

**Die Rolle der Proteinkinase C
bei der Bildung von Langzeitgedächtnis:
Interaktion der PKC mit Ankerproteinen im
Pilzkörper der Honigbiene *Apis mellifera***

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Titels Dr. rer. nat.
vorgelegt von
Ulf Thomas

Freien Universität Berlin
Fachbereich der Biologie Chemie und Pharmazie
Institut für Neurobiologie

September 2002

Die vorliegende Arbeit wurde am Institut für Neurobiologie des Fachbereichs Biologie, Chemie und Pharmazie der Freien Universität Berlin in der Arbeitsgruppe von Herrn Prof. Dr. Randolph Menzel angefertigt.

1. Gutachter: PD Dr. Uli Müller
2. Gutachter: Prof.Dr. R. Menzel

Tag der Disputation: 11.11.2002

1. Einleitung.....	6
1.1 Lernen und neuronale Plastizität.....	6
1.1.1 Nicht-assoziative und assoziative Lernformen.....	6
1.1.2 Modellsysteme für die Untersuchung von Lern- und Gedächtnisphasen.....	8
1.1.3 Molekulare Mechanismen von Lernen und Gedächtnis.....	12
1.2 Protein Kinase C.....	15
1.2.1 Die PKC-Familie: Einteilung und Aktivatoren....	15
1.2.2 Aktivierungsmechanismen der PKC.....	16
1.2.3 Substrate und Funktionen von neuronaler PKC.....	17
1.3 Ziel dieser Arbeit.....	18
2. Material und Methoden.....	20
2.1 Methoden.....	20
2.1.1 Vorbereitung der Versuchstiere.....	20
2.1.1.1 Habituation und Dishabituation.....	20
2.1.1.2 Sensibilisierung.....	21
2.1.1.3 Olfaktorische Konditionierung.....	21
2.1.1.4 Injektion der Pharmaka.....	21
2.1.2 Immunchemische und immunhistologische Techniken.....	22
2.1.2.1 Präparation der Pilzkörper.....	22
2.1.2.2 Immunhistologie.....	23
2.1.2.3 Proteinquantifizierung mittels ELISA-Technik (Enzyme linked sorbent assay)	24
2.1.2.4 Westernblot.....	25
2.1.2.5 Immunpräzipitation.....	26
2.1.3 Bestimmung der Proteinkinase-Aktivität.....	27
2.1.4 Diskontinuierliche Gelelektrophorese.....	29
2.2 Material.....	30
2.2.1 Puffer und Lösungen.....	30
2.2.2 Chemikalien.....	32
2.2.3 Antikörper und Enzyme.....	33
2.2.4 Verbrauchsmaterialien.....	34

2.2.4	Geräte.....	34
3.	Ergebnisse	35
3.1	Etablierung von Methoden zur Messung und Inhibition von PKC- und PKM-Aktivität.....	35
3.1.1	Die PKC-Gesamtaktivität kann nicht auf die PKC-Isoformen unterteilt werden.....	35
3.1.2	Eine Methode zur Differenzierung von PKC und PKM-Aktivität.....	37
3.1.3	Bestimmung eines spezifischen PKC-Inhibitors.....	38
3.1.4	Bestimmung eines PKM-Inhibitors.....	40
3.2	Inhibition der PKC-Aktivität während nicht assoziativer Lernprozessen.....	42
3.2.1	Habituation.....	42
3.2.2	Sensibilisierung.....	42
3.3	Inhibition der PKC-Aktivität während und nach assoziativen Lernprozessen.....	43
3.3.1	Inhibition der PKC-Aktivität während der olfaktorischen Konditionierung.....	44
3.3.2	Inhibition der PKC-Aktivität bei der Gedächtnisbildung.....	45
3.4	Wird die Reduktion im Gedächtnis durch die Inhibition der PKC- oder der PKM-Aktivität verursacht?.....	47
3.5	Quantifizierung der PKC nach assoziativem Lernen.....	48
3.5.1	Eine Stunde nach dem Training wird weniger membrangebundene PKC detektiert.....	48
3.5.2	Die Inhibition der PKC-Aktivität verhindert die Reduktion der membrangebundenen PKC.....	51
3.5.3	Hinweise auf Komplexbildung durch Aufarbeitung mit Harnstoff und Trypsin.....	52
3.6	Direkter Nachweis von PKC-Proteinkomplexen.....	55
3.7	Nachweis der PKC-Komplexbildung nach der olfaktorischen Konditionierung.....	58
3.8	Identifikation eines PKC Bindeproteins.....	60

3.8.1	Charakterisierung eines RACK1-Antikörpers.....	60
3.8.2	Immunhistologische Untersuchung der RACK1 Verteilung im Bienenhirn.....	62
3.8.3	RACK1 bindet in den Kenyonzellen der Biene nur an aktive PKC.....	64
4.	Diskussion.....	66
4.1	Untersuchungen zur Spezifität von PKC-Inhibitoren	66
4.2	Quantifizierung der PKC mit Hilfe eines Antikörpers.....	67
4.3	Nicht assoziatives Lernen wird durch die Inhibition der PKC-Aktivität nicht beeinflusst.....	68
4.4	PKC ist notwendig für das Langzeitgedächtnis von assoziativen Lernformen.....	69
4.5	Mechanismen der PKC Modulation bei plastischen Prozessen.....	72
4.6	PKC Bindeproteine und ihre Funktion.....	73
4.7	Hinweise für eine Interaktion der PKC mit Ankerproteinen bei der Gedächtnisbildung.....	76
4.8	Lerninduzierte Veränderungen der PKC im Gehirn der Honigbiene.....	77
4.9	Mögliche Funktionen der PKC Komplexbildung für die Etablierung von Langzeitgedächtnis.....	79
5.	Zusammenfassung.....	82
6.	Literatur.....	84
	Liste der verwendeten Abkürzungen.....	98
	Lebenslauf.....	99
	Danksagung.....	101