

4. Diskussion

Die vorliegende Arbeit berührt methodische und inhaltliche Aspekte der Forschung auf dem Gebiet der Langzeitpotenzierung, die als ein Schlüsselmechanismus für das Verständnis von Gedächtnisbildung angesehen werden kann.

Mit der vorliegenden Arbeit konnte eine neue Methode für die Untersuchung von zeitabhängigen, intrazellulären Ereignissen im Hippocampus vorgestellt werden, die an der Ausbildung von langanhaltenden Veränderungen der synaptischen Transmission beteiligt sind. Während derzeit lediglich Meßkammern für elektrophysiologische Ableitungen einer begrenzten Anzahl Schnitte (2-6) zur Verfügung standen (Reid et al. 1988, Reynaud et al. 1995), konnte mit der oben beschriebenen Meßkammer eine verbesserte Meßkammer konstruiert werden, um zeitgleiche Untersuchungen an bis zu 30 Hippocampusschnitten durchzuführen. Während es in den bisher verwendeten Meßkammern, während der elektrophysiologischen Ableitungen häufig zu Beeinträchtigungen der Vitalität der Hippocampusschnitte kam, die sich durch deutliche Beeinträchtigungen und Abfall der elektrophysiologisch ableitbaren Potentiale zeigte, konnte mit der neuen Meßkammer eine längere Vitalität der Schnitte über einen längeren Beobachtungszeitraum

erreicht werden. Als Vitalitätskriterium wurde in den durchgeführten Experimenten unter anderem eine stabile Pop-Spike-Amplitude herangezogen. In Untersuchungen konnte über einen Zeitraum von 240 min (Abb.3/S.34) nach Abschluß der Inkubationszeit eine stabile Langzeitpotenzierung aufgenommen werden. In Kontrollschnitten konnte auch ohne Auslösung von LTP die normale synaptische Transmission über 240 min gemessen werden. Die stabile synaptische Transmission ist ein wesentliches Kriterium für die Vitalität der Hippocampusschnitte. Es konnte gezeigt werden, dass nach der Inkubationsphase bei allen Hippocampusschnitten, unabhängig von der Lage in der Meßkammer, keine Veränderungen der physiologischen synaptischen Aktivität in den Hippocampusschnitten gemessen werden konnten. Nach Auslösung der Langzeitpotenzierung konnte bis zur Beendigung der Messungen (240 min) eine stabile Pop-Spike-Amplitude gemessen werden. Um die Nutzbarkeit der Kammer für elektrophysiologische Messungen zu testen, war es wichtig durch die Untersuchung von unbehandelten Kontrollschnitten, bei denen keine Langzeitpotenzierung ausgelöst wurde, Reizartefakte von stimuluspezifischen Reizantworten zu differenzieren. Die Kontrollschnitte zeigten über die Dauer der Untersuchungen eine stabile synaptische Transmission, womit gezeigt werden konnte, dass die elektrophysiologischen Veränderungen der Pop-Spike-Amplitude auf die Auslösung der Langzeitpotenzierung durch tetanische Stimuli zurückgeführt werden können. Die verwendete Meßkammer ermöglicht die einfache Entnahme der Hippocampusschnitte für weitergehende Untersuchungen. Durch die größere Anzahl und längere Vitalität der Schnitte in der neuen Meßkammer, ist es möglich geworden zeitabhängige, intrazelluläre Mechanismen während der Langzeitpotenzierung exakter zu untersuchen, als das bisher mit anderen Methoden möglich war. Die Nutzbarkeit der neuen Meßkammer ist jedoch nicht nur auf die Untersuchung von Hippocampusschnitten beschränkt. Vielmehr besteht ebenfalls die Möglichkeit auch Schnitte anderer Hirnregionen in der neuen Meßkammer zu untersuchen. Durch den Aufbau der Meßkammer ist auch die Behandlung der Schnitte mit verschiedenen Substanzen verbessert und erleichtert worden. Das dem cAMP abhängige Antwort-Element (CRE) bei der Induktion der Genexpression in hippocampaler LTP eine wichtige Bedeutung zukommt ist bekannt (Stevens 1994 , Bailey et al. 1996, Impey et al.1996). Durch die vorliegenden *in vitro* Ergebnisse konnten die zeitliche und räumliche Dynamik der CREB Serin-133 Phosphorylierung in Hippocampusschnitten der Ratte dargestellt werden. Die

Immunreaktivität von CREB zeigte einen schnellen und deutlichen Anstieg bis zum 15 Minuten-Wert und anschließend einen langsamen Abfall bis zum 120 Minuten-Wert. Dabei ist CREB-Immunreaktivität besonders deutlich in den Zellkernen der Pyramidenzellen der CA1-Region festzustellen. Hervorzuheben ist, dass die Phosphorylierung von CREB mit zwei unabhängigen Detektionsmethoden, immunhistochemisch und mit Westernblot, zeitparallel verlaufend dargestellt werden konnte. Welche Signalkaskaden im Einzelnen an der CREB-Phosphorylierung beteiligt sind ist indes noch unklar. Für eine Vielzahl verschiedener Proteinkinasen (PKA, CaMKII und CaMKIV) liegen bisher lediglich Ergebnisse *in vitro* vor. Lediglich für PKA liegen Beweise für die Bedeutung *in vivo* vor. In entsprechenden Untersuchungen konnte festgestellt werden, dass die Zugabe von PKA Inhibitoren die Spätphase der LTP blockiert (Reymann et al 1998, Impey et al. 1996). PKA Inhibitoren blockierten dabei nicht nur die Spätphase der LTP sondern auch den Anstieg CRE-vermittelter Transkription (Frey et al.1993).

Durch die vorliegenden Ergebnisse kann ein Prozeß vermutet werden, in welchem eine PKA -abhängige, stimulationsspezifische Beteiligung CREB-vermittelter Transkriptionsfaktoren während der Frühphase der LTP eine cAMP-induzierte Kaskade von Genen aktiviert, die die Frühphase der LTP in die `Spätphase` überleitet. Die beschriebene Meßkammer stellt eine gute Grundlage für die Untersuchung intrazellulärer Vorgänge während hippocampaler LTP dar. Die Interpretation von Untersuchungsergebnissen aus Hippocampuschnitten *in vitro* ist allerdings nicht unproblematisch. Die Abgrenzung stimulationsspezifischer intrazellulärer Ereignisse von Reizartefakten, bleibt weiter ein Problem in der *in vitro* Technik. Die Empfindlichkeit der Hippocampuschnitte auf Umgebungsbedingungen ist in der Literatur ausführlich dargestellt worden. Zhou et al. 1995 berichten über den Anstieg von Fos, Jun und MAP2-Immunreaktivität durch eine hypoxische Schädigung der Hippocampuschnitte. Burgoon et al. 1997 berichten über den Einfluß der Schnittdicke auf die Überlebensfähigkeit der Hippocampuschnitte. Nowak et al. 1995 berichten über Veränderungen der Genexpression durch mangelhafte Blutversorgung von Rattenhirngewebe durch die Präparation. Der Einfluß der Temperatur in Verbindung mit einer Ischämie durch die Präparation ist ebenfalls untersucht worden. Hier konnten Churn et al. 1990 und Ginsberg et al. 1992 einen wesentlichen Einfluß der

Temperatur feststellen. Newman et al. 1992 konnten beweisen, dass reduzierte Temperaturen unmittelbar nach der Entnahme des Gehirns zu geringeren neuronalen Schäden im Hippocampus führen. Die Ergebnisse geben Hinweise darauf, dass *in vitro* Untersuchungstechnik für molekularbiologische Untersuchungen der intrazellulären Vorgänge während hippocampaler LTP nicht immer leicht zu bewerten ist. Es ist unbestritten, dass neuronales Antwortverhalten in Hippocampusschnitten nicht vollständig auf die Verhältnisse im intakten Hippocampus übertragbar sind (Bernard et al 1997, Claiborne et al. 1993). Bernard entwickelte vor diesem Hintergrund ein computergestütztes Modell, in dem die räumlich-zeitliche Verteilung von Aktionspotentialen in den Schaffer-Kollateralen und Moosfasern *in vivo* und *in vitro* nach der Auslösung eines Teststimulus nachgestellt werden konnte. Mit diesem Modell konnte gezeigt werden, dass die Entnahme der Hippocampi aus ihrem Gefüge ein Eingriff darstellt, der im Vergleich zu intakten Hippocampi veränderte synaptischen Reaktionen auf elektrische Stimulation bewirken kann. Die Unterschiede in der neuronalen Konnektivität zwischen CA1-Region und CA3-Region *in vitro* und *in vivo* können eine Erklärung dafür bieten, warum eine Vielzahl verschiedener synaptischer Antworten auf elektrische Stimulationen die *in vitro* gezeigt werden konnten, nicht in *in vivo* Modellen reproduziert werden konnten. Die Konnektivitätsargumente können helfen, die oft unterschiedlichen Ergebnisse verschiedener Labore auf gleiche Stimuli bei der *in vitro* Technik in Hippocampusschnitten zu erklären (Claiborne et al. 1993, Debanne et al. 1999). Eine Anzahl Differenzen von Untersuchungsergebnissen an Hippocampusschnitten, trotz gleicher Arbeitsmethoden, werden in der Literatur beschrieben (Kuba und Kumamoto 1990). Sayer et al. 1990 konnten zeigen, dass nach mehrmaliger Auslösung von LTP mit den gleichen Reizparametern die aufgenommenen EPSPs in der CA1-Region zwischen 30 bis 665 μV schwankten. Friedlander et al. 1990 konnten mit Untersuchungen an Hippocampusschnitten feststellen, dass trotz gleicher Reizparameter nicht in jedem Fall LTP ausgelöst werden konnte. Vor diesem Hintergrund sind unterschiedliche Ergebnisse trotz ähnlicher Versuchprotokolle erklärbar. Die Variabilität der Ergebnisse unterstreicht die Bedeutung der *in vivo* Technik für die Untersuchung intrazellulärer Vorgänge während hippocampaler LTP. Durch die Möglichkeit elektrische Potentialveränderungen im intakten Hippocampus zu messen, ohne den Hippocampus aus seinem histologisch-physiologischen Strukturgefüge herauslösen zu müssen, bestehen gute Voraussetzungen für reprodu-

zierbare Untersuchungsergebnisse. Dass die vorgelegten Ergebnisse der *in vivo* und *in vitro* Untersuchungen einen unterschiedlichen Verlauf der CREB-Aktivierung zeigen, ist vor diesem Hintergrund nicht überraschend. Während in den *in vitro* Untersuchungen die CREB-Aktivierung monophasisch verläuft, erscheint sie *in vivo* zweiphasig. Mit den vorliegenden Ergebnissen an frei beweglichen Tieren konnten die zeitliche und räumliche Dynamik der CREB Serin-133 Phosphorylierung während hippocampaler LTP charakterisiert werden. Die CREB-Phosphorylierung erschien zweiphasig, mit einem ersten, relativ instabilen, kurz anhaltenden Gipfel nach 30 min und einen zweiten, stabileren Gipfel der sich 2 h nach der Tetanisierung herausbildete, und bis zum 24 Stunden-Zeitpunkt anhielt (Abb. 6/S. 41). Das räumliche Aktivierungsmuster deutet darauf hin, dass CREB selektiv im Gyrus dentatus und in der CA1-Region benötigt wird, um LTP aufrechtzuerhalten. CREB wird hingegen nicht in der CA3-Region des ipsilateralen Hippocampus benötigt. Die CREB-Phosphorylierung wurde stimulationsspezifisch ausgelöst. Nur Hochfrequenzstimuli (HFS), die in der Lage waren, eine dauerhafte Erhöhung der synaptischen Aktivität zu verursachen, konnten deutliche Erhöhungen der hippocampalen CREB-Immunreaktivität hervorrufen. Niedrigfrequenzstimulationen (LFS), die keine Pop-Spike-, oder fEPSP-Erhöhung bewirkten, konnten keine Phosphorylierung von CREB induzieren. Nur Stimuli, die nichtdekrementale LTP induzierten, bewirkten eine massive, stabile und langanhaltende CREB-Phosphorylierung, während Stimuli, die dekrementale LTP verursachten, keine stabile CREB-Phosphorylierung hervorriefen. Die gute Korrelation zwischen stimuluspezifischer LTP-Generierung und CREB-Aktivierung unterstreicht die Bedeutung von CREB für LTP. CREB-Phosphorylierung ist vom Calciuminflux durch die NMDA-Kanäle abhängig, da eine Vorbehandlung der Versuchstiere mit dem nicht kompetitiven Blocker des NMDA-Rezeptors gekoppelten Ionenkanals MK 801 die Induktion von hippocampaler LTP und die sich dadurch ausgelöste CREB-Phosphorylierung am 30 Minuten-Zeitpunkt vollständig unterbunden werden konnte. Die Ergebnisse *in vivo* untermauern die Hypothese, dass CREB eine besondere Bedeutung als Schalter der Kurzzeit- in die Langzeitplastizität hat. Die Signalkaskaden, die zur Phosphorylierung von CREB führen, sind bisher noch unbekannt. Die Sequenzen in der näheren Umgebung von Serin-133 in CREB umfassen sowohl Erkennungsstellen von PKA, CamKII als auch für RSK (Sheng et al. 1991, Hagiwara et al. 1993, Impey et al. 1998), so dass diese Faktoren eine Bedeutung bei der Phosphorylierung von CREB ha-

ben könnten. Die frühe Phase der LTP kann durch Inhibitoren der CamKII unterbunden werden (Ito et al. 1993, Malinow et al. 1989), während die späte Phase der Langzeitpotenzierung von PKA Aktivität abhängig ist (Frey et al. 1993, Huang und Kandel 1994, Ito et al. 1991, Matthies und Reymann 1993). Lu et al. 1999 konnten zeigen, dass NO eine Bedeutung für die Spätphase von LTP zukommt. Othmakhova et al. 2000 konnten die Bedeutung von PKA in der Frühphase von LTP darstellen. Huang et al. 2000 zeigten in Amygdalaschnitten, dass PKA für die Ausbildung sowohl der frühen und späten Phase von LTP notwendig ist. Josselyn et al. 2001 konnten in Lernversuchen mit Ratten zeigen, dass Langzeiterinnerung und Lernen mit einer CREB-Aktivierung in der Amygdala verbunden ist. Ob die CamKII bei der Ausprägung der ersten Phase der CREB-Phosphorylierung beteiligt ist, oder PKA für den zweiten Anstieg verantwortlich ist, kann zum gegenwärtigen Zeitpunkt nicht geklärt werden. Letzte Arbeiten von Impey et al. 1998 vermuten eine sequentielle Aktivierung der ERK-MAPK-Signalkaskaden und der CREB-Kinase RSK 2, die zur Phosphorylierung von CREB führen könnten. Robertson et al. 1999 vermuten, dass PKC über Raf-1 oder Ras und den MEK-Pathway zur Phosphorylierung der MAP-Kinase führt. Xing et al. 1996 vermuten, dass die Phosphorylierung von CREB durch die MAP-Kinase über RSK vermittelt wird. Davis et al. 2000 zeigten in *in vivo* Studien im Gyrus dentatus, dass sowohl Elk-1 und zif268 nach der Auslösung von LTP hochreguliert sind. In der vorliegenden Arbeit wurde die Aktivität der MAPK-Signalkaskade durch den Einsatz eines Phosphotyrosin-204-spezifischen MAPK-Antikörper untersucht. MAPK-Immunreaktivität konnte nur deutlich zeitlich und räumlich getrennt von der Immunreaktivität von CREB beobachtet werden. Während 30 min nach dem Tetanus pCREB-Immunreaktivität deutlich in den Kernen der Granularzellen der CA1-Region nachgewiesen werden konnte, war zu diesem Zeitpunkt eine deutliche pMAP-Immunreaktivität nur in den Nervenfasern dieser Zellen nachweisbar. Die Ergebnisse lassen einen Prozeß vermuten, in dem die synaptische Aktivierung von MAPK, die nukleäre Translokation von RSK 2 induziert, welches anschließend zu einer Phosphorylierung von CREB führt. Alternativ könnte die MAP-Kinase andere Vorgänge während hippocampaler LTP unterstützen, z.B. Phosphorylierungen von neuronalen Zelladhäsionsmolekülen (Bailey et al. 1997). Obwohl CREB-Phosphorylierung zuerst im ipsilateralen Gyrus dentatus festgestellt werden konnte, beschränkte sie sich nicht ausschließlich auf dieses Gebiet. pCREB-Immunreaktivität konnte ebenfalls in

der ipsilateralen CA1-Region beobachtet werden. pCREB-Immunreaktivität konnte aber nicht in der CA3-Region, jedoch mit einer Verzögerung auch im contralateralen Gyrus dentatus nachgewiesen werden. Die einfachste Erklärung hierfür könnte die Tatsache sein, dass erhöhte synaptische Aktivität über intrahippocampale Kreisläufe vom ipsilateralen Gyrus dentatus zur ipsilateralen CA1-Region, wie auch zum contralateralen Gyrus dentatus ziehen könnten. Eher wahrscheinlich ist jedoch, dass der Tractus perforans den ipsilateralen Gyrus dentatus und die ipsilaterale CA1-Region parallel aktiviert. Bekannt ist auch, dass eine schwache erregende Bahn vom ipsilateralen entorhinalen Cortex zur contralateralen Area dentata zieht (Amaral und Witter 1989, Berger et al. 1997). Dazu korrespondiert, dass bei Tetanisierung des ipsilateralen Tractus perforans auch im contralateralen Gyrus dentatus LTP auftritt (Krug, unveröffentlichte Beobachtung). Es wurde bisher vermutet, dass die Erregung der ipsilateralen CA1-Region über die klassische dreisynaptische Schleife, von den Moosfasern, welche an den Pyramidenzellen der CA3-Region enden und über die Schaffer-Kollaterale zur CA1-Region zieht. Dennoch ist keine wesentliche CREB-Phosphorylierung in den Zellkernen der Pyramidenzellen in der CA3-Region festzustellen. Das ist nicht überraschend, da bekannt ist, dass diese Form der LTP, die an den Moosfasern gemessen werden kann, NMDA unabhängig ist und damit auch anderen Aktivierungsmechanismen unterliegt (Collinridge und Bliss 1995, Nicoll und Malenka 1995). Neuere Erkenntnisse von Kanterewicz et al. 2000 haben gezeigt, dass in der CA3-Region die Phosphorylierung von CREB durch PKA nicht über den ERK-Kinasepathway erfolgt. Hingegen konnte gezeigt werden, dass die ERK-Kinase bei der Ausprägung von NMDA unabhängigen LTP in der CA1-Region notwendig ist. Hier liegt ein ungeklärtes Problem vor. Der Tractus perforans innerviert auch die Pyramidenzellen der CA3-Region direkt. Unter bestimmten Bedingungen können die einzelnen Potentiale ausgelöst und LTP induziert werden (Krug, pers. Mitteilung). Die Tatsache, dass hier nach Auslösung von LTP keine pCREB-Aktivität dargestellt werden kann, läßt die Hypothese zu, dass in der CA3-Region ein anderer Aktivierungsmodus vorhanden ist. Die vorliegenden Ergebnisse zeigen, dass CREB-Phosphorylierung vom Calcium-Einstrom via NMDA-Rezeptoren abhängig ist. Obwohl substanzielle Übereinstimmung über die Bedeutung von CREB im Prozeß der Gedächtnisbildung besteht und die vorliegende Arbeit klar demonstriert, dass CREB spezifisch während hippocampaler LTP *in vivo* aktiviert wird, ist es weiter unbekannt, welche der vielen CREB- ATF- oder

CREM-Proteine in neuronaler Langzeitplastizität involviert sind. Mit der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Serin-133 CREB-Phosphorylierung zu zwei verschiedenen Zeitpunkten für die Konsolidierung von LTP bedeutsam ist. Während der erste Gipfel der CREB-Phosphorylierung schnell durch Dephosphorylierung abgebaut wird, erscheint der zweite Anstieg stabiler und langanhaltender, so dass er bis zum 24-Stunden-Zeitpunkt erhalten bleibt. CRE-vermittelte Genexpression wurde in anderen Untersuchungen frühestens 2 h nach dem Tetanus mit einem Maximum zum 4-6 Stunden-Zeitpunkt nachgewiesen (Impey et al. 1996), was vermuten lässt, dass eine stabile CREB-Phosphorylierung für die Induktion einer persistenten CRE-vermittelten Genexpression notwendig ist. Es bleibt allerdings weiterhin die Frage offen, welche Rolle hemmende CREM-Isoformen für die Konsolidierung eines zweiten Anstiegs der CREB-Phosphorylierung haben. In der Literatur sind mehrere CREM-Isoformen charakterisiert worden (Foulkes et al. 1991). CREM ist ein Mitglied der CREB-Familie und scheint eine wichtige Rolle in der nukleären Antwort auf physiologische und neuroendokrine Stimuli zu haben (de Groot und Sassone-Corsi 1993, Takahashi 1993). CREM hat einen strukturell ähnlichen Aufbau wie CREB. Das CREM-Gen kodiert eine Vielzahl verschiedener Proteine mit unterschiedlichen Funktionen, die zell- und gewebespezifisch exprimiert werden (Foulkes et al. 1992). CREM-Gen kodiert sowohl Transkriptionsaktivatoren (CREM τ , CREM τ 1 und τ 2, Foulkes et al. 1992; Laoide et al. 1993) und Transkriptionsrepressoren CREM α , β und γ (Foulkes et al. 1991). Die unterschiedlichen CREM-Proteinformen werden durch mehrere verschiedene Mechanismen im Zellkern generiert. Der genutzte Translationsmechanismus entscheidet über die Eigenschaft des CREM-Proteins. Alle CREM-Aktivatoren werden von einem „upstream“ Promotor generiert, während die Nutzung eines zweiten Promotors Repressoren generiert. Diese Repressoren werden inducible cAMP early repressors (ICER) genannt. Inwieweit diese Repressoren eine mögliche Bedeutung bei der Ausprägung der CRE-vermittelten Genexpression in hippocampaler LTP haben ist unbekannt. Die zellspezifische Expression der verschiedenen CREM-Formen gibt einen Hinweis auf die mögliche Bedeutung der CREM-Isoformen im zellulären Antwortverhalten auf ansteigendes cAMP. CREM-Proteine erkennen spezifisch CRE und zeigen das Bindungsverhalten von CREB (Loriaux et al. 1994). CREM-Proteine zeichnen sich allerdings durch eine höhere Bindungsaffinität zum CRE aus. Dadurch sind sie in der Lage, in Konkurrenz um die Bindung von

CRE-Bindungsstellen, CREB-Proteine zu verdrängen. Aus der Homologie in der Leucin-Zipper-Region des CREM-Gens resultiert die Eigenschaft der CREM-Proteine Dimere zu bilden. CREM-Proteine bilden Homodimere und Heterodimere mit CREB (Foulkes et al. 1992). Es sind CREM α -CREB Heterodimere, CREM β -CREB Heterodimere und CREM-Homodimere in JEG-3 Zellen beschrieben worden (Foulkes et al. 1991). In einer Vielzahl anderer Zellarten konnten diese Ergebnisse ebenfalls bestätigt werden (Foulkes et al. 1991). Danach bewirkt der Anstieg endogener CREM-Proteine eine Hemmung der CRE-vermittelten Genexpression. Diese Erkenntnisse lassen den Schluß zu, dass CREM-Proteine die CRE-Bindungsstellen als CREM-Homodimere oder CREM-CREB Heterodimere besetzen und blockieren können. In der Tat wirken CREM α , β direkt als Antagonisten der cAMP vermittelten Genexpression (Foulkes et al. 1991). Ansteigende cAMP-Konzentrationen bewirken nach Besetzung der CRE-Bindungsstellen mit CREM keine Veränderung am CRE (Habener 1990, Sassone-Corsi et al. 1988 b) und CRE-vermittelte Transkription wird dauerhaft unterbunden. Steigende cAMP Spiegel können allerdings verbleibende CREB-Homologe aktivieren und die transkriptionshemmende Wirkung des CREM aufheben und damit CRE-vermittelte Transkription auslösen. Jüngere Untersuchungen an CREB-CREM α Heterodimeren haben gezeigt, dass diese Formen nur ein Drittel der transkriptionalen Aktivität von CREB-Homodimeren erreichen (Loriaux et al. 1994), während CREM-Homologe gar keine transkriptionale Aktivität entfalten. Die möglichen heterodimeren CREB-CREM-Kombinationen verändern die kombinatorischen Möglichkeiten und können damit auch die Funktion von CREB und CREM nachhaltig beeinflussen. CRE-Bindungsproteine sind nukleäre Ziele verschiedener Signalwege, die intrazelluläres cAMP als second messenger benötigen. Obwohl die Proteine CREM und CREB zu verschiedenen Signalwegen gehören, ist ihre Struktur ähnlich und sie binden an ähnliche DNA-Regionen. Die unübliche Eigenschaft des CREM-Gens zwei unterschiedliche DNA-Bindungsstellen zu besitzen, muß als Möglichkeit interpretiert werden in der Zelle ähnliche, wenig differente Modulator-Proteine zu produzieren. Der Gebrauch von alternativen DNA-Bindungsstellen und die Generierung verschiedener mRNA Formen läßt die Feststellung zu, dass die Entscheidung darüber welches CREM-Protein exprimiert wird, auf posttranskriptionaler Ebene erfolgt. Die An- oder Abwesenheit von CREM-Proteinen kann direkt auf das zelluläre Antwortverhalten

von cAMP-abhängiger Transkription einwirken. CREM-Proteine sind als negative Regulatoren der cAMP-vermittelten Transkription beschrieben worden (de Groot und Sassone-Corsi 1993). Die Regulation der cAMP vermittelten Genexpression durch CREB und CREM α hängt auch davon ab, ob CREM α durch PKA phosphoryliert werden kann oder nicht. Die Phosphorylierung von mindestens einer CREB-Untereinheit ist nötig, um PKA induzierte CRE-vermittelte Genexpression auszulösen (Loriaux et al. 1994). CREB-CREM-Heterodimere, die eine Phosphorylierungsstelle von CREB besitzen, zeigen unterschiedliche transkriptionale Aktivitäten, die vom Phosphorylierungsstatus der dimeren Komponente abhängt. Diese Ergebnisse lassen einen Mechanismus vermuten, in dem durch die Möglichkeit der Heterodimerisierung und Phosphorylierung von CREM verschiedene Stufen der Transkriptionskontrolle erreicht werden können. Eine CREM-vermittelte Regulation der CRE-vermittelten Transkription könnte eine mögliche Erklärung für den Abfall der CREB-Phosphorylierung nach 30 min und dem zweiten Anstieg nach 2 h sein. Es ist auch wichtig festzuhalten, dass Korrelationen zwischen dem Zeitverlauf der CREB-Phosphorylierung und der Expression von „Frühen Genen“ (Immediate early genes= IEG) nach Auslösung von LTP bestehen (Dragunow et al. 1989). Aufgrund durchgeführter *in vivo* Untersuchungen konnte festgestellt werden, dass die tetanische Stimulation des Tractus perforans die Expression von Fos verwandten Genen auslöst (Hughes und Dragunow 1995). Eines der ersten untersuchten frühen Gene im Modell LTP war NGFI-A (Milbrandt 1987). Nach der Induktion von LTP konnte ein schneller Anstieg beobachtet werden (Cole et al. 1989). In *in situ* Untersuchungen konnten bereits 15 min nach der Stimulation bis 3 h danach erhöhte mRNA Mengen festgestellt werden. Dabei war die Persistenz von LTP deutlich von der Höhe des NGFI-A Gipfels abhängig (Richardson et al. 1992). Wie NGFI-A LTP unterstützt ist allerdings unklar. 1 bis 2 h nach Auslösung von LTP erscheinen ebenfalls viele Gene hochreguliert (Hevroni et al. 1998). Abraham et al. 1991 konnten nachweisen, dass innerhalb dieses Zeitfensters ein weiteres frühes Gen -zif268- hochreguliert ist. Diese Ergebnisse lassen die Vermutung zu, dass die Expression der IEG die zeitliche Lücke zwischen der CREB-Aktivierung und der nukleären Genexpression schließen könnte (Hughes and Dragunow 1995). Es ist auch bekannt, dass der Prozeß der heterosynaptischen Verstärkung (hetero synaptic facilitation) in der Meeresschnecke *Aplysia* mit einer Welle der Proteinsynthese verbunden ist. Der sensitivierende Reiz aktiviert eine Gruppe von Interneuronen,

die Synapsen mit sensorischen Neuronen bilden. Diese erregenden Interneuronen - einige von ihnen sind serotonerg - verstärken die Ausschüttung von Transmittern aus den sensorischen Neuronen, in dem sie die Menge des Second Messenger cAMP in den sensorischen Neuronen vergrößern. Bei *Aplysia* konnte in den ersten 2 h nach Applikation von 5-HT zehn verschiedene Proteine nachgewiesen werden. Diese frühen Veränderungen werden durch eine zweite Welle nach 3 h und später durch eine dritte längeranhaltende Welle der Proteinsynthese ergänzt (Barzilai et al. 1989, Abel und Kandel 1998). Ähnliche mehrphasige Verläufe der Proteinsynthese konnten ebenfalls in einfachen Lernversuchen festgestellt werden (Matthies 1989). Es ist durchaus vorstellbar, dass die zweiphasige Phosphorylierung von CREB verschiedene Wellen der Proteinsynthese auslöst, die benötigt werden um plastische Veränderungen der synaptischen Aktivität zu bewirken. Andererseits konnte in Schnitten *in vitro* nur eine monophasische Aktivierung durch LTP gezeigt werden. Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass die zeitliche und räumliche Erscheinung der CREB-Phosphorylierung während hippocampaler LTP *in vivo* komplexer ist, als bisher erwartet. Der Transkriptionsfaktor CREB wird spezifisch an zwei verschiedenen Zeitpunkten als Antwort auf Stimuli, die LTP induzieren, benötigt. Diese Ergebnisse unterstreichen die Bedeutung der Wiederaufnahme der Untersuchungen an der CREB / ATF Familie der Transkriptionsfaktoren als mögliche wichtige Komponenten bei der Umschaltung von Kurzzeit in Langzeitplastizität.

Darüber hinaus soll erwähnt werden, dass durch die Kombination von *in vitro* Untersuchungen an Hippocampuschnitten und *in vivo* Experimenten an freibeweglichen Ratten die Aussagen zur Bedeutung der MAP-Kinase und CREB, zweier Schlüsselsubstanzen der synaptischen Plastizität, erweitert und präzisiert werden können. Es ist der Vorteil der *in vitro* Experimente, dass an Hirnschnitten gezielte Stimulationen und Ableitungen für Zeitreihen gemacht werden können. Auch die Beeinflussung der Langzeitpotenzierung durch Einspülung pharmakologisch wirksamer Stoffe ist leicht möglich. Diese Untersuchungen sind *in vivo* mit einem erheblich größeren Aufwand verbunden. Die nachgewiesene Vitalität der Hippocampuschnitte über einen längeren Zeitraum zeigt, dass die vorgestellte Untersuchungstechnik eine Verbesserung der bisherigen Untersuchungsmethoden darstellt. Die neue Meßkammer ermöglicht die Untersuchung und

Aufnahme von Zeitverläufen, ohne eine Degeneration der zu untersuchenden Neuronpopulation befürchten zu müssen. Die Kombination von *in vitro* und *in vivo* Untersuchungsmethoden, verbunden mit einer parallelen Beobachtung und Auswertung von elektrophysiologischen und immunhistochemischen Befunden, erlaubt eine wesentlich fundiertere Betrachtung des Phänomens der synaptischen Plastizität. Das soll im Hinblick auf den medizinischen Aspekt, am Vergleich der Ausbildung nichtdecrementaler und decrementaler LTP, betont werden. Hier konnte die Parallelität des physiologischen Ablaufs und der molekularen Veränderungen sehr intensiv gezeigt werden. Teile der dargestellten Ergebnisse wurden bereits publiziert:

Matthies, H., Schulz, S., Thiemann, W., Siemer, H., Schmidt, H., Krug, M., Höllt, V.: Design of a multiple slice interface chamber and application for resolving the temporal pattern of CREB-phosphorylation in hippocampal long-term-potential, *Journal of Neuroscience Methods*, 78 (1997b)

Schulz, S., Siemer, H., Krug, M., Höllt, V.: Direct evidence for biphasic cAMP responsive element-binding protein phosphorylation during long-term-potential in the rat dentate gyrus *in vivo*; *Journal of Neuroscience*, 1 (1999)