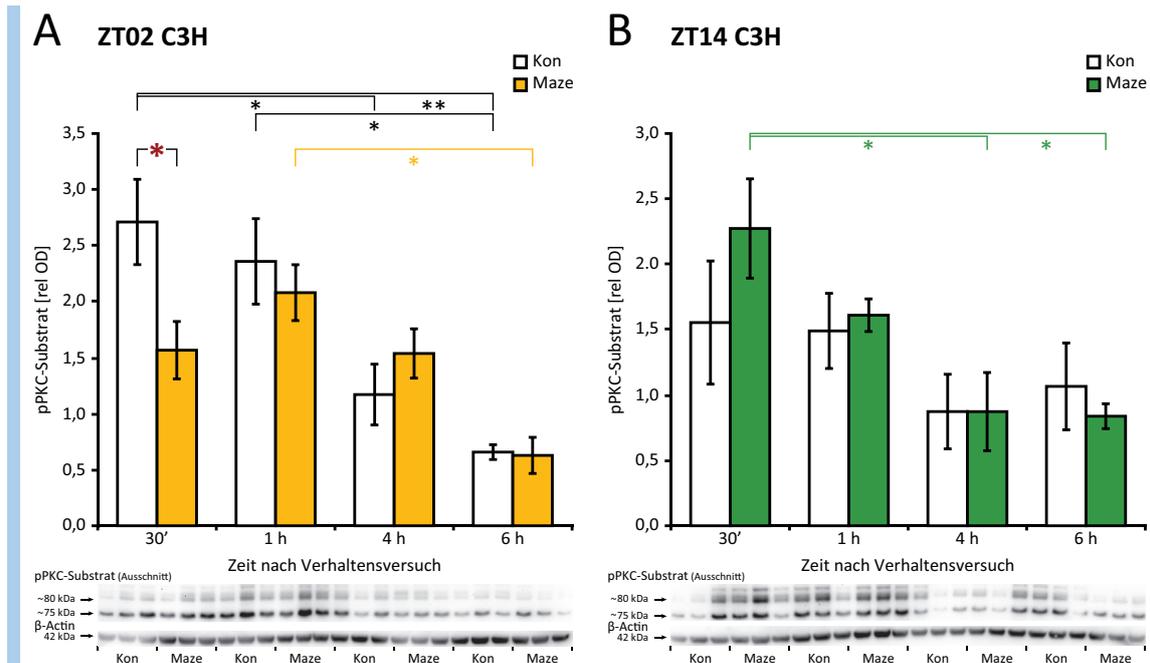


Abb. 15: pPKC-Substrat im Hippocampus der C3H-Mäuse nach Training im Maze

Signifikanzen innerhalb jeder Gruppe (einfaktorielle ANOVA mit Bonferroni-Korrektur), verdeutlicht durch Klammern und *-Symbole (* $P \leq 0,05$; ** $P \leq 0,01$). Beachte die relative Achsenskalierung. Genaue Werte siehe Tab. 13: pPKC-Substrat im Hippocampus der C3H-Mäuse nach Training im Maze. **A** ZT02: trainierte C3H-Tiere (Maze) ■; Kontrollgruppe (Kon) □. **B** ZT14: trainierte C3H-Tiere (Maze) ■; Kontrollgruppe (Kon) □. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SEM der relativen optischen Dichte (rel OD) der im Western Blot gefundenen und quantifizierten Banden.

Tab. 13: pPKC-Substrat im Hippocampus der C3H-Mäuse nach Training im Maze

Dargestellt sind Mittelwerte \pm SEM der rel OD von pPKC-Substrat im Western Blot sowie der erreichte Anteil am Maximalwert innerhalb der jeweiligen Trainings- (Maze) bzw. Kontrollgruppe (Kon). P -Werte und Signifikanzen der Vergleiche zwischen beiden Gruppen zu den einzelnen Zeitpunkten sind angegeben (zweifaktorielle ANOVA mit Bonferroni-Korrektur, * $P \leq 0,05$; ns $P > 0,5$).

	Zeitpunkt	Kon ($\bar{x} \pm \text{SEM}$)	%-Max	Maze ($\bar{x} \pm \text{SEM}$)	%-Max	P -Wert	
ZT02	30 min	2,711 \pm 0,381	100 %	1,563 \pm 0,259	75 %	0,037	*
	1 h	2,358 \pm 0,388	87 %	2,076 \pm 0,247	100 %	> 0,05	ns
	4 h	1,176 \pm 0,272	43 %	1,537 \pm 0,222	74 %	> 0,05	ns
	6 h	0,650 \pm 0,067	24 %	0,627 \pm 0,160	30 %	> 0,05	ns
ZT14	30 min	1,554 \pm 0,471	100 %	2,274 \pm 0,380	100 %	> 0,05	ns
	1 h	1,490 \pm 0,287	96 %	1,610 \pm 0,125	71 %	> 0,05	ns
	4 h	0,873 \pm 0,285	56 %	0,873 \pm 0,299	38 %	> 0,05	ns
	6 h	1,066 \pm 0,332	69 %	0,838 \pm 0,095	37 %	> 0,05	ns

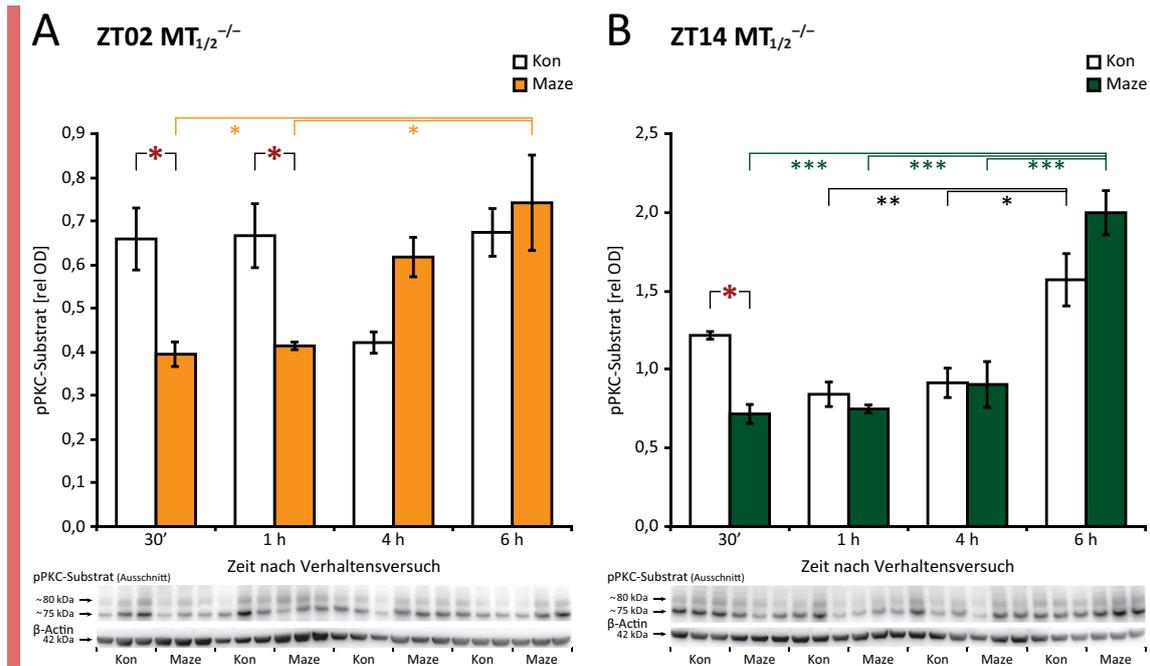


Abb. 16: pPKC-Substrat im Hippocampus der $MT_{1/2}^{-/-}$ -Mäuse nach Training im Maze
 Signifikanzen innerhalb jeder Gruppe (einfaktorielle ANOVA mit Bonferroni-Korrektur), verdeutlicht durch Klammern und *-Symbole (* $P \leq 0,05$; ** $P \leq 0,01$; *** $P \leq 0,001$). Beachte die relative Achsen-skalierung. Genaue Werte siehe Tab. 14. **A** ZT02: trainierte transgene $MT_{1/2}^{-/-}$ -Tiere (Maze) ■; Kontrollgruppe (Kon) □. **B** ZT14: trainierte $MT_{1/2}^{-/-}$ -Tiere (Maze) ■; Kontrollgruppe (Kon) □. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SEM der relativen optischen Dichte (rel OD) der im Western Blot gefundenen und quantifizierten Banden.

Tab. 14: pPKC-Substrat im Hippocampus der $MT_{1/2}^{-/-}$ -Mäuse nach Training im Maze
 Dargestellt sind Mittelwerte \pm SEM der rel OD von pPKC-Substrat im Western Blot sowie der erreichte Anteil am Maximalwert innerhalb der jeweiligen Trainings- (Maze) bzw. Kontrollgruppe (Kon). P -Werte und Signifikanzen der Vergleiche zwischen beiden Gruppen zu den einzelnen Zeitpunkten sind angegeben (zweifaktorielle ANOVA mit Bonferroni-Korrektur, *ns* $P > 0,5$; * $P \leq 0,05$).

	Zeitpunkt	Kon ($\bar{x} \pm \text{SEM}$)	%-Max	Maze ($\bar{x} \pm \text{SEM}$)	%-Max	P -Wert	
ZT02	30 min	0,660 \pm 0,071	98 %	0,397 \pm 0,028	54 %	> 0,027	*
	1 h	0,668 \pm 0,073	99 %	0,413 \pm 0,009	56 %	> 0,033	*
	4 h	0,423 \pm 0,024	63 %	0,617 \pm 0,045	83 %	> 0,05	ns
	6 h	0,676 \pm 0,054	100 %	0,742 \pm 0,109	100 %	> 0,05	ns
ZT14	30 min	0,967 \pm 0,018	77 %	0,575 \pm 0,050	36 %	> 0,021	*
	1 h	0,674 \pm 0,064	54 %	0,599 \pm 0,022	38 %	> 0,05	ns
	4 h	0,730 \pm 0,078	58 %	0,723 \pm 0,118	45 %	> 0,05	ns
	6 h	1,252 \pm 0,134	100 %	1,590 \pm 0,116	100 %	> 0,05	ns

3.2.2 d) pMAPK

In Abb. 17 sind die Mittelwerte der rel OD von pMAPK im Hippocampus der C3H-Mäuse nach Training dargestellt. Bei den Tieren, die zum Zeitpunkt ZT02 im Maze trainiert wurden, zeigt sich eine deutliche Dynamik der Phosphorylierung der MAPK: Zunächst fallen die Werte ab, 4 h nach Versuchsende ist der Wert auf etwa ein Drittel des Ausgangswertes zu Zeitpunkt 30 min signifikant verringert ($P = 0,037$). Zum Zeitpunkt 6 h nach dem Versuch war dann wieder ein stark signifikanter Anstieg ($P = 0,004$) auf etwa das Vierfache des 4-h-Wertes zu beobachten. Bei den Tieren aus der korrespondierenden Kontrollgruppe hingegen lassen sich keinerlei signifikante Unterschiede über den Versuchsverlauf ausmachen.

Vergleicht man beide Gruppen zu den einzelnen Zeitpunkten miteinander, so besteht erst 6 h nach dem Versuch ein signifikanter Unterschied ($P = 0,023$). Hier ist der Mittelwert in der Gruppe der trainierten Tiere auf etwa das Doppelte des Wertes der Kontrollgruppe erhöht.

Wurde das Training im Maze an C3H-Tieren zum Zeitpunkt ZT14 durchgeführt, so kann man sowohl bei der Maze- als auch bei der entsprechenden Kontrollgruppe Fluktuationen der Mittelwerte von pMAPK im Hippocampus erkennen. Bei den trainierten Tieren ist der Verlauf der Werte zunächst gleichförmig, nach 4 h kommt es dann zu einem starken Abfall, der gegenüber den beiden Vorwerten von 30 min und 1 h signifikant ist ($P = 0,002$ bzw. $P = 0,0008$). Nach 6 h bleibt der Mittelwert tief und ist ebenfalls signifikant unterschiedlich zu den Vorwerten bei 30 min ($P = 0,002$) und 1 h ($P = 0,0007$). Bei den Tieren aus der entsprechenden Kontrollgruppe fällt zum Zeitpunkt 1 h ein Hochpunkt auf, der sich signifikant von den anderen Werten bei 30 min ($P = 0,020$), bei 4 h ($P = 0,017$) und 6 h ($P = 0,014$) unterscheidet. Zu allen übrigen Zeitpunkten liegen die Werte gleichartig tief.

Beim Vergleich der Werte zwischen trainierten Tieren und Kontrollgruppe zeigt sich 1 h nach dem Versuch ein signifikanter Unterschied ($P = 0,011$), hier erreicht pMAPK in der Kontrollgruppe etwa den doppelten Wert der Mazegruppe. Zu allen anderen Zeitpunkten liegen keine Unterschiede vor, die die Signifikanzgrenze erreichen. Der schwankende Verlauf der endogenen Phosphorylierung der MAP-Kinase im Hippocampus, deren höchster Wert hier 1 h nach dem Versuch zu ZT 14, also zu ZT15 gemessen

wurde, wird also durch den Versuch abgeflacht, wohingegen die tiefen Werte zu den späteren Zeitpunkten erhalten bleiben.

Das Training führt also zu beiden Versuchszeitpunkten bei C3H-Mäusen nach 4 h zu einer Verringerung der Phosphorylierung der MAP-Kinase, die die basalen Schwankungen, wie sie in der Kontrollgruppe vorliegen, überdeckt. Wurde der Versuch jedoch am frühen Tag durchgeführt, so ist die Verringerung der Werte von kürzerer Dauer oder aber bereits früher vorhanden und früher wieder aufgehoben, denn nach 6 h ist hier wieder ein starker Anstieg zu finden, der auch eine Induktion gegenüber der Kontrollgruppe darstellt. Nach dem in der frühen Nacht durchgeführten Versuch bleibt diese Induktion aus.

Die Mittelwerte von pMAPK im Hippocampus der $MT_{1/2}^{-/-}$ -Tiere sind in Abb. 18 dargestellt. Hier sind nach dem zu ZT02 durchgeführten Versuch weder in der Maze- noch in der Kontrollgruppe Unterschiede zu finden, die das Signifikanzniveau von 5 % erreichen. Auch unterscheiden sich die Tiere, die im Maze waren, zu keinem Zeitpunkt von denen der Kontrollgruppe.

Ähnlich verhält es sich bei den $MT_{1/2}^{-/-}$ -Tieren, die zu ZT14 trainiert wurden, auch hier bleibt der Gehalt der phosphorylierten MAP-Kinase uniform auf gleicher Höhe mit fortschreitender Zeit nach dem Training. Auch der entsprechenden Kontrollgruppe liegen keine signifikanten Schwankungen der Mittelwerte vor. Zwischen Maze- und Kontrollgruppe finden sich zu keinem der untersuchten Zeitpunkte signifikante Unterschiede.

Die Phosphorylierung der MAP-Kinase bleibt also unbeeinflusst davon, ob der Melatoninrezeptor exprimiert wird (C3H) oder in den transgenen $MT_{1/2}^{-/-}$ -Tieren fehlt

Das Training im *Radial Arm Maze* scheint also bei den transgenen $MT_{1/2}^{-/-}$ -Tieren im Gegensatz zu den Wildtyptieren zu keinem der beiden Versuchszeitpunkte einen messbaren Einfluss auf die Phosphorylierung der MAP-Kinase zu nehmen. Auch die zugrundeliegenden basalen Schwankungen in der Kontrollgruppe, wie sie bei den Wildtyptieren zu finden sind, fehlen hier.

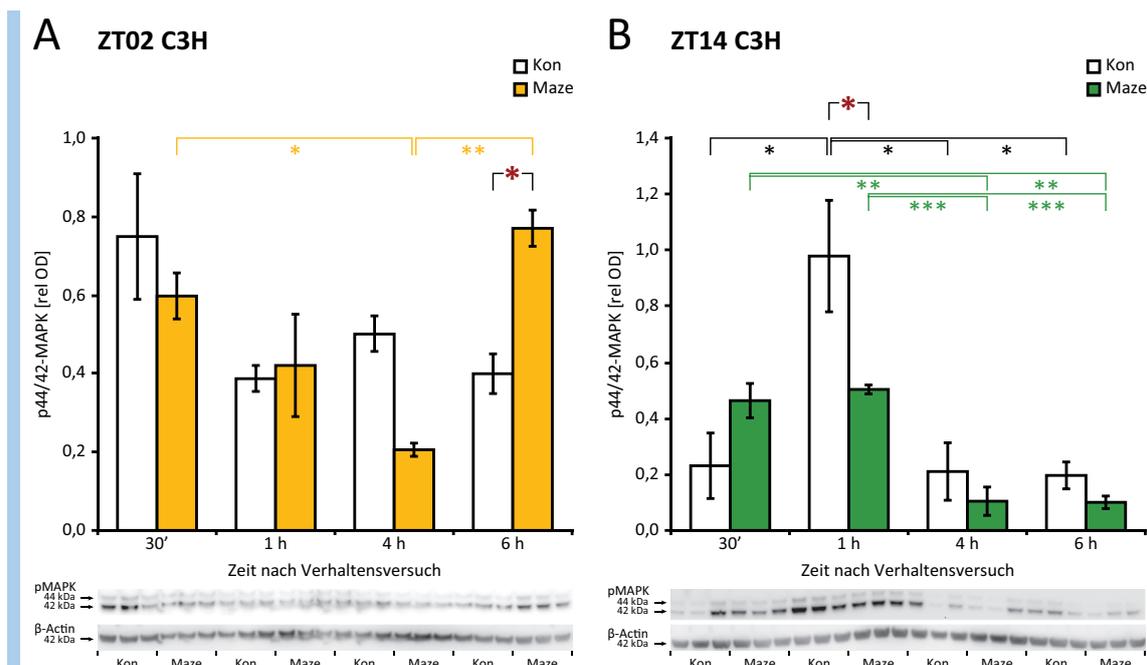


Abb. 17: pMAPK im Hippocampus der C3H-Mäuse nach Training im Maze

Signifikanzen innerhalb jeder Gruppe (einfaktorielle ANOVA mit Bonferroni-Korrektur), verdeutlicht durch Klammern und *-Symbole (* $P \leq 0,05$; ** $P \leq 0,01$; *** $P \leq 0,001$). Beachte die relative Achsen-skalierung. Genaue Werte siehe Tab. 15. **A** ZT02: trainierte C3H-Tiere (Maze) ■; Kontrollgruppe (Kon) □. **B** ZT14: trainierte C3H-Tiere (Maze) ■; Kontrollgruppe (Kon) □. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SEM der relativen optischen Dichte (rel OD) der im Western Blot gefundenen und quantifizierten Banden.

Tab. 15: pMAPK im Hippocampus der C3H-Mäuse nach Training im Maze

Dargestellt sind Mittelwerte \pm SEM der rel OD von pMAPK im Western Blot sowie der erreichte Anteil am Maximalwert innerhalb der jeweiligen Trainings- (Maze) bzw. Kontrollgruppe (Kon). P -Werte und Signifikanzen der Vergleiche zwischen beiden Gruppen zu den einzelnen Zeitpunkten sind angegeben (zweifaktorielle ANOVA mit Bonferroni-Korrektur, *ns* $P > 0,5$; * $P \leq 0,05$).

	Zeitpunkt	Kon ($\bar{x} \pm \text{SEM}$)	%-Max	Maze ($\bar{x} \pm \text{SEM}$)	%-Max	P -Wert	
ZT02	30 min	0,745 \pm 0,160	100 %	0,596 \pm 0,059	78 %	> 0,05	ns
	1 h	0,385 \pm 0,032	52 %	0,418 \pm 0,129	55 %	> 0,05	ns
	4 h	0,500 \pm 0,046	67 %	0,204 \pm 0,017	27 %	> 0,05	ns
	6 h	0,396 \pm 0,050	53 %	0,766 \pm 0,045	100 %	0,023	*
ZT14	30 min	0,231 \pm 0,177	24 %	0,461 \pm 0,061	92 %	> 0,05	ns
	1 h	0,979 \pm 0,199	100 %	0,502 \pm 0,016	100 %	0,011	*
	4 h	0,207 \pm 0,101	21 %	0,101 \pm 0,049	20 %	> 0,05	ns
	6 h	0,188 \pm 0,046	19 %	0,098 \pm 0,022	20 %	> 0,05	ns

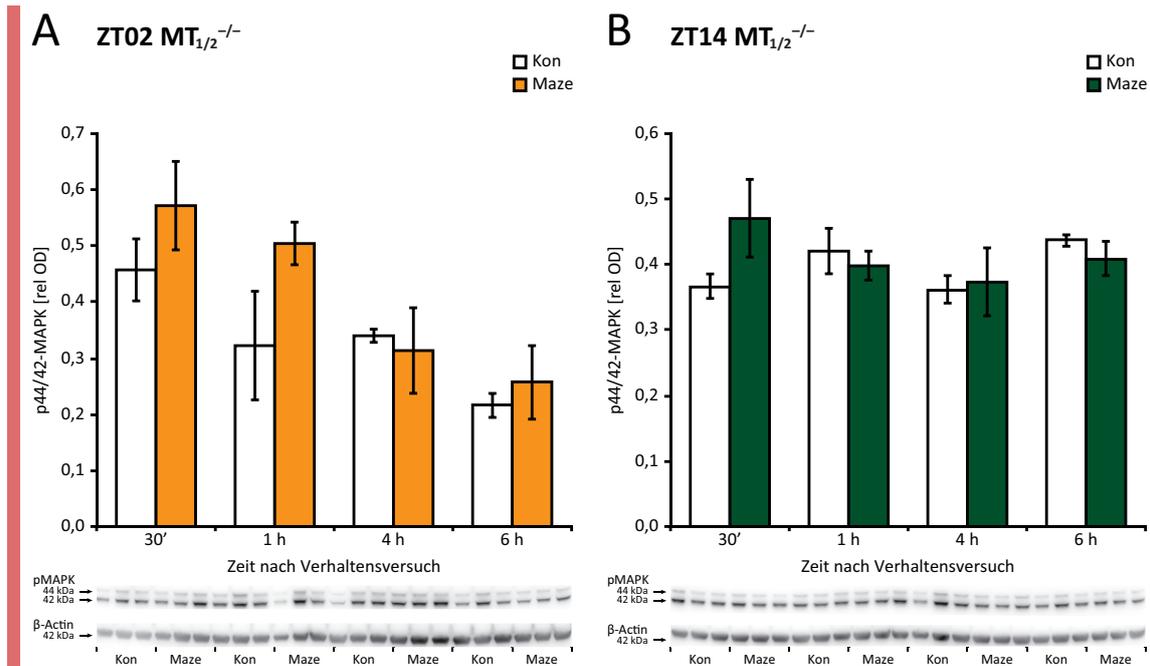


Abb. 18: pMAPK im Hippocampus der $MT_{1/2}^{-/-}$ -Mäuse nach Training im Maze

Beachte die relative Achsenskalierung. Genaue Werte siehe Tab. 16. **A** ZT02: trainierte transgene $MT_{1/2}^{-/-}$ -Tiere (Maze) ■; Kontrollgruppe (Kon) □. **B** ZT14: trainierte $MT_{1/2}^{-/-}$ -Tiere (Maze) ■; Kontrollgruppe (Kon) □. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SEM der relativen optischen Dichte (rel OD) der im Western Blot gefundenen und quantifizierten Banden.

Tab. 16: pMAPK im Hippocampus der $MT_{1/2}^{-/-}$ -Mäuse nach Training im Maze

Dargestellt sind Mittelwerte \pm SEM der rel OD von pMAPK im Western Blot sowie der erreichte Anteil am Maximalwert innerhalb der jeweiligen Trainings- (Maze) bzw. Kontrollgruppe (Kon). *P*-Werte und Signifikanzen der Vergleiche zwischen beiden Gruppen zu den einzelnen Zeitpunkten sind angegeben (zweifaktorielle ANOVA mit Bonferroni-Korrektur, *ns* $P > 0,5$).

	Zeitpunkt	Kon ($\bar{x} \pm$ SEM)	%-Max	Maze ($\bar{x} \pm$ SEM)	%-Max	<i>P</i> -Wert	
ZT02	30 min	0,458 \pm 0,056	100 %	0,572 \pm 0,079	100 %	> 0,05	ns
	1 h	0,323 \pm 0,097	70 %	0,504 \pm 0,038	88 %	> 0,05	ns
	4 h	0,339 \pm 0,013	74 %	0,314 \pm 0,076	55 %	> 0,05	ns
	6 h	0,216 \pm 0,021	47 %	0,257 \pm 0,066	45 %	> 0,05	ns
ZT14	30 min	0,367 \pm 0,019	84 %	0,471 \pm 0,059	100 %	> 0,05	ns
	1 h	0,421 \pm 0,035	96 %	0,398 \pm 0,022	85 %	> 0,05	ns
	4 h	0,362 \pm 0,021	83 %	0,374 \pm 0,052	79 %	> 0,05	ns
	6 h	0,437 \pm 0,009	100%	0,410 \pm 0,027	87 %	> 0,05	ns

3.2.2 e) pCREB

Die Mittelwerte der rel OD von pCREB im Hippocampus der C3H-Mäuse sind in Abb. 19 dargestellt. Bei den zum Zeitpunkt ZT02 trainierten Tieren zeigt sich 1 h nach dem Versuch ein Maximum, das etwa das Doppelte der Werte nach 30 min ($P = 0,041$) und 4 h ($P = 0,012$) erreicht. Dieser Hochpunkt stellt eine signifikante Erhöhung um 60 % gegenüber der Kontrollgruppe dar ($P = 0,018$), in der der Hochpunkt vollständig fehlt. Zu keinem Zeitpunkt sind hier signifikante Schwankungen von pCREB nachzuweisen.

Wurde der Versuch im Maze zum Zeitpunkt ZT14 durchgeführt, verläuft die Konzentration von pCREB sowohl bei den trainierten Tieren als auch in der Kontrollgruppe gleichförmig und es lassen sich keine signifikanten Schwankungen nachweisen. Auch im direkten Vergleich zwischen beiden Gruppen besteht zu keinem der getesteten Zeitpunkte ein signifikanter Unterschied.

In Abb. 20 sind die Mittelwerte von pCREB im Hippocampus der $MT_{1/2}^{-/-}$ -Tiere dargestellt. In der Gruppe, die zu ZT02 den Versuch im Maze durchlaufen hatte, findet sich der höchste Wert bereits 30 min nach Versuchsende. Anschließend fällt die Konzentration von phosphoryliertem CREB nach 1 h deutlich ab auf etwa die Hälfte des 30-min-Wertes und bleibt auch nach 4 h und 6 h konstant tief. Alle Unterschiede sind signifikant ($P = 0,0005$; $P = 0,0003$; $P = 0,0004$ resp.). In der Kontrollgruppe verläuft der Gehalt an phosphoryliertem CREB gleichförmig. Zwischen beiden Gruppen bestehen zu keinem der Untersuchungszeitpunkte signifikante Unterschiede.

Wurde der Mazeversuch zu ZT14 durchgeführt, zeigen sich weder bei den trainierten Tieren noch in der Kontrollgruppe signifikante Schwankungen. Auch hier sind zu keinem der untersuchten Zeitpunkte nach dem Versuch die Mittelwerte von pCREB zwischen Versuchs- und Kontrollgruppe signifikant verschieden.

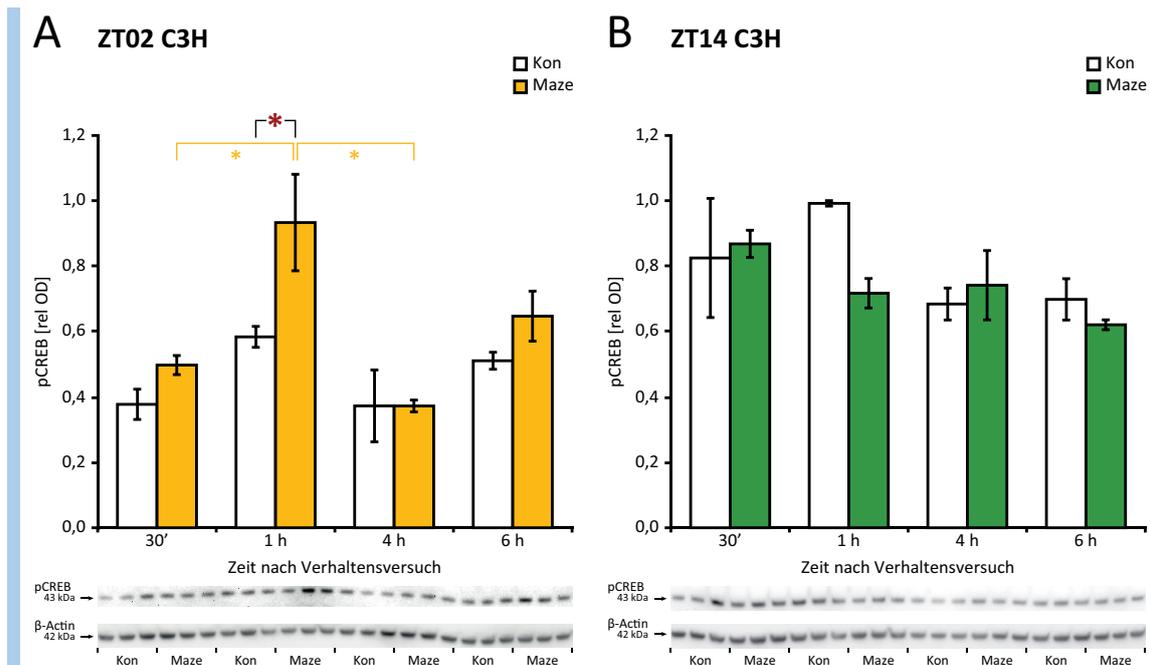


Abb. 19: pCREB im Hippocampus der C3H-Mäuse nach Training im Maze

Signifikanzen innerhalb jeder Gruppe (einfaktorielle ANOVA mit Bonferroni-Korrektur), verdeutlicht durch Klammern und *-Symbole ($* P \leq 0,05$). Beachte die relative Achsenskalierung. Genaue Werte siehe Tab. 17. **A** ZT02: trainierte C3H-Tiere (Maze) ■; Kontrollgruppe (Kon) □. **B** ZT14: trainierte C3H-Tiere (Maze) ■; Kontrollgruppe (Kon) □. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SEM der relativen optischen Dichte (rel OD) der im Western Blot gefundenen und quantifizierten Banden.

Tab. 17: pCREB im Hippocampus der C3H-Mäuse nach Training im Maze

Dargestellt sind Mittelwerte \pm SEM der rel OD von pCREB im Western Blot sowie der erreichte Anteil am Maximalwert innerhalb der jeweiligen Trainings- (Maze) bzw. Kontrollgruppe (Kon). *P*-Werte und Signifikanzen der Vergleiche zwischen beiden Gruppen zu den einzelnen Zeitpunkten sind angegeben (zweifaktorielle ANOVA mit Bonferroni-Korrektur, *ns* $P > 0,5$; $* P \leq 0,05$).

	Zeitpunkt	Kon ($\bar{x} \pm \text{SEM}$)	%-Max	Maze ($\bar{x} \pm \text{SEM}$)	%-Max	<i>P</i> -Wert	
ZT02	30 min	0,378 \pm 0,046	65 %	0,498 \pm 0,029	53 %	> 0,05	ns
	1 h	0,584 \pm 0,032	100 %	0,934 \pm 0,148	100 %	0,018	*
	4 h	0,373 \pm 0,110	64 %	0,373 \pm 0,018	40 %	> 0,05	ns
	6 h	0,511 \pm 0,026	87 %	0,647 \pm 0,077	69 %	> 0,05	ns
ZT14	30 min	0,825 \pm 0,182	83 %	0,869 \pm 0,042	100 %	> 0,05	ns
	1 h	0,992 \pm 0,008	100 %	0,717 \pm 0,045	83 %	> 0,05	ns
	4 h	0,685 \pm 0,049	69 %	0,742 \pm 0,106	85 %	> 0,05	ns
	6 h	0,699 \pm 0,063	70 %	0,621 \pm 0,015	72 %	> 0,05	ns

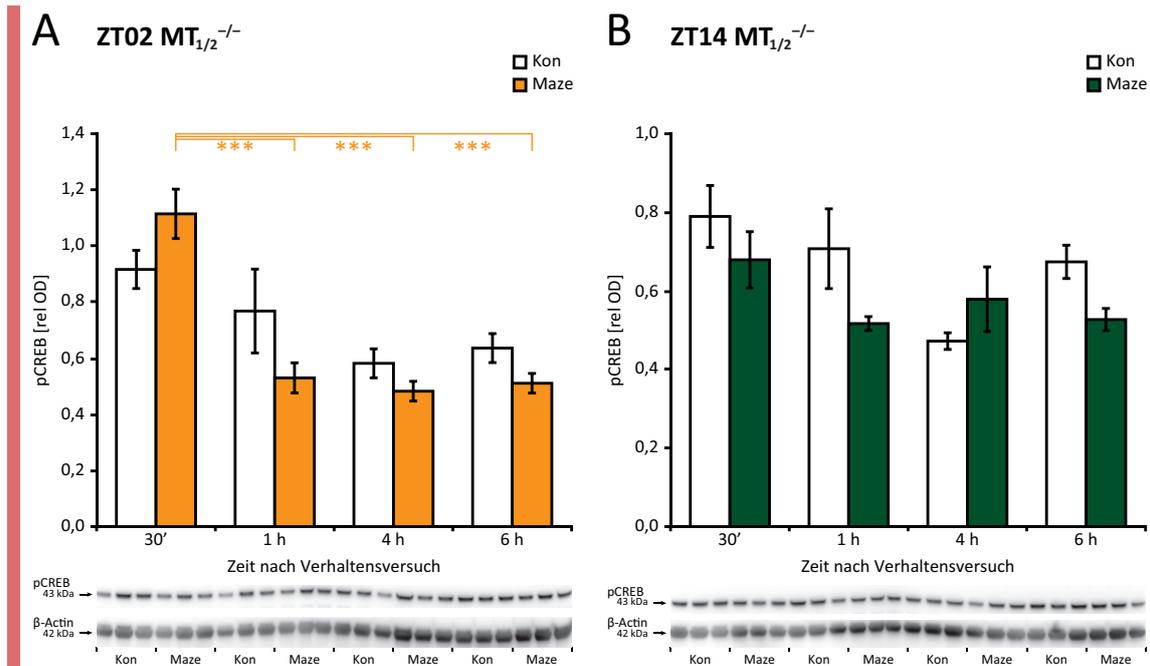


Abb. 20: pCREB im Hippocampus der $MT_{1/2}^{-/-}$ -Mäuse nach Training im Maze

Signifikanzen innerhalb jeder Gruppe (einfaktorielle ANOVA mit Bonferroni-Korrektur), verdeutlicht durch Klammern und *-Symbole (***) $P \leq 0,001$). Beachte die relative Achsenskalierung. Genaue Werte siehe Tab. 18. **A** ZT02: trainierte transgene $MT_{1/2}^{-/-}$ -Tiere (Maze) ■; Kontrollgruppe (Kon) □. **B** ZT14: trainierte $MT_{1/2}^{-/-}$ -Tiere (Maze) ■; Kontrollgruppe (Kon) □. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SEM der relativen optischen Dichte (rel OD) der im Western Blot gefundenen und quantifizierten Banden.

Tab. 18: pCREB im Hippocampus der $MT_{1/2}^{-/-}$ -Mäuse nach Training im Maze

Dargestellt sind Mittelwerte \pm SEM der rel OD von pCREB im Western Blot sowie der erreichte Anteil am Maximalwert innerhalb der jeweiligen Trainings- (Maze) bzw. Kontrollgruppe (Kon). P -Werte und Signifikanzen der Vergleiche zwischen beiden Gruppen zu den einzelnen Zeitpunkten sind angegeben (zweifaktorielle ANOVA mit Bonferroni-Korrektur, ns $P > 0,5$).

	Zeitpunkt	Kon ($\bar{x} \pm SEM$)	%-Max	Maze ($\bar{x} \pm SEM$)	%-Max	P -Wert	
ZT02	30 min	0,917 \pm 0,068	100 %	1,115 \pm 0,088	100 %	> 0,05	ns
	1 h	0,768 \pm 0,149	84 %	0,530 \pm 0,054	48 %	> 0,05	ns
	4 h	0,582 \pm 0,052	63 %	0,483 \pm 0,035	43 %	> 0,05	ns
	6 h	0,636 \pm 0,052	69 %	0,511 \pm 0,035	46 %	> 0,05	ns
ZT14	30 min	0,790 \pm 0,079	100 %	0,679 \pm 0,072	100 %	> 0,05	ns
	1 h	0,707 \pm 0,102	90 %	0,517 \pm 0,018	76 %	> 0,05	ns
	4 h	0,472 \pm 0,021	60 %	0,579 \pm 0,082	85 %	> 0,05	ns
	6 h	0,674 \pm 0,042	85 %	0,527 \pm 0,028	78 %	> 0,05	ns

3.2.2 f) H3K9ac

Abb. 21 zeigt die Mittelwerte der rel OD des an Lysin 9 acetylierten Histon H3 bei den C3H-Mäusen im Verlauf nach dem Lernversuch. Nach dem zu ZT02 durchgeführten Training im Maze liegt nach 30 min zunächst der höchste Wert von H3K9ac vor, nach 1 h fällt der Wert auf die Hälfte ab und steigt später wieder an. Der Hochpunkt nach 30 min ist von 1 h ($P = 0,0002$), 4 h ($P = 0,0007$) und 6 h ($P = 0,005$) signifikant verschieden. Auch in der Kontrollgruppe liegt der Maximalwert nach 30 min, hier ist der Abfall jedoch langsamer, sodass erst nach 4 h der Tiefpunkt erreicht ist. Dieser ist von den Werten nach 30 min ($P = 0,002$) und 1 h ($P = 0,040$) signifikant verschieden. Auch noch nach 6 h besteht die signifikante ($P = 0,003$) Verringerung gegenüber dem 30-min-Wert. Im Vergleich zwischen trainierten Tieren und Kontrollgruppe fällt auf, dass bei den trainierten Tieren die Werte zu den späteren untersuchten Zeitpunkten wieder ansteigen und daher 6 h nach dem Versuch eine signifikant ($P = 0,015$) höhere Konzentration von H3K9ac als in der Kontrollgruppe vorliegt.

Nach dem zu ZT14 durchgeführten Versuch verläuft der Gehalt an H3K9ac gleichförmig, weder in der Mazegruppe noch in der Kontrollgruppe sind signifikante Schwankungen im Verlauf des Trainingsversuchs zu erkennen. Allerdings fällt im Vergleich beider Gruppen bei den trainierten Tieren 1 h nach dem Versuch eine signifikante ($P = 0,047$) Verminderung gegenüber der Kontrollgruppe auf.

In Abb. 22 sind die Mittelwerte von H3K9ac bei den $MT_{1/2}^{-/-}$ -Tieren dargestellt. Nach dem zu ZT02 durchgeführten Training verlaufen die Werte bei den Versuchstieren gleichförmig, zu keinem der untersuchten Zeitpunkte sind signifikante Schwankungen festzustellen. Auch in der korrespondierenden Kontrollgruppe zeigen sich keine Schwankungen. Im Vergleich zwischen beiden Gruppen liegen keine signifikanten Unterschiede vor.

Auch nach dem zu ZT14 durchgeführten Mazeversuch zeigen sich weder bei den trainierten Tieren noch bei den Tieren der Kontrollgruppe Schwankungen. Auch im Vergleich zwischen beiden Gruppen treten keine Unterschiede auf.

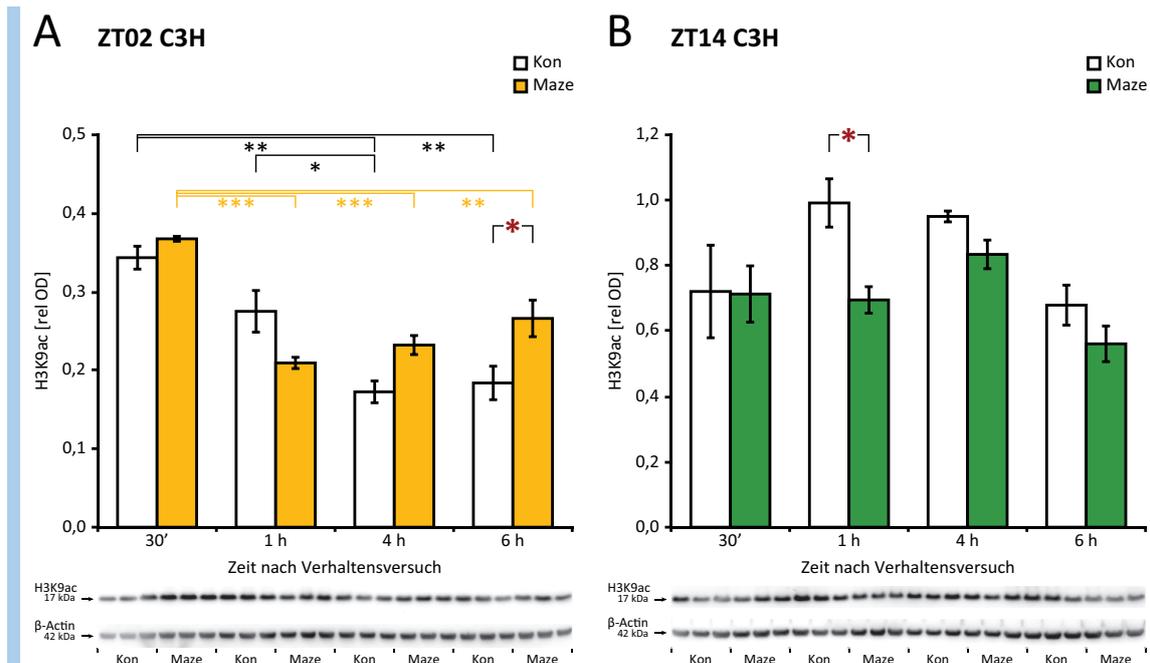


Abb. 21: H3K9ac im Hippocampus der C3H-Mäuse nach Training im Maze

Signifikanzen innerhalb jeder Gruppe (einfaktorielle ANOVA mit Bonferroni-Korrektur), verdeutlicht durch Klammern und *-Symbole (* $P \leq 0,05$; ** $P \leq 0,01$; *** $P \leq 0,001$). Beachte die relative Achsen-skalierung. Genaue Werte siehe Tab. 19. **A** ZT02: trainierte C3H-Tiere (Maze) ■; Kontrollgruppe (Kon) □. **B** ZT14: trainierte C3H-Tiere (Maze) ■; Kontrollgruppe (Kon) □. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SEM der relativen optischen Dichte (rel OD) der im Western Blot gefundenen und quantifizierten Banden.

Tab. 19: H3K9ac im Hippocampus der C3H-Mäuse nach Training im Maze

Dargestellt sind Mittelwerte \pm SEM der rel OD von H3K9ac im Western Blot sowie der erreichte Anteil am Maximalwert innerhalb der jeweiligen Trainings- (Maze) bzw. Kontrollgruppe (Kon). P -Werte und Signifikanzen der Vergleiche zwischen beiden Gruppen zu den einzelnen Zeitpunkten sind angegeben (zweifaktorielle ANOVA mit Bonferroni-Korrektur, *ns* $P > 0,5$; * $P \leq 0,05$).

	Zeitpunkt	Kon ($\bar{x} \pm \text{SEM}$)	%-Max	Maze ($\bar{x} \pm \text{SEM}$)	%-Max	P -Wert	
ZT02	30 min	0,343 \pm 0,015	100 %	0,367 \pm 0,003	100 %	> 0,05	ns
	1 h	0,275 \pm 0,027	80 %	0,209 \pm 0,007	57 %	> 0,05	ns
	4 h	0,172 \pm 0,014	50 %	0,232 \pm 0,012	63 %	> 0,05	ns
	6 h	0,184 \pm 0,021	54 %	0,266 \pm 0,023	72 %	0,015	*
ZT14	30 min	0,721 \pm 0,142	73 %	0,713 \pm 0,086	85 %	> 0,05	ns
	1 h	0,992 \pm 0,074	100 %	0,695 \pm 0,040	83 %	0,047	*
	4 h	0,950 \pm 0,017	96 %	0,834 \pm 0,044	100 %	> 0,05	ns
	6 h	0,679 \pm 0,061	68 %	0,561 \pm 0,055	67 %	> 0,05	ns

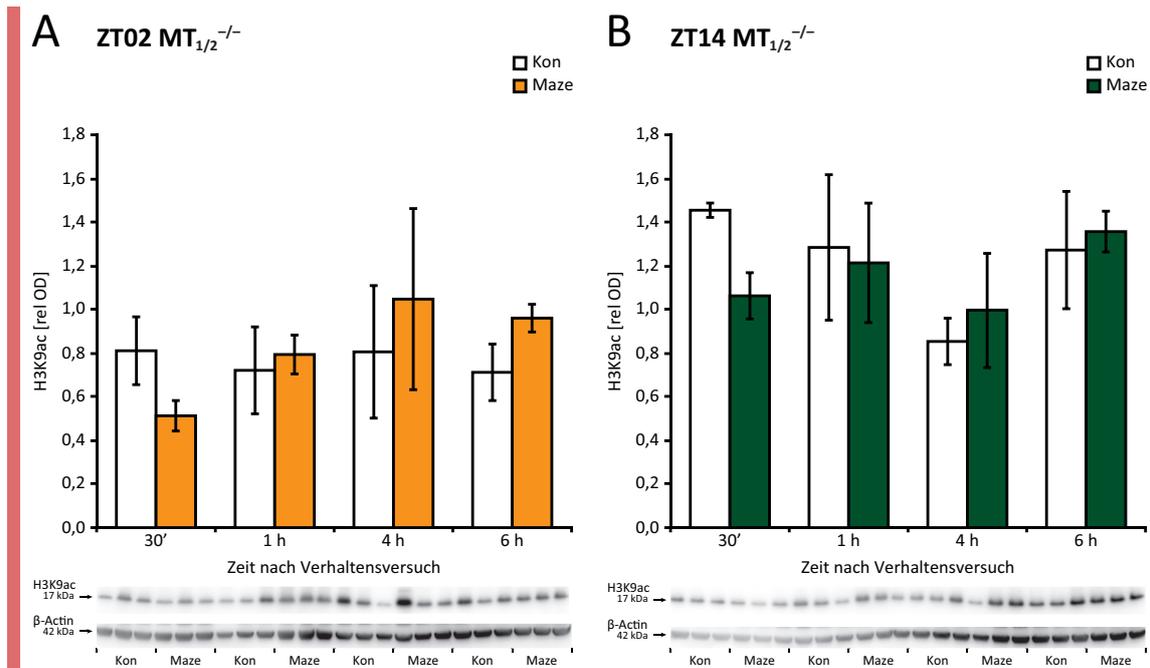


Abb. 22: H3K9ac im Hippocampus der $MT_{1/2}^{-/-}$ -Mäuse nach Training im Maze

Beachte die relative Achsenskalierung. Genaue Werte siehe Tab. 20. **A** ZT02: trainierte transgene $MT_{1/2}^{-/-}$ -Tiere (Maze) ■; Kontrollgruppe (Kon) □. **B** ZT14: trainierte $MT_{1/2}^{-/-}$ -Tiere (Maze) ■; Kontrollgruppe (Kon) □. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SEM der relativen optischen Dichte (rel OD) der im Western Blot gefundenen und quantifizierten Banden.

Tab. 20: H3K9ac im Hippocampus der $MT_{1/2}^{-/-}$ -Mäuse nach Training im Maze

Dargestellt sind Mittelwerte \pm SEM der rel OD von H3K9ac im Western Blot sowie der erreichte Anteil am Maximalwert innerhalb der jeweiligen Trainings- (Maze) bzw. Kontrollgruppe (Kon). *P*-Werte und Signifikanzen der Vergleiche zwischen beiden Gruppen zu den einzelnen Zeitpunkten sind angegeben (zweifaktorielle ANOVA mit Bonferroni-Korrektur, *ns* $P > 0,5$).

	Zeitpunkt	Kon ($\bar{x} \pm \text{SEM}$)	%-Max	Maze ($\bar{x} \pm \text{SEM}$)	%-Max	<i>P</i> -Wert	
ZT02	30 min	0,811 \pm 0,155	100 %	0,513 \pm 0,070	49 %	> 0,05	ns
	1 h	0,721 \pm 0,199	89 %	0,793 \pm 0,089	76 %	> 0,05	ns
	4 h	0,806 \pm 0,304	99 %	1,047 \pm 0,415	100 %	> 0,05	ns
	6 h	0,712 \pm 0,130	88 %	0,960 \pm 0,063	92 %	> 0,05	ns
ZT14	30 min	1,455 \pm 0,033	100 %	1,062 \pm 0,106	78 %	> 0,05	ns
	1 h	1,284 \pm 0,333	88 %	1,213 \pm 0,274	89 %	> 0,05	ns
	4 h	0,853 \pm 0,106	59 %	0,997 \pm 0,262	73 %	> 0,05	ns
	6 h	1,272 \pm 0,269	87 %	1,356 \pm 0,094	100 %	> 0,05	ns

3.2.2 g) H3K14ac

Abb. 23 zeigt die Mittelwerte von an Lysin 14 acetyliertem Histon H3 im Hippocampus der C3H-Mäuse. Die Werte der zu ZT02 trainierten Tiere folgen einem Verlauf mit deutlicher Dynamik. Zunächst verlaufen sie gleichförmig, bis 6 h nach dem Versuch eine deutliche Erhöhung auftritt. Dieses Maximum ist signifikant verschieden von den anderen Werten 30 min ($P = 0,005$), 1 h ($P = 0,003$) und 4 h ($P = 0,009$) nach dem Versuch. In der korrespondierenden Kontrollgruppe hingegen verhalten sich die Werte genau gegenläufig. Hier liegt der Hochpunkt 30 min nach dem Versuch vor, nach 1 h hat sich der Wert halbiert ($P = 0,004$) und bleibt auch nach 4 h ($P = 0,012$) und 6 h ($P = 0,014$) signifikant tiefer. Im Vergleich zwischen der Gruppe der trainierten Tiere und der Kontrollgruppe ergeben sich somit 30 min und 6 h nach dem Versuch signifikante Unterschiede. Nach 30 min liegt bei den trainierten Tieren eine verminderte Acetylierung von H3K14 vor ($P = 0,018$). Beim Hochpunkt 6 h nach dem Versuch kehrt sich das Verhältnis um, hier ist die Konzentration von H3K14ac etwa doppelt so hoch wie in der Kontrollgruppe ($P < 0,0001$).

Bei den Tieren, mit denen das Training zu ZT14 durchgeführt wurde, fehlt dieses Maximum 6 h nach dem Versuch, die Werte bleiben an allen untersuchten Zeitpunkten annähernd gleich. Nur in der Kontrollgruppe treten signifikante Fluktuationen der Acetylierung von H3K14 auf. Wie nach dem Versuch am frühen Tag zeigt sich auch hier nach 30 min ein deutliches Maximum. Nach 1 h hat sich der Wert halbiert ($P = 0,042$) und fällt nach 4 h ($P = 0,007$) und 6 h ($P = 0,005$) weiter ab. Der Vergleich zwischen beiden Gruppen ergibt, dass der Maximalwert der Kontrollgruppe nach 30 min signifikant ($P = 0,023$) höher ist als der Wert aus der Gruppe der trainierten Tiere.

Die Mittelwerte von H3K14ac im Hippocampus der $MT_{1/2}^{-/-}$ -Tiere sind in Abb. 24 dargestellt. Anders als bei den Wildtypen findet sich hier nach dem zu ZT02 durchgeführten Training keine mit der Zeit nach dem Versuch zunehmende Acetylierung von H3K14, sondern eine stetig abfallende Konzentration, wie sie auch in den Kontrollgruppen beider Genotypen vorliegt. Der höchste Wert liegt 30 min nach dem Versuch vor, nach 4 h ist der Wert auf die Hälfte abgefallen ($P = 0,001$) und bleibt auch nach 6 h signifikant vermindert ($P = 0,002$). Auch gegenüber dem 1-h-Wert ist der Abfall nach 4 h ($P = 0,014$) und 6 h ($P = 0,029$) signifikant. In der Kontrollgruppe folgt der Verlauf der Werte einer ähnlichen Dynamik. Nach 30 min und 1 h liegen hohe Werte vor, nach

4 h ($P = 0,027$) und nach 6 h ($P = 0,018$) findet sich eine signifikante Verminderung gegenüber dem Wert nach 1 h. Vergleicht man Maze- und Kontrollgruppe, so fallen zu keinem der untersuchten Zeitpunkte signifikante Unterschiede auf. Im Gegensatz zu C3H scheint das Training im Maze zu ZT02 bei den $MT_{1/2}^{-/-}$ -Tieren also keinen Einfluss auf die Acetylierung von H3K14 zu nehmen.

Wurde der Versuch mit den $MT_{1/2}^{-/-}$ -Tieren zu ZT14 durchgeführt, so verlaufen die Mittelwerte von H3K14ac sowohl bei trainierten Tieren als auch in der Kontrollgruppe ohne signifikante Schwankungen. Auch im Vergleich zwischen beiden Gruppen fallen keine Unterschiede auf.

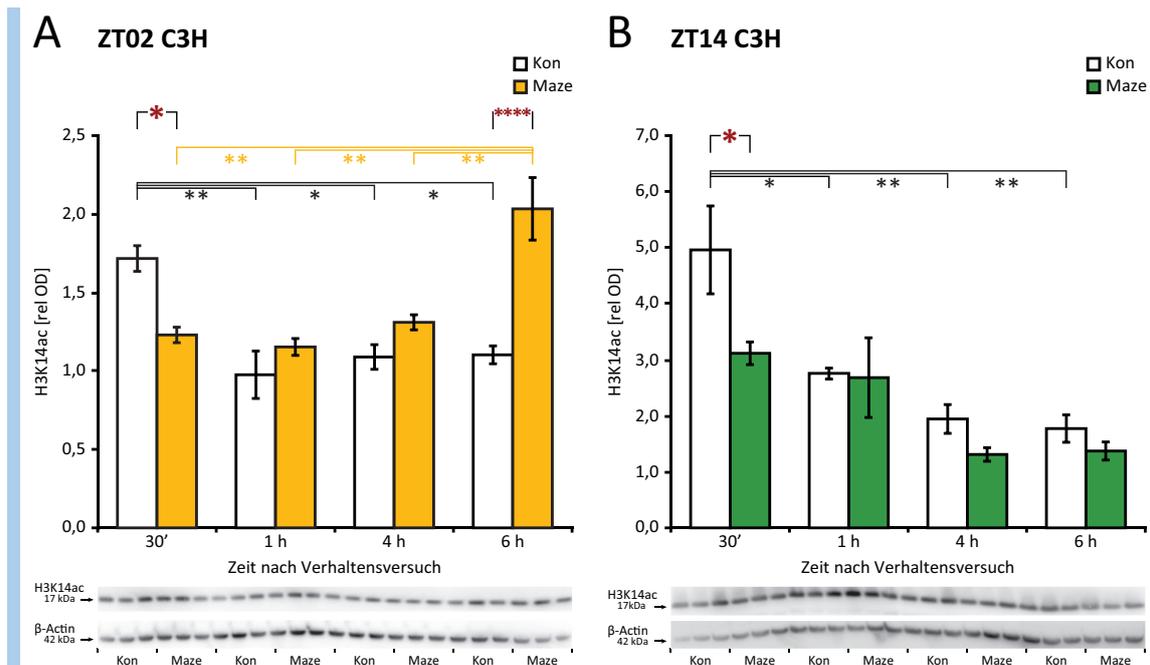


Abb. 23: H3K14ac im Hippocampus der C3H-Mäuse nach Training im Maze

Signifikanzen innerhalb jeder Gruppe (einfaktorielle ANOVA mit Bonferroni-Korrektur), verdeutlicht durch Klammern und *-Symbole (* $P \leq 0,05$; ** $P \leq 0,01$). Beachte die relative Achsenskalierung. Genaue Werte siehe Tab. 21. **A** ZT02: trainierte C3H-Tiere (Maze) ■; Kontrollgruppe (Kon) □. **B** ZT14: trainierte C3H-Tiere (Maze) ■; Kontrollgruppe (Kon) □. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SEM der relativen optischen Dichte (rel OD) der im Western Blot gefundenen und quantifizierten Banden.

Tab. 21: H3K14ac im Hippocampus der C3H-Mäuse nach Training im Maze

Dargestellt sind Mittelwerte \pm SEM der rel OD von H3K14ac im Western Blot sowie der erreichte Anteil am Maximalwert innerhalb der jeweiligen Trainings- (Maze) bzw. Kontrollgruppe (Kon). P -Werte und Signifikanzen der Vergleiche zwischen beiden Gruppen zu den einzelnen Zeitpunkten sind angegeben (zweifaktorielle ANOVA mit Bonferroni-Korrektur, *ns* $P > 0,5$; * $P \leq 0,05$; ** $P \leq 0,01$; *** $P \leq 0,001$; **** $P \leq 0,0001$).

	Zeitpunkt	Kon ($\bar{x} \pm \text{SEM}$)	%-Max	Maze ($\bar{x} \pm \text{SEM}$)	%-Max	P -Wert	
ZT02	30 min	1,717 \pm 0,082	100 %	1,230 \pm 0,049	60 %	0,018	*
	1 h	0,976 \pm 0,151	57 %	1,153 \pm 0,054	57 %	> 0,05	ns
	4 h	1,089 \pm 0,079	63 %	1,310 \pm 0,048	64 %	> 0,05	ns
	6 h	1,103 \pm 0,057	64 %	2,033 \pm 0,199	100 %	< 0,0001	****
ZT14	30 min	4,961 \pm 0,784	100 %	3,116 \pm 0,202	100 %	0,023	*
	1 h	2,758 \pm 0,098	56 %	2,681 \pm 0,711	86 %	> 0,05	ns
	4 h	1,943 \pm 0,257	39 %	1,310 \pm 0,121	42 %	> 0,05	ns
	6 h	1,772 \pm 0,245	36 %	1,372 \pm 0,162	44 %	> 0,05	ns

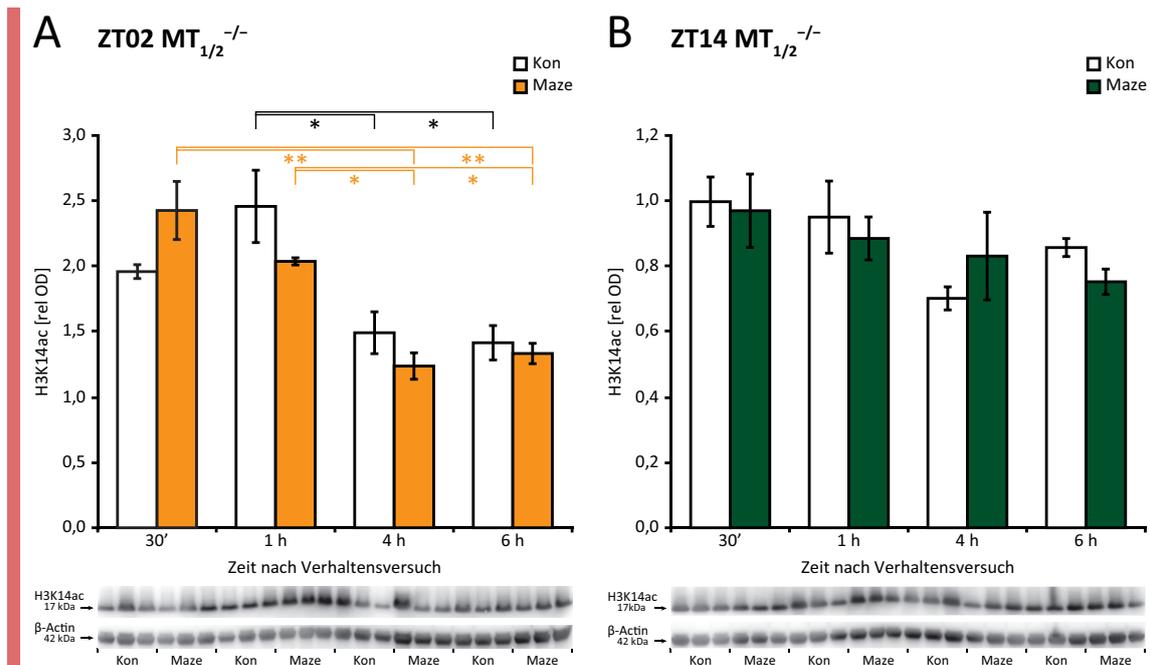


Abb. 24: H3K14ac im Hippocampus der $MT_{1/2}^{-/-}$ -Mäuse nach Training im Maze

Signifikanzen innerhalb jeder Gruppe (einfaktorielle ANOVA mit Bonferroni-Korrektur), verdeutlicht durch Klammern und *-Symbole (* $P \leq 0,05$; ** $P \leq 0,01$). Beachte die relative Achsenskalierung. Genaue Werte siehe Tab. 22. **A** ZT02: trainierte transgene $MT_{1/2}^{-/-}$ -Tiere (Maze) ■; Kontrollgruppe (Kon) □. **B** ZT14: trainierte $MT_{1/2}^{-/-}$ -Tiere (Maze) ■; Kontrollgruppe (Kon) □. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SEM der relativen optischen Dichte (rel OD) der im Western Blot gefundenen und quantifizierten Banden.

Tab. 22: H3K14ac im Hippocampus der $MT_{1/2}^{-/-}$ -Mäuse nach Training im Maze

Dargestellt sind Mittelwerte \pm SEM der rel OD von H3K14ac im Western Blot sowie der erreichte Anteil am Maximalwert innerhalb der jeweiligen Trainings- (Maze) bzw. Kontrollgruppe (Kon). P -Werte und Signifikanzen der Vergleiche zwischen beiden Gruppen zu den einzelnen Zeitpunkten sind angegeben (zweifaktorielle ANOVA mit Bonferroni-Korrektur, *ns* $P > 0,05$).

	Zeitpunkt	Kon ($\bar{x} \pm$ SEM)	%-Max	Maze ($\bar{x} \pm$ SEM)	%-Max	P -Wert	
ZT02	30 min	1,959 \pm 0,053	80 %	2,427 \pm 0,222	100 %	> 0,05	ns
	1 h	2,458 \pm 0,277	100 %	2,037 \pm 0,027	84 %	> 0,05	ns
	4 h	1,492 \pm 0,160	61 %	1,237 \pm 0,101	51	> 0,05	ns
	6 h	1,415 \pm 0,131	58 %	1,333 \pm 0,078	55 %	> 0,05	ns
ZT14	30 min	0,998 \pm 0,075	100 %	0,970 \pm 0,112	100 %	> 0,05	ns
	1 h	0,950 \pm 0,110	95 %	0,885 \pm 0,066	91 %	> 0,05	ns
	4 h	0,702 \pm 0,035	70 %	0,831 \pm 0,134	86 %	> 0,05	ns
	6 h	0,857 \pm 0,028	86 %	0,753 \pm 0,039	78 %	> 0,05	ns

3.2.2 h) H3K27me2

In Abb. 25 sind die Mittelwerte der rel OD von H3K27me2 im Hippocampus der C3H-Mäuse dargestellt. Nachdem der Mazeversuch zu ZT02 durchgeführt wurde, bleiben die Werte zunächst gleich, bis 6 h nach dem Versuch eine signifikante Erhöhung ($P = 0,034$) gegenüber 30 min erreicht wird. Auch in der Kontrollgruppe steigt der Gehalt an zweifach methyliertem H3K27 zu den späteren Untersuchungszeitpunkten hin an, erreicht aber schon nach 4 h ($P = 0,031$) einen signifikant höheren Wert als nach 30 min und bleibt nach 6 h ($P = 0,033$) hoch. Vergleicht man Maze- und Kontrollgruppe miteinander, finden sich aufgrund des ähnlichen Verlaufes der Werte keine signifikanten Unterschiede zwischen den beiden Gruppen.

Auch nach dem zu ZT14 durchgeführten Training im Maze zeigt sich eine ausgeprägte Dynamik der Werte von H3K27me2. Der initial hohe Wert 30 min nach dem Training hat sich nach 1 h bereits halbiert ($P = 0,034$) und ist nach 4 h ($P = 0,007$) weiter abgesunken auf das Minimum. Auch in der Kontrollgruppe liegt das Minimum 4 h nach dem Versuchszeitpunkt. Hier kommt es aber erst nach 4 h zu einem gegenüber 30 min ($P = 0,028$) und 1 h ($P = 0,010$) signifikanten Abfall von H3K27me2. Nach 6 h hingegen tritt bereits wieder ein gegenüber dem 4-h-Wert signifikanter ($P = 0,035$) Anstieg auf. Im Vergleich zwischen im Maze trainierten Tieren und Kontrollgruppe finden sich keine signifikanten Unterschiede.

Die Mittelwerte der rel OD von H3K27me2 bei den $MT_{1/2}^{-/-}$ -Tieren sind in Abb. 26 dargestellt. Nach dem zu ZT02 durchgeführten Versuch unterliegen die Werte einer ähnlichen Dynamik wie bei den Wildtypen. Es erfolgt nach 6 h ein Anstieg, der gegenüber dem Wert nach 1 h signifikant ($P = 0,028$) ist. In der Kontrollgruppe entsteht zunächst nach 1 h ein Minimum, das gegenüber 30 min ($P = 0,008$) und 4 h ($P = 0,042$) signifikant ist. Der späte Anstieg bleibt hier aus, sodass sich im Vergleich zwischen Maze- und Kontrollgruppe 6 h nach dem Versuch eine signifikante ($P = 0,015$) Erhöhung von H3K27me2 in der Mazegruppe ergibt. Wurde das Training zu ZT14 durchgeführt, lassen sich bei den $MT_{1/2}^{-/-}$ -Tieren keinerlei Schwankungen erkennen, die Werte bleiben auf einem gleichförmigen Niveau. In der korrespondierenden Kontrollgruppe liegt hingegen ein nach 30 min ein Maximum vor, von dem der Wert dann nach 1 h auf etwa ein Drittel abfällt ($P = 0,025$) und auch nach 4 h ($P = 0,031$) und 6 h ($P = 0,026$) signifikant vermindert bleibt. Im Vergleich zwischen beiden Gruppen fällt

auf, dass der Hochpunkt in der Kontrollgruppe 30 min nach dem Versuch bei den trainierten Tieren fehlt. Dieser Unterschied ist signifikant ($P = 0,010$).

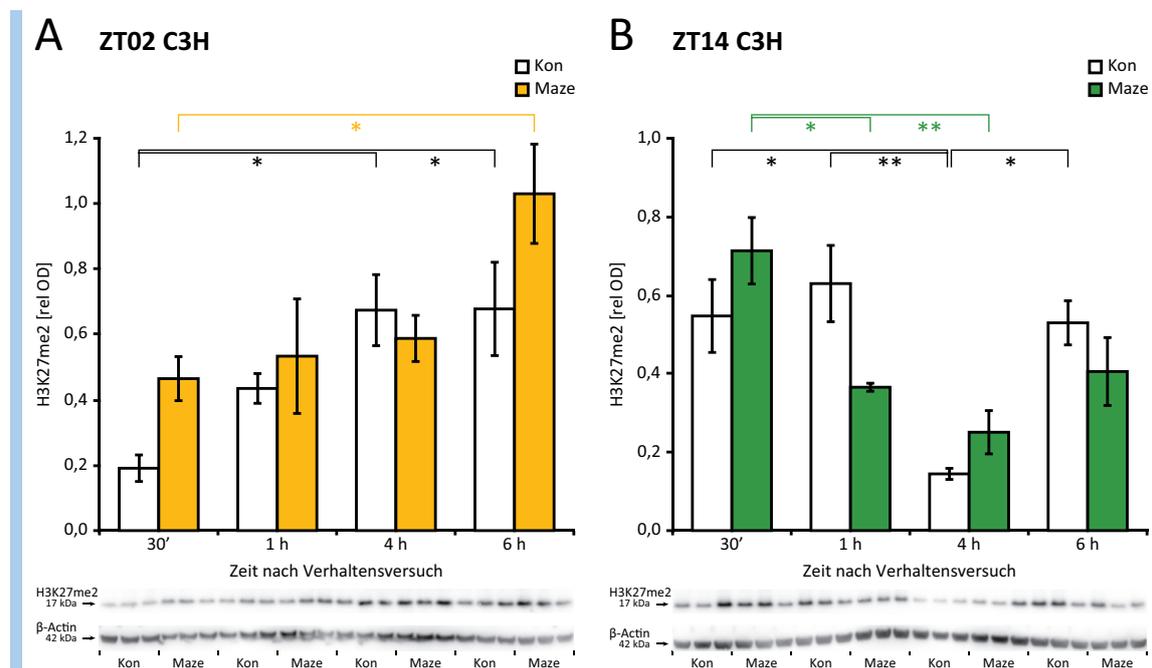


Abb. 25: H3K27me2 im Hippocampus der C3H-Mäuse nach Training im Maze

Signifikanzen innerhalb jeder Gruppe (einfaktorielle ANOVA mit Bonferroni-Korrektur), verdeutlicht durch Klammern und *-Symbole ($*P \leq 0,05$; $**P \leq 0,01$). Beachte die relative Achsenskalierung. Genaue Werte siehe Tab. 23: H3K27me2 im Hippocampus der C3H-Mäuse nach Training im Maze. **A** ZT02: trainierte C3H-Tiere (Maze) ■; Kontrollgruppe (Kon) □. **B** ZT14: trainierte C3H-Tiere (Maze) ■; Kontrollgruppe (Kon) □. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SEM der relativen optischen Dichte (rel OD) der im Western Blot gefundenen und quantifizierten Banden..

Tab. 23: H3K27me2 im Hippocampus der C3H-Mäuse nach Training im Maze

Dargestellt sind Mittelwerte \pm SEM der rel OD von H3K27me2 im Western Blot sowie der erreichte Anteil am Maximalwert innerhalb der jeweiligen Trainings- (Maze) bzw. Kontrollgruppe (Kon). P -Werte und Signifikanzen der Vergleiche zwischen beiden Gruppen zu den einzelnen Zeitpunkten sind angegeben (zweifaktorielle ANOVA mit Bonferroni-Korrektur, $ns P > 0,5$).

	Zeitpunkt	Kon ($\bar{x} \pm \text{SEM}$)	%-Max	Maze ($\bar{x} \pm \text{SEM}$)	%-Max	P -Wert	
ZT02	30 min	0,203 \pm 0,043	31 %	0,449 \pm 0,062	45 %	> 0,05	ns
	1 h	0,413 \pm 0,044	63 %	0,504 \pm 0,142	50 %	> 0,05	ns
	4 h	0,657 \pm 0,095	100 %	0,578 \pm 0,054	58 %	> 0,05	ns
	6 h	0,650 \pm 0,124	99 %	0,999 \pm 0,128	100 %	> 0,05	ns
ZT14	30 min	0,547 \pm 0,093	87 %	0,713 \pm 0,085	100 %	> 0,05	ns
	1 h	0,630 \pm 0,097	100 %	0,365 \pm 0,010	51 %	> 0,05	ns
	4 h	0,145 \pm 0,014	23 %	0,251 \pm 0,055	35 %	> 0,05	ns
	6 h	0,530 \pm 0,056	84 %	0,406 \pm 0,087	57 %	> 0,05	ns

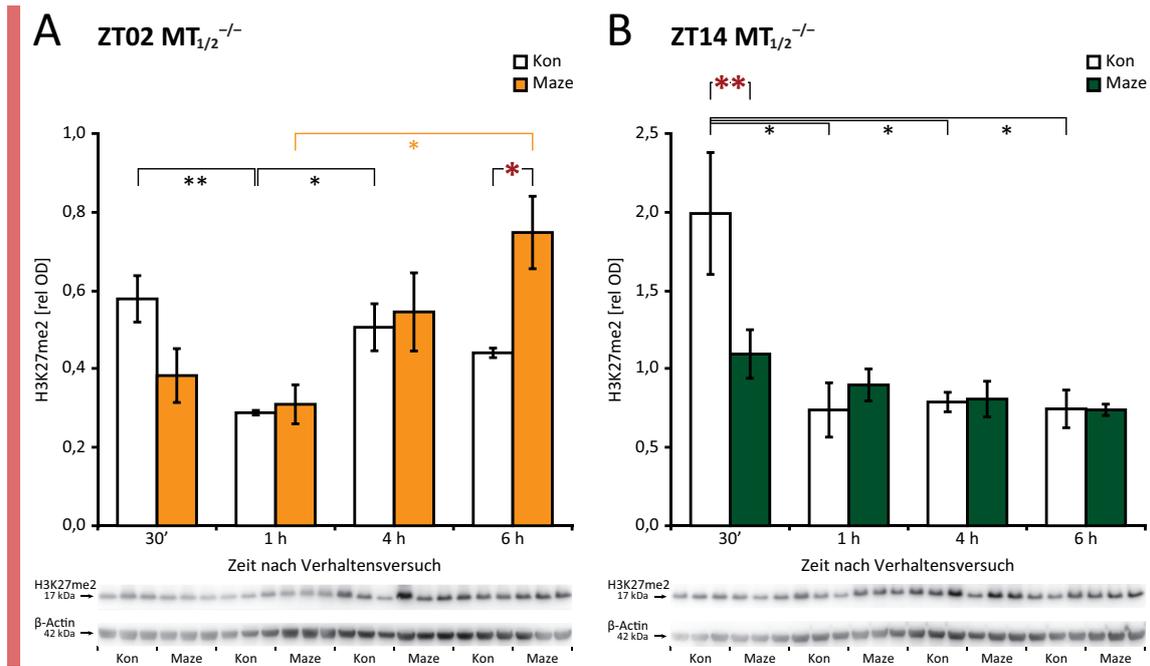


Abb. 26: H3K27me2 im Hippocampus der $MT_{1/2}^{-/-}$ -Mäuse nach Training im Maze

Signifikanzen innerhalb jeder Gruppe (einfaktorielle ANOVA mit Bonferroni-Korrektur), verdeutlicht durch Klammern und *-Symbole (* $P \leq 0,05$; ** $P \leq 0,01$). Beachte die relative Achsenskalierung. Genaue Werte siehe Tab. 24. **A** ZT02: trainierte transgene $MT_{1/2}^{-/-}$ -Tiere (Maze) ■; Kontrollgruppe (Kon) □. **B** ZT14: trainierte $MT_{1/2}^{-/-}$ -Tiere (Maze) ■; Kontrollgruppe (Kon) □. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SEM der relativen optischen Dichte (rel OD) der im Western Blot gefundenen und quantifizierten Bänder.

Tab. 24: H3K27me2 im Hippocampus der $MT_{1/2}^{-/-}$ -Mäuse nach Training im Maze

Dargestellt sind Mittelwerte \pm SEM der rel OD von H3K27me2 im Western Blot sowie der erreichte Anteil am Maximalwert innerhalb der jeweiligen Trainings- (Maze) bzw. Kontrollgruppe (Kon). P -Werte und Signifikanzen der Vergleiche zwischen beiden Gruppen zu den einzelnen Zeitpunkten sind angegeben (zweifaktorielle ANOVA mit Bonferroni-Korrektur, *ns* $P > 0,5$; * $P \leq 0,05$; ** $P \leq 0,01$).

	Zeitpunkt	Kon ($\bar{x} \pm \text{SEM}$)	%-Max	Maze ($\bar{x} \pm \text{SEM}$)	%-Max	P -Wert	
ZT02	30 min	0,578 \pm 0,059	100 %	0,383 \pm 0,069	51 %	> 0,05	ns
	1 h	0,288 \pm 0,006	50 %	0,310 \pm 0,050	41 %	> 0,05	ns
	4 h	0,506 \pm 0,060	87 %	0,545 \pm 0,100	73 %	> 0,05	ns
	6 h	0,441 \pm 0,012	76 %	0,748 \pm 0,092	100 %	0,015	*
ZT14	30 min	1,990 \pm 0,389	100 %	1,095 \pm 0,155	100 %	0,010	**
	1 h	0,738 \pm 0,173	37 %	0,898 \pm 0,102	82 %	> 0,05	ns
	4 h	0,789 \pm 0,062	40 %	0,807 \pm 0,114	74 %	> 0,05	ns
	6 h	0,745 \pm 0,120	37 %	0,739 \pm 0,036	67 %	> 0,05	ns

4. Diskussion

4.1 Übersicht

Der Hippocampus stellt eine zentrale Struktur zur Bildung von dauerhaften Erinnerungen des deklarativen Gedächtnisses dar. Erlernen neuer Informationen führt im Hippocampus zur nachweisbaren Aktivierung einer Reihe von Signalwegen, die zur Aktivierung von Proteinbiosynthese und zellulären Auf- und Umbauvorgängen – der sogenannten synaptischen Plastizität. Neuronale Verbindungen werden gestärkt, um ein dauerhaftes Langzeitgedächtnis zu bilden.

Lernvorgänge und ihr Erfolg sind sehr stark von der Tageszeit und einer intakten inneren Uhr abhängig.²²⁵ Um die molekularen Prozesse dieser Vorgänge im Hippocampus zu erforschen, wurden für die vorliegende Arbeit zunächst mit Mäusen verschiedener genetischer Hintergründe Verhaltensversuche durchgeführt. Im *Radial Arm Maze*, einem gut etablierten Versuchsparadigma für räumliches, hippocampusabhängiges Lernen,²⁰⁰ mussten die Tiere lernen, alle Futterbelohnungen zu finden. Anschließend wurde zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach dem Training Hippocampusgewebe der Versuchstiere entnommen. Im Labor wurde dieses biochemisch untersucht, um die zeitliche Dynamik der Signaltransduktion und einiger ihrer Zielmoleküle sowie mit synaptischer Plastizität assoziierter Histonmodifikationen in der Zeit bis zu einigen Stunden nach dem Lernen zu beleuchten.

Da hormonelle Wirkungen von Melatonin, dem Hormon des Pinealorgans, auf Gedächtnisprozesse vielfach belegt und Inhalt umfassender Forschungstätigkeit sind,^{181,184,192,193,226} sollte dessen Einfluss auf Gedächtnisengrammierung, wichtige Signalwege und auf ausgesuchte Chromatinmodifikationen untersucht werden. Melatonin gilt als das Hormon der Dunkelheit²²⁷ und hat einen hemmenden Einfluss unter anderem auf den Lernerfolg und dessen elektrophysiologisches Korrelat LTP. Die Blockade seiner Wirkung hebt diese Hemmung auf.^{181,192,228} Deshalb wurden für die hier vorgestellten Untersuchungen die an Wildtypmäusen erhobenen Befunde verglichen mit transgenen Tieren mit einem Knockout beider bekannter G-Protein-gekoppelter Membranrezeptoren für das Hormon Melatonin.

Es konnte gezeigt werden, dass in einigen der untersuchten Stationen des Signalweges je nach Tageszeit mitunter deutlich verschiedene, zum Teil gegensätzliche Reaktionen in den untersuchten Signalmolekülen auf den Lernstimulus zwischen den beiden untersuchten Tiergruppen zu beobachten waren.

Im nachstehenden Abschnitt werden zunächst die molekularbiologischen Erkenntnisse zu den verschiedenen Signaltransduktionswegen besprochen. Im Anschluss daran erfolgt die Diskussion des Einflusses des Hormons Melatonin auf diese Vorgänge. Abschließend folgen einige Betrachtungen über begleitende Beobachtungen aus den durchgeführten Verhaltensversuchen sowie ein kurzer Ausblick.

4.2 Signaltransduktion über pCREB ins Genom

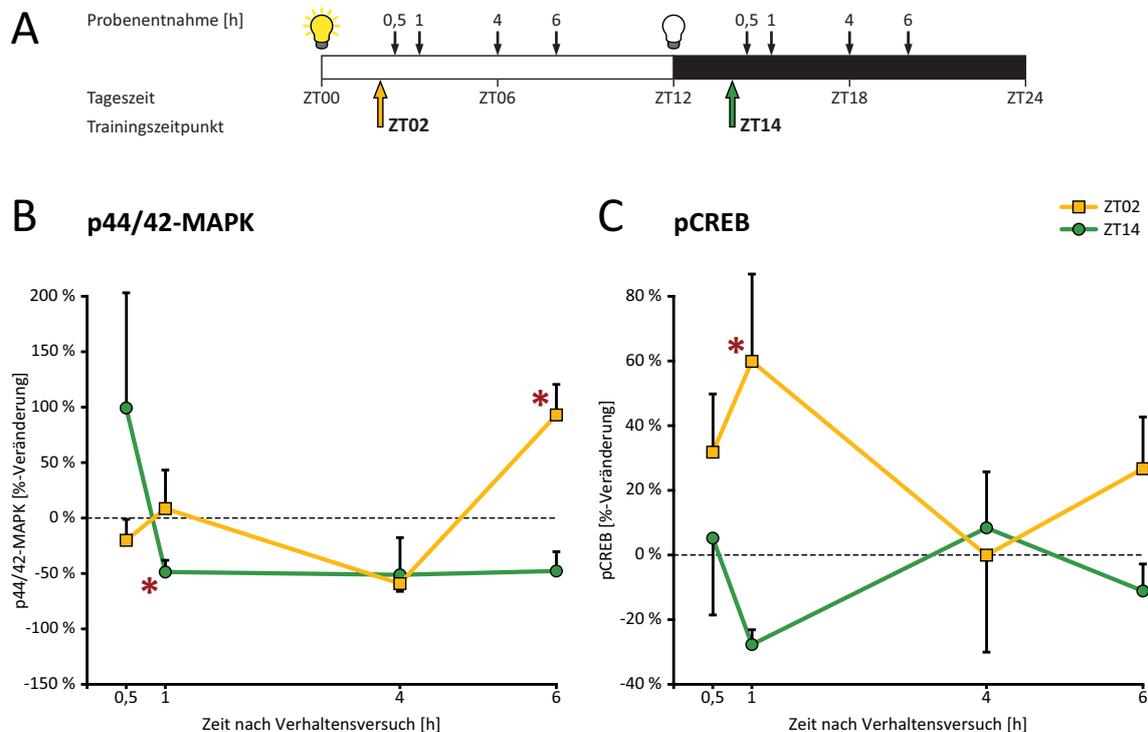


Abb. 27: Durch Lernen im *Radial Arm Maze* induzierte Phosphorylierung von MAPK und CREB in C3H-Mäusen

A Schematisiertes Versuchsdesign mit Zeitpunkten des Training sowie der Probenpräparation. **B** Phosphorylierung von MAPK. Hemmung der Phosphorylierung nach Training während der Nacht, tagsüber fehlt diese Hemmung, nach 6 h schließlich Induktion von pMAPK. **C** Die Induktion von pCREB nach Training am Tag bleibt nachts aus. Dargestellt ist die prozentuale Änderung gegenüber der jeweiligen Kontrollgruppe, Mittelwerte \pm SEM, * $P \leq 0,05$, zweifaktorielle ANOVA mit Bonferroni-Korrektur. ZT02 \square ; ZT14 \bullet . Beachte die relative Achsenskalierung.

Der Transkriptionsfaktor CREB gilt als zentraler Dreh- und Angelpunkt in der Regulation hippocampaler synaptischer Plastizität.⁴³ Sein Vorliegen in der aktiven, phosphory-

lierten Form (pCREB) und die zeitlich davor daran beteiligten Moleküle cAMP und pMAPK unterliegen im Hippocampus einem eigenen circadianen Rhythmus mit jeweiligem Hochpunkt am frühen Tag.^{42,186} Dieser Rhythmus ist SCN-abhängig, Störungen können sich drastisch auf das Gedächtnis auswirken.^{186,229} Auch die epigenetischen Ereignisse des Chromatinremodelling erfolgen im Hippocampus rhythmisch.⁴² Während der Gesamtgehalt an Histonen konstant bleibt, zeigen einige Histonmodifikationen (u.a. H3K14ac, H3K9me2 und -3, H3K27me3, nicht aber H3K27me2) sowie die Histon-deacetylase Sirtuin 1 (SIRT1) eine von der Tageszeit abhängige Rhythmik⁴² (Abb. 30). Dieser Rhythmus steht offenbar im direkten Zusammenhang mit der allgemeinen, sowohl bei Vertebraten als auch bei Invertebraten für verschiedene Arten des Lernens gut dokumentierten besseren Lernleistung während des subjektiven Tages.^{186,190–192} Es konnte gezeigt werden, dass erhöhte pCREB- und pMAPK-Spiegel und bessere Lernleistung zeitlich miteinander korrelieren.⁴² In Übereinstimmung hiermit fand sich bei den Mäusen des Stammes C3H nur nach dem Training während des Tages ein signifikanter transients Anstieg von pCREB im Hippocampus. Dieser ließ sich 1 h nach dem Training nachweisen, war aber bereits nach 4 h schon wieder verschwunden (Abb. 27C). Auch die Acetylierungen von Histon H3 an Lysin 9 und Lysin 14 ließen sich nur durch Training am Tag induzieren (Abb. 28A und B), und zwar zeitlich etwas versetzt nach dem Anstieg von pCREB, also passend zu ihrer nachgeschalteten Position in der intrazellulären Signalübertragung. Bemerkenswerterweise trat keiner dieser Effekte nach Training während der Nacht auf. Passend dazu kann auch *in vitro* durch pharmakologische Stimulation des cAMP-Signalwegs mit Forskolin in akuten Hippocampus-Schnitten nur in tagsüber präparierten Schnitten eine Induktion von H3K14ac erreicht werden.⁴²

Lernen im Sinne von Konditionierung geht mit verstärkter Acetylierung von Histon H3 im Hippocampus einher, pharmakologische Stimulation der Acetylierung bzw. Inhibition der Deacetylierung führen zu verbesserter LTP *in vitro* bzw. LTM *in vivo*.⁵⁰ H3K9ac und H3K14ac sind beide als aktivierend für die Genexpression gut beschrieben.^{50,230} Ihre Hochregulation kann als Ausdruck der verstärkten Transkriptionsaktivität im Rahmen synaptischer Anpassungsvorgänge angesehen werden und ist auch nach wiederholter Durchführung des Trainings an mehreren aufeinanderfolgenden Tagen stabil nachweisbar.⁴² Bei der die Transkription hemmenden Dimethylierung von H3K27 hingegen konnten zu keiner Tageszeit Veränderungen durch das Training hervorgerufen

werden. Es konnte hier also gezeigt werden, dass als Ausdruck des Erlernens neuer Informationen transiente Veränderungen im Hippocampus hervorgerufen werden, die in dauerhafte Anpassung münden. Dies war jedoch nur während des Tages der Fall, was sich wiederum im Phänotyp als ein tagsüber besserer Lernerfolg widerspiegelt.

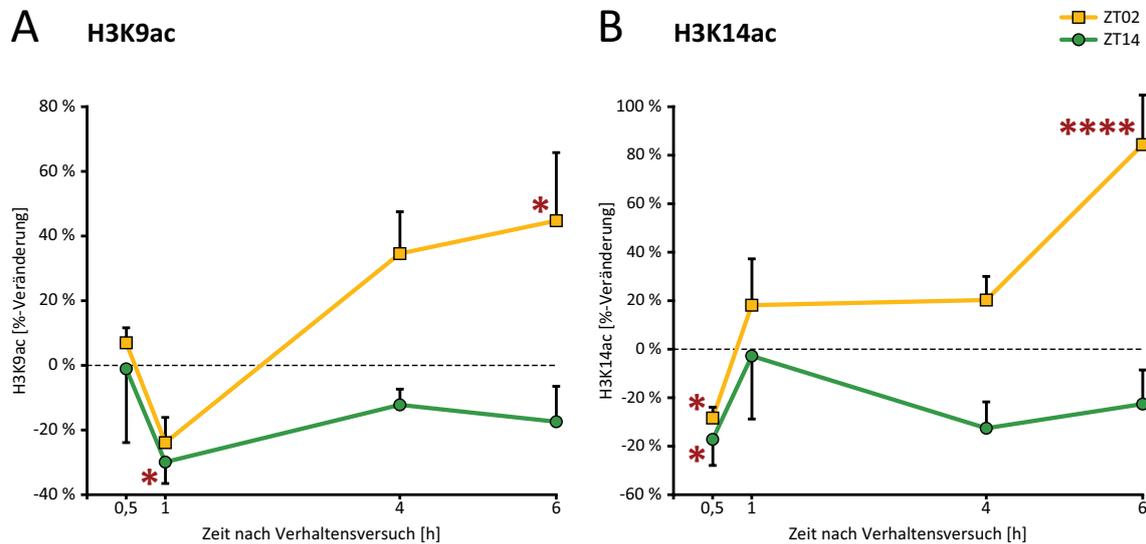


Abb. 28: Acetylierung von H3K9 und H3K14 sind bei C3H tagsüber durch Lernen induzierbar

Die Induktion plastizitätsassoziierter aktivierender Histonmodifikationen ist tageszeitabhängig. Nur während des Tages (ZT02 ■) zeigen sich nach dem Training **A** H3K9ac und **B** H3K14ac im Hippocampus erhöht (Prozentuale Veränderung gegenüber der jeweiligen Kontrollgruppe, Mittelwerte \pm SEM, * $P \leq 0,05$; ** $P \leq 0,01$; *** $P \leq 0,001$; **** $P \leq 0,0001$, zweifaktorielle ANOVA mit Bonferroni-Korrektur). Training während der Nacht (ZT14 ●) ruft keine Induktion der Acetylierung hervor. Trainings- und Präparationszeitpunkte siehe Abb. 27. Beachte die relative Achsenskalierung.

Weniger eindeutig sind die Ergebnisse bei den zeitlich früher stattfindenden Abschnitten der Signalkaskade. Auch hier finden sich unterschiedliche Reaktionen je nach Trainingszeitpunkt. Jedoch tritt nach dem in der Nacht durchgeführten Training eine Hemmung der Signalübertragung im Vergleich zur Kontrollgruppe auf, erkennbar an der verringerten Menge an pMAPK sowie phosphorylierten Substraten der PKA. Vor allem pMAPK zeigt deutliche zeitliche Schwankungen (Abb. 17), wie sie schon früher beschrieben wurden.¹⁸⁶ Der Hochpunkt der MAPK-Phosphorylierung ist am frühen Tag zu ZT02⁴² bis ZT08¹⁸⁶ beschrieben, während hier der höchste Wert zu ZT15 gemessen wurde. Allerdings waren zuvor nur Proben in vierstündigen Abständen untersucht worden, sodass möglicherweise ein kurzes zweites Maximum zu ZT15 nicht erkannt wurde. Nach beiden Versuchszeitpunkten sind diese basalen Schwankungen der Phosphorylierung der MAPK teils überdeckt, nachts zeigt sich dies in einer Hemmung der Kaskade und eines abgeflachten pMAPK-Rhythmus. Tagsüber fehlt diese Hemmung, und 6 h

nach dem Training kommt es dann schließlich zur Induktion von pMAPK (Abb. 27B). Letztlich lassen sich auch diese Befunde im Sinne einer verstärkten Signalübertragung in zeitlicher Korrelation mit der tagsüber verbesserten Formierung des Langzeitgedächtnisses verstehen. Die verstärkte Phosphorylierung von MAPK tritt zu einem Zeitpunkt auf, an dem die CREB-Phosphorylierung schon wieder abnimmt. Deren Aktivierung muss also noch auf einem weiteren Weg erfolgen. Hier kommt die CaMKIV infrage, die ebenso durch Ca^{2+} -Influx nach Stimulation des NMDA-Rezeptors aktiviert wird und CREB unabhängig von MAPK und PKA direkt phosphorylieren kann.⁵¹ Im Mausmodell konnte gezeigt werden, dass ein Knockout von CaMKIV die Stimulierbarkeit von CREB-Phosphorylierung und hippocampaler L-LTP erheblich verringert sowie mit Defiziten der Gedächtniskonsolidierung einhergeht.²³¹

Interessanterweise konnte bei der Aktivierung der CaMKII zu keinem Zeitpunkt ein messbarer Einfluss des Lernens im *Radial Arm Maze* nachgewiesen werden, auch fanden sich hier keine relevanten basalen Schwankungen in der Kontrollgruppe. CaMKII spielt vor allem bei E-LTP und insbesondere bei der Phosphorylierung der AMPA-Rezeptoren an der postsynaptischen Membran eine Rolle.^{32,33} Die Reizweiterleitung zum Zellkern und damit zur Induktion von L-LTP erfolgt nach der ersten Trainingseinheit vermutlich vorwiegend über andere Signalwege. Da der in dieser Art durchgeführte Versuch außerdem neben dem räumlichen Lernen auch trotz der vorangehenden Habituationsphase eine Komponente der erstmaligen Exposition gegenüber einer neuen Umgebungssituation enthält, bleibt zu klären, ob es nach Auseinandersetzung mit wiederholten, gleichbleibenden Trainingseinheiten zur Nutzung auch der CaMKII kommt, zumal eine essentielle Abhängigkeit eines stabilen Langzeitgedächtnisses von CaMKII beschrieben ist: Wird ihre Aktivierung durch Autophosphorylierung unterdrückt, resultiert dies in beeinträchtigtem Gedächtnis, Überexpression führt zu verbesserter Performance.³¹

Die vermutete Verbindung zwischen rhythmischer CREB-Phosphorylierung und Gedächtniskonsolidierung und -unterhaltung wird eindrucksvoll weiter untermauert durch Erkenntnisse aus Versuchen mit Mäusen mit Knockout des Uhrgenes PER1 (*Per1^{-/-}*). In diesen geht der hippocampale pCREB-Rhythmus verloren, ebenso wie die tagsüber im Vergleich zu nachts bessere Gedächtnisleistung verschwindet.^{42,185} Auch die Rhythmen des Chromatinremodellings und der basalen Genexpression im Hippo-

campus sind bei *Per1*^{-/-}-Mäusen drastisch verschoben. Die Induktion von H3K14ac durch Lernen blieb aus, ebenso zeigten *Per1*^{-/-}-Tiere eingeschränkte LTP im *Gyrus dentatus*.⁴² Weiterhin konnte auch in *Drosophila melanogaster* beobachtet werden, dass *Per*-Mutanten erheblich schlechtere Lernerfolge zeigen als Wildtyp-Fliegen.²³² Dies belegt, dass Mechanismen der Wechselwirkung zwischen dem circadianen System und dem Langzeitgedächtnis evolutionär über viele hundert Millionen Jahre konserviert sind.

Die Fähigkeit, transiente Stimuli in langandauernde Anpassung der Signalübertragung und des resultierenden Verhaltens umzusetzen, ist entscheidend für die erfolgreiche Anpassung an eine sich wandelnde Umwelt. Wiederkehrende, evolutionär entweder lohnenswerte oder bedrohliche Situationen machen ein effizientes Zeitsystem, das antizipatorisch reagiert, und entsprechende molekulare Mechanismen, welche Informationen über die Zeit wirksam mit Erlerntem verknüpfen, notwendig. Vor dem Hintergrund endogener Rhythmen des Hippocampus – sowohl in der Expression von pCREB und weiterer Komponenten der cAMP-Signaltransduktion¹⁸⁶ als auch bei plastizitätsassoziierten Histonmodifikationen⁴² – sowie des Einflusses von Uhrengenen auf Lernprozesse könnte hierin ein Mechanismus bestehen, um täglich wiederkehrende relevante Ereignisse vorausszusehen, während gleichzeitig eine Abschirmung des Hintergrundrauschens erzielt wird. Es bedarf weiterer Studien, um die komplexen molekularen Wechselwirkungen zwischen den Kernkomponenten der inneren Uhr und dem Lernen zu analysieren und unser Verständnis der spezies- und taxonübergreifenden tageszeitabhängigen Schwankungen der Gedächtnisleistung²²⁵ zu erweitern.

4.3 Melatonin – Modulator der molekularen Korrelate des Lernens

Nicht nur über die Kernkomponenten der molekularen Uhr wie PER1 übt das circadiane System seinen Einfluss auf Gedächtnisprozesse aus. Das Hormon Melatonin, integraler Bestandteil des körpereigenen Zeitsystems, kann die Gedächtniskonsolidierung¹⁹² ebenso wie die Induktion von LTP im Hippocampus¹⁸¹ wirksam unterdrücken und so die Lernleistung in der Nacht mindern. Im Zebrafisch und in Mäusen konnte gezeigt werden, dass die Blockade der Melatoninwirkung auf unterschiedlichen Wegen dies aufhebt.^{181,192}

Die hier durchgeführten Experimente zeigen, dass der Knockout beider Membranrezeptoren für Melatonin jedoch keineswegs durchweg zum Angleichen der nächtlichen Ergebnisse an die während des Tages erzielten Lernleistungen führt. Lerntraining induziert bei Wildtypmäusen PKA und PKC, teilweise kommt es auch zu Hemmungen. Es scheint, dass hier weitere Stimuli an der Signalübertragung zu pCREB beteiligt sein müssen. Es ist bekannt, dass Melatonin hemmend auf AC und PKA und stimulierend auf PKC²³³ wirken kann. Hemmung von PKA führt zu eingeschränkter Gedächtnisleistung.²³⁴ Im Wildtyp zeigt sich nachts nach einem Gedächtnistraining eine Reduktion in der Aktivität der PKA, die tagsüber, wenn kein Melatonin synthetisiert wird, fehlt. In $MT_{1/2}^{-/-}$ -Mäusen verschwindet dieser von der Tageszeit abhängige Effekt erwartungsgemäß. Die PKC wird im Wildtyp tagsüber kurz nach dem Training gehemmt. Nachts fehlt diese Hemmung, was möglicherweise zurückzuführen ist auf eine zusätzliche Stimulation von PKC durch Melatonin. Mit dem Verlust der Melatoninrezeptoren geht in $MT_{1/2}^{-/-}$ -Mäusen auch dieser Effekt verloren, die trainingsbedingte Dynamik in der PKC-Regulation gleicht sich nachts und tagsüber (Abb. 29A).

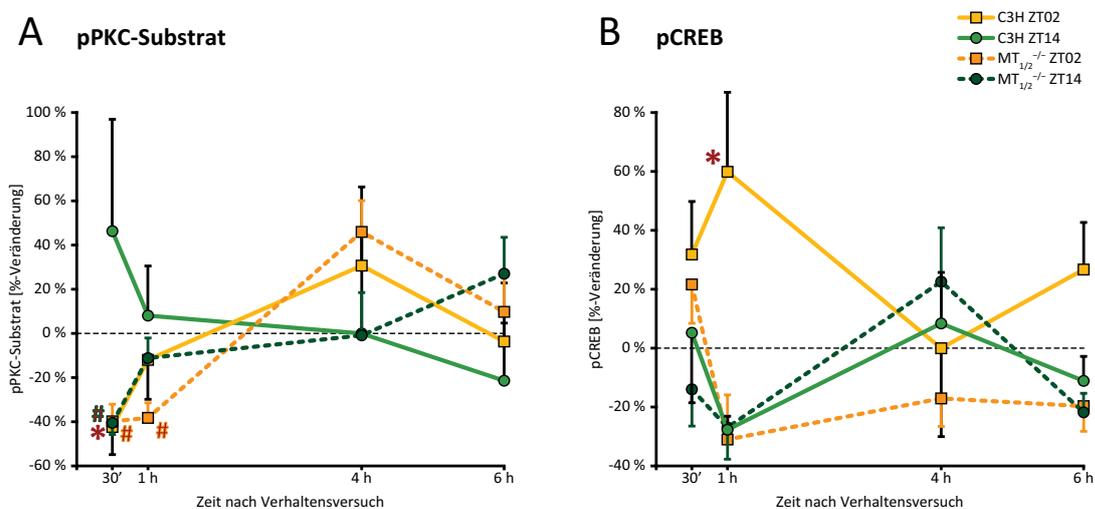


Abb. 29: Aktivität von PKC und pCREB im Vergleich zwischen C3H und $MT_{1/2}^{-/-}$

A Die nächtliche Unterdrückung der Hemmung von PKC beim Vorhandensein von Melatonin im Wildtyp (ZT14 —) ist ohne Rezeptoren aufgehoben (ZT14 - -). Bei $MT_{1/2}^{-/-}$ kommt es in der Nacht genau wie tagsüber (ZT02 - -) zur gleichen Hemmung von PKC, der Verlauf beider Kurven entspricht der Kurve von C3H tagsüber (ZT02 —). **B** Die Induktion von pCREB kurze Zeit nach dem Training von C3H am Tag bleibt bei $MT_{1/2}^{-/-}$ aus. Dargestellt ist die prozentuale Veränderung gegenüber der jeweiligen Kontrollgruppe, Mittelwerte \pm SEM, * (C3H) bzw. # ($MT_{1/2}^{-/-}$) $P \leq 0,05$, zweifaktorielle ANOVA mit Bonferroni-Korrektur. Trainings- und Präparationszeitpunkte Abb. 27. Beachte die relative Achsen-skalierung.

Bei der Dynamik der nachgeschalteten zentralen Elemente der Signaltransduktionskaskade pCREB und MAPK jedoch zeigt sich ein entgegengesetztes Bild: Anstatt einer gesteigerten Induktion in der Nacht – wie sie im Licht der beschriebenen verbesserten Lernleistung nach Ausschalten von Melatonin zu erwarten wäre – erfolgt hier auch nach Training am Tag keine messbare Zunahme von pCREB, es kommt im Gegenteil sogar zu seiner Repression (Abb. 29B). Auch der Anstieg der MAPK-Phosphorylierung bleibt aus. Interessanterweise lässt sich dasselbe ebenso für die Histonacetylierungen H3K9ac und H3K14ac beobachten, auch hier kann keine Induktion mehr erreicht werden. Während H3K14ac in WT-Mäusen einen stabilen circadianen Rhythmus mit Höhepunkt zu Beginn der Dunkelphase zeigt,⁴² scheint dieser Rhythmus bei $MT_{1/2}^{-/-}$ -Tieren nicht zu bestehen (Abb. 24, Abb. 30B). Eine vermehrte Phosphorylierung von MAPK und CREB *in vitro* unter direktem Melatonineinfluss ist beschrieben worden²³⁵ und bietet unter Umständen einen Ansatzpunkt zur Erklärung dieses scheinbaren Widerspruches. Weiterhin besteht Anhalt auf eine direkte Interaktion von Melatonin mit CaM/CamKII.²³⁶ CaMKII zeigt in den hier durchgeführten Versuchen unabhängig von Zeit und Genotyp eine stabile gleichförmige Aktivität ohne erkennbaren Einfluss des Trainings. Lediglich scheint bei $MT_{1/2}^{-/-}$ -Tieren eine gewisse Eigenrhythmik neu aufzutreten, die aber auch vom Lernstimulus unbeeinflusst bleibt.

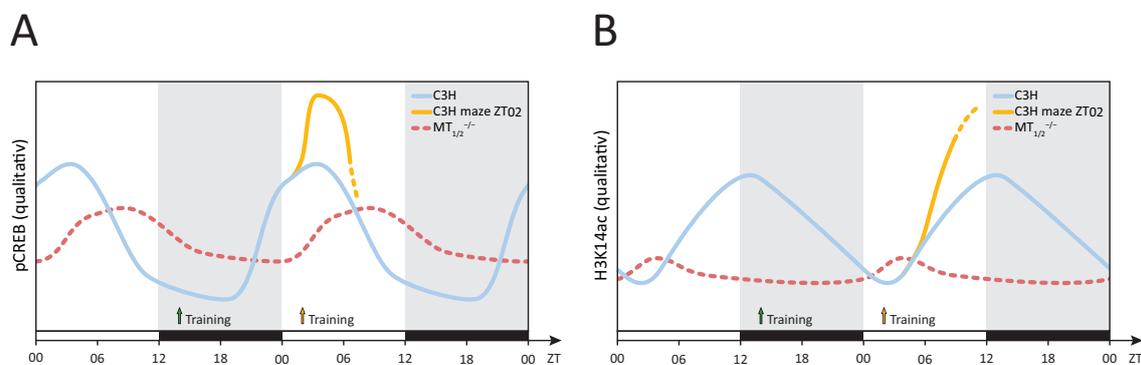


Abb. 30: Hippocampale Rhythmik von pCREB und H3K14ac

Qualitative Darstellung des endogenen hippocampalen Rhythmus von **A** pCREB und **B** H3K14ac in C3H-^{42,237} (—) und $MT_{1/2}^{-/-}$ -Mäusen²³⁷ (Abb. 20, Abb. 24) (---). Beide endogenen Rhythmen sind bei $MT_{1/2}^{-/-}$ -Mäusen abgeflacht und phasenverschoben. Außerdem dargestellt ist die Induktion durch das Training der C3H-Tiere im Maze zu ZT02 (—). Durch Training zu ZT14 war bei C3H keine Induktion möglich, bei $MT_{1/2}^{-/-}$ -Mäusen zu keinem Zeitpunkt.

Melatoninrezeptorantagonisten verbessern zumindest im Zebrafisch die nächtliche Lernleistung.¹⁹² Bei Ratten führen Melatonininjektionen am Tag zu einem verbesserten Gedächtnis, in der Nacht hingegen zu Beeinträchtigungen der Lernleistung.²³⁸ Bei den

natürlicherweise melatonindefizienten C57BL/6-Mäusen,²⁰⁹ die tagsüber nicht besser als nachts lernen,²³⁷ führt eine Gabe von Melatonin in der Nacht im Sinne der Wiederherstellung des natürlichen Melatoninrhythmus zum selben Lernphänotyp wie bei C3H-Mäusen.²³⁷ Die ohne die Melatoninrezeptoren fehlende Induzierbarkeit von pCREB und pMAPK sowie des Chromatinremodellings stellt nur scheinbar einen Widerspruch hierzu dar, denn sie deckt sich durchaus mit den phänotypischen Beobachtungen, nach denen $MT_{1/2}^{-/-}$ -Tiere keinen Unterschied im Erfolg des räumlichen Lernens und der Induktion von LTP zwischen Tag und Nacht zeigen.^{226,239} Es ergibt sich bei den $MT_{1/2}^{-/-}$ -Mäusen aber keine Verbesserung des nächtlichen Lernergebnisses auf das tagsüber erzielte Ergebnis wie bei der akuten Blockade der Melatoninrezeptoren,^{181,192} sondern eher ein Angleichen des tagsüber erzielten Ergebnisses an das nächtliche.²²⁶ Dies muss also auf komplexerem Weg zustande kommen als durch bloßes Fehlen des Melatoninrezeptorsignals in der Nacht, es muss ein langanhaltender Effekt vorhanden sein, der durch das vollständige Fehlen der Rezeptoren verhindert wird.

Zwar werden in einem anderen Lernparadigma (hier im *Barnes Maze*) für den Genotyp $MT_{1/2}^{-/-}$ von O'Neal-Moffitt auch eine im Vergleich zu C3H verbesserte Lernleistung und eine verbesserte LTP beschrieben,²³⁹ während der Knockout nur des MT_2 alleine zu schlechteren Ergebnissen in beiden Parametern führt.¹⁹⁷ O'Neal-Moffitt beschreibt auch erhöhte hippocampale pCREB-Level (in Bezug auf Gesamt-CREB) bei $MT_{1/2}^{-/-}$ -Mäusen und leitet daraus verbesserte pCREB-basierte Signalübertragung als Grundlage eines verbesserten Lernvermögens bei $MT_{1/2}^{-/-}$ -Mäusen ab. Die fehlende Induktion von pCREB könnte also auch durch ein bereits konstitutiv zugunsten von pCREB verschobenes Gleichgewicht CREB/pCREB bedingt sein. Allerdings wurden von O'Neal-Moffitt die Verhaltenstests nachts durchgeführt, während die Proben für den pCREB-Nachweis am frühen Tag gewonnen wurden. Eine kausale Verbindung zwischen beidem bleibt also spekulativ, zumal nicht auf den endogenen hippocampalen Rhythmus von pCREB¹⁸⁶ eingegangen wird, an dessen Hochpunkt der pCREB-Nachweis erfolgte. Dieser Rhythmus ist in $MT_{1/2}^{-/-}$ -Mäusen deutlich phasenverschoben und mit abgeschwächter Amplitude ausgeprägt (vgl. Abb. 30), ebenso verschiebt sich auch die rhythmische Uhrengenenexpression im Hippocampus im Vergleich zu Wildtypmäusen fundamental.²²⁶

Beide Membranrezeptoren des Melatonins haben über inhibitorische G-Proteine hemmende Wirkung auf die Bildung von cAMP¹⁷² und folglich den Gehalt von pCREB. In Zellen der *Pars tuberalis* der Adenohypophyse führt längerfristige Einwirkung von Melatonin (>4 h) jedoch auch zu einer Sensibilisierung der Adenylatcyclase.²⁴⁰ Ein vergleichbarer AC-sensibilisierender Effekt im Hippocampus wäre demnach vereinbar mit dem hippocampalen pCREB-Rhythmus, dessen Maximum der maximalen Melatonsynthese um einige Stunden versetzt folgt,²²⁶ wenn die akute Inhibition nicht mehr vorliegt, aber die Sensibilisierung noch anhält. Dazu passt, dass der endogene hippocampale pCREB-Rhythmus bei den $MT_{1/2}^{-/-}$ -Mäusen nur noch mit signifikant abgeschwächter Amplitude phasenverzögert besteht.²³⁷ Gleichermäßen bietet diese mögliche Sensibilisierung einen Erklärungsansatz für die zur frühen Tageszeit am besten ausgeprägte Signaltransduktion und Lernleistung sowie die oben beschriebenen Veränderungen der Induzierbarkeit von pCREB und des Chromatinremodellings (Abb. 31). Offenbar ergibt sich daraus der Vorteil des schnelleren Lernens am Tag, für den die geringere Leistung während der Nacht Voraussetzung ist, oder der diese zumindest überwiegt.

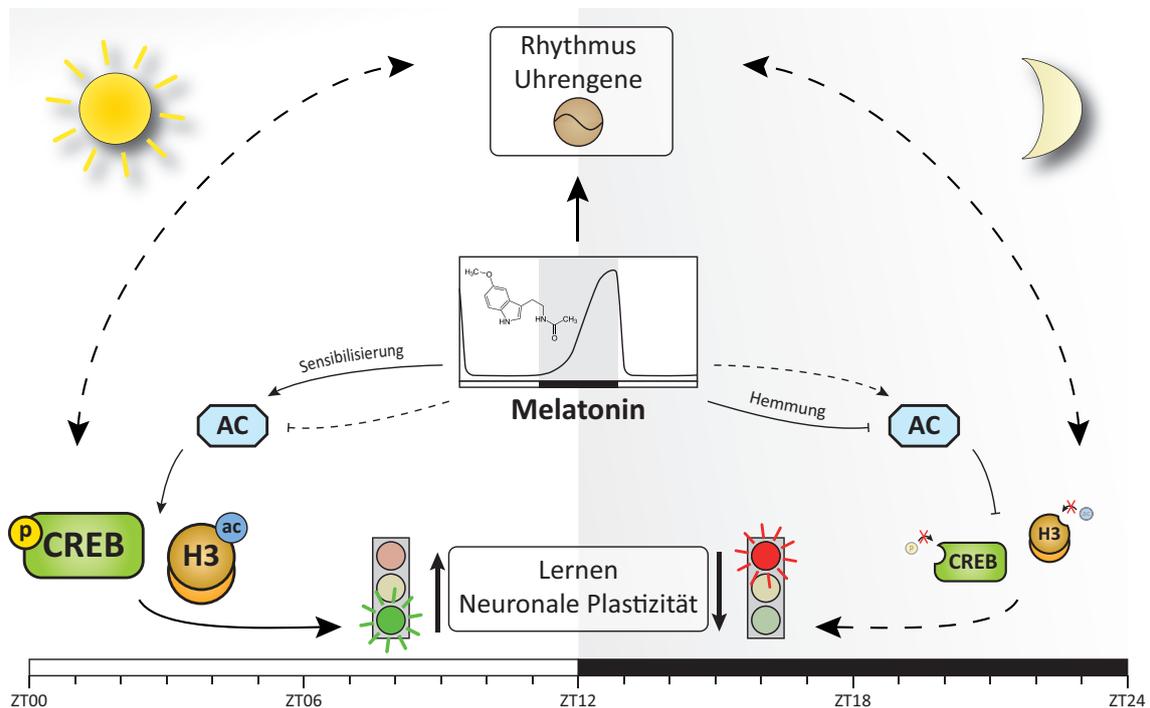


Abb. 31: Schematisches Erklärungsmodell des Melatonineinflusses auf das Lernen

In der Dunkelphase hemmt Melatonin die Signaltransduktion, während sie in der Hellphase durch die postulierte langfristige Sensibilisierung der Adenylatcyclase gebahnt wird und somit die bessere Lernleistung ermöglicht. Molekulare Komponenten der Gedächtnisformation sowie der inneren Uhr beeinflussen einander wechselseitig. *CREB* cAMP-responsive element binding protein; *H3* Histon H3; *AC* Adenylatcyclase. Abbildung modifiziert nach Jilg et al.²²⁶

Der genaue Mechanismus der abgeschwächten pCREB-Induktion und des verschwundenen Lernvorteil tagsüber bei den $MT_{1/2}^{-/-}$ -Tieren bleibt zwar noch nicht abschließend gesichert, liegt aber wohl im Zusammenspiel der beschriebenen Effekte. Melatonin wirkt also offenbar je nach Signalweg und Tageszeit unterschiedlich. Sowohl durch direkte rezeptorvermittelte Effekte als auch indirekt über Beeinflussung der Kernkomponenten der inneren Uhr übt es Einfluss auf das Lernen aus. Es fungiert als Modulator der synaptischen Übertragung auf verschiedenen Stufen der intrazellulären Signaltransduktionswege, die mit Lernen assoziiert sind. Möglicherweise setzt Melatonin phasenabhängig eine Schwelle für einkommende Signale und trägt so mit dazu bei, Zeitinformationen in Erinnerungen direkt miteinzukodieren (Abb. 31).

4.4 Verhaltensversuche – phänotypische Korrelate

Zwar betreten die Wildtypmäuse im *Radial Arm Maze* während des Versuchs deutlich mehr Arme pro Zeit und begingen auch mehr Fehler, jedoch zeigte sich bei der Anzahl der Fehler bezogen auf die Gesamtaktivität kein Unterschied zu den $MT_{1/2}^{-/-}$ -Mäusen. Im *Radial Arm Maze* fiel die bei den Wildtyptieren signifikant höhere Gesamtaktivität auf. Alle Tiere hatten im Vorlauf der Versuche ca. 10 – 15 % ihres Körpergewichtes verloren, bei den Versuchsdurchgängen zu beiden Tageszeiten hatten jeweils die $MT_{1/2}^{-/-}$ -Tiere prozentual sogar mehr Körpergewicht verloren als die C3H-Tiere. Es ist also davon auszugehen, dass ihr Hunger und damit ihre Motivation, auf Futtersuche zu gehen, wenigstens gleich groß war – fehlende Motivation zur Futtersuche kann also als Ursache für die geringere Gesamtaktivität der Knockoutmäuse ausgeschlossen werden. Interessanterweise zeigte sich bei den $MT_{1/2}^{-/-}$ -Tieren als Nebenbefund eine signifikant höhere Körpermasse als bei ihren gleichaltrigen C3H-Artgenossen. Chronodisruption stellt einen bekannten Risikofaktor für das metabolische Syndrom dar¹⁶³ und direkter Einfluss von Melatonin auf die metabolische Regulation konnte bereits gezeigt werden, so zum Beispiel die inhibitorische Wirkung auf Insulin- und Leptinspiegel sowie den Körperfettgehalt.²⁴¹ Dies könnte gut das Übergewicht bei den Knockouttieren erklären.

Die Wirkung von Melatonin auf das motorische System wird als inhibierend betrachtet und tatsächlich ist für $MT_{1/2}^{-/-}$ -Tiere höheren Alters eine verstärkte motorische Aktivität beschrieben²³⁹ worden. In den hier durchgeführten Versuchen wurde dagegen entweder kein Unterschied in der Gesamtaktivität (*Open Field Test*) oder aber eine geringere motorische Aktivität (*Radial Arm Maze*) festgestellt. Die Gesamtaktivität nimmt bei

Mäusen im Allgemeinen mit zunehmendem Alter ab,²⁴² somit ist denkbar, dass sich die Versuchsergebnisse, wenn in einem anderen Alter durchgeführt, unterscheiden würden.

Angstverhalten stellt grundsätzlich einen möglichen Störfaktor von Verhaltensversuchen dar, die ja immer mit einem Eingriff in die natürliche Umwelt und das Verhalten eines Versuchstieres darstellen. Da Melatonin außerdem in Verbindung mit Angstverhalten gebracht bzw. ein anxiolytischer Effekt vor allem über den MT₂-Rezeptor beschrieben wird,^{243,244} sollte folglich auch das Angstverhalten der MT_{1/2}^{-/-}-Tiere evaluiert werden, denn auch Angstverhalten könnte einen Erklärungsansatz für veränderte Aktivität bieten. Im *Open Field Test* ergaben sich zwischen beiden Tierstämmen keine Unterschiede, weder in der Aktivität noch in der Präferenz für den Aufenthalt in der Nähe der schützenden Wände. Zwar zeigte sich an Tag 1 bei den C3H-Tieren eine längere Latenz bis zum ersten Wechsel in eines der angrenzenden Felder, jedoch war diese an den Folgetagen nicht mehr nachweisbar. An anderer Stelle wird kein Unterschied für die Präferenz der geschlossenen Arme im *Elevated Plus Maze* (EPM) beschrieben.²²⁶ Aus diesen Befunden kann auf kein verändertes Angstverhalten der MT_{1/2}^{-/-}-Tiere geschlossen werden. Mäuse ohne MT₂-Rezeptor zeigen im EPM eine längere Aufenthaltszeit auf der zentralen offenen Plattform,¹⁹⁷ was von manchen Autoren als verringertes Angstverhalten interpretiert wird.²³⁹ Jedoch zeigen sie auch in wiederholten Versuchsdurchgängen im Gegensatz zu Wildtypen keine zunehmende Verkürzung der Latenzzeit bis zum Betreten der geschlossenen Arme, es zeigt sich also eine geringere Lernleistung. Im Kontext der Zeit der Versuchsdurchführung am Tag betrachtet zeichnet sich somit ein ähnliches Bild wie bei den MT_{1/2}^{-/-}-Mäusen, die tagsüber auch im *Radial Arm Maze* ebenso langsam lernen wie nachts.²²⁶ Insgesamt kann also bei den MT_{1/2}^{-/-}-Mäusen kein anderes Angstverhalten beobachtet werden als bei Wildtypen. Auch wenn Melatonin eine anxiolytische und/oder eine motorisch-hemmende Wirkung hat, kann der Effekt der akuten Exposition nicht unbedingt mit dem Phänotyp bei vollständig fehlenden Rezeptoren verglichen werden.

4.5 Limitationen

Bei globalem Knockout in sämtlichen Geweben wie im vorliegenden Mausmodell lässt sich nicht ohne Weiteres differenzieren, zu welchem Anteil die Beobachtungen auf einer unmittelbaren Wirkung im untersuchten Material selbst beruhen oder eher auf fortgeleitete Effekte von Veränderungen an anderer Stelle im Organismus – hier

namentlich der molekularen Uhr vor allem im SCN und ihr untergeordneter Rhythmen – zurückzuführen sind. Zum Beispiel ist die zyklische Expression von Uhrengenen im Hippocampus von $MT_{1/2}^{-/-}$ -Mäusen gegenüber dem Wildtyp deutlich verändert.²²⁶ Auch könnten Unterschiede konstitutionell bedingt sein, andererseits können während der Entwicklung des Individuums Kompensationsstrategien stattfinden. Bereits beim Fetus kann Chronodisruption bzw. ein Mangel an Melatonin zu Veränderungen in Rhythmus und Lernleistung beim erwachsenen Tier führen.²⁴⁵ In den bereits unterschiedlichen Grundschwankungen der untersuchten gedächtnisrelevanten Moleküle zeigt sich, dass zwischen C3H- und $MT_{1/2}^{-/-}$ -Mäusen ganz offensichtlich deutliche Unterschiede in mit dem Gedächtnis assoziierten Signaltransduktionsvorgängen bestehen. So lässt sich beispielsweise in $MT_{1/2}^{-/-}$ -Mäusen auch in der Kontrollgruppe keine basale Rhythmik von pMAPK ausmachen. Für zukünftige Studien wäre ein Modellorganismus mit konditioneller, gewebsspezifischer Deletion der Rezeptoren denkbar und wünschenswert.

4.6 Lernen als Zeitgeber

Die Uhrengene bilden die Kernbausteine der zentralen molekularen Uhr im SCN sowie auch in der Generation abhängiger Rhythmen in zahlreichen peripheren Geweben und Organen. Sie üben darüber hinaus aber auch großen Einfluss auf Lernen und Gedächtnis aus.⁴² Erlerntes wird je nach Stimulus mit der Zeit verknüpft, sodass die erlernte Reaktion nur zu bestimmten Zeiten hervorgerufen werden kann. Mitunter reicht hierfür bereits ein einziges Ereignis. Dies verschafft den Vorteil, vor- oder nachteilhafte Ereignisse antizipieren und das Verhalten entsprechend anpassen zu können. Es bestehen bemerkenswerte Überschneidungen der biochemischen Mechanismen von Uhr und Lernen. So ist die Expression von *Per1* CREB-abhängig, in seinem Promotor findet sich ein CRE.^{199,246} Die Transkription von *Bmal1*, eines weiteren zentralen Uhrengens, wird durch MAPK-abhängige Phosphorylierung seines Produktes BMAL1 gehemmt.¹⁹⁸ *Bmal*-Knockout-Mäuse sind sowohl arrhythmisch als auch in räumlichem Lernen und LTP stark eingeschränkt.²⁴⁷ Die Rhythmen von cAMP und MAPK im Hippocampus fehlen ihnen.²⁴⁷ Dies deutet darauf hin, dass nicht nur die Zeit Einfluss auf den Lernerfolg hat, sondern möglicherweise auch umgekehrt Lernen selbst die Messung der Zeit beeinflussen könnte, indem es die Feedbackschleifen der Uhrengentranskription beeinflusst und so beispielsweise eine Phasenverschiebung verursacht (vgl. Abb. 31).

Für den Rhythmus im dorsalen Striatum konnte inzwischen gezeigt werden, dass ein Lernstimulus – abhängig vom Zeitpunkt des Trainings – dort als Antwort eine deutliche Phasenverschiebung im Rhythmus von *Per2* erzeugt.²⁴⁸ Hierin könnte ein Werkzeug bestehen, einerseits zeitliche Information mit dem Erlernten zu verknüpfen und andererseits auch die Uhr mit der Frequenz eines wiederkehrenden Ereignisses zu resynchronisieren. Melatonin könnte als Modulator für die Stärke dieser Phasenantwort und somit als weiterer Verweis auf den zeitlichen Kontext von Erinnerungen dienen.

Durch die wechselseitige Beeinflussung zwischen Uhr und Lernen dürfte es äußerst schwierig sein, in zukünftigen Studien die einzelnen Effekte von einander zu differenzieren und Ursache und Wirkung voneinander abzugrenzen. Dies könnte mithilfe einzeln markier- und beeinflussbarer Neuronen gelingen. Weiterhin bleibt stets zu bedenken, dass Verhaltensversuche an sich je nach circadianem Versuchszeitpunkt eine Störung des Schlaf-Wach-Rhythmus darstellen und somit allein schon – unabhängig von Art und Ergebnis des Versuchs – Zeitgeber-Effekte ausüben können. Beeinträchtigte Gedächtnisleistung durch einen gestörten circadianen Rhythmus ist gut beschrieben,^{187–189} und es muss als Limitation des hier verwendeten Versuchsaufbaus auch in Betracht gezogen werden, dass die Manipulation an der Wirkung von Melatonin durch den Knockout der Rezeptoren Auswirkungen auf den Rhythmus hat und die phänotypischen Beobachtungen möglicherweise auch hierauf beruhen. Allerdings besitzen $MT_{1/2}^{-/-}$ -Mäuse genau wie der natürlicherweise melatonindefiziente Mäusestamm C57BL/6²⁰⁹ einen unveränderten Aktivitätsrhythmus. Bei $MT_{1/2}^{-/-}$ -Tieren ist lediglich eine gering verlängerte Periodendauer τ beschrieben worden.²³⁹

4.7 Fazit und Ausblick

Ziel dieser Arbeit war es, anhand molekularbiologischer Untersuchungen Prozesse im cAMP-Signalweg und der epigenetischen Regulation nach einem Lernstimulus zu beleuchten. Weiterhin sollte der Einfluss des Pinealhormons Melatonin auf eben diese Prozesse und die verbundenen phänotypischen Erscheinungen betrachtet werden. Hierzu wurden neben den molekularen Methoden auch Verhaltensversuche angewendet. Folgende Ergebnisse konnten gezeigt werden:

(1) Stabile Induktion von pCREB und Chromatinremodelling nach Stimulus

Lernen als Stimulus führt tagsüber zu einer stabil nachweisbaren Induktion des zentralen *memory molecule*^{42,43} pCREB und der nachgeschalteten Histonmodifikationen H3K9ac und H3K14ac im Hippocampus. Lernen führt also zu einer verstärkten Signaltransduktion sowie zu epigenetischen Modifikationen als Zeichen transienter und dauerhafter Umbauvorgänge. Bereits ein einmaliger Stimulus ist dafür ausreichend. Die zeitliche Dynamik der Induzierbarkeit dieser Vorgänge korreliert mit dem bekannten Phänotyp,¹⁸⁶ der sich als tagsüber bessere Lernleistung ausdrückt.

(2) Verschobene Grundrhythmen und keine Induktion bei $MT_{1/2}^{-/-}$ -Tieren

Mit dem Knockout beider Melatonin-Membranrezeptoren geht die beschriebene Induzierbarkeit der Signalkaskade und des Chromatinremodellings verloren. Es findet trotz Stimulus keine vermehrte Signaltransduktion statt, weiterhin sind auch basale Rhythmen diverser beteiligter Proteine wie z.B. PKA und PKC, pCREB und H3K14ac verändert. Auch hier existiert eine gute Korrelation mit dem Phänotyp, bei dem der Lernvorteil während der Hellphase verschwunden ist.²²⁶

(3) Akute versus chronische Wirkung von Melatonin

Nur einige festgestellte Effekte sind durch eine nicht mehr vorhandene rezeptorvermittelte Wirkung von Melatonin erklärbar, so zum Beispiel die Dynamik in der Aktivität der Proteinkinasen A und C. Die fehlende Induzierbarkeit von pCREB, pMAPK und des Chromatinremodellings steht im Licht der verbesserten Lernleistung durch akute Blockade der Rezeptoren¹⁹² scheinbar im Widerspruch dazu. Sie wird aber erklärbar durch eine gleichermaßen weggefallene langfristige, ebenfalls rezeptorvermittelte Wirkung von Melatonin, die zum Beispiel in einer Sensibilisierung der Adenylatcyclase durch prolongierte Melatoninexposition ähnlich wie in den Zellen der *Pars tuberalis*²⁴⁰ bestehen könnte. Hierdurch lässt sich auch der entsprechende Phänotyp der $MT_{1/2}^{-/-}$ -Mäuse erklären sowie die Beobachtung, dass bei den natürlicherweise melatonindefizienten Mäusen des Stammes C57BL/6 die Behandlung mit Melatonin zum selben Phänotyp führt wie bei C3H.²²⁶ Unter diesem Gesichtspunkt sollte zukünftig überprüft werden, ob sich eine längerfristige Behandlung mit Melatoninantagonisten anders auf die Lernergebnisse auswirkt als die einmalige Gabe und möglicherweise zum selben Verhalten führt wie der Rezeptorknockout.

(4) Unterschiede in Verhalten und Körpermasse

Es bestehen Unterschiede im Verhalten zwischen C3H- und $MT_{1/2}^{-/-}$ -Mäusen, die je nach verwendetem Versuchsaufbau unterschiedlich ausgeprägt sind. Mit den hier verwendeten Methoden und Verhaltensversuchen konnte kein klar definierter Phänotyp bezüglich Aktivität und Angstverhalten erkannt werden. An anderer Stelle wurde die veränderte tageszeitliche Dynamik in der Lernleistung beschrieben,²²⁶ die im Einklang mit den Ergebnissen der molekularen Untersuchungen stehen. Teilweise sind anderslautende Veränderungen im Lern- und Angstverhalten der $MT_{1/2}^{-/-}$ -Mäuse postuliert worden,²³⁹ dies gilt es in zukünftigen Verhaltensstudien genauer zu untersuchen. $MT_{1/2}^{-/-}$ -Mäuse haben im Vergleich zu gleichalten Artgenossen ohne Knockout ein höheres Körpergewicht, was am Einfluss von Melatonin auf Insulin, Leptin und Fettgewebe²⁴¹ liegen könnte. Die Wirkung von Melatonin auf die metabolische Regulation ist Gegenstand von aktueller Forschung.

Wie dargelegt wurde, reguliert Melatonin Verhalten, Signaltransduktion und neuronale Plastizität auf vielschichtige und differenzierte Weise. Als Modulator hat es Einfluss auf Rhythmus, Aktivität, Schlaf und viele weitere Vorgänge, die einander wiederum gegenseitig beeinflussen. Das komplexe Zusammenspiel aus der inneren Uhr und Gedächtnisprozessen gilt es weiter zu erforschen, auch um die vermutlich zahlreichen Implikationen zu erkennen im Hinblick auf die Bedingungen einer eng vernetzten Gesellschaft, für deren Rhythmus die äußerlich vorgegebene Uhrzeit nur bedingt eine Rolle spielt.

5. Zusammenfassung/Abstract

5.1 Zusammenfassung: Einfluss von Melatonin auf das hippocampale Lernen bei der Maus

Die Hippocampusformation ist eine wichtige Hirnstruktur für die Gedächtnisakquisition und -konsolidierung, insbesondere beim räumlichen Lernen spielt sie eine essentielle Rolle. Langzeitpotenzierung (LTP) gilt als das elektrophysiologische Korrelat der synaptischen Plastizität, dem langfristigen Umbau synaptischer Verbindungen, der letztlich zur Ausbildung stabiler, langanhaltender Erinnerungen führt. Signalübertragung über den cAMP/PKA/MAPK/CREB-Weg stellt den wichtigsten molekularen Mechanismus der Langzeitpotenzierung dar, CREB gilt als die zentrale Komponente und Schnittstelle dieser Übertragung. Neuronale Plastizität ist abhängig von *de-novo*-Proteinbiosynthese, an deren Regulation Veränderungen der Chromatinstruktur durch Histonmodifikationen beteiligt ist, in die der genannte Signalweg mündet.

Circadiane Rhythmen sind in den meisten Spezies in vielen verschiedenen Organen und Geweben nachgewiesen und manifestieren sich als Einflüsse auf zahlreiche Parameter des Verhaltens, so auch auf die Leistung beim Erlernen neuer Information. Ihr zentraler Taktgeber ist der Nucleus suprachiasmaticus (SCN). Melatonin ist ein wichtiges Effektorsignal des circadianen Systems und hat gleichzeitig Rückkopplungsfunktion. Seine unmittelbare Wirkung übt es über die beiden G-Protein-gekoppelten Melatoninrezeptoren MT₁ und MT₂ aus. Es hat direkten Einfluss auf das Lernen und stellt damit einen Schnittpunkt zwischen Signalwegen der synaptischen Plastizität und des circadianen Systems dar.

Der Lernerfolg vieler Tierarten ist bekanntermaßen während deren subjektivem Tag höher als während der Nacht. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass beim räumlichen Lernen bereits ein einmaliger Stimulus ausreicht, um im Hippocampus der verwendeten C3H-Mäuse eine stabile Induktion der Phosphorylierung von CREB sowie der transkriptionsaktivierenden Histonmodifikationen H3K9ac und H3K14ac zu erzeugen. Ein einmaliger Stimulus hat also verstärkte Signaltransduktion und Proteinsyntheseaktivität als Zeichen synaptischer Plastizität zur Folge. Dies geschieht nur tagsüber, nachts zeigt sich kein Effekt. Somit spiegelt sich der Phänotyp in diesen molekularen Markern wider. Anhand eines Mausmodells mit genetischem Knockout der

beiden membrangebundenen Melatoninrezeptoren MT_1 und MT_2 ($MT_{1/2}^{-/-}$) wurde der Einfluss von Melatonin auf die molekularen Prozesse des hippocampalen Lernens näher beleuchtet. Über $MT_{1/2}^{-/-}$ -Mäuse ist bekannt, dass ihr Lernerfolg in den benutzten Verhaltensversuchen zu jeder Tageszeit auf dem Niveau der C3H-Mäuse während der Nacht liegt. Zunächst zeigt sich, dass in $MT_{1/2}^{-/-}$ -Mäusen die Grundrhythmen der meisten untersuchten Proteine und Histonmodifikationen verändert, teilweise phasenverschoben und abgeflacht sind. Eine Induktion von pCREB und H3K9ac und H3K14ac ist in diesen Tieren nicht mehr erreichbar und somit nach einem einmaligen Lernstimulus keine vermehrte Signalübertragung oder synaptischer Umbau nachweisbar. Auch hier besteht eine gute Korrelation mit dem Lernphänotyp. Weiterhin wurden Unterschiede im Aktivitätsmuster der beiden Mäusestämme gezeigt, $MT_{1/2}^{-/-}$ -Mäuse sind abhängig von der Situation weniger oder gleich aktiv wie C3H-Tiere. Im Angstverhalten als möglichem Störfaktor besteht kein Unterschied zwischen beiden Tierstämmen.

Melatoninrezeptoren wirken über inhibitorische G-Proteine auf die Adenylatcyclase und hemmen den cAMP/CREB-Signalübertragung, was die schlechtere Lernperformance während der Nacht erklärt, wenn der Melatoninspiegel seinen natürlichen Höhepunkt erreicht. Durch Melatonin lassen sich auch tagsüber bei Mäusen und Zebrafischen LTP und räumliches Lernen unterdrücken. Jedoch lässt sich durch diese akute Wirkung von Melatonin nur ein Teil der Ergebnisse erklären, so zum Beispiel die veränderte Aktivität von PKA und PKC. Um das scheinbar paradoxe verschlechterte Lernverhalten der $MT_{1/2}^{-/-}$ -Mäuse und die fehlende Induzierbarkeit von pCREB und Chromatinremodelling zu erklären, muss ein längerfristiger Effekt von Melatonin bestehen, der über dessen maximale Konzentration hinaus anhält und in seiner Abwesenheit zu verbesserter Signalübertragung führt. Hierfür ist eine Sensibilisierung der Adenylatcyclase durch prolongierte Melatoninexposition, wie sie beispielsweise in Zellen der *Pars tubercalis* nachgewiesen wurde, beschrieben worden. Es konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass Melatonin vielfältigen Einfluss auf das hippocampale Lernen hat und dieses mit der inneren Uhr verbindet.

5.2 Abstract: The influence of melatonin on hippocampal learning in mice

The hippocampus is a structure in the brain which is integral to memory acquisition and consolidation, especially in spatial learning it plays an essential role. Long-term potentiation (LTP) is generally viewed as the electrophysiological correlate of synaptic plasticity, long lasting changes in synaptic connections which ultimately result in stable and persistent memories. Signalling via the cAMP/PKA/MAPK/CREB pathway is the most important molecular mechanism of long-term potentiation. CREB is seen as central component and intersection of this signalling pathway. Neuronal plasticity is dependent on *de novo* protein synthesis which is regulated by changes in chromatin structure through the modification of histone proteins. These modifications are one endpoint in the cAMP signalling pathway.

Circadian rhythms have been shown to exist in most species in many organs and tissues. Among many other variables, circadian rhythms can be shown to have an effect on the processing of new memories. The central master clock of these circadian dynamics is the suprachiasmatic nucleus (SCN). Melatonin acts as an important effector in this intricate circadian system, while at the same time also contributing feedback to it. Its immediate effects are transmitted by the two G protein-coupled receptors MT₁ and MT₂. Melatonin thus has a direct influence on memory performance and is a converging point for signalling pathways of synaptic plasticity and circadian systems.

It is known that many animal species show enhanced memory performance during their subjective day. In this study, it could be shown that a single stimulus is sufficient to yield a stable induction of phosphorylation of CREB and transcription-associated histone modifications H3K9ac and H3K14ac in the hippocampus of the used C3H mice.

Hence a single stimulus causes enhanced signalling and protein synthesis, which can be seen as indicators of synaptic plasticity. This can only be achieved during daytime, during the night the same effect is not seen. The phenotype is thus mirrored in the here studied molecular markers. The influence of melatonin on molecular processes of hippocampal learning was studied in detail using a mouse model with genetic deletion of both membrane bound melatonin receptors MT₁ and MT₂ (MT_{1/2}^{-/-}). It is known that in the behavioural analyses used here, MT_{1/2}^{-/-} mice show a memory performance

similar to that of C3H mice during night time at any time of day. Firstly, it was demonstrated that baseline rhythms of most studied proteins and histone modifications were altered, some of these phase-shifted with dampened amplitude. Furthermore, in correlation with the learning phenotype, induction of pCREB and H3K9ac and H3K14ac could no longer be produced. After a single stimulus no enhanced signalling and synaptic remodelling is detectable. Additionally, differences in activity levels between both strains of mice were noted. Depending on the situation $MT_{1/2}^{-/-}$ mice are equally or less active when compared to C3H mice. There were no differences between the two strains in terms of anxiety behaviour, which was evaluated as a possible confounder.

Melatonin receptors signal via inhibitory G Proteins on adenylyl cyclase and repress the cAMP/CREB pathway, which explains decreased learning performance during night time when melatonin levels are naturally highest. During daytime melatonin can effectively suppress LTP and spatial learning in mice and zebrafish. However, this acute effect of melatonin can only explain some of the results of this study, such as altered activity of PKA and PKC. A long-lasting effect of melatonin, continuing past its peak concentration and facilitating improved signalling (in the absence of melatonin), could explain the seemingly paradoxical learning impediment and the lack of inducibility of pCREB and chromatin remodelling in $MT_{1/2}^{-/-}$ mice. A suitable candidate for this presumed effect would be long term sensitization of adenylyl cyclase, by prolonged exposure to melatonin, as has been shown to exist for instance in *pars tuberalis* cells. This offers a multitude of new and interesting hypotheses and approaches for further research. It could be shown in this study that melatonin has complex influence on hippocampal learning and intricately interconnects it with the circadian clock.

6. Literaturverzeichnis

1. Sweatt JD. *Mechanisms of Memory*. Academic Press; 2009.
2. Kandel ER, Dudai Y, Mayford MR. The Molecular and Systems Biology of Memory. *Cell*. 2014;157(1):163-186. doi:10.1016/j.cell.2014.03.001
3. Müller GE, Pilzecker A. Experimentelle Beiträge zur Lehre vom Gedächtnis. *Z Für Psychol Physiol Sinnesorgane*. 1900;1:1-288.
4. Hebb D. *The Organization of Behaviour: A Neuropsychological Theory*. New York: Wiley & Sons; 1949.
5. Barondes SH, Cohen HD. Puromycin Effect on Successive Phases of Memory Storage. *Science*. 1966;151(3710):594-595. doi:10.1126/science.151.3710.594
6. Flexner JB, Flexner LB, Stellar E. Memory in Mice as Affected by Intracerebral Puromycin. *Science*. 1963;141(3575):57-59. doi:10.1126/science.141.3575.57
7. Kandel ER. The Molecular Biology of Memory Storage: A Dialogue Between Genes and Synapses. *Science*. 2001;294(5544):1030-1038. doi:10.1126/science.1067020
8. Gupta S, Kim SY, Artis S, et al. Histone Methylation Regulates Memory Formation. *J Neurosci*. 2010;30(10):3589-3599. doi:10.1523/JNEUROSCI.3732-09.2010
9. Andersen P. *The Hippocampus Book*. Oxford University Press, USA; 2007.
10. Amaral DG. A Golgi study of cell types in the hilar region of the hippocampus in the rat. *J Comp Neurol*. 1978;182(4 Pt 2):851-914.
11. Blackstad TW. Commissural connections of the hippocampal region in the rat, with special reference to their mode of termination. *J Comp Neurol*. 1956;105(3):417-537. doi:10.1002/cne.901050305
12. Frotscher M, Kahle W, Spitzer G, Frotscher M. *Nervensystem und Sinnesorgane*. 11., überarb. Aufl. Stuttgart: Thieme; 2013.
13. Rodríguez F, López JC, Vargas JP, Broglio C, Gómez Y, Salas C. Spatial memory and hippocampal pallium through vertebrate evolution: insights from reptiles and teleost fish. *Brain Res Bull*. 2002;57(3-4):499-503. doi:10.1016/S0361-9230(01)00682-7
14. O'Keefe J, Dostrovsky J. The hippocampus as a spatial map. Preliminary evidence from unit activity in the freely-moving rat. *Brain Res*. 1971;34(1):171-175. doi:10.1016/0006-8993(71)90358-1
15. Biegler R, McGregor A, Krebs JR, Healy SD. A larger hippocampus is associated with longer-lasting spatial memory. *Proc Natl Acad Sci*. 2001;98(12):6941-6944. doi:10.1073/pnas.121034798

16. Maguire EA, Gadian DG, Johnsrude IS, et al. Navigation-related structural change in the hippocampi of taxi drivers. *Proc Natl Acad Sci*. 2000;97(8):4398-4403. doi:10.1073/pnas.070039597
17. Volman SF, Grubb TC, Schuett KC. Relative hippocampal volume in relation to food-storing behavior in four species of woodpeckers. *Brain Behav Evol*. 1997;49(2):110-120.
18. Milner B. Disorders of learning and memory after temporal lobe lesions in man. *Clin Neurosurg*. 1972;19:421-446.
19. Scoville WB, Milner B. LOSS OF RECENT MEMORY AFTER BILATERAL HIPPOCAMPAL LESIONS. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 1957;20(1):11-21.
20. Maviel T, Durkin TP, Menzaghi F, Bontempi B. Sites of Neocortical Reorganization Critical for Remote Spatial Memory. *Science*. 2004;305(5680):96-99. doi:10.1126/science.1098180
21. Restivo L, Vetere G, Bontempi B, Ammassari-Teule M. The Formation of Recent and Remote Memory Is Associated with Time-Dependent Formation of Dendritic Spines in the Hippocampus and Anterior Cingulate Cortex. *J Neurosci*. 2009;29(25):8206-8214. doi:10.1523/JNEUROSCI.0966-09.2009
22. Gräff J, Woldemichael BT, Berchtold D, Dewarrat G, Mansuy IM. Dynamic histone marks in the hippocampus and cortex facilitate memory consolidation. *Nat Commun*. 2012;3:991. doi:10.1038/ncomms1997
23. Miller CA, Gavin CF, White JA, et al. Cortical DNA methylation maintains remote memory. *Nat Neurosci*. 2010;13(6):664-666. doi:10.1038/nn.2560
24. Frankland PW, Bontempi B. The organization of recent and remote memories. *Nat Rev Neurosci*. 2005;6(2):119-130. doi:10.1038/nrn1607
25. Squire LR, Zola-Morgan S. The medial temporal lobe memory system. *Science*. 1991;253(5026):1380-1386. doi:10.1126/science.1896849
26. Lein ES, Hawrylycz MJ, Ao N, et al. Genome-wide atlas of gene expression in the adult mouse brain. *Nature*. 2007;445(7124):168-176. doi:10.1038/nature05453
27. Bliss TVP, Lømo T. Long-lasting potentiation of synaptic transmission in the dentate area of the anaesthetized rabbit following stimulation of the perforant path. *J Physiol*. 1973;232(2):331-356.
28. Lømo T. Frequency potentiation of excitatory synaptic activity in the dentate area of the hippocampal formation. *Acta Physiol Scand*. 1966;68(Suppl 277):128.
29. Bliss TVP, Collingridge GL. A synaptic model of memory: long-term potentiation in the hippocampus. *Nature*. 1993;361(6407):31-39. doi:10.1038/361031a0

30. Schmidt RF, Lang F, eds. *Physiologie des Menschen: mit Pathophysiologie ; [+IMPP-Fragen Physiologie online]*. 30., neu bearb. und aktualisierte Aufl. Heidelberg: Springer Medizin; 2007.
31. Giese KP, Fedorov NB, Filipkowski RK, Silva AJ. Autophosphorylation at Thr286 of the α Calcium-Calmodulin Kinase II in LTP and Learning. *Science*. 1998;279(5352):870-873. doi:10.1126/science.279.5352.870
32. Barria A, Muller D, Derkach V, Griffith LC, Soderling TR. Regulatory Phosphorylation of AMPA-Type Glutamate Receptors by CaM-KII During Long-Term Potentiation. *Science*. 1997;276(5321):2042-2045. doi:10.1126/science.276.5321.2042
33. Lisman J, Schulman H, Cline H. The molecular basis of CaMKII function in synaptic and behavioural memory. *Nat Rev Neurosci*. 2002;3(3):175-190. doi:10.1038/nrn753
34. Sweatt JD. Toward a Molecular Explanation for Long-Term Potentiation. *Learn Mem*. 1999;6(5):399-416. doi:10.1101/lm.6.5.399
35. Silva AJ, Stevens CF, Tonegawa S, Wang Y. Deficient hippocampal long-term potentiation in alpha-calcium-calmodulin kinase II mutant mice. *Science*. 1992;257(5067):201-206. doi:10.1126/science.1378648
36. Yang H-W, Hu X-D, Zhang H-M, et al. Roles of CaMKII, PKA, and PKC in the Induction and Maintenance of LTP of C-Fiber-Evoked Field Potentials in Rat Spinal Dorsal Horn. *J Neurophysiol*. 2004;91(3):1122-1133. doi:10.1152/jn.00735.2003
37. Gonzalez GA, Montminy MR. Cyclic AMP stimulates somatostatin gene transcription by phosphorylation of CREB at serine 133. *Cell*. 1989;59(4):675-680. doi:10.1016/0092-8674(89)90013-5
38. Montminy MR, Bilezikjian LM. Binding of a nuclear protein to the cyclic-AMP response element of the somatostatin gene. *Nature*. 1987;328(6126):175-178. doi:10.1038/328175a0
39. Alarcón JM, Malleret G, Touzani K, et al. Chromatin Acetylation, Memory, and LTP Are Impaired in CBP^{+/-} Mice: A Model for the Cognitive Deficit in Rubinstein-Taybi Syndrome and Its Amelioration. *Neuron*. 2004;42(6):947-959. doi:10.1016/j.neuron.2004.05.021
40. Korzus E, Rosenfeld MG, Mayford M. CBP histone acetyltransferase activity is a critical component of memory consolidation. *Neuron*. 2004;42(6):961-972.
41. Vecsey CG, Hawk JD, Lattal KM, et al. Histone Deacetylase Inhibitors Enhance Memory and Synaptic Plasticity via CREB: CBP-Dependent Transcriptional Activation. *J Neurosci*. 2007;27(23):6128-6140. doi:10.1523/JNEUROSCI.0296-07.2007

42. Rawashdeh O, Jilg A, Jedlicka P, et al. PERIOD1 coordinates hippocampal rhythms and memory processing with daytime. *Hippocampus*. 2014;24(6):712-723. doi:10.1002/hipo.22262
43. Kandel ER. The molecular biology of memory: cAMP, PKA, CRE, CREB-1, CREB-2, and CPEB. *Mol Brain*. 2012;5:14. doi:10.1186/1756-6606-5-14
44. Bourtchuladze R, Frenguelli B, Blendy J, Cioffi D, Schutz G, Silva AJ. Deficient long-term memory in mice with a targeted mutation of the cAMP-responsive element-binding protein. *Cell*. 1994;79(1):59-68. doi:10.1016/0092-8674(94)90400-6
45. Dash PK, Hochner B, Kandel ER. Injection of the cAMP-responsive element into the nucleus of Aplysia sensory neurons blocks long-term facilitation. *Nature*. 1990;345(6277):718-721. doi:10.1038/345718a0
46. Kida S, Josselyn SA, de Ortiz SP, et al. CREB required for the stability of new and reactivated fear memories. *Nat Neurosci*. 2002;5(4):348-355. doi:10.1038/nn819
47. Kogan JH, Frankland PW, Blendy JA, et al. Spaced training induces normal long-term memory in CREB mutant mice. *Curr Biol*. 1997;7(1):1-11. doi:10.1016/S0960-9822(06)00022-4
48. Deisseroth K, Mermelstein PG, Xia H, Tsien RW. Signaling from synapse to nucleus: the logic behind the mechanisms. *Curr Opin Neurobiol*. 2003;13(3):354-365. doi:10.1016/S0959-4388(03)00076-X
49. Josselyn SA, Shi C, Carlezon WA, Neve RL, Nestler EJ, Davis M. Long-Term Memory Is Facilitated by cAMP Response Element-Binding Protein Overexpression in the Amygdala. *J Neurosci*. 2001;21(7):2404-2412.
50. Levenson JM, O'Riordan KJ, Brown KD, Trinh MA, Molfese DL, Sweatt JD. Regulation of Histone Acetylation during Memory Formation in the Hippocampus. *J Biol Chem*. 2004;279(39):40545-40559. doi:10.1074/jbc.M402229200
51. Waltereit R, Weller M. Signaling from cAMP/PKA to MAPK and synaptic plasticity. *Mol Neurobiol*. 2003;27(1):99-106. doi:10.1385/MN:27:1:99
52. DeLange RJ, Fambrough DM, Smith EL, Bonner J. Calf and Pea Histone IV III. COMPLETE AMINO ACID SEQUENCE OF PEA SEEDLING HISTONE IV; COMPARISON WITH THE HOMOLOGOUS CALF THYMUS HISTONE. *J Biol Chem*. 1969;244(20):5669-5679.
53. Von Holt C, Strickland WN, Brandt WF, Strickland MS. More histone structures. *FEBS Lett*. 1979;100(2):201-218. doi:10.1016/0014-5793(79)80337-3
54. Kornberg RD. Chromatin structure: a repeating unit of histones and DNA. *Science*. 1974;184(4139):868-871.

55. Luger K, Mäder AW, Richmond RK, Sargent DF, Richmond TJ. Crystal structure of the nucleosome core particle at 2.8 Å resolution. *Nature*. 1997;389(6648):251-260. doi:10.1038/38444
56. Richmond TJ, Finch JT, Rushton B, Rhodes D, Klug A. Structure of the nucleosome core particle at 7 Å resolution. *Nature*. 1984;311(5986):532-537.
57. Zhou Y-B, Gerchman SE, Ramakrishnan V, Travers A, Muylldermans S. Position and orientation of the globular domain of linker histone H5 on the nucleosome. *Nature*. 1998;395(6700):402-405. doi:10.1038/26521
58. Löffler G, Petrides PE, Heinrich PC, Löffler-Petrides-Heinrich, eds. *Biochemie und Pathobiochemie*. 8., völlig neu bearb. Aufl. Heidelberg: Springer Medizin; 2007.
59. Guan J-S, Haggarty SJ, Giacometti E, et al. HDAC2 negatively regulates memory formation and synaptic plasticity. *Nature*. 2009;459(7243):55-60. doi:10.1038/nature07925
60. Levenson JM, Roth TL, Lubin FD, et al. Evidence That DNA (Cytosine-5) Methyltransferase Regulates Synaptic Plasticity in the Hippocampus. *J Biol Chem*. 2006;281(23):15763-15773. doi:10.1074/jbc.M511767200
61. Lubin FD, Roth TL, Sweatt JD. EPIGENETIC REGULATION OF BDNF GENE TRANSCRIPTION IN THE CONSOLIDATION OF FEAR MEMORY. *J Neurosci*. 2008;28(42):10576-10586. doi:10.1523/JNEUROSCI.1786-08.2008
62. Miller CA, Sweatt JD. Covalent Modification of DNA Regulates Memory Formation. *Neuron*. 2007;53(6):857-869. doi:10.1016/j.neuron.2007.02.022
63. Muñoz PC, Aspé MA, Contreras LS, Palacios AG. Correlations of recognition memory performance with expression and methylation of brain-derived neurotrophic factor in rats. *Biol Res*. 2010;43(2):251-258. doi:10.4067/S0716-97602010000200013
64. Dodge JE, Ramsahoye BH, Wo ZG, Okano M, Li E. De novo methylation of MMLV provirus in embryonic stem cells: CpG versus non-CpG methylation. *Gene*. 2002;289(1-2):41-48. doi:10.1016/S0378-1119(02)00469-9
65. Santos KF, Mazzola TN, Carvalho HF. The prima donna of epigenetics: the regulation of gene expression by DNA methylation. *Braz J Med Biol Res*. 2005;38(10):1531-1541. doi:10.1590/S0100-879X2005001000010
66. Martin KC, Sun YE. To Learn Better, Keep the HAT on. *Neuron*. 2004;42(6):879-881. doi:10.1016/j.neuron.2004.06.007
67. Martinowich K, Hattori D, Wu H, et al. DNA Methylation-Related Chromatin Remodeling in Activity-Dependent *Bdnf* Gene Regulation. *Science*. 2003;302(5646):890-893. doi:10.1126/science.1090842
68. Wade PA. Methyl CpG-binding proteins and transcriptional repression*. *BioEssays*. 2001;23(12):1131-1137. doi:10.1002/bies.10008

69. Heyward FD, Sweatt JD. DNA Methylation in Memory Formation Emerging Insights. *The Neuroscientist*. April 2015;1073858415579635. doi:10.1177/1073858415579635
70. Cheng X, Hashimoto H, Horton JR, Zhang X. Mechanisms of DNA Methylation, Methyl-CpG Recognition, and Demethylation in Mammals. In: Tollefsbol TO, ed. *Handbook of Epigenetics*. 1st ed. Academic Press; 2010:9-24.
71. Cervoni N, Bhattacharya S, Szyf M. DNA Demethylase Is a Processive Enzyme. *J Biol Chem*. 1999;274(13):8363-8366. doi:10.1074/jbc.274.13.8363
72. Chen T, Ueda Y, Xie S, Li E. A Novel Dnmt3a Isoform Produced from an Alternative Promoter Localizes to Euchromatin and Its Expression Correlates with Active de Novo Methylation. *J Biol Chem*. 2002;277(41):38746-38754. doi:10.1074/jbc.M205312200
73. Berger SL. The complex language of chromatin regulation during transcription. *Nature*. 2007;447(7143):407-412. doi:10.1038/nature05915
74. Strahl BD, Allis CD. The language of covalent histone modifications. *Nature*. 2000;403(6765):41-45. doi:10.1038/47412
75. Mersfelder EL, Parthun MR. The tale beyond the tail: histone core domain modifications and the regulation of chromatin structure. *Nucleic Acids Res*. 2006;34(9):2653-2662. doi:10.1093/nar/gkl338
76. Bártová E, Krejčí J, Harničarová A, Galiová G, Kozubek S. Histone Modifications and Nuclear Architecture: A Review. *J Histochem Cytochem*. 2008;56(8):711-721. doi:10.1369/jhc.2008.951251
77. Eberharter A, Becker PB. Histone acetylation: a switch between repressive and permissive chromatin. *EMBO Rep*. 2002;3(3):224-229. doi:10.1093/embo-reports/kvf053
78. Barski A, Cuddapah S, Cui K, et al. High-Resolution Profiling of Histone Methylations in the Human Genome. *Cell*. 2007;129(4):823-837. doi:10.1016/j.cell.2007.05.009
79. Rosenfeld JA, Wang Z, Schones DE, Zhao K, DeSalle R, Zhang MQ. Determination of enriched histone modifications in non-genic portions of the human genome. *BMC Genomics*. 2009;10:143. doi:10.1186/1471-2164-10-143
80. Mühlbacher F, Schiessel H, Holm C. Tail-induced attraction between nucleosome core particles. *Phys Rev E Stat Nonlin Soft Matter Phys*. 2006;74(3 Pt 1):031919.
81. Cheung P, Tanner KG, Cheung WL, Sassone-Corsi P, Denu JM, Allis CD. Synergistic Coupling of Histone H3 Phosphorylation and Acetylation in Response to Epidermal Growth Factor Stimulation. *Mol Cell*. 2000;5(6):905-915. doi:10.1016/S1097-2765(00)80256-7
82. Urnov FD, Wolffe AP. Chromatin remodeling and transcriptional activation: the cast (in order of appearance). 2001;20(24). doi:10.1038/sj.onc.1204323

83. Jenuwein T, Allis CD. Translating the Histone Code. *Science*. 2001;293(5532):1074-1080. doi:10.1126/science.1063127
84. Rothbart SB, Strahl BD. Interpreting the language of histone and DNA modifications. *Biochim Biophys Acta*. 2014;1839(8):627-643. doi:10.1016/j.bbagr.2014.03.001
85. Zovkic IB, Guzman-Karlsson MC, Sweatt JD. Epigenetic regulation of memory formation and maintenance. *Learn Mem*. 2013;20(2):61-74. doi:10.1101/lm.026575.112
86. Dias BG, Ressler KJ. Parental olfactory experience influences behavior and neural structure in subsequent generations. *Nat Neurosci*. 2014;17(1):89-96. doi:10.1038/nn.3594
87. Allfrey VG, Faulkner R, Mirsky AE. Acetylation and Methylation of Histones and Their Possible Role in the Regulation of Rna Synthesis. *Proc Natl Acad Sci*. 1964;51(5):786-794.
88. Sterner DE, Berger SL. Acetylation of Histones and Transcription-Related Factors. *Microbiol Mol Biol Rev*. 2000;64(2):435-459. doi:10.1128/MMBR.64.2.435-459.2000
89. Brownell JE, Zhou J, Ranalli T, et al. Tetrahymena Histone Acetyltransferase A: A Homolog to Yeast Gcn5p Linking Histone Acetylation to Gene Activation. *Cell*. 1996;84(6):843-851. doi:10.1016/S0092-8674(00)81063-6
90. Lee KK, Workman JL. Histone acetyltransferase complexes: one size doesn't fit all. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2007;8(4):284-295. doi:10.1038/nrm2145
91. Hong L, Schroth GP, Matthews HR, Yau P, Bradbury EM. Studies of the DNA binding properties of histone H4 amino terminus. Thermal denaturation studies reveal that acetylation markedly reduces the binding constant of the H4 "tail" to DNA. *J Biol Chem*. 1993;268(1):305-314.
92. Norton VG, Imai BS, Yau P, Bradbury EM. Histone acetylation reduces nucleosome core particle linking number change. *Cell*. 1989;57(3):449-457. doi:10.1016/0092-8674(89)90920-3
93. Lee DY, Hayes JJ, Pruss D, Wolffe AP. A positive role for histone acetylation in transcription factor access to nucleosomal DNA. *Cell*. 1993;72(1):73-84. doi:10.1016/0092-8674(93)90051-Q
94. Winston F, Allis CD. The bromodomain: a chromatin-targeting module? *Nat Struct Mol Biol*. 1999;6(7):601-604. doi:10.1038/10640
95. de Ruijter AJM, van Gennip AH, Caron HN, Kemp S, van Kuilenburg ABP. Histone deacetylases (HDACs): characterization of the classical HDAC family. *Biochem J*. 2003;370(Pt 3):737-749. doi:10.1042/BJ20021321

96. Zupkovitz G, Tischler J, Posch M, et al. Negative and Positive Regulation of Gene Expression by Mouse Histone Deacetylase 1. *Mol Cell Biol.* 2006;26(21):7913-7928. doi:10.1128/MCB.01220-06
97. Koch CM, Andrews RM, Flicek P, et al. The landscape of histone modifications across 1% of the human genome in five human cell lines. *Genome Res.* 2007;17(6):691-707. doi:10.1101/gr.5704207
98. Qian W, Miki D, Zhang H, et al. A Histone Acetyltransferase Regulates Active DNA Demethylation in Arabidopsis. *Science.* 2012;336(6087):1445-1448. doi:10.1126/science.1219416
99. Shi Y, Lan F, Matson C, et al. Histone Demethylation Mediated by the Nuclear Amine Oxidase Homolog LSD1. *Cell.* 2004;119(7):941-953. doi:10.1016/j.cell.2004.12.012
100. Klose RJ, Zhang Y. Regulation of histone methylation by demethylimination and demethylation. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2007;8(4):307-318. doi:10.1038/nrm2143
101. Jacobs SA, Khorasanizadeh S. Structure of HP1 Chromodomain Bound to a Lysine 9-Methylated Histone H3 Tail. *Science.* 2002;295(5562):2080-2083. doi:10.1126/science.1069473
102. Nielsen PR, Nietlispach D, Mott HR, et al. Structure of the HP1 chromodomain bound to histone H3 methylated at lysine 9. *Nature.* 2002;416(6876):103-107. doi:10.1038/nature722
103. Musselman CA, Avvakumov N, Watanabe R, et al. Molecular basis for H3K36me3 recognition by the Tudor domain of PHF1. *Nat Struct Mol Biol.* 2012;19(12):1266-1272. doi:10.1038/nsmb.2435
104. Li H, Ilin S, Wang W, et al. Molecular basis for site-specific read-out of histone H3K4me3 by the BPTF PHD finger of NURF. *Nature.* 2006;442(7098):91-95. doi:10.1038/nature04802
105. Shilatifard A. Molecular implementation and physiological roles for histone H3 lysine 4 (H3K4) methylation. *Curr Opin Cell Biol.* 2008;20(3):341-348. doi:10.1016/j.ceb.2008.03.019
106. Bannister AJ, Zegerman P, Partridge JF, et al. Selective recognition of methylated lysine 9 on histone H3 by the HP1 chromo domain. *Nature.* 2001;410(6824):120-124. doi:10.1038/35065138
107. Rea S, Eisenhaber F, O'Carroll D, et al. Regulation of chromatin structure by site-specific histone H3 methyltransferases. *Nature.* 2000;406(6796):593-599. doi:10.1038/35020506
108. Chwang WB, O'Riordan KJ, Levenson JM, Sweatt JD. ERK/MAPK regulates hippocampal histone phosphorylation following contextual fear conditioning. *Learn Mem.* 2006;13(3):322-328. doi:10.1101/lm.152906

109. Levenson JM, Sweatt JD. Epigenetic mechanisms in memory formation. *Nat Rev Neurosci.* 2005;6(2):108-118. doi:10.1038/nrn1604
110. Macdonald N, Welburn JPI, Noble MEM, et al. Molecular Basis for the Recognition of Phosphorylated and Phosphoacetylated Histone H3 by 14-3-3. *Mol Cell.* 2005;20(2):199-211. doi:10.1016/j.molcel.2005.08.032
111. Goto H, Tomono Y, Ajiro K, et al. Identification of a Novel Phosphorylation Site on Histone H3 Coupled with Mitotic Chromosome Condensation. *J Biol Chem.* 1999;274(36):25543-25549. doi:10.1074/jbc.274.36.25543
112. Wilkins BJ, Rall NA, Ostwal Y, et al. A Cascade of Histone Modifications Induces Chromatin Condensation in Mitosis. *Science.* 2014;343(6166):77-80. doi:10.1126/science.1244508
113. Heard E. Delving into the diversity of facultative heterochromatin: the epigenetics of the inactive X chromosome. *Curr Opin Genet Dev.* 2005;15(5):482-489. doi:10.1016/j.gde.2005.08.009
114. Latham JA, Dent SYR. Cross-regulation of histone modifications. *Nat Struct Mol Biol.* 2007;14(11):1017-1024. doi:10.1038/nsmb1307
115. Lo W-S, Trievel RC, Rojas JR, et al. Phosphorylation of Serine 10 in Histone H3 Is Functionally Linked In Vitro and In Vivo to Gcn5-Mediated Acetylation at Lysine 14. *Mol Cell.* 2000;5(6):917-926. doi:10.1016/S1097-2765(00)80257-9
116. de Mairan J-J. Observation botanique. *Hist Académie R Sci Avec Mém Mathématique Phys Tirés Regist Cette Académie.* 1729:35.
117. Huang T-C, Grobbelaar N. The circadian clock in the prokaryote *Synechococcus* RF-1. *Microbiology.* 1995;141(3):535-540.
118. Halberg F, Halberg E, Barnum CP, Bittner JJ. Physiologic 24-hour periodicity in human beings and mice, the lighting regimen and daily routine. In: *R. B. Withrow, (Ed.). Photoperiodism and Related Phenomena in Plants and Animals.* Washington, DC: AAAS; 1959:803-878.
119. Aschoff J. Circadian Rhythms in Man. *Science.* 1965;148(3676):1427-1432. doi:10.1126/science.148.3676.1427
120. Stephan FK, Zucker I. Circadian Rhythms in Drinking Behavior and Locomotor Activity of Rats Are Eliminated by Hypothalamic Lesions. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1972;69(6):1583-1586.
121. Moore RY, Eichler VB. Loss of a circadian adrenal corticosterone rhythm following suprachiasmatic lesions in the rat. *Brain Res.* 1972;42(1):201-206.
122. Ralph MR, Menaker M. A mutation of the circadian system in golden hamsters. *Science.* 1988;241(4870):1225-1227. doi:10.1126/science.3413487
123. Ralph MR, Foster RG, Davis FC, Menaker M. Transplanted suprachiasmatic nucleus determines circadian period. *Science.* 1990;247(4945):975-978.

124. Reppert SM, Weaver DR. Coordination of circadian timing in mammals. *Nature*. 2002;418(6901):935-941. doi:10.1038/nature00965
125. Bae K, Jin X, Maywood ES, Hastings MH, Reppert SM, Weaver DR. Differential Functions of mPer1, mPer2, and mPer3 in the SCN Circadian Clock. *Neuron*. 2001;30(2):525-536. doi:10.1016/S0896-6273(01)00302-6
126. Gooley JJ, Saper CB. Anatomy of the Mammalian Circadian System. In: *Principles and Practice of Sleep Medicine*. Elsevier; 2005:335-350. <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B0721607977500355>. Accessed August 9, 2016.
127. Buijs RM, Wortel J, Hou Y-X. Colocalization of γ -aminobutyric acid with vasopressin, vasoactive intestinal peptide, and somatostatin in the rat suprachiasmatic nucleus. *J Comp Neurol*. 1995;358(3):343-352. doi:10.1002/cne.903580304
128. Snodgrass-Belt P, Gilbert JL, Davis FC. Central administration of transforming growth factor- α and neuregulin-1 suppress active behaviors and cause weight loss in hamsters. *Brain Res*. 2005;1038(2):171-182. doi:10.1016/j.brainres.2005.01.030
129. Cheng MY, Bullock CM, Li C, et al. Prokineticin 2 transmits the behavioural circadian rhythm of the suprachiasmatic nucleus. *Nature*. 2002;417(6887):405-410. doi:10.1038/417405a
130. Lerner AB, Case JD, Heinzelman RV. STRUCTURE OF MELATONIN₁. *J Am Chem Soc*. 1959;81(22):6084-6085. doi:10.1021/ja01531a060
131. Lynch HJ, Wurtman RJ, Moskowitz MA, Archer MC, Ho MH. Daily rhythm in human urinary melatonin. *Science*. 1975;187(4172):169-171.
132. Quay WB. CIRCADIAN AND ESTROUS RHYTHMS IN PINEAL MELATONIN AND 5-HYDROXY INDOLE-3-ACETIC ACID. *Proc Soc Exp Biol Med Soc Exp Biol Med N Y N*. 1964;115:710-713.
133. Mano H, Fukada Y. A Median Third Eye: Pineal Gland Retraces Evolution of Vertebrate Photoreceptive Organs†. *Photochem Photobiol*. 2007;83(1):11-18. doi:10.1562/2006-02-24-IR-813
134. Whitmore D, Foulkes NS, Sassone-Corsi P. Light acts directly on organs and cells in culture to set the vertebrate circadian clock. *Nature*. 2000;404(6773):87-91. doi:10.1038/35003589
135. Maronde E, Stehle JH. The mammalian pineal gland: known facts, unknown facets. *Trends Endocrinol Metab*. 2007;18(4):142-149. doi:10.1016/j.tem.2007.03.001
136. Tosini G, Doyle S, Geusz M, Menaker M. Induction of photosensitivity in neonatal rat pineal gland. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2000;97(21):11540-11544.

137. Foster RG, Provencio I, Hudson D, Fiske S, Grip WD, Menaker M. Circadian photoreception in the retinally degenerate mouse (rd/rd). *J Comp Physiol A*. 1991;169(1):39-50. doi:10.1007/BF00198171
138. Gooley JJ, Lu J, Chou TC, Scammell TE, Saper CB. Melanopsin in cells of origin of the retinohypothalamic tract. *Nat Neurosci*. 2001;4(12):1165-1165. doi:10.1038/nn768
139. Moore RY, Lenn NJ. A retinohypothalamic projection in the rat. *J Comp Neurol*. 1972;146(1):1-14. doi:10.1002/cne.901460102
140. Larsen PJ. Tracing autonomic innervation of the rat pineal gland using viral transneuronal tracing. *Microsc Res Tech*. 1999;46(4-5):296-304. doi:10.1002/(SICI)1097-0029(19990815/01)46:4/5<296::AID-JEMT6>3.0.CO;2-C
141. Gastel JA, Roseboom PH, Rinaldi PA, Weller JL, Klein DC. Melatonin Production: Proteasomal Proteolysis in Serotonin N-Acetyltransferase Regulation. *Science*. 1998;279(5355):1358-1360. doi:10.1126/science.279.5355.1358
142. Korf HW, Schomerus C, Stehle JH. The pineal organ, its hormone melatonin, and the photoneuroendocrine system. *Adv Anat Embryol Cell Biol*. 1998;146:1-100.
143. Scharrer E. Photo-Neuro-Endocrine Systems: General Concepts. *Ann N Y Acad Sci*. 1964;117(1):13-22. doi:10.1111/j.1749-6632.1964.tb48155.x
144. Stehle J, Vanecek J, Vollrath L. Effects of melatonin on spontaneous electrical activity of neurons in rat suprachiasmatic nuclei: an in vitro iontophoretic study. *J Neural Transm*. 1989;78(2):173-177.
145. von Gall C, Weaver DR, Kock M, Korf H-W, Stehle JH. Melatonin limits transcriptional impact of phosphoCREB in the mouse SCN via the Mel1a receptor. [Miscellaneous Article]. *Neuroreport June 26 2000*. 2000;11(9):1803-1807.
146. Redman J, Armstrong S, Ng KT. Free-running activity rhythms in the rat: entrainment by melatonin. *Science*. 1983;219(4588):1089-1091.
147. Sack RL, Brandes RW, Kendall AR, Lewy AJ. Entrainment of Free-Running Circadian Rhythms by Melatonin in Blind People. *N Engl J Med*. 2000;343(15):1070-1077. doi:10.1056/NEJM200010123431503
148. Arendt J, Skene DJ. Melatonin as a chronobiotic. *Sleep Med Rev*. 2005;9(1):25-39. doi:10.1016/j.smr.2004.05.002
149. Benloucif S, Dubocovich ML. Melatonin and Light Induce Phase Shifts of Circadian Activity Rhythms in the C3H/HeN Mouse. *J Biol Rhythms*. 1996;11(2):113-125. doi:10.1177/074873049601100204
150. Buscemi N, Vandermeer B, Hooton N, et al. Efficacy and safety of exogenous melatonin for secondary sleep disorders and sleep disorders accompanying sleep restriction: meta-analysis. *BMJ*. 2006;332(7538):385-393. doi:10.1136/bmj.38731.532766.F6

151. Herxheimer A, Petrie KJ. Melatonin for the prevention and treatment of jet lag. In: *Cochrane Database of Systematic Reviews*. John Wiley & Sons, Ltd; 2002. <http://onlinelibrary.wiley.com.proxy.ub.uni-frankfurt.de/doi/10.1002/14651858.CD001520/abstract>. Accessed August 29, 2015.
152. Sugden D. Psychopharmacological effects of melatonin in mouse and rat. *J Pharmacol Exp Ther*. 1983;227(3):587-591.
153. Lieberman HR, Waldhauser F, Garfield G, Lynch HJ, Wurtman RJ. Effects of melatonin on human mood and performance. *Brain Res*. 1984;323(2):201-207. doi:10.1016/0006-8993(84)90290-7
154. Lewy AJ, Ahmed S, Jackson JM, Sack RL. Melatonin shifts human circadian rhythms according to a phase-response curve. *Chronobiol Int*. 1992;9(5):380-392.
155. Klein DC. Evidence for the Placental Transfer of 3H-Acetyl-Melatonin. *Nature*. 1972;237(73):117-118. doi:10.1038/10.1038/newbio237117a0
156. Davis FC, Mannion J. Entrainment of hamster pup circadian rhythms by prenatal melatonin injections to the mother. *Am J Physiol*. 1988;255(3 Pt 2):R439-448.
157. Honnebier MB, Nathanielsz PW. Primate parturition and the role of the maternal circadian system. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*. 1994;55(3):193-203.
158. Stehle JH, Saade A, Rawashdeh O, et al. A survey of molecular details in the human pineal gland in the light of phylogeny, structure, function and chronobiological diseases. *J Pineal Res*. 2011;51(1):17-43. doi:10.1111/j.1600-079X.2011.00856.x
159. Carlberg C. Gene regulation by melatonin. *Ann N Y Acad Sci*. 2000;917:387-396.
160. Carlberg C, Wiesenberg I. The orphan receptor family RZR/ROR, melatonin and 5-lipoxygenase: an unexpected relationship. *J Pineal Res*. 1995;18(4):171-178.
161. Poeggeler B, Reiter RJ, Tan D-X, Chen L-D, Manchester LC. Melatonin, hydroxyl radical-mediated oxidative damage, and aging: A hypothesis. *J Pineal Res*. 1993;14(4):151-168. doi:10.1111/j.1600-079X.1993.tb00498.x
162. Reiter RJ. The pineal and its hormones in the control of reproduction in mammals. *Endocr Rev*. 1980;1(2):109-131. doi:10.1210/edrv-1-2-109
163. Korkmaz A, Topal T, Tan D-X, Reiter RJ. Role of melatonin in metabolic regulation. *Rev Endocr Metab Disord*. 2009;10(4):261-270. doi:10.1007/s11154-009-9117-5
164. Peschke E, Stumpf I, Bazwinsky I, Litvak L, Dralle H, Mühlbauer E. Melatonin and type 2 diabetes – a possible link?*. *J Pineal Res*. 2007;42(4):350-358. doi:10.1111/j.1600-079X.2007.00426.x

165. Bonnefond A, Clément N, Fawcett K, et al. Rare MTNR1B variants impairing melatonin receptor 1B function contribute to type 2 diabetes. *Nat Genet.* 2012;44(3):297-301. doi:10.1038/ng.1053
166. Chaste P, Clement N, Botros HG, et al. Genetic variations of the melatonin pathway in patients with attention-deficit and hyperactivity disorders. *J Pineal Res.* 2011;51(4):394-399. doi:10.1111/j.1600-079X.2011.00902.x
167. Melke J, Goubran Botros H, Chaste P, et al. Abnormal melatonin synthesis in autism spectrum disorders. *Mol Psychiatry.* 2007;13(1):90-98. doi:10.1038/sj.mp.4002016
168. Sánchez-Barceló EJ, Cos S, Fernández R, Mediavilla MD. Melatonin and mammary cancer: a short review. *Endocr Relat Cancer.* 2003;10(2):153-159. doi:10.1677/erc.0.0100153
169. Koppiseti S, Jenigiri B, Terron MP, et al. Reactive Oxygen Species and the Hypomotility of the Gall Bladder as Targets for the Treatment of Gallstones with Melatonin: A Review. *Dig Dis Sci.* 2008;53(10):2592-2603. doi:10.1007/s10620-007-0195-5
170. Miroddi M, Bruno R, Galletti F, et al. Clinical pharmacology of melatonin in the treatment of tinnitus: a review. *Eur J Clin Pharmacol.* 2015;71(3):263-270. doi:10.1007/s00228-015-1805-3
171. Cardinali DP. Melatonin. A mammalian pineal hormone. *Endocr Rev.* 1981;2(3):327-346. doi:10.1210/edrv-2-3-327
172. Dubocovich ML, Delagrange P, Krause DN, Sugden D, Cardinali DP, Olcese J. International Union of Basic and Clinical Pharmacology. LXXV. Nomenclature, Classification, and Pharmacology of G Protein-Coupled Melatonin Receptors. *Pharmacol Rev.* 2010;62(3):343-380. doi:10.1124/pr.110.002832
173. Carlson LL, Weaver DR, Reppert SM. Melatonin Signal Transduction in Hamster Brain: Inhibition of Adenylyl Cyclase by a Pertussis Toxin- Sensitive G Protein. *Endocrinology.* 1989;125(5):2670-2676. doi:10.1210/endo-125-5-2670
174. Ebisawa T, Karne S, Lerner MR, Reppert SM. Expression cloning of a high-affinity melatonin receptor from *Xenopus* dermal melanophores. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1994;91(13):6133-6137.
175. Dufourny L, Levasseur A, Migaud M, et al. GPR50 is the mammalian ortholog of Mel1c: Evidence of rapid evolution in mammals. *BMC Evol Biol.* 2008;8:105. doi:10.1186/1471-2148-8-105
176. Reppert SM, Godson C, Mahle CD, Weaver DR, Slaugenhaupt SA, Gusella JF. Molecular characterization of a second melatonin receptor expressed in human retina and brain: the Mel1b melatonin receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1995;92(19):8734-8738.

177. Reppert SM, Weaver DR, Ebisawa T. Cloning and characterization of a mammalian melatonin receptor that mediates reproductive and circadian responses. *Neuron*. 1994;13(5):1177-1185. doi:10.1016/0896-6273(94)90055-8
178. Roca AL, Godson C, Weaver DR, Reppert SM. Structure, characterization, and expression of the gene encoding the mouse Mel1a melatonin receptor. *Endocrinology*. 1996;137(8):3469-3477. doi:10.1210/en.137.8.3469
179. Liu C, Weaver DR, Jin X, et al. Molecular Dissection of Two Distinct Actions of Melatonin on the Suprachiasmatic Circadian Clock. *Neuron*. 1997;19(1):91-102. doi:10.1016/S0896-6273(00)80350-5
180. Weaver DR, Liu C, Reppert SM. Nature's knockout: the Mel1b receptor is not necessary for reproductive and circadian responses to melatonin in Siberian hamsters. *Mol Endocrinol Baltim Md*. 1996;10(11):1478-1487. doi:10.1210/mend.10.11.8923472
181. Wang LM, Suthana NA, Chaudhury D, Weaver DR, Colwell CS. Melatonin inhibits hippocampal long-term potentiation. *Eur J Neurosci*. 2005;22(9):2231-2237. doi:10.1111/j.1460-9568.2005.04408.x
182. Nosjean O, Ferro M, Cogé F, et al. Identification of the Melatonin-binding SiteMT 3 as the Quinone Reductase 2. *J Biol Chem*. 2000;275(40):31311-31317. doi:10.1074/jbc.M005141200
183. Belvin MP, Zhou H, Yin JCP. The Drosophila dCREB2 Gene Affects the Circadian Clock. *Neuron*. 1999;22(4):777-787. doi:10.1016/S0896-6273(00)80736-9
184. Gerstner JR, Yin JCP. Circadian rhythms and memory formation. *Nat Rev Neurosci*. 2010;11(8):577-588. doi:10.1038/nrn2881
185. Jilg A, Lesny S, Peruzki N, et al. Temporal dynamics of mouse hippocampal clock gene expression support memory processing. *Hippocampus*. 2010;20(3):377-388. doi:10.1002/hipo.20637
186. Eckel-Mahan KL, Phan T, Han S, et al. Circadian oscillation of hippocampal MAPK activity and cAMP: implications for memory persistence. *Nat Neurosci*. 2008;11(9):1074-1082.
187. Ruby NF, Hwang CE, Wessells C, et al. Hippocampal-dependent learning requires a functional circadian system. *Proc Natl Acad Sci*. 2008;105(40):15593-15598. doi:10.1073/pnas.0808259105
188. Fekete M, van Ree JM, Niesink RJ, de Wied D. Disrupting circadian rhythms in rats induces retrograde amnesia. *Physiol Behav*. 1985;34(6):883-887.
189. Devan BD, Goad EH, Petri HL, et al. Circadian Phase-Shifted Rats Show Normal Acquisition but Impaired Long-Term Retention of Place Information in the Water Task. *Neurobiol Learn Mem*. 2001;75(1):51-62. doi:10.1006/nlme.1999.3957

190. Chaudhury D, Colwell CS. Circadian modulation of learning and memory in fear-conditioned mice. *Behav Brain Res.* 2002;133(1):95-108. doi:10.1016/S0166-4328(01)00471-5
191. Lyons LC, Rawashdeh O, Katzoff A, Susswein AJ, Eskin A. Circadian modulation of complex learning in diurnal and nocturnal *Aplysia*. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2005;102(35):12589-12594. doi:10.1073/pnas.0503847102
192. Rawashdeh O, Borsetti NH de, Roman G, Cahill GM. Melatonin Suppresses Nighttime Memory Formation in Zebrafish. *Science.* 2007;318(5853):1144-1146. doi:10.1126/science.1148564
193. Yang Z, Li C, Huang F. Melatonin impaired acquisition but not expression of contextual fear in rats. *Neurosci Lett.* 2013;552:10-14. doi:10.1016/j.neulet.2013.07.025
194. El-Sherif Y, Tesoriero J, Hogan M v., Wieraszko A. Melatonin regulates neuronal plasticity in the hippocampus. *J Neurosci Res.* 2003;72(4):454-460. doi:10.1002/jnr.10605
195. Hogan M v., El-Sherif Y, Wieraszko A. The modulation of neuronal activity by melatonin: In vitro studies on mouse hippocampal slices. *J Pineal Res.* 2001;30(2):87-96. doi:10.1034/j.1600-079X.2001.300204.x
196. Sharif R, Aghsami M, Gharghabi M, et al. Melatonin reverses H-89 induced spatial memory deficit: Involvement of oxidative stress and mitochondrial function. *Behav Brain Res.* 2017;316:115-124. doi:10.1016/j.bbr.2016.08.040
197. Larson J, Jessen RE, Uz T, et al. Impaired hippocampal long-term potentiation in melatonin MT2 receptor-deficient mice. *Neurosci Lett.* 2006;393(1):23-26. doi:10.1016/j.neulet.2005.09.040
198. Sanada K, Okano T, Fukada Y. Mitogen-activated Protein Kinase Phosphorylates and Negatively Regulates Basic Helix-Loop-Helix-PAS Transcription Factor BMAL1. *J Biol Chem.* 2002;277(1):267-271. doi:10.1074/jbc.M107850200
199. Eckel-Mahan KL, Storm DR. Circadian rhythms and memory: not so simple as cogs and gears. *EMBO Rep.* 2009;10(6):584-591. doi:10.1038/embor.2009.123
200. Crusio WE, Schwegler H. Learning spatial orientation tasks in the radial-maze and structural variation in the hippocampus in inbred mice. *Behav Brain Funct BBF.* 2005;1:3. doi:10.1186/1744-9081-1-3
201. Morris R. Developments of a water-maze procedure for studying spatial learning in the rat. *J Neurosci Methods.* 1984;11(1):47-60. doi:10.1016/0165-0270(84)90007-4
202. Gerlai RT, McNamara A, Williams S, Phillips HS. Hippocampal dysfunction and behavioral deficit in the water maze in mice: An unresolved issue? *Brain Res Bull.* 2002;57(1):3-9. doi:10.1016/S0361-9230(01)00630-X

203. Hall CS. Emotional behavior in the rat. I. Defecation and urination as measures of individual differences in emotionality. *J Comp Psychol.* 1934;18(3):385-403. doi:10.1037/h0071444
204. Ennaceur A. Tests of unconditioned anxiety — Pitfalls and disappointments. *Physiol Behav.* 2014;135:55-71. doi:10.1016/j.physbeh.2014.05.032
205. Stanford SC. The Open Field Test: reinventing the wheel. *J Psychopharmacol (Oxf).* 2007;21(2):134-135. doi:10.1177/0269881107073199
206. Walsh RN, Cummins RA. The Open-Field Test: a critical review. *Psychol Bull.* 1976;83(3):482-504.
207. Jin X, Gall C von, Pieschl RL, et al. Targeted Disruption of the Mouse Mel1b Melatonin Receptor. *Mol Cell Biol.* 2003;23(3):1054-1060. doi:10.1128/MCB.23.3.1054-1060.2003
208. Pfeffer M, Rauch A, Korf H-W, von Gall C. The endogenous melatonin (MT) signal facilitates reentrainment of the circadian system to light-induced phase advances by acting upon MT2 receptors. *Chronobiol Int.* 2012;29(4):415-429. doi:10.3109/07420528.2012.667859
209. Ebihara S, Marks T, Hudson DJ, Menaker M. Genetic control of melatonin synthesis in the pineal gland of the mouse. *Science.* 1986;231(4737):491-493.
210. Goto M, Oshima I, Tomita T, Ebihara S. Melatonin Content of the Pineal Gland in Different Mouse Strains. *J Pineal Res.* 1989;7(2):195–204. doi:10.1111/j.1600-079X.1989.tb00667.x
211. Castillo C, Molyneux P, Carlson R, Harrington ME. Restricted wheel access following a light cycle inversion slows re-entrainment without internal desynchrony as measured in Per2Luc mice. *Neuroscience.* 2011;182:169-176. doi:10.1016/j.neuroscience.2011.02.003
212. Schwegler H, Crusio WE, Brust I. Hippocampal mossy fibers and radial-maze learning in the mouse: A correlation with spatial working memory but not with non-spatial reference memory. *Neuroscience.* 1990;34(2):293-298. doi:10.1016/0306-4522(90)90139-U
213. Deller T, Korte M, Chabanis S, et al. Synaptopodin-deficient mice lack a spine apparatus and show deficits in synaptic plasticity. *Proc Natl Acad Sci.* 2003;100(18):10494-10499. doi:10.1073/pnas.1832384100
214. Vivien-Roels B, Malan A, Rettori M-C, Delagrangé P, Jeannot J-P, Pévet P. Daily Variations in Pineal Melatonin Concentrations in Inbred and Outbred Mice. *J Biol Rhythms.* 1998;13(5):403-409. doi:10.1177/074873098129000228
215. Maronde E, Pfeffer M, von Gall C, et al. Signal transduction in the rodent pineal organ. From the membrane to the nucleus. *Adv Exp Med Biol.* 1999;460:109-131.

216. Laird PW, Zijderveld A, Linders K, Rudnicki MA, Jaenisch R, Berns A. Simplified mammalian DNA isolation procedure. *Nucleic Acids Res.* 1991;19(15):4293-4293. doi:10.1093/nar/19.15.4293
217. Mullis KB, Faloona FA. Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. In: Ray Wu, ed. *Methods in Enzymology*. Vol Volume 155. Recombinant DNA Part F. Academic Press; 1987:335-350. <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0076687987550236>. Accessed November 12, 2013.
218. Saiki RK, Gelfand DH, Stoffel S, et al. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science*. 1988;239(4839):487-491. doi:10.1126/science.2448875
219. Shapiro AL, Viñuela E, V. Maizel Jr. J. Molecular weight estimation of polypeptide chains by electrophoresis in SDS-polyacrylamide gels. *Biochem Biophys Res Commun.* 1967;28(5):815-820. doi:10.1016/0006-291X(67)90391-9
220. Towbin H, Staehelin T, Gordon J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci.* 1979;76(9):4350-4354.
221. Burnette WN. "Western Blotting": Electrophoretic transfer of proteins from sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gels to unmodified nitrocellulose and radiographic detection with antibody and radioiodinated protein A. *Anal Biochem.* 1981;112(2):195-203. doi:10.1016/0003-2697(81)90281-5
222. White EH, Roswell DF. Chemiluminescence of organic hydrazides. *Acc Chem Res.* 1970;3(2):54-62. doi:10.1021/ar50026a003
223. Gassmann M, Grenacher B, Rohde B, Vogel J. Quantifying Western blots: Pitfalls of densitometry. *ELECTROPHORESIS.* 2009;30(11):1845–1855. doi:10.1002/elps.200800720
224. Miller L. Analyzing gels and western blots with ImageJ. <http://lukemiller.org/index.php/2010/11/analyzing-gels-and-western-blots-with-image-j/>. Published November 4, 2010. Accessed December 6, 2013.
225. Gerstner JR, Lyons LC, Wright KP, et al. Cycling Behavior and Memory Formation. *J Neurosci.* 2009;29(41):12824-12830. doi:10.1523/JNEUROSCI.3353-09.2009
226. Jilg A, Bechstein P, Saade A, et al. Melatonin modulates daytime-dependent synaptic plasticity and learning efficiency. *J Pineal Res.* 2019;66(3):e12553. doi:10.1111/jpi.12553
227. Stehle JH, Gall C von, Korf H-W. Organisation of the circadian system in melatonin-proficient C3H and melatonin-deficient C57BL mice: a comparative investigation. *Cell Tissue Res.* 2002;309(1):173-182. doi:10.1007/s00441-002-0583-2

228. Rawashdeh O, Maronde E. The hormonal Zeitgeber melatonin: role as a circadian modulator in memory processing. *Front Mol Neurosci.* 2012;5. doi:10.3389/fnmol.2012.00027
229. Phan TH, Chan GC-K, Sindreu CB, Eckel-Mahan KL, Storm DR. The Diurnal Oscillation of MAP (Mitogen-Activated Protein) Kinase and Adenylyl Cyclase Activities in the Hippocampus Depends on the Suprachiasmatic Nucleus. *J Neurosci.* 2011;31(29):10640-10647. doi:10.1523/JNEUROSCI.6535-10.2011
230. Cheung P, Allis CD, Sassone-Corsi P. Signaling to Chromatin through Histone Modifications. *Cell.* 2000;103(2):263-271. doi:10.1016/S0092-8674(00)00118-5
231. Kang H, Sun LD, Atkins CM, Soderling TR, Wilson MA, Tonegawa S. An Important Role of Neural Activity-Dependent CaMKIV Signaling in the Consolidation of Long-Term Memory. *Cell.* 2001;106(6):771-783. doi:10.1016/S0092-8674(01)00497-4
232. Sakai T, Tamura T, Kitamoto T, Kidokoro Y. A clock gene, period, plays a key role in long-term memory formation in *Drosophila*. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2004;101(45):16058. doi:10.1073/pnas.0401472101
233. McArthur AJ, Hunt AE, Gillette MU. Melatonin Action and Signal Transduction in the Rat Suprachiasmatic Circadian Clock: Activation of Protein Kinase C at Dusk and Dawn¹. *Endocrinology.* 1997;138(2):627-634. doi:10.1210/endo.138.2.4925
234. Nguyen PV, Woo NH. Regulation of hippocampal synaptic plasticity by cyclic AMP-dependent protein kinases. *Prog Neurobiol.* 2003;71(6):401-437. doi:10.1016/j.pneurobio.2003.12.003
235. Sung J-Y, Bae J-H, Lee J-H, et al. The Melatonin Signaling Pathway in a Long-Term Memory In Vitro Study. *Molecules.* 2018;23(4):737. doi:10.3390/molecules23040737
236. Hardeland R, Cardinali DP, Srinivasan V, Spence DW, Brown GM, Pandi-Perumal SR. Melatonin—A pleiotropic, orchestrating regulator molecule. *Prog Neurobiol.* 2011;93(3):350-384. doi:10.1016/j.pneurobio.2010.12.004
237. Jilg A, Bechstein P, Saade A, et al. Melatonin modulates daytime-dependent synaptic plasticity and learning efficiency. *J Pineal Res.* 2019;66(3):e12553. doi:10.1111/jpi.12553
238. Takahashi Y, Sawa K, Okada T. The diurnal variation of performance of the novel location recognition task in male rats. *Behav Brain Res.* 2013;256(Supplement C):488-493. doi:10.1016/j.bbr.2013.08.040
239. O'Neal-Moffitt G, Pilli J, Kumar SS, Olcese J. Genetic deletion of MT1/MT2 melatonin receptors enhances murine cognitive and motor performance. *Neuroscience.* 2014;277:506-521. doi:10.1016/j.neuroscience.2014.07.018

240. Gall C von, Garabette ML, Kell CA, et al. Rhythmic gene expression in pituitary depends on heterologous sensitization by the neurohormone melatonin. *Nat Neurosci.* 2002;5(3):234-238. doi:10.1038/nn806
241. Rasmussen DD, Boldt BM, Wilkinson CW, Yellon SM, Matsumoto AM. Daily melatonin administration at middle age suppresses male rat visceral fat, plasma leptin, and plasma insulin to youthful levels. *Endocrinology.* 1999;140(2):1009-1012. doi:10.1210/endo.140.2.6674
242. Weinert D, Waterhouse J. Daily Activity and Body Temperature Rhythms Do Not Change Simultaneously With Age in Laboratory Mice. *Physiol Behav.* 1999;66(4):605-612. doi:10.1016/S0031-9384(98)00342-4
243. Comai S, Gobbi G. Unveiling the role of melatonin MT2 receptors in sleep, anxiety and other neuropsychiatric diseases: a novel target in psychopharmacology. *J Psychiatry Neurosci.* 2014;39(1):6-21. doi:10.1503/jpn.130009
244. Crupi R, Mazzon E, Marino A, et al. Melatonin treatment mimics the antidepressant action in chronic corticosterone-treated mice: Antidepressant effect of melatonin in mice. *J Pineal Res.* May 2010:no-no. doi:10.1111/j.1600-079X.2010.00775.x
245. Vilches N, Spichiger C, Mendez N, et al. Gestational Chronodisruption Impairs Hippocampal Expression of NMDA Receptor Subunits Grin1b/Grin3a and Spatial Memory in the Adult Offspring. *PLoS ONE.* 2014;9(3). doi:10.1371/journal.pone.0091313
246. Yamaguchi S, Mitsui S, Miyake S, et al. The 5' upstream region of mPer1 gene contains two promoters and is responsible for circadian oscillation. *Curr Biol.* 2000;10(14):873-876. doi:10.1016/S0960-9822(00)00602-3
247. Wardlaw SM, Phan TX, Saraf A, Chen X, Storm DR. Genetic disruption of the core circadian clock impairs hippocampus-dependent memory. *Learn Mem.* 2014;21(8):417-423. doi:10.1101/lm.035451.114
248. Shrestha TC, Šuchmanová K, Houdek P, Sumová A, Ralph MR. Implicit time-place conditioning alters Per2 mRNA expression selectively in striatum without shifting its circadian clocks. *Sci Rep.* 2018;8. doi:10.1038/s41598-018-33637-y

7. Schriftliche Erklärung

Ich erkläre ehrenwörtlich, dass ich die dem Fachbereich Medizin der Johann Wolfgang Goethe-Universität Frankfurt am Main zur Promotionsprüfung eingereichte Dissertation mit dem Titel

Einfluss von Melatonin auf das hippocampale Lernen bei der Maus

in dem Institut für Anatomie III (Zelluläre und molekulare Anatomie), Johann Wolfgang Goethe-Universität, Frankfurt am Main unter Betreuung von Prof. Dr. Jörg H. Stehle mit Unterstützung durch Antje Ried ohne sonstige Hilfe selbst durchgeführt und bei der Abfassung der Arbeit keine anderen als die in der Dissertation angeführten Hilfsmittel benutzt habe. Darüber hinaus versichere ich, nicht die Hilfe einer kommerziellen Promotionsvermittlung in Anspruch genommen zu haben.

Ich habe bisher an keiner in- oder ausländischen Universität Gesuch um Zulassung zur Promotion eingereicht. Die vorliegende Arbeit wurde bisher nicht als Dissertation eingereicht.

Vorliegende Ergebnisse wurden in folgendem Publikationsorgan veröffentlicht:

1. Rawashdeh, Oliver; Jilg, Antje; Jedlicka, Peter; Slawska, Jolanta; Thomas, Lukas; Saade, Anastasia; Schwarzacher, Stephan W.; Stehle, Jörg H.:
PERIOD1 coordinates hippocampal rhythms and memory processing with day-time
Hippocampus, Band 24, Seiten 712 – 723, 2014

Frankfurt am Main, 07.07.2020

Lukas B. Thoma