

4 Diskussion

Das Ziel dieser Arbeit bestand darin, die Rolle von PKC bei olfaktorischen Lernprozessen zu untersuchen. Zum ersten Mal wurde gezeigt, dass die Inhibition der PKC in einem Zeitfenster von 1-2 Stunden nach dem Training zu einer signifikanten Reduktion in der Gedächtnisbildung führt. In diesem Zeitfenster wurden lern-induzierte Veränderungen der PKC im Pilzkörper beobachtet und auf molekularer Ebene untersucht. Die Analysen zeigten, dass die aktivierte PKC im Pilzkörper mit anderen Proteinen interagiert. Als ein möglicher Interaktionspartner der PKC konnte ein RACK1 ähnliches Protein identifiziert werden, das vor allem im Pilzkörper exprimiert wird. Dies deutet erstmals auf eine Beteiligung von PKC-Bindeproteinen bei der Bildung von Langzeitgedächtnis hin.

4.1 Untersuchungen zur Spezifität von PKC Inhibitoren

Um die Funktion von Proteinen in Signalkaskaden und bei physiologischen Prozessen zu untersuchen, werden entweder genetische oder pharmakologische Methoden benutzt. In genetischen Analysen wird das Gen des untersuchten Proteins inaktiviert oder ausgetauscht. In pharmakologischen Experimenten erfolgt die Untersuchung von Proteinen durch spezifische Aktivatoren bzw. Inhibitoren. Da genetische Methoden für diese Arbeit nicht zur Verfügung standen, musste zunächst durch *in vitro* Versuche ein Inhibitor gefunden werden, der spezifisch nur die Proteinkinase C inhibiert. Von den vier kommerziell erworbenen PKC-Inhibitoren zeigte das PKC Inhibitor Peptid 19-31 überhaupt keine Wirkung, während Gö 7874 neben der PKC-Aktivität im gleichen Maß die Aktivität der PKA inhibierte. Mit dem Inhibitor Bisindolylmaleimid Hydrochlorid wurden die besten Ergebnisse erzielt. Im Bienenhirn wurde die Aktivität der PKC und des konstitutiv aktiven Fragments PKM durch Bisindolylmaleimid bei einer Konzentration von 0,2 μM spezifisch inhibiert.

In anderen Studien konnte für verschiedene Zelllinien bereits gezeigt werden, dass Bisindolylmaleimid durch das Binden an die ATP-Bindestelle die Aktivität der PKC inhibiert, und dass neben der Ca^{2+} -abhängigen PKC auch die Ca^{2+} -unabhängige PKC in gleichem Maße inhibiert wird (Toullec et al., 1991; Le Panse, 1994).

Leider war es nicht möglich, zwischen einzelnen PKC-Isoformen zu differenzieren und Inhibitoren auszuwählen, die nur spezifisch einzelne PKC-Isoformen hemmen.

Allerdings war es möglich, neben der Aktivität von PKC auch die Aktivität der konstitutiv aktiven PKM zu messen, und somit einen spezifischen Inhibitor für PKM zu ermitteln. Durch das Alkaloid Chelerythrin wurde *in vitro* nur die PKM inhibiert. Durch eine Konzentration von 30 μM Chelerythrin wurde die Aktivität der PKM fast vollständig blockiert. Die Aktivität der PKC wurde durch diesen Inhibitor nicht beeinflusst. Aus anderen Arbeiten ist bekannt, dass Chelerythrin in niedrigen Konzentrationen das katalytische Fragment PKM inhibiert und erst bei höheren Konzentrationen ebenfalls die PKC (Ling et al., 2002). Mit den Inhibitoren Bisindolylmaleimid Hydrochlorid und Chelerythrin war es somit möglich, die Aktivität der Proteinkinase C und des katalytischen Fragments PKM zu inhibieren und die daraus resultierenden Veränderungen eindeutig einer der beiden Kinasen zuzuordnen.

Der Befund, dass Chelerythrin und Bisindolylmaleimid Hydrochlorid *in vitro* Experimenten unterschiedliche Wirkung zeigten, konnte auch *in vivo* Experimenten beobachtet werden. Die Inhibition der PKM durch Chelerythrin eine Stunde nach der dreifachen Konditionierung führt nicht zu den gleichen Verhaltensänderungen wie die Inhibition der PKC durch Bisindolylmaleimid Hydrochlorid. Daher gehe ich davon aus, dass die Funktion und die Spezifität der Inhibitoren in den *in vivo* und den *in vitro* Experimenten gleich oder ähnlich ist, und dass die gewählte Inhibitorkonzentration für die Verhaltensexperimente von 10 μM nicht zu groß war.

4.2 Quantifizierung der PKC mit Hilfe eines Antikörpers

Um die aktivitätsabhängige Translokation der PKC nachzuweisen, erfolgte der PKC Nachweis mit Hilfe eines Antikörpers. Sowohl die inaktive, im Cytosol vorkommende PKC als auch die aktive, membrangebundene PKC wurde quantifiziert. Dabei zeigte sich, dass eine Stunde nach der dreifachen Konditionierung weniger membrangebundene PKC detektiert wurde als in den Kontrollen, was auf eine Abnahme der PKC-Aktivität hindeutete. Dies stand im Widerspruch zu den Ergebnissen aus den Verhaltensversuchen, die gezeigt haben, dass die Gedächtnisbildung zu eben diesem Zeitpunkt PKC-Aktivität benötigt. Weitere Untersuchungen mit Proteasen und Harnstoff zeigten, dass es sich nicht um eine Abnahme der PKC-Menge, sondern um eine Maskierung der Antikörperbindestelle durch Protein-Protein Interaktionen zwischen PKC und einem oder mehreren Bindeproteinen handelte (Abb. 17).

Veränderungen im Antikörpersignal, die nicht durch wirkliche Mengenänderungen des Antigens, sondern durch Protein-Protein Interaktionen entstehen, wurden auch bei der Augenschlag Konditionierung von Kaninchen beobachtet. Dabei wird ein Ton (CS) mit einem Luftstoß in die Augen (US) gepaart. Nach der Konditionierung kommt es im Gyrus Dentatus, in der CA1 und der CA3 Region des Hippokampus zu einem signifikanten Anstieg der PKC γ -Immunreaktivität (Van de Zee, 1997). Dabei wird PKC, welche inaktiv gebunden an ein inhibitorisches Peptid vorliegt, durch die Konditionierung stimuliert. Diese Stimulation bewirkt eine Konformationsänderung des Enzyms, die mit dem Lösen der PKC vom inhibitorischen Peptid verbunden ist. Dadurch ist relativ mehr freie PKC vorhanden, die von den verwendeten Antikörpern detektiert werden kann (Van de Zee, 1997). Dieser scheinbare Unterschied verschwindet nach einer Behandlung mit Proteasen und die detektierte Masse an PKC zwischen Kontrolltieren und konditionierten Tieren ist gleich.

Der limitierte Verdau durch Proteasen, die Bindungen zwischen Proteinen aufbrechen und so maskierte Antikörperbindestellen freilegen, stellt also eine geeignete Methode dar, um erste Hinweise auf Protein-Protein Interaktionen zu erhalten. Ob und welche Protein Interaktionen erkannt werden, ist abhängig vom Epitop, an das der verwendete Antikörper bindet.

4.3 Nicht-assoziatives Lernen wird durch die Inhibition der PKC-Aktivität nicht beeinflusst

Im Antennallobus konnte gezeigt werden, dass die Aktivität einer Ca²⁺-abhängigen PKC nach der Sensitisierung und der Habituation in den ipsi- und kontralateralen Antennalloben erhöht ist. Dieser Anstieg der PKC-Aktivität im Antennallobus wurde auch bei der olfaktorischen Konditionierung beobachtet und unterschied sich nicht von der Aktivierung der PKC durch Einzelreize (Duft bzw. Zuckerwasser). Grünbaum (1997) folgerte daher, dass der Anstieg der Ca²⁺-abhängigen PKC an der Prozessierung von chemosensorischen Stimuli im AL beteiligt, jedoch nicht notwendig für das Lernen und die Bildung von Gedächtnis ist.

Die verhaltenspharmakologischen Untersuchungen dieser Arbeit bestätigen die Hypothese von Grünbaum, da weder die Habituation noch die Sensitisierung durch die Inhibition der PKC-Aktivität während des Lernens beeinflusst wurde.

Welche Rolle der Anstieg der PKC-Aktivität im Antennallobus bei der chemosensorischen Reizverarbeitung spielt, muss in zukünftigen Untersuchungen geklärt werden. Auch in *Aplysia* kommt es kurz nach der Sensitisierung in den beteiligten Neuronen zu einem Anstieg der PKC-Aktivität, der jedoch bis zu drei Stunden anhält (Sossin et al., 1994). Manseau und Mitarbeiter (1998) konnten *in vitro* Experimenten an *Aplysia* zeigen, dass die Behandlung mit Serotonin zu einer Änderung in der Reizbarkeit der sensorischen Neurone führt, die durch die Aktivität der PKC induziert wird. Da der zeitliche Verlauf der PKC-Aktivität mit der intermediären Phase der Faszilitierung (ITF) (Ghirardi et al., 1995) korreliert, wurde angenommen, dass PKC für das ITF eine wichtige Rolle spielt (Sossin et al., 1997; Sossin et al., 1994). Sowohl bei *Aplysia* als auch bei der Biene scheint somit nur die Aktivierung der PKC im Stundenbereich bei plastischen Prozessen eine Rolle zu spielen.

4.4 PKC-Aktivität ist notwendig für das Langzeitgedächtnis von assoziativen Lernformen

Die Analyse von Gedächtnisphasen in verschiedenen Organismen hat ergeben, dass verschiedene molekulare Prozesse zur Ausprägung paralleler und sequentieller Gedächtnisphasen beitragen (Squire, 1987; DeZazzo und Tully, 1996). Die Induktion verschiedener molekularer Mechanismen ist dabei vornehmlich von den Parametern der gewählten Trainingsparadigmen abhängig.

Für die Honigbiene konnte ich erstmals zeigen, dass die spezifische Inhibition der Proteinkinase C eine Stunde nach der mehrfachen olfaktorischen Konditionierung zu einer Reduktion im Langzeitgedächtnis führte. Die Inhibition der PKC-Aktivität zu anderen Zeitpunkten, nach oder während der Konditionierung, hatte keinen Einfluss auf das Lernen oder die Gedächtnisbildung. Eine Rolle der Proteinkinase C nach dem eigentlichen Lernprozess wird auch in anderen Systemen beschrieben.

In Mäusen hatte die Inhibition der PKC mit Bisindolylmaleimid Hydrochlorid nach einer operanten Konditionierung ebenfalls Einfluss auf die Gedächtnisbildung. Dabei wurde das Herunterdrücken eines Hebels mit der Ausgabe von Futter belohnt (verstärkt). Im Vergleich zu den letzten Minuten der ersten Trainingseinheit zeigen Tiere normalerweise in einem Test 24 Stunden später eine signifikant gesteigertes Benutzen dieses gelernten Verhaltens (Drücken des Hebels). Eine intraventrikuläre Injektion von Bisindolylmaleimid Hydrochlorid direkt nach der Konditionierung verhinderte

diese verbesserte Ausführung (24 Stunden später). Allerdings waren die Tiere, die mit Bisindolylmaleimid Hydrochlorid behandelt wurden, während des Gedächtnistests in der Lage, die gestellte Aufgabe wieder zu erlernen (Stemmelin et al., 1999). Da Bisindolylmaleimid Hydrochlorid weder die Futteraufnahme noch die Motorik der Tiere beeinflusste, folgerten Stemmelin und Mitarbeiter, dass PKC vor allem an der Bildung der Gedächtnisphasen beteiligt ist, die nach dem initialen Lernvorgang eine Rolle spielen. Bei einem räumlichen Vermeidungslernen von Mäusen führte die Inhibition der PKC-Aktivität durch den PKC-Inhibitor NPC 15437, sowohl vor als auch nach dem Training, zu spezifischen Defiziten im Gedächtnis (Mathis, 1992). Die Tiere mussten lernen, innerhalb einer bestimmten Zeit durch ein Y-Labyrinth zu laufen und den linken Gang des Labyrinthes zu wählen, um einem elektrischen Schlag an den Füßen auszuweichen. Eine interperitoneale Injektion des Inhibitors nach dem Training verhinderte die Gedächtnisbildung für die zeitliche, nicht aber für die räumliche Komponente der gestellten Aufgabe. Dabei hatte der Inhibitor keinen Effekt auf die Akquisition. Die Inhibition der PKC-Aktivität durch einen Inhibitor führte somit auch bei Mäusen zu Defiziten in der Gedächtnisbildung, während der initiale Lernvorgang unbeeinflusst blieb. Für Mäuse konnte dies sowohl für aversiv als auch für appetitive Lernparadigmen gezeigt werden.

Nach einem operanten Vermeidungslernen von Ratten, bei dem die Tiere durch einen elektrischen Schlag an die Pfoten lernen den Boden des Käfigs nicht zu berühren, führte die Inhibition der PKC β I und/oder α Isoformen 10 Minuten vor oder 50 Minuten nach dem Lernen zu einer signifikanten Reduktion im Kurzzeitgedächtnis (3 h) (Vianna et al., 2000). Höhere Dosen des PKC α/β I-Isoform-spezifischen Inhibitors (Go 6976; 4 nM) oder eines PKC-Isoform unspezifischen Inhibitors (Go 7874; 8 nM) 10 Minuten vor und 1 h bzw. 2 h nach der operanten Konditionierung verhinderte die Bildung von Langzeitgedächtnis nach 24 Stunden (Paratacha et al., 2000; Vianna et al., 2000). Dagegen hatte die Inhibition 3 h nach dem Training weder Einfluss auf das Kurzzeitgedächtnis noch auf das Langzeitgedächtnis. Wie bei der Biene wurde somit auch für das operante Vermeidungslernen der Ratte gezeigt, dass die Inhibition der PKC-Aktivität nur in einem spezifischen Zeitfenster Auswirkungen auf das Gedächtnis hatte.

Ähnliches konnte auch bei einem Vermeidungslernen von Hühnern nachgewiesen werden. Die Hühner lernten dabei, dass ein farbig markiertes Korn ungenießbar und als Futter nicht geeignet ist. Die intracerebrale Injektion der PKC-Inhibitoren Melittin

oder H7 10 Minuten vor bzw. 10 Minuten nach dem Training führt drei Stunden später zu einer signifikanten Reduktion in der Gedächtnisbildung (Burchuladze et al., 1990). Das generelle Verhalten und das Lernen der Hühner wurde durch die Injektion der Inhibitoren nicht beeinflusst. In einer weiteren Arbeit wurde gezeigt, dass die Inhibition der PKC-Aktivität durch Chelerythrin bei demselben Vermeidungslernen ebenfalls die Gedächtnisbildung blockiert (Serrano et al., 1995; Serrano et al., 1994). Dabei war das Gedächtnis 45 Minuten nach der Konditionierung noch unbeeinflusst, aber bereits nach 60 Minuten wurden signifikante Gedächtnisdefizite beobachtet. Welche Gedächtnisphasen durch die Inhibition der PKC-Aktivität beeinflusst werden und über welchen Zeitraum die Aktivität der PKC für die Gedächtnisbildung notwendig ist, muss in zukünftigen Experimenten geklärt werden. Es wurde aber deutlich gezeigt, dass auch bei dem Vermeidungslernen von Hühnern Proteinkinase C Teil einer neurochemischen Kaskade ist, die durch assoziatives Lernen aktiviert wird, und dass die Aktivität der PKC nicht für die Akquisition, sondern vornehmlich für die Bildung von Gedächtnis notwendig ist.

Bei der Langzeitpotenzierung im Hippokampus von Säugetieren, die als Modellsystem für assoziatives Lernen diskutiert wird, scheint PKC ebenfalls an der initialen Induktion nicht beteiligt zu sein (Colley et al., 1990; Roberson et al., 1996; Sweatt, 1999). Eine transiente Translokation der PKC während der ersten Minuten nach Induktion der LTP wurde zwar beschrieben, wird aber nicht mit der initialen Induktion, sondern mit einer Aktivierung der PKC in der frühen Phase der Langzeitpotenzierung (E-LTP) in Verbindung gebracht (Sacktor et al., 1993; Roisin et al., 1997). PKC-Inhibitoren, die nach der Induktion appliziert wurden, blockierten die Langzeitpotenzierung, was darauf schließen lässt, dass PKC über die frühe Phase der LTP hinaus aktiv ist (Bliss und Collingridge, 1993). So verhindert die Inhibition der PKC-Aktivität durch Polymyxin B die Ausbildung der LTP 30-120 Minuten nach der Induktion (Reymann et al., 1988). Diese Befunde zur LTP stimmen somit mit den Daten für die Biene darin überein, dass PKC an langzeitigen physiologischen Veränderungen beteiligt ist, aber bei der initialen Auslösung dieser langanhaltenden Veränderungen keine Rolle spielt.

Die Ergebnisse, die in Untersuchungen an *Drosophila* zur Rolle der PKC beim Lernen und der Bildung von Gedächtnis gemacht wurden, sind sehr unterschiedlich und zum Teil widersprüchlich. In *Drosophila* sind drei PKC-Gene identifiziert worden (Schaeffer et al., 1989). In der Lern-Mutante *turnip*, die ursprünglich als Lern-Mutante

bei dem olfaktorischen Vermeidungslernen identifiziert wurde, ist die PKC-Aktivität stark reduziert, obwohl die Mutation keines der PKC-Gene betrifft und an einer anderen Stelle im Genom lokalisiert ist (Choi et al., 1991). Bei der Balz-Konditionierung zeigen *turnip* Mutanten normale Akquisition, bilden aber kein Gedächtnis (Gailey et al., 1982). Hingegen zeigen transgene Fliegen, in denen die PKC-Aktivität durch die Expression eines PKC-inhibitorischen Peptides reduziert wurde, während der Akquisition der Balz-Konditionierung zwar kein Lernverhalten, entwickelten aber normales Gedächtnis (Kane et al., 1997).

Die genetischen Analysen an Vertebraten deuten ebenfalls darauf hin, dass PKC auch beim initialen Lernvorgang eine Rolle spielt. In PKC β -knock-out-Mäusen wurde das PKC β -Gen durch ein anderes Gen ersetzt. PKC β -knock-out-Mäuse zeigten bei der Angstkonditionierung eine signifikante Reduktion sowohl beim Lernen als auch bei der Gedächtnisbildung (Weeber et al., 2000). Dabei wird ein akustisches Signal (CS) mit einem leichten elektrischen Schlag an die Pfoten der Tiere (US) gepaart. Bei der Wiederholung des Experiments wurde ein signifikanter Unterschied allerdings nur bei der Gedächtnisbildung, nicht aber beim initialen Lernvorgang beobachtet.

Abgesehen von diesen Ausnahmen lässt sich dennoch feststellen, dass die PKC in allen anderen untersuchten Organismen für die Bildung von Gedächtnis notwendig ist.

4.5 Mechanismen der PKC Modulation bei plastischen Prozessen

Auf molekularer Ebene sind für die Proteinkinase C verschiedene Mechanismen bekannt, die bei Prozessen des Lernens und der Gedächtnisbildung eine Rolle spielen. Dazu gehören die mit der Aktivierung verbundene Translokation und die limitierte Proteolyse der PKC. Beide Mechanismen wurden in Zusammenhang mit neuronaler Plastizität sowohl in Vertebraten als auch in Invertebraten nachgewiesen (Grünbaum und Müller, 1998; Drier et al., 2002; Sacktor, 1993; Bank et al., 1988; Burchuladze et al., 1990).

Die in dieser Arbeit durchgeführten Analysen über die molekularen Mechanismen von PKC zeigten, dass diese im Pilzkörper der Honigbiene nach der olfaktorischen Konditionierung mit anderen Proteinen Komplexe bildet. Die Bildung und die Bedeutung solcher Interaktionen der PKC mit Ankerproteinen wurden bisher nur in zellbiologischen Studien untersucht. In diesen Studien wurde gezeigt, dass in einer Zelle

verschiedene PKC-Isoformen vorkommen, und dass jede Isoform nach der Aktivierung an einer bestimmten subzellulären Stelle lokalisiert ist (Disatnik et al., 1994a; Disatnik et al., 1994b; Nishizuka et al., 1992). Inzwischen konnte in vielen zellulären Studien gezeigt werden, dass für die Lokalisation der verschiedenen PKC-Isoformen spezifische Bindeproteine verantwortlich sind (Mochly-Rosen, 1995; Pawson und Scott, 1997).

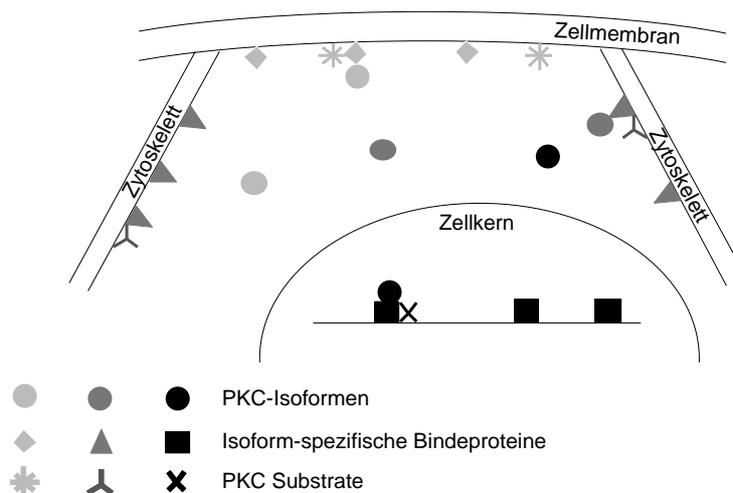


Abbildung 25: Schematische Darstellung der Regulation von PKC-Isoformen durch spezifische Bindeproteine

Die Substratspezifität der PKC wird durch die unterschiedliche Lokalisation der einzelnen PKC-Isoformen gewährleistet. Dabei wird die Isoform-spezifische Lokalisation durch das Binden der PKC-Isoformen an Ankerproteine vermittelt.

4.6 PKC Bindeproteine und ihre Funktion

Verschiedene PKC-Bindeproteine wurden in den letzten Jahren identifiziert und auf ihre Funktion hin untersucht. Eines der ersten identifizierten PKC-bindenden Proteine ist das RACK1 (Mochly-Rosen et al., 1991), welches spezifisch an die aktivierte PKC β II-Isoform bindet (Mochly-Rosen et al., 1991; Ron und Mochly-Rosen, 1995; Ron et al., 1999). Dabei heftet RACK1 sich an die V5 und vermutlich die C2 Region der PKC β II-Isoform (Stebbins und Mochly-Rosen, 2001). In *in vitro* Experimenten wurde gezeigt, dass RACK1 auch an die PKC β I-Isoform bindet, allerdings mit wesentlich geringerer Affinität als zur PKC β II-Isoform (Stebbins und Mochly-Rosen, 2001). Die Blockierung der PKC-RACK1 Interaktionen verhindert in Neuronen des präfrontalen Cortex eine durch Serotonin vermittelte Verringerung der GABA Rezeptorströme (Feng et al., 2001). In *Xenopus* Oocyten blockiert die Mikroinjektion eines inhibitorischen Peptids (Peptid I), welches die Bindung von PKC β II an RACK1

vehindert, die Insulin induzierte Translokation der PKC β -Isoform und die Oocyten Reifung (Ron et al., 1995).

Das β -COP (auch RACK2 genannt) wurde als PKC ϵ Bindeprotein identifiziert und erfüllt alle Kriterien eines RACK: Es bindet spezifisch und ist nur mit aktivierter PKC ϵ am Zytoskelett, dem Perinukleus und an Zell-Zell Kontakten lokalisiert (Csukai et al., 1997).

Staudinger und Mitarbeiter (1995) identifizierten ein PKC α Bindeprotein, das sogenannte PICK 1 (protein interacting with C-Kinase), welches an die katalytische Domäne der PKC α bindet. PICK1 gehört zur Gruppe der PDZ-Proteine und bindet nur an PKC, wenn diese in einem aktivierten Zustand vorliegt. In Neuronen der CA1 Region des Hippokampus bindet PICK1 ebenfalls an die GluR2 Untereinheit von AMPA-Rezeptoren (Daw et al., 2000). Durch die Fähigkeit Dimere zu bilden, ist PICK1 in der Lage PKC α und AMPA-Rezeptoren miteinander zu verbinden und die PKC-abhängige Phosphorylierung von AMPA-Rezeptoren zu ermöglichen (Daw et al., 2000; Perez et al., 2001). Diese, durch PICK1 vermittelte Phosphorylierung, spielt bei dem Lösen bzw. der Verankerung von AMPA-Rezeptoren an die Membran während basaler Aktivität und bei Prozessen synaptischer Plastizität eine wichtige Rolle.

Neben der genauen Lokalisation sind Ankerproteine auch an der Regulation von Signalkaskaden beteiligt. Im Auge von *Drosophila* wurde für die dort spezifische PKC ein Bindeprotein nachgewiesen, InaD (inactivation-no-afterpotential D), welches mehrere PDZ Domänen besitzt und für die Verarbeitung von Lichtreizen erforderlich ist (Tsunoda et al., 1997; Adamski et al., 1998; Shieh et al., 1995). Dabei dient InaD als Gerüst für die Phototransduktion, indem es verschiedene Komponenten wie Phospholipase C, PKC, TRP-Ionenkanal, Rhodopsin und Calmodulin bindet und dadurch den geregelten Ablauf der Phototransduktion gewährleistet. In InaD-Nullmutanten sind Phospholipase C, PKC, und TRP nicht an den Rhabdomeren lokalisiert, wie in Wildtyp-Fliegen, sondern wahllos entweder an der Zellmembran (TRP) oder im Cytosol verteilt (Phospholipase C, PKC). Ein Fehlen der PKC-InaD-Interaktionen in InaD-Nullmutanten führt zu einem vollständigen Verlust der PKC-Aktivität im Auge (Tsunoda et al., 1997; Adamski et al., 1998). In Abwesenheit von InaD ist PKC der Proteolyse ausgesetzt, was darauf hindeutet, dass eine weitere Aufgabe von Ankerproteinen darin besteht, PKC vor zellulären Proteasen zu schützen.

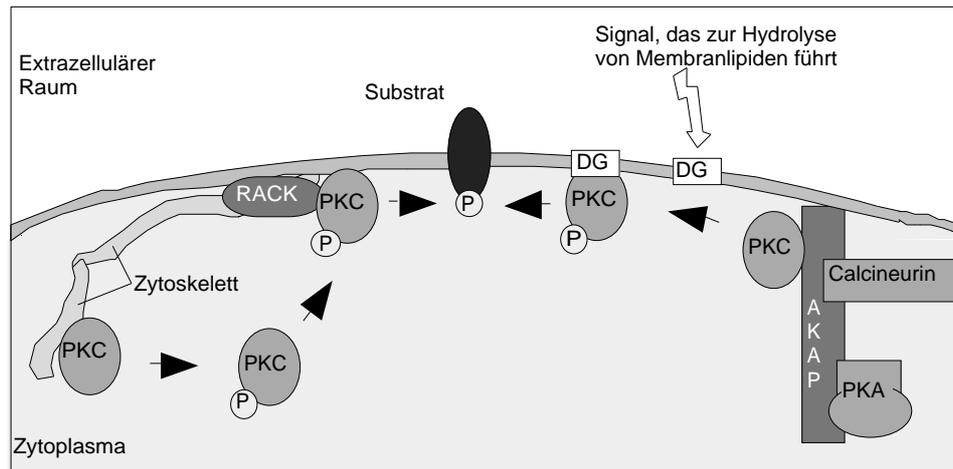


Abbildung 26: Schematische Darstellung molekularer Mechanismen bei der PKC-Komplexierung

Neu synthetisierte PKC wird durch Phosphorylierung (drei Phosphorylierungsstellen vereinfacht dargestellt durch das eingekreiste P) modifiziert und ins Zytosol freigesetzt. Dort interagieren verschiedene PKC-Isoformen mit spezifischen Bindeproteinen, welche oft mit dem Zytoskelett assoziiert sind. Zwei Möglichkeiten sind dargestellt: Die aktivierte PKC bindet an ein RACK und phosphoryliert nahegelegene Substrate (linke Seite). Auf der rechten Seite bindet die inaktive PKC an das Ankerprotein AKAP 79 und ist dadurch mit Proteinkinase A (PKA) und Calcineurin kolokalisiert. Die Bildung von Diacylglycerol (DAG) und/oder ein Anstieg der Ca^{2+} -Konzentration aktiviert PKC, welche nach dem Lösen von AKAP79 benachbarte Substrate phosphoryliert.

AKAP 79 (A kinase anchoring protein) ist ein Protein, das neben der PKA und Calcineurin (CaN) auch die PKC bindet (Klauck et al., 1996). In Neuronen des Hippokampus von Ratten bindet das Protein an konventionelle, novel und atypische PKC-Isoformen, was sowohl *in vitro* als auch *in vivo* Experimenten nachgewiesen wurde (Faux et al., 1999). Dabei konnte für PKC β II gezeigt werden, dass AKAP79 an die katalytische Domäne bindet und dadurch die Aktivität der Kinase inhibiert (Klauck et al., 1996; Newton, 1996). Ankerproteine wie AKAP79 spielen vor allem für die genaue Positionierung der Enzyme eine Rolle. Jedoch nehmen diese Ankerproteine durch das Binden ebenfalls Einfluss auf den Aktivitätszustand einer Kinase und sind somit als Multikomplexsysteme in der Lage, neben der Regulation einzelner Enzyme verschiedene Signalkaskaden aufeinander abzustimmen. Während PKC durch das Binden an AKAP 79 inaktiviert wird, könnte gleichzeitig PKA aktiv sein, da die Aktivität der katalytischen Untereinheit der PKA durch das Binden an AKAP 79 nicht beeinflusst wird (Klauck et al., 1996; Newton, 1996). Calcineurin ist imstande, PKC zu dephosphorylieren und somit einen Anstieg der PKC-Aktivität zu verhindern (Newton, 1996).

4.7 Hinweise für eine Interaktion der PKC mit Ankerproteinen bei der Gedächtnisbildung

Während es sich bei den bisherigen Untersuchungen über Bindeproteine der PKC vornehmlich um zelluläre Studien handelte, konnte ich in meiner Arbeit erstmals einen Hinweis auf eine funktionelle Bedeutung der beobachteten PKC-Protein-Interaktion im Pilzkörper der Biene für die Gedächtnisbildung nachweisen: Die Inhibition der PKC-Aktivität eine Stunde nach der Konditionierung führte zu einer Reduktion im Langzeitgedächtnis (Abb. 12). Zum gleichen Zeitpunkt kommt es in konditionierten Tieren zu einer Veränderung in der detektierbaren PKC-Menge. Diese Veränderung beruht auf der Interaktion der PKC mit anderen Proteinen (Abb. 17, Abb. 20) und wurde nur bei der membrangebundenen und damit aktiven PKC beobachtet. Ein Zusammenhang zwischen dem Binden der PKC an Bindeproteine und der beobachteten Reduktion in der Gedächtnisbildung durch die Inhibition der PKC-Aktivität konnte ebenfalls gezeigt werden: Die Inhibition der PKC eine Stunde nach der Konditionierung führte zu einem Ausfall der PKC Komplexbildung mit anderen Proteinen (Abb. 15).

Aufgrund der Beobachtung, dass nur die aktive, membrangebundene PKC im Pilzkörper mit anderen Proteinen interagiert, kamen als mögliche Kandidaten nur Proteine in Frage, die ausschließlich an die aktive Form des Enzyms binden. Dazu gehören unter anderem RACK1, β '-COP (RACK2) und PICK 1. Mit Hilfe einer Proteindatenbank (NBC) wurde geprüft, ob PKC Bindeproteine in der Biene vorhanden sind. Dabei wurden signifikante Gemeinsamkeiten zwischen der Aminosäuresequenz von menschlichem RACK1 und einer Aminosäuresequenz des Bienengehirns gefunden (Abb. 21). Mit Hilfe eines kommerziell erworbenen Antikörpers konnte im Westernblot ein spezifisches Signal nachgewiesen werden. Durch eine Immunpräzipitation wurde schließlich nachgewiesen, dass PKC an das RACK1-ähnliche Protein bindet (Abb. 24). Der immunchemische Nachweis von RACK1 zeigte, dass es ebenso wie PKC im Pilzkörper exprimiert wird und somit eine Interaktion beider Proteine in diesem Neuron möglich wäre.

Ob es sich wirklich um RACK1 bzw. das RACK1-ähnliche Protein handelt, welches mit PKC bei der Gedächtnisbildung interagiert ist noch unklar. Unabhängig davon, steht jedoch fest, dass die Komplexbildung der PKC als ein neuer Mechanismus der PKC Modulation beim assoziativen Lernen beschrieben wurde. Zum ersten Mal konnte ich zeigen, dass PKC im Pilzkörper der Honigbiene nach der olfaktorischen

Konditionierung mit anderen Proteinen Komplexe bildet, und dass diese Komplexbildung bei der Bildung von Langzeitgedächtnis eine wesentliche Rolle spielt.

4.8 Lerninduzierte Veränderungen der PKC im Gehirn der Honigbiene

Neben den Pilzkörpern wird Proteinkinase C vor allem in den Antennalloben exprimiert (Abb. 4). Beide Neuropile haben für das olfaktorische Lernen der Biene eine große Bedeutung (Hammer und Menzel, 1995; Menzel und Müller, 1996). Optische Messungen mit Hilfe calciumsensitiver Farbstoffe zeigten, dass die glomeruläre Aktivität der Antennalloben auf einen konditionierten Duft stärker und in ihrem räumlichen Muster verändert wird, wenn dieser Duft vorher konditioniert wurde (Faber et al., 1999). Die Kühlung der Antennalloben oder der Pilzkörper führte nach der Konditionierung zu retrograden Amnesien (Menzel et al., 1974; Erber et al., 1980). Den Pilzkörpern wird aufgrund der multimodalen Eingänge eine wichtige Funktion bei der Integration und der Prozessierung verschiedener Stimuli zugesprochen. Ablationen der Pilzkörper und Mutationen, die zu missgebildeten Pilzkörpern führen, verursachen in *Drosophila melanogaster* Defekte im olfaktorischen Lernen (Heisenberg et al., 1985; deBelle und Heisenberg, 1994).

Nach der mehrfachen Konditionierung kommt es im Antennallobus der Honigbiene zu einem signifikanten Anstieg der PKC-Aktivität um 20-30 %. Dieser Anstieg beginnt eine Stunde nach dem Training, bleibt über drei Tage auf diesem erhöhten Niveau und kann in zwei Phasen gegliedert werden (Grünbaum und Müller, 1998). Auf molekularer Ebene wurde gezeigt, dass in der ersten Phase (1-18 h) die Zunahme der PKC-Aktivität auf die Bildung der konstitutiv aktiven PKM zurückzuführen ist. Somit wurde im Antennallobus die limitierte Proteolyse der PKC als eine lern-induzierte Veränderung nachgewiesen. Wird die PKM Bildung (Calpain-Inhibitor E64) während der Konditionierung blockiert, so wird die Bildung des Mittelzeitgedächtnisses signifikant reduziert. So konnte eine Reduktion in der Gedächtnisbildung zwischen ca. 1 und 18 Stunden beobachtet werden. Dieser Effekt war transient und das Gedächtnis der mit E64 behandelten Tiere war zu später getesteten Zeitpunkten (≥ 1 d) wieder auf demselben Niveau wie das der Kontrolltiere.

Die in dieser Arbeit durchgeführten Versuche haben gezeigt, dass die Inhibition der PKC-Aktivität eine Stunde nach der mehrfachen Konditionierung eine signifikante Verminderung im Langzeitgedächtnis zur Folge hatte. Während das Mittelzeitge-

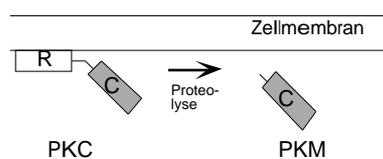
dächtnis im Bereich von Stunden unbeeinflusst blieb, reagierten nach einem Tag deutlich weniger Tiere auf den gelernten Duft mit einer PER als in der Kontrollgruppe. In den Pilzkörpern wurde in Zusammenhang mit dieser Reduktion eine Komplexbildung der PKC mit anderen Proteinen nachgewiesen. Die Bildung der PKM wurde im Pilzkörper nicht beobachtet. Die an der Gedächtnisbildung beteiligte PKC im Pilzkörper wird also durch andere molekulare Mechanismen reguliert als die PKC in den Antennalloben. Weiterhin ist die PKC im Pilzkörper für andere Gedächtnisphasen notwendig als die PKC der Antennalloben.

Molekulare Mechanismen der PKC-Aktivität nach der olfaktorischen Konditionierung

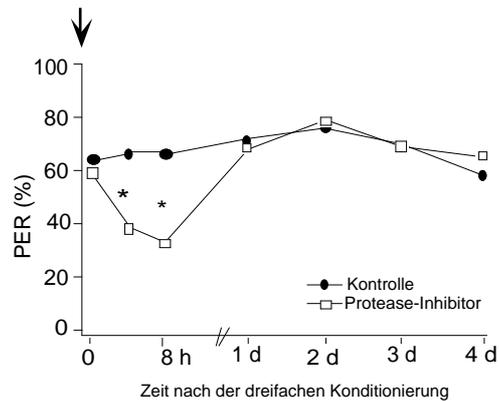
Beginn und Dauer

Auswirkung auf das Verhalten durch Inhibition der beobachteten Mechanismen

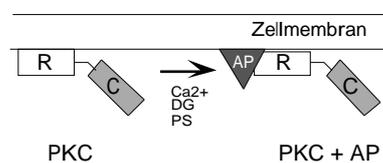
AL



1 h - 3 d nach der Konditionierung



PK



1 - 2 h nach der Konditionierung

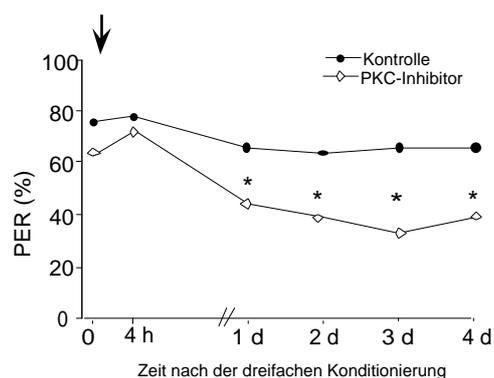


Abbildung 27: Schematische Darstellung der molekularen Mechanismen der PKC-Aktivität im Gehirn der Biene und ihrer funktionellen Bedeutungen

Auf der linken Seite sind die molekularen Mechanismen beschrieben: AL, Antennallobus; PK, Pilzkörper; R, regulatorische Domäne; C, katalytische Domäne; AP, Ankerprotein; n. K., nach Konditionierung. Auf der rechten Seite sind die Ergebnisse der Verhaltensversuche abgebildet: Im AL wurde dabei die Bildung der PKM während der mehrfachen Konditionierung inhibiert; im PK wurde die Aktivität der PKC eine Stunde nach der mehrfachen Konditionierung blockiert. Der schwarze Pfeil markiert den Zeitpunkt der Inhibition

Nach Grünbaums Untersuchungen wird im AL bei der Assoziation eine PKM gebildet. Dieser Vorgang ist für das Mittelzeitgedächtnis notwendig. In meiner Arbeit hatte die systemische Blockierung der PKM zu allen Zeitpunkten keine direkte Auswirkung auf das Mittelzeitgedächtnis. Deshalb muss angenommen werden, dass entweder die im AL entstandene PKM für die Inhibitoren nicht zugänglich ist (z.B. im Komplex mit anderen Proteinen) oder dass durch die Inhibition von Calpain, welches den Abbau von PKC zu PKM reguliert, noch andere Prozesse der Gedächtnisbildung betroffen sind.

4.9 Mögliche Funktion der PKC Komplexbildung für die Etablierung von Langzeitgedächtnis

Die lern-induzierte Veränderung der PKC im Pilzkörper tritt zu einem definierten Zeitpunkt (1-2 h) nach der Konditionierung auf und ist in ihrer Dauer deutlich kürzer als die beobachtete Veränderung im Verhalten. In diesem kurzen Zeitfenster der PKC Modulation werden daher vermutlich Prozesse induziert, die für die Bildung von Langzeitgedächtnis notwendig sind. Langzeitige Veränderungen der synaptischen Übertragung und die Bildung von Langzeitgedächtnis sind mit einer Veränderung der Genexpression und der Umstrukturierung sowie Neubildung von Synapsen verbunden (Davis und Squire, 1984; Chang et al., 1984; Bailey und Kandel, 1993, 1994). Daher wäre es denkbar, dass eine Stunde nach der olfaktorischen Konditionierung Proteinkinase C im Komplex mit einem Ankerprotein Transkriptionsfaktoren phosphoryliert, welche Veränderungen in der Genexpression vermitteln. Ein Hinweis darauf geben die immunhistologischen Untersuchungen zu dem RACK1 ähnlichen Bindeprotein der PKC (Abb. 23). Dabei zeigt sich, dass das Bindeprotein vornehmlich in den Kenyonzellen der Pilzkörper exprimiert wird. Hier ist das Protein in den Somata und dabei vor allem in den Zellkernen lokalisiert. Obwohl der direkte Nachweis noch fehlt, wäre es denkbar, dass die Verknüpfung beider Proteine dazu führt, dass PKC zum Zellkern transportiert wird, um dort Transkriptionsfaktoren durch Phosphorylierung zu aktivieren.

So wurde in zellulären Studien gezeigt, dass das Binden der PKC an RACK1 notwendig für die gerichtete Bewegung beider Proteine ist (Ron et al., 1999). Dabei fungiert RACK1 als ein Transportprotein, welches PKC nach der Aktivierung bindet und zu spezifischen Substraten befördert. Da RACK1 keine Domäne besitzt, die es er-

möglicht an eine spezifische subzelluläre Stelle zu binden, und damit mehr ein mobiles als ein fest verankertes Protein darstellt, wurde vermutet, dass RACK1 auch durch andere Signalkaskaden beeinflusst wird. Tatsächlich führte die Behandlung mit Forskolin (ein Aktivator der Adenylatzyklase) dazu, dass RACK1 in den Zellkern wanderte (Ron et al., 1999).

Im Pilzkörper der Biene könnte die dreifache Konditionierung zunächst eine Aktivierung der cAMP vermittelten Signalkaskade bewirken. Dadurch wird RACK1 aktiviert und wandert (mit oder ohne PKC) in den Zellkern. Im Zellkern bindet RACK1 an aktive PKC. Durch diese Komplexbildung verändert PKC ihre Phosphorylierungseigenschaften, wodurch für das Langzeitgedächtnis notwendige Transkriptionsfaktoren aktiviert werden. Die Verknüpfung von RACK1 und PKC im Zellkern könnte dabei ein wichtiges Signal für die Bildung von Langzeitgedächtnis darstellen. Nur wenn RACK1 und aktivierte PKC im Zellkern lokalisiert sind, kommt es zur Phosphorylierung von Transkriptionsfaktoren und zur Bildung von Gedächtnis.

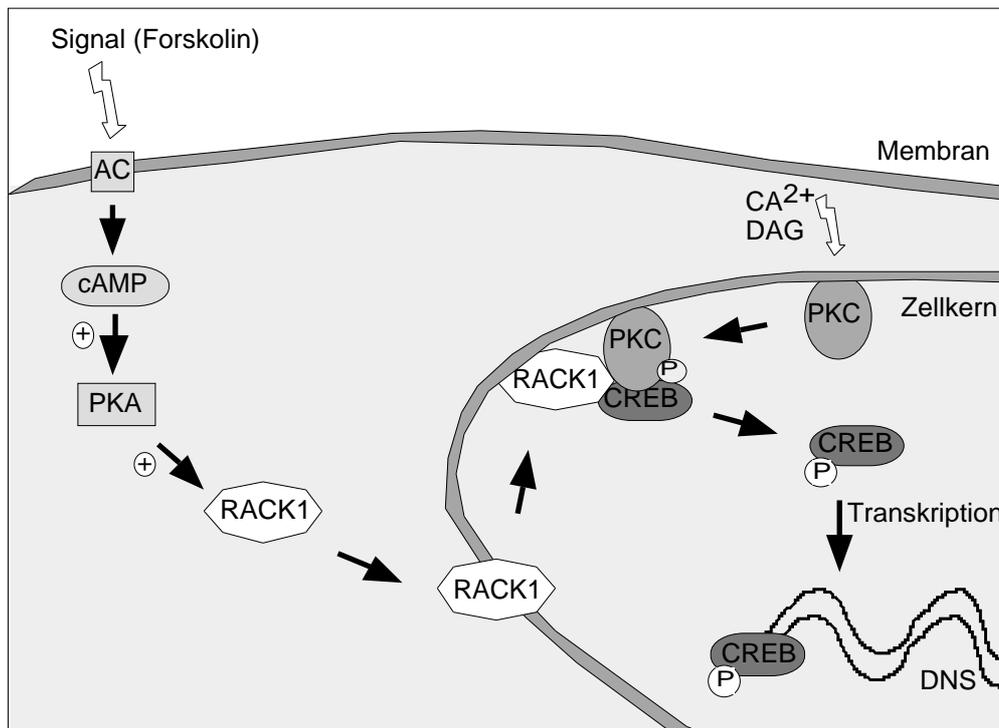


Abbildung 28: Mögliche Interaktion zwischen PKC und RACK1 bei der Gedächtnisbildung

Nach der mehrfachen Konditionierung kommt es in den Kenyonzellen der Pilzkörper zur Aktivierung der Adenylatzyklase (AC) und damit zu einem Anstieg von cAMP (zyklisches Adenosinmonophosphat). cAMP aktiviert die Proteinkinase A (PKA), welche wiederum an der Aktivierung von RACK1 beteiligt ist. RACK1 wandert daraufhin in den Zellkern und bindet an die aktivierte PKC. Dadurch werden die Phosphorylierungseigenschaften der PKC verändert, so dass Transkriptionsfaktoren wie z. B. CREB (Ca^{2+} /cAMP response element binding protein) von PKC phosphoryliert und damit aktiviert werden.

Ein Transkriptionsfaktor, der bei der Gedächtnisbildung eine Rolle spielt und der von PKC phosphoryliert wird, ist das CREB Protein (Ca²⁺/cAMP response element binding protein). In verschiedenen Systemen wurde nachgewiesen, dass CREB spezifisch für langanhaltende plastische Prozesse notwendig ist, nicht aber für kurzzeitige Prozesse (Yin et al., 1994; Bourchouladze et al., 1994; Lamprecht et al., 1997). Anhand zellulären Studien wurde bisher angenommen, dass die Induktion von langanhaltender Plastizität die Aktivierung der PKA bewirkt, welche daraufhin CREB phosphoryliert. CREB wird durch Phosphorylierung aktiviert und ist für die Ausbildung dauerhafter plastischer Prozesse notwendig. Bisher konnte aber eine direkte Phosphorylierung von CREB durch PKA in Zusammenhang mit neuronaler Plastizität nicht nachgewiesen werden. Dagegen wurde bereits gezeigt, dass neben der PKA auch PKC und die Ca²⁺/Calmodulin-abhängigen Kinase in der Lage ist, CREB zu phosphorylieren (Brindle et al., 1995; Gonzalez und Montimy, 1989; Dash et al., 1991; Deisseroth et al., 1998; Sheng et al., 1991; Sun et al., 1995; Yamamoto et al., 1988). In der Biene ist ein CREB Gen bekannt, das *AmCREB*, dessen Primärtranskript alternativ gespleißt wird, so dass mindestens acht Isoformen entstehen (Eisenhardt 1998). Immunologische Untersuchungen zeigten für die AmCREB Isoformen unterschiedliche Verteilungen in den Pilzkörpern und den Antennalloben und, dass einige, aber nicht alle Isoformen lern-induzierten Veränderungen unterliegen (Friedrich, 2001). Für die Bildung von Langzeitgedächtnis wäre also im Pilzkörper der Honigbiene eine durch ein Bindeprotein vermittelte Phosphorylierung von CREB durch Proteinkinase C durchaus denkbar.