

Aus dem Institut für Pharmakologie und Toxikologie
der Otto von Guericke Universität Magdeburg
und
aus dem Institut für Pharmakologie und Toxikologie
des Fachbereichs Veterinärmedizin
der Freien Universität Berlin

**Über die Beteiligung des Transkriptionsfaktors CREB im Modell der
Langzeitpotenzierung (LTP) im Hippocampus der Ratte**

Inaugural Dissertation

zur Erlangung des Grades eines

Doktors der Veterinärmedizin

an der Veterinärmedizinischen Fakultät der Freien Universität Berlin

vorgelegt von Helge Siemer
geb. am 05.07.1969 in Bremerhaven

Berlin, Juni 2001

Journal-Nr.: 2533

Gedruckt mit Genehmigung
des Fachbereiches Veterinärmedizin
der Freien Universität Berlin

| | |
|--------------------|---------------------------|
| Dekan: | Univ.-Prof. Dr.K.Hartung |
| Erster Gutachter: | Priv.Doz. Dr. R.Scherkl |
| Zweiter Gutachter: | Univ.-Prof.Dr. V. Höllt |
| Dritter Gutachter: | Univ.-Prof.Dr.. R.Rudolph |

Inhaltsverzeichnis

Seite

Liste der verwendeten Abkürzungen

1. Einleitung 1-2

1.1 Das Modell der posttetanischen Langzeitpotenzierung (LTP) 2-5

1.2 Dekrementale und nichtdekrementale Form der LTP 5-6

1.3 Regulation der Genexpression 6-7

1.4 CREB 7-9

2. Eigene Untersuchungen

2.1 Arbeitsmaterialien und Geräte

2.1.1 Chemikalien 9-12

2.1.2 Lösungen 12-18

2.1.3 Geräte 18-19

2.1.4 Verbrauchsmaterialien 19

2.2 Methoden

| | Seite |
|---|-------|
| a) <i>in vitro</i> | |
| 2.2.1 Die Ableitung evozierter Feldpotentiale mit Hilfe der <i>in vitro</i> Technik | 20-21 |
| 2.2.2 Herstellung der Hippocampusschnitte | 21 |
| 2.2.3 Milieubedingungen | 22 |
| 2.2.4 Elektrodenmaterial und Messung der fokalen Potentiale | 22-23 |
| 2.2.5 Reizparameter <i>in vitro</i> | 23 |
| 2.2.6 Westernblotting | 24-25 |
| 2.2.7 Immunhistochemie | 25-26 |
| 2.2.8 Auswertung der Ergebnisse | 26 |
| b) <i>in vivo</i> | |
| 2.2.9 Versuchsvorbereitung | 26 |
| 2.2.10 Implantation der Reizelektroden | 26-27 |
| 2.2.11 Die Ableitung evozierter Feldpotentiale <i>in vivo</i> | 27-28 |
| 2.2.12 Reizparameter | 28-29 |

| | Seite |
|--|-------|
| 2.2.13 Perfusion | 29 |
| 2.2.14 Immunhistochemie | 29-30 |
| 2.2.15 Auswertung der Ergebnisse | 30 |
| | |
| 3. Ergebnisse | |
| | |
| a) <i>in vitro</i> | |
| | |
| 3.1 Vorstellung einer neuen Meßkammer | 31-35 |
| | |
| 3.2 Zeitabhängigkeit der CREB-Phosphorylierung während hippocampaler LTP | 35 |
| | |
| 3.2.1 Immunhistochemie | 35-37 |
| | |
| 3.2.2 Westernblotting | 37-38 |
| | |
| b) <i>in vivo</i> | |
| | |
| 3.3 Zeitabhängigkeit der CREB-Phosphorylierung während hippocampaler LTP | 38-39 |
| | |
| 3.4 Stimulusspezifität der CREB Aktivierung | 39-42 |

| | Seite |
|--|-------|
| 3.5 Hemmung der CREB-Phosphorylierung durch MK 801 | 42-44 |
| 3.6 CREB Aktivität während nichtdecrementaler und decrementaler LTP | 44-46 |
| 3.7 Vergleich des Aktivitätsstatus von CREB und MAP-Kinase in hippocampaler LTP | 46-48 |
| | |
| 4. Diskussion | 48-59 |
| | |
| 5. Zusammenfassung | 59-60 |
| | |
| 6. Summary | 60-61 |
| | |
| 7. Literatur | 62-85 |
| | |
| 8. Danksagung | |

Abkürzungen:

ABC: avidin-biotinylated peroxidase complex

ACSF: artificial cerebrospinal fluid

AP-2: activator protein 2

BT: biotinylated tyramine

CaMKII: Ca²⁺ / Calmodulin-dependent kinase II

CaMKIV: Ca²⁺ / Calmodulin-dependent kinase IV

CRE: cAMP responsible element

CREB: cAMP responsive element binding protein

CREM: cAMP responsive element modulator protein

Cy3: cyanine 3.18

DTT: Dithioereitol

Elk-1: Transkriptionsfaktor

ERK :extracellular signal regulated kinase

fEPSP: field excitatory postsynaptic potentials

fos: nukleärer Transkriptionsfaktor

GTP: guanosinetriphosphat

HFS: high frequency stimulation

5-HT:5-Hydroxytryptamin

ICER: inducible cAMP early repressor

IEG: Immediate early genes

ir: immunoreactive

li: like immunoreactivity

JEG-3: human chorio-carcinoma Zellen

JUN: Transkriptionsfaktor

LFS: low frequency stimulation

LTP: long-term-potential

MAP2: microtubule associated protein 2

MEK: MAPK-Kinase

MAPK: mitogen activated protein kinase

NGFI-A: neural growth factor

NGS: Normal goat serum

NO: Nitric Oxide

pCREB: serine 133-phosphorylated CREB

PBS: phosphat buffered saline

PKA: protein kinase A

PKC: protein kinase C

pMAP: p42/44 phosphorylated MAP Kinase

POP-Spike: population spike

RAF : Kinase der MAP-Kinase-Kaskade

RAS : GTP-bindendes Protein

RSK 2: ribosomale Kinase 2

RT: Room temperatur

SDS: Sodium dodecylsulfate

SRC: tyrosine kinase

TPBS: Tris/phosphate-buffered saline

Zif268: Transkriptionsfaktor

Lebenslauf

Name: Siemer

Vorname: Helge

geboren in: Bremerhaven

geboren am: 05.07.1969

Schulbildung:

1975-1979 Gorch-Fock-Grundschule

1979-1985 Gymnasium Wilhelm-Raabe-Schule

1985-1988 Oberstufe Geschwister-Scholl-Schule

Universitätsausbildung:

1988-1990 Rechtswissenschaften an der Universität Bayreuth

1991-1996 Veterinärmedizin an der Uni Leipzig Staatsexamen Dez.1996

Jan.1997 Approbation als Tierarzt

Dissertation:

1997-2001 Universität Magdeburg, Institut f.Pharmakologie und Toxikologie

8. Danksagung

Herrn Professor Höllt möchte ich für die freundliche Überlassung des Themas, seine wissenschaftlichen Anregungen ,sowie für die großzügigen Arbeitsmöglichkeiten in seinem Institut danken

Insbesondere danke ich Herrn Dr. Stefan Schulz für die methodische Einarbeitung und die unzähligen Diskussionen und Hilfestellungen. Ich bedanke mich auch bei Herrn Professor Krug und Herrn Dr. Matthies für die Einarbeitung in die elektrophysiologischen Methoden und die zahlreichen Ratschläge und Diskussionen.

Nicht zuletzt möchte ich mich bei Frau Dana Wiborny, Frau Karin Schulzeck, Frau Carina Schäfer und allen anderen Mitarbeitern für die vielen Hilfestellungen und die moralische Unterstützung recht herzlich bedanken.

Herrn PD Dr. Scherkl danke ich für die Betreuung der Dissertation.

Selbständigkeitserklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Dissertation selbstständig unter Zuhilfenahme der im Anhang befindlichen Literatur erstellt habe.

Helge Siemer