

4. Diskussion

4.1	Transgene Strategie und verhinderte Translokation der dendritischen Arc/Arg3.1-mRNA	96
4.2	Unveränderte konstitutive Expression des Arc/Arg3.1-Proteins	97
4.2.1	Arc/Arg3.1-Expression reagiert mit verschiedenen zeitlichen Komponenten auf die synaptische Aktivität	98
4.2.2	Zielgerichtete Verteilung der postsynaptischen Proteine	100
4.2.3	Komplexe Regulation der neuronalen Arc/Arg3.1-Expression	101
4.3	Synaptische Funktionen des Arc/Arg3.1-Proteins	103
4.4	Unterschiedliche Bedeutung der dendritischen Arc/Arg3.1-Synthese für verschiedene Gedächtnis-Systeme	106
4.5	Ein intermediärer Prozess während der Gedächtniskonsolidierung ist von der dendritischen Arc/Arg3.1-Synthese abhängig	108
4.5.1	Intermediäre Prozesse in der Gedächtnisbildung bei Invertebraten	108
4.5.2	Ein intermediärer Prozess während der hippocampusabhängigen Gedächtniskonsolidierung der Mäuse ist von der dendritischen Arc/Arg3.1-Protein-Synthese abhängig	109
4.5.3	Ein zelluläres Modell der hippocampusabhängigen Konsolidierung des Langzeit-Gedächtnisses	110
4.6	Ausblick	113

Die synaptische Plastizität, also die Fähigkeit von Neuronen, die Übertragungsstärke ihrer Synapsen zu verändern, liegt der Entwicklung des Nervensystems, dem Lernen und Gedächtnis, aber auch neuropathologischen Prozessen zugrunde. Wie das Langzeit-Gedächtnis, so benötigen auch andere lang anhaltende Formen der synaptischen Plastizität, einschließlich der LTP, komplexe Veränderungen in der molekularen Zusammensetzung und in der Struktur der Synapsen und sind von der Synthese neuer mRNA und neuer Proteine abhängig (Goelet et al., 1986; Morgan et al., 1987; Sheng und Greenberg, 1990). Die plastischen Eigenschaften von Nervensystemen könnten daher auf aktivitätsinduzierten Veränderungen in der Expression spezifisch früh exprimierter Gene (IEGs) beruhen (Kuhl, 2000). Diese genomische Reaktion von synaptisch aktivierten Neuronen umfasst die Expression zum einen von Transkriptionsfaktoren, wie *c-fos* oder *egr1/zif268* (Greenberg et al., 1986; Morgan et al., 1987; Saffen et al., 1988), und zum anderen von Effektorgenen, deren Proteine direkt an der Synapse lokalisiert sind und somit an den dortigen Veränderungen unmittelbar beteiligt sein könnten (Nedivi et al., 1993; Qian et al., 1993; Yamagata et al., 1993; Frey et al., 1996; Lanahan und Worley, 1998; Kauselmann et al., 1999; Konietzko et al., 1999). Ein solches Effektorgen ist das *Arc/Arg3.1*, das unter den aktivitätsregulierten Genen insofern einzigartig ist, als sowohl mRNA als auch Protein dendritisch lokalisiert und selektiv an den aktivierten Synapsen akkumuliert sind (Link et al., 1995; Lyford et al., 1995; Steward und Worley, 2001). Die essentielle Rolle des *Arc/Arg3.1* bei der Stabilisierung der lang anhaltenden Formen der synaptischen Plastizität (LTP und LTD) und bei der Konsolidierung des Langzeit-Gedächtnisses in verschiedenen expliziten und impliziten Lernparadigmen ist in den *Arc/Arg3.1*-defizienten Mäusen bestätigt (Plath et al., 2006).

In der vorliegenden Arbeit wird die funktionelle Rolle vom dendritischen Transport der *Arc/Arg3.1*-mRNA durch Generierung einer transgenen Mauslinie mit *Arc/Arg3.1*-Knockout-Hintergrund *in vivo* untersucht. Das Genom der transgenen Mäuse (tg) trägt ein *PI derived artificial chromosome* (PAC), in dem die für den dendritischen Transport der mRNA zuständige 3'UTR-Sequenz des *Arc/Arg3.1*-Gens durch eine andere 3'UTR-Sequenz ausgetauscht ist. Die Auswirkungen dieser genetischen Mutation auf die zeitliche und räumliche *Arc/Arg3.1*-Expression der tg-Mäuse werden zunächst mit molekularbiologischen und biochemischen Methoden analysiert. Die Charakterisierung der tg-Mäuse auf der Verhaltensebene bildet dann den Abschluss dieser Arbeit.

Drei überraschende Ergebnisse tauchen während der Charakterisierungen der tg-Mäuse auf.

Erstens zeigt, abweichend von der ursprünglichen Erwartung, die Verhinderung des Arc/Arg3.1-mRNA-Transportes in den bisherigen Analysen keinen Einfluss auf die konstitutive und induzierte Expression des Arc/Arg3.1-Proteins in den Postsynapsen. Daraus ergeben sich zwei offene Fragen: Welcher Mechanismus der zielgerichteten Proteinverteilung ist für die synaptische Expression des Arc/Arg3.1-Proteins zuständig? Wie interagieren die somatische und die dendritische Synthese des Arc/Arg3.1-Proteins in Bezug auf die synaptische Arc/Arg3.1-Expression? Außerdem lässt, da eine quantitative Veränderung in der konstitutiven Arc/Arg3.1-Expression in den Synapsen der tg-Mäuse ausgeschlossen ist, das veränderte Verhalten der tg-Mäuse einen Rückschluss zu auf eine spezielle Rolle der dendritischen Arc/Arg3.1-Protein-Synthese bei der Konsolidierung des Langzeit-Gedächtnisses.

Zweitens liefern uns die Ergebnisse aus den Experimenten dieser Arbeit, nämlich die reduzierte Gedächtnis-Retention der tg-Mäuse bei der hippocampusabhängigen expliziten NO-Aufgabe und ihr unverändertes Langzeit-Gedächtnis bei der hippocampusunabhängigen impliziten CTA-Aufgabe, einen Hinweis darauf, dass die dendritische Arc/Arg3.1-Synthese für verschiedene Gedächtnis-Systeme von unterschiedlich notwendiger Bedeutung ist.

Drittens lässt uns das ungewöhnliche Verhalten der tg-Mäuse in der kontextabhängigen Angstkonditionierung, bei der sie ein vollständiges Langzeit-Gedächtnis trotz des beeinträchtigten intermediären Gedächtnisses zeigen, über den Zeitverlauf der Gedächtniskonsolidierung nachdenken. Meine Experimente schlagen vor, dass ein Protein-Synthese-abhängiges Gedächtnis in mindestens zwei Phasen aufgeteilt werden kann, denen unterschiedliche molekulare Mechanismen unterliegen.

4.1 Transgene Strategie und verhinderte Translokation der dendritischen Arc/Arg3.1-mRNA

Durch unsere transgene Strategie, den Austausch der gesamten Arc/Arg3.1-3'UTR gegen die *egr1/zif268*-3'UTR ist es uns gelungen, die Translokation der Arc/Arg3.1-mRNA quantitativ zu verhindern. In anderen Fällen gibt es auch Hinweise, dass in den hippokampalen Neuronen die 3'UTR von Arc/Arg3.1 eine wichtige Rolle für die dendritische Verteilung der mRNA spielt (Kobayashi et al., 2005). In dieser Arbeit bestätigt der Austausch der 3'UTR-Sequenz in dem Transgen die Notwendigkeit dieses Sequenzbereiches für das dendritische Targeting der Arc/Arg3.1-mRNA *in vivo*. In einer neuen Studie berichtete Gao, dass eine in dem offenen Leserahmen des Arc/Arg3.1-Gens lokalisierte funktionelle A2RE (*hnRNP A2 response element*)-ähnliche Sequenz für die Verteilung der mikroinjizierten RNA in die Dendriten ausreichend und notwendig ist (Gao et al., 2008). Doch die Tatsache, dass der Arc/Arg3.1-ORF in der vorliegenden Arbeit intakt bleibt, deutet darauf hin, dass diese Sequenz allein nicht ausreicht, um im intakten Gehirn die mRNA in die Dendriten zu leiten.

Der 3'UTR-Bereich des Arc/Arg3.1-Gens enthält zudem noch andere Sequenz-Elemente, die für die posttranskriptionelle Regulation der Arc/Arg3.1-mRNA bezüglich der Translokation und Immobilisierung bzw. der Translation und Degradation eine wesentliche Rolle spielen. So berichtete zum Beispiel Giorgi, dass der über die zwei im 3'UTR-Bereich lokalisierten Introns vermittelte Prozess zum Abbau der *pre*-mRNA die Menge der Arc/Arg3.1-mRNA und des Proteins in kortikalen Neuronen reguliert (Giorgi et al., 2007). In den tg-Mäusen sind die zwei Introns durch den 3'UTR-Austausch deletiert. Die erhöhte Menge der transgenen Arc/Arg3.1-mRNA versus der Wildtyp-mRNA in den tg-Mäusen mit dem Arc/Arg3.1^{+/-}-Hintergrund lässt sich mit der Verhinderung des beschriebenen Prozesses erklären. Allerdings muss noch ausgeschlossen werden, dass eine von dem Endogen abweichende Promoter-Aktivität des Transgens die Produktion der mRNA erhöht.

4.2 Unveränderte konstitutive Expression des Arc/Arg3.1-Proteins

Aufgrund der verhinderten mRNA-Translokation ist die lokale Synthese des Arc/Arg3.1-Proteins in den Dendriten unterbunden. Dies führt aber überraschenderweise zu keiner sichtbaren Veränderung in Bezug auf die konstitutive Expression des Arc/Arg3.1-Proteins. In den tg- und den wt-Mäusen wird eine vergleichbar große Menge Arc/Arg3.1-Protein produziert. In den tg-Mäusen ist dieses Protein trotz der fehlenden dendritischen Protein-Synthese in den Dendriten verteilt, in den PSDs akkumuliert und über PSD-95/SAP90 mit dem postsynaptischen Proteinkomplex assoziiert. Die Quantität der konstitutiven Arc/Arg3.1-Expression in den Synapsen weist keinen Unterschied zwischen tg- und wt-Tieren auf. Die zielgerichteten Eigenschaften der Arc/Arg3.1-Verteilung und der Zeitverlauf der Arc/Arg3.1-Expression in den Dendriten schließen die Möglichkeit aus, dass die Anwesenheit des Arc/Arg3.1-Proteins in den Dendriten der tg-Mäuse durch unspezifische Protein-Diffusion zustande kommt.

Durch dieses überraschende Ergebnis werden zwei neue Fakten der aktivitätsabhängigen Arc/Arg3.1-Expression aufgedeckt. Erstens, neben der unmittelbar frühen Expression als Antwort auf eine akute Induktion der neuronalen Aktivität besteht eine langsame, späte Komponente der Arc/Arg3.1-Expression als Reaktion auf eine chronische Veränderung der synaptischen Aktivität. Diese Komponente ist als konstitutive Basis-Expression in den Mäusen unter nicht-stimulierender Bedingung deutlich nachweisbar. Sie ist von der somatischen, aber nicht von der dendritischen Protein-Synthese abhängig. Zweitens existiert für die synaptische Expression des Arc/Arg3.1-Proteins parallel neben dem bisher bekannten mRNA-Transport und der anschließenden dendritischen Translation ein zweiter Mechanismus, nämlich die somatische Protein-Synthese und der nachfolgende Protein-Transport. Diese Aspekte werden im Folgenden diskutiert.

4.2.1 Arc/Arg3.1-Expression reagiert mit verschiedenen zeitlichen Komponenten auf die synaptische Aktivität

Ursprünglich wurde Arc/Arg3.1 als ein unmittelbar frühes Effektorgen identifiziert (Link et al., 1995; Lyford et al., 1995). Die Expression sowohl der Arc/Arg3.1-mRNA als auch des Proteins wird durch eine Vielzahl der NMDA-Rezeptor-aktivierenden Stimuli induziert, wozu die generalisierte Epilepsie, die LTP-induzierende Stimulation, die Applikation von BDNF und verschiedene Verhaltensparadigmen gehören (Link et al., 1995; Guzowski et al., 1999; Yin et al., 2002). Zudem akkumuliert die Arc/Arg3.1-mRNA nach spezifischer Stimulation eines räumlich begrenzten, synaptischen Bereiches selektiv an den aktivierten Synapsen (Steward und Worley, 2001). Dieses Verteilungsmuster des Arc/Arg3.1-Proteins konnte in unserem Labor mit einer vergleichbaren Stimulation auch im Maus-Hippokampus demonstriert werden (Plath, 2004). Diese selektive Verteilung von Arc/Arg3.1 deutet auf eine lokale Protein-Synthese hin. Die lokale Translation der Arc/Arg3.1-mRNA an den Synapsen wurde in einer späteren Studie unter *in vitro* Bedingungen nachgewiesen. Die Applikation von BDNF zu aufgereinigten Synaptosomen führte aufgrund der Induktion der lokalen Protein-Synthese zu einer spezifisch erhöhten Produktion des synaptischen Arc/Arg3.1-Proteins und diese Induktion war ebenfalls abhängig von der Aktivierung des NMDA-Rezeptors (Yin et al., 2002). Alle diese Befunde sprechen für einen wesentlichen Beitrag der dendritischen Arc/Arg3.1-Synthese zur aktivitätsinduzierten Modifizierung der Postsynapsen und weiterhin zur Stabilisierung der veränderten synaptischen Übertragungsstärke bzw. zur Konsolidierung des Langzeit-Gedächtnisses, obwohl in den bisher publizierten Studien die spezifischen Funktionen des dendritisch synthetisierten Arc/Arg3.1 noch nicht erklärt werden konnten. Mit der vorliegenden Arbeit hoffe ich, zum besseren Verständnis dieses Aspektes beizutragen (siehe Kapitel 4.4, 4.5).

Eine Schwierigkeit bei der Untersuchung der dendritischen Protein-Synthese des Arc/Arg3.1 besteht darin, dass dieser dendritenspezifische Prozess immer von einem anderen Prozess der somatischen Protein-Synthese begleitet wird. Sowohl nach der generalisierten Epilepsie als auch im Fall der laminaspezifischen Stimulation oder der BDNF-vermittelten Induktion ist ein großer Anteil von Arc/Arg3.1-Protein in den Somata nachweisbar (Plath 2004; Aakalu et al., 2001). Die Frage, ob das somatisch synthetisierte Arc/Arg3.1-Protein eine Funktion

ausschließlich im Soma bzw. im Zellkern übernimmt, oder ob dieses auch in die Dendriten transportiert und hier seine Funktionen im Bereich der Synapsen ausübt, war bisher offen geblieben. Die auch nach Verhinderung der mRNA-Translokation unbeeinflusste synaptische Arc/Arg3.1-Expression in den tg-Mäusen gibt uns eine eindeutige Antwort: Das somatisch synthetisierte Arc/Arg3.1-Protein wird aktiv in die Dendriten transportiert. Darüber hinaus ist beim Vergleich der synaptischen Basis-Expression zwischen wt- und tg-Tieren eine konstitutive Komponente der Arc/Arg3.1-Expression festzustellen, die sich als unabhängig von der dendritischen Arc/Arg3.1-Synthese erweist. Diese Ansicht wird durch diverse vorhergehende Studien in verschiedenen experimentellen Systemen bestärkt. Zum Beispiel, demonstrierte Shepherd et al. (2006) eine konstitutive Expression des endogenen Arc/Arg3.1 in den Somata und Dendriten der primären hippocampalen und kortikalen Neuronen. Diese Expression wurde interessanterweise durch die über TTX bzw. Bicucullin vermittelten chronischen Veränderungen der neuronalen Aktivität dynamisch reguliert. Weitere Untersuchungen zeigten, dass das Arc/Arg3.1-Protein durch seinen Einfluss auf den endozytotischen Prozess des AMPA-Rezeptors in dem homoöstatischen *synaptic scaling* involviert ist. Bemerkenswert ist, dass in einem Überexpression-Experiment ein Arc/Arg3.1-ORF-Konstrukt ohne die 3'UTR in die Neuronen transfiziert wurde. Das exprimierte rekombinante Protein war überall bis in den distalen dendritischen Bereich der Zellen verteilt und blockierte ein durch TTX induziertes *synaptic scaling*. In diesem Fall haben die Autoren die durch die akute Synapsenaktivierung induzierte, von der Lokal-Protein-Synthese abhängige Arc/Arg3.1-Expression nicht weiter verfolgt, sondern sich auf die Funktion des somatisch synthetisierten Arc/Arg3.1 in den Synapsen konzentriert. Die Transfektion eines ähnlichen Arc/Arg3.1-ORF-Konstruktes in kultivierte organotypische hippocampale Schnitte führte zu einer entsprechenden Reduktion der über den AMPA-Rezeptor vermittelten synaptischen Übertragung (Rial Verde et al., 2006). Auch hier konnten die Autoren den Aspekt hinsichtlich der akuten Akkumulation der Arc/Arg3.1-mRNA in den Dendriten nicht berücksichtigen.

Die charakteristische Veränderung in der hippocampalen LTP der Arc/Arg3.1-Knockout-Mäuse mit einer 50%igen Erhöhung in der frühen Phase (innerhalb 30 Minuten nach der LTP-Induktion) und einer fehlenden späten Phase (Plath et al., 2006) deutet ebenfalls darauf hin, dass das Arc/Arg3.1-Protein verschiedene synaptische Funktionen mit unterschiedlichen Zeitverläufen nach synaptischer Aktivierung übernimmt.

Der zeitliche Verlauf der Arc/Arg3.1-mRNA-Transkription nach akuter synaptischer Aktivierung und dessen Abhängigkeit von Protein-Synthese wurde von Li et al. (2005) untersucht. In dieser Studie demonstrierten die Autoren, dass die aktivitätsinduzierte Arc/Arg3.1-Transkription im Gyrus dentatus der Mäuse nach einer unmittelbar frühen Protein-Synthese-unabhängigen Phase in eine späte Protein-Synthese-abhängige Phase übergeht. Zum Beispiel wurde vier Stunden nach einem Kainat-induzierten Krampfanfall die Produktion der Arc/Arg3.1-mRNA durch einen über die unmittelbar früh exprimierten Transkriptionsfaktoren *egr1/zif268* bzw. *egr3* vermittelten Mechanismus moduliert.

4.2.2 Zielgerichtete Verteilung der postsynaptischen Proteine

Trotz fehlender dendritischer Translation ist das Arc/Arg3.1-Protein der tg-Mäuse in der PSD angereichert und über die Assoziation mit PSD-95/SAP90 in dem postsynaptischen Gerüst integriert. Dieses Protein kann nur nach der somatischen Synthese über einen aktiven Transport-Prozess des Proteins selber an seinem Zielort – der Postsynapse – lokalisiert werden.

Die bisherigen Forschungen über die Mechanismen der synaptischen Lokalisation des Arc/Arg3.1-Proteins beschreiben ausschließlich den Weg über den mRNA-Transport und die anschließende lokale Protein-Synthese in den Dendriten. Die in den letzten Jahren gewonnenen Kenntnisse über die zielgerichtete Verteilung der anderen postsynaptisch lokalisierten Proteine legen uns jedoch ein neues Modell nahe, in dem die postsynaptischen Proteine über zwei parallel laufende Wege gerichtet an den Zielort gelangen.

Einen wichtigen Hinweis liefern uns die Untersuchungen der synaptischen Verteilung der Shank-Proteine und ihrer kodierenden mRNAs. Böckers et al. (2004) demonstrierte eine Isoform- und Zelltyp-spezifische dendritische Verteilung der Shank-Protein-kodierenden mRNAs. Danach sind Shank1- und Shank3-mRNA in den distalen dendritischen Bereichen der Körnerzellen und Pyramidenzellen des Ratten-Hippokampus *in situ* nachweisbar. Auf der anderen Seite postulierte Gerrow et al. (2006) aufgrund der Beobachtungen in einer *time-lapse imaging* Studie, dass in den Somata von transfizierten jungen hippocampalen Neuronen die Shank-Proteine zusammen mit dem PSD-95/SAP90 und dem GKAP einen *pre*-Komplex

der postsynaptischen Gerüstproteine aufbauen. Nach seinem Transport in die Dendriten dient dieser *pre*-Komplex dann als postsynaptischer Bestimmungsort für die anlaufenden Synaptogenesen.

Die Protein-Verteilung in den Maus-Mutanten mit einer 3'UTR-Deletion der alpha-CaMKII ist ein weiterer Hinweis auf die parallel verlaufenden Mechanismen für die postsynaptische Protein-Verteilung. In diesen Mäusen ist ein Teil der Kinase in den Postsynapsen erhalten geblieben (Miller et al., 2002). Die Autoren erklärten diesen Befund mit einem möglichen Transport der im Soma synthetisierten und zusammengebauten Holokinase in die Dendriten.

4.2.3 Komplexe Regulation der neuronalen Arc/Arg3.1-Expression

Seit der Identifizierung des Arc/Arg3.1 vor 13 Jahren geben uns viele Untersuchungen einschließlich dieser Arbeit einen deutlichen Hinweis, dass das Arc/Arg3.1 als ein aktivitätsreguliertes Gen auf allen Stufen bis hin zum Einbau des Proteinproduktes in die Synapsen präzise reguliert wird. Die wesentlichen, aufgeklärten Regulationsmechanismen der Arc/Arg3.1-Expression werden im Folgenden kurz zusammengefasst.

Auf der transkriptionellen Ebene reagiert das Arc/Arg3.1-Gen zuerst in einer unmittelbar frühen Phase mit einer schnell erhöhten Rate der mRNA-Synthese auf eine akute Aktivierung der Synapsen. Dieser Prozess wird durch die Aktivierung des NMDA-Rezeptors eingeleitet, ist von der Aktivität der PKA und MAPK abhängig (Waltereit et al., 2001) und benötigt keine Synthese von neuen Proteinen (Link et al., 1995; Lyford et al., 1995). Zu einem späteren Zeitpunkt geht die aktivitätsinduzierte Arc/Arg3.1-Transkription in eine Protein-Synthese-abhängige Phase über, in der die durch die Aktivität früh angeschalteten Transkriptionsfaktoren *egr1/zif268* bzw. *egr3* die Synthese der Arc/Arg3.1-mRNA regulieren (Li et al., 2005).

Nach der Transkription wird die mRNA ins Soma transportiert. Hier sind zwei Mechanismen für ihre weitere Prozessierung operativ. Einerseits wird ein Teil der Arc/Arg3.1-mRNA in die Dendriten transportiert und akkumuliert dort an aktivierten Synapsen (Steward und Worley, 2001). Diese mRNA-Moleküle können dann durch einen über den NMDA-Rezeptor vermittelten, noch unbekanntem Mechanismus der dendritischen Translation schnell, aber nur

transient auf einen lokalen synaptischen Reiz reagieren (Yin et al., 2002). Andererseits wird das Arc/Arg3.1-Protein im Soma synthetisiert und weiter durch einen aktiven Transport-Prozess in die Synapsen transportiert (siehe diese Arbeit). Dieser Weg stellt einen langsamen, aber kontinuierlichen Prozess dar, der nicht nur zu einer aktivitätsbedingten konstitutiven Basis-Arc/Arg3.1-Expression führt, sondern auch für den Effekt von Arc/Arg3.1 für die späte Konsolidierung des Langzeit-Gedächtnisses verantwortlich ist (siehe Kapitel 4.5).

Andere Aspekte hinsichtlich der Arc/Arg3.1-Expression bleiben jedoch noch unklar. Die neuen in dieser Arbeit von den tg-Mäusen gewonnenen Kenntnisse über den Arc/Arg3.1-Protein-Transport muss noch in den wt-Tieren verifiziert, und die für den dendritischen Transport der Arc/Arg3.1-mRNA bzw. des Proteins zuständigen Mechanismen müssen weiter untersucht werden. Zudem stellt uns die physiologische Bedeutung der komplexen Regulation der Arc/Arg3.1-Expression vor neue Fragen. Meiner Ansicht nach dient das Arc/Arg3.1-Protein in den Neuronen als ein Sensor-Effektor-Molekül. Seine Expression kann mit verschiedenen zeitlichen und räumlichen Mustern auf die unterschiedlichen Muster des synaptischen *Input* eines Neurons reagieren. So führt zum Beispiel ein lokaler, synapsenspezifischer *Input* zuerst zu einer Transkriptions-unabhängigen Aktivierung der lokalen Translation der vorhandenen dendritischen Arc/Arg3.1-mRNA. Je nach der *Input*-Stärke reagiert die Transkription des Arc/Arg3.1-Gens unterschiedlich. Eine robuste synaptische Stimulation induziert parallel zur Aktivierung der lokalen Protein-Synthese die transkriptionelle Aktivierung, die mit einer robusten somatischen Protein-Synthese verbunden ist. Das dabei entstandene Arc/Arg3.1-Protein sorgt für die spätere Stabilisierung der durch die Aktivität modifizierten Synapsen. Auf die gesamte Zelle betreffende chronische Veränderung der neuronalen Aktivität reagiert das Arc/Arg3.1-Gen vermutlich mit dem langsamen, aber lang anhaltenden Modul, was zu einer zellenumfassenden Veränderung der Expression führt. Ein solches Modell der aktivitätsabhängigen Reaktion der Arc/Arg3.1-Expression ist in der Abbildung 4.1 dargestellt. Die entscheidende Frage ist dann, welche molekularen Funktionen das Arc/Arg3.1-Protein in den Neuronen veranlasst?

4.3 Synaptische Funktionen des Arc/Arg3.1-Proteins

Einige Forschungsergebnisse in den letzten Jahren ermöglichen uns einen ersten Einblick in die möglichen molekularen Wirkungsweisen des Arc/Arg3.1-Proteins in den Synapsen.

Chowdhury et al., (2006) charakterisierte die Interaktionen zwischen Arc/Arg3.1 und Dynamin bzw. spezifischen Isoformen von Endophilin (2 und 3) – Komponenten der endozytotischen Maschinerie. Die mit einem Arc/Arg3.1-ORF-Konstrukt transfizierten Neuronen zeigten eine reduzierte Expression von GluR1 (der AMPA-Rezeptor-Untereinheit 1) auf der Zelloberfläche und eine erhöhte Rate der Endozytose von GluR1. Diese Arbeit zusammen mit Shepherd et al., (2006) wies eine erhöhte GluR1-Zelloberflächen-Expression in aus den Arc/Arg3.1-Knockout-Mäusen stammenden Neuronen nach, was mit einer Erhöhung der über den AMPA-Rezeptor vermittelten synaptischen Übertragung einherging. Außerdem hatten in den Arc/Arg3.1-Knockout-Neuronen die Synapsen ihre Fähigkeit verloren, auf eine chronische Veränderung der neuronalen Aktivität zu reagieren. Der Effekt von Arc/Arg3.1 auf die Zelloberflächen-Expression des funktionellen AMPA-Rezeptors wurde von Rial Verde et al. (2006) in transfizierten organotypischen hippocampalen Schnitten bestätigt. In dieser Studie wurde aber statt GluR1 der GluR2/3-AMPA-Rezeptor als die von Arc/Arg3.1 beeinflusste Rezeptor-Komponente vorgeschlagen. Trotz der zum Teil widersprüchlichen Befunde überzeugen uns diese Studien doch von einer spezifischen Wirkung des Arc/Arg3.1-Proteins auf die Expression von AMPA-Rezeptor auf der Zelloberfläche und einer wichtigen Funktion für das *synaptic scaling*. Wie bereits erwähnt, besteht eine wesentliche Einschränkung dieser Studien darin, dass alle Untersuchungen unter Bedingungen einer globalen Aktivität in neuronalen Kulturen durchgeführt wurden. Zudem konnte die Funktion von Arc/Arg3.1 nach synapsenspezifischer Aktivierung wegen der fehlenden 3'UTR in dem Transfektionskonstrukt nicht betrachtet werden.

Messaoudi et al. (2007) befasste sich hingegen mit der Rolle des Arc/Arg3.1-Proteins bei der Konsolidierung der LTP *in vivo*. Mittels lokaler Infusion von Antisense-Oligodeoxynukleotiden (AS ODN) während einer über den Tractus perforans induzierten LTP im Gyrus dentatus konnten die Autoren demonstrieren, dass die Applikation der Arc/Arg3.1-spezifischen AS ODN zwei Stunden nach der LTP-Induktion zu einem schnellen,

permanenten Verlust der LTP führte. In weiteren Untersuchungen behaupteten sie, dass dieser Verlust von der Dephosphorylierung von Cofilin und dadurch von einem Prozess der Depolymerisierung des synaptischen F-Actin begleitet ist. Der Effekt von Arc/Arg3.1 auf die lokale Actin-Polymerisierung in den Synapsen muss noch in anderen experimentellen Systemen überprüft werden, denn in einem vorläufigen Experiment zeigte die Menge des polymerisierten F-Actin keinen Unterschied im Hippokampus der Wildtyp-Mäuse versus der Arc/Arg3.1-Knockout-Mäuse (Daten nicht gezeigt).

Trotz vieler Bemühungen bleibt für die Aufklärung der molekularen Funktionen des Arc/Arg3.1 noch viel zu tun. Ein Aspekt dieser Arbeit beschäftigt sich mit dem Versuch, Hinweise über die Arc/Arg3.1-Funktionen durch biochemische Identifizierungen seiner möglichen Assoziationspartner zu erlangen. Durch die etablierten Immunpräzipitationen (IP) konnte ich eine solide Assoziation zwischen dem Arc/Arg3.1 und dem PSD-95/SAP90 experimentell feststellen. Die beiden Proteine sind in der PSD-Fraktion stark angereichert. Das PSD-95/SAP90 gehört zu der Protein-Familie der membranassoziierten Guanylat-Kinasen (MAGUKs), die als postsynaptisches Gerüstprotein dienen und Signalmoleküle in den Synapsen rekrutieren. Dafür stehen PSD-95/SAP90 fünf Proteininteraktionsdomänen zur Verfügung, drei PDZ- (PSD-95/*Disc-large*/ZO-1), eine Src-Homologie 3- (SH3) und eine Guanylat-Kinase-ähnliche (GK) Domäne (Kornau et al., 1997). Das PSD-95/SAP90 bindet über die PDZ-Domänen an die Isoformen der NMDA-Rezeptor-Untereinheit 2 (NR2) (Kornau et al., 1995), die neuronale Stickstoffmonoxid-Synthase (nNOS) (Brenman et al., 1996), das synaptische, RasGTPase aktivierende Protein (SynGAP) (Kim et al., 1998) und das Zelladhäsionsmolekül Neuroligin (Irie et al., 1997). Ebenfalls über die ersten beiden PDZ-Domänen interagiert das PSD-95/SAP90 mit den transmembranen AMPA-Rezeptor-regulatorisch-Proteinen (TARPs), die die Insertion des funktionellen AMPA-Rezeptors in die postsynaptische Plasmamembran bzw. seine Kanal-Eigenschaft für die synaptische Übertragung regulieren (Chen et al., 2000; Tomita et al., 2005). Über die GK-Domäne bindet PSD-95/SAP90 darüber hinaus an das Guanylat-Kinase-assoziierte Protein (GKAP) (Kim et al., 1997), das wiederum direkt mit den Proteinen der Shank-Familie interagiert (Naisbitt et al., 1999). Aufgrund seiner großen Menge in der PSD und der mannigfaltigen Interaktionen mit anderen postsynaptischen Proteinen kommt dem PSD-95/SAP90 eine wesentliche Bedeutung für synaptische Funktionen zu. Eine beeinträchtigte räumliche Lernfähigkeit im *Morris water maze* und eine erhöhte LTP sind in PSD-95/SAP90-Knockout-Mäusen

festgestellt worden (Migaud et al., 1998). Elias et al. (2006) konnte mit Hilfe von shRNA-vermittelten Knockdown-Experimenten in hippocampalen Neuronen und der Analyse von PSD-95/PSD-93-Doppel-Knockout-Mäusen die komplexen fördernden Effekte der MAGUK-Proteine auf die synaptischen Expression des AMPA-Rezeptors und auf die glutamatergische synaptische Übertragung demonstrieren. Die robuste Assoziation des Arc/Arg3.1-Proteins mit PSD-95/SAP90 und die Beteiligung der beiden Proteine an der Regulation der AMPAR-Expression auf der Zelloberfläche lassen ein Zusammenwirken der Proteine bei der synaptischen Übertragung vermuten.

Die Zusammenfassung der in den letzten Jahren gewonnenen Kenntnisse über die molekularen und zellulären Funktionen des Arc/Arg3.1-Proteins stellt uns vor drei noch offene, wesentliche Fragen. Erstens muss der Mechanismus für die spezifische über Arc/Arg3.1 vermittelte Regulation der AMPAR-Zelloberflächen-Expression aufgeklärt werden, denn es existiert bisher noch kein Hinweis für eine direkte Interaktion zwischen dem Arc/Arg3.1-Protein und AMPA-Rezeptoren bzw. TARPs (siehe auch in dieser Arbeit). Nur durch die Arc/Arg3.1-Interaktion mit Komponenten der allgemeinen endozytotischen Maschinerie allein lässt sich die Spezifität dieses Effekts nicht erklären. Zweitens lässt sich der LTP-Phenotyp der Arc/Arg3.1-Knockout-Mäuse durch den Arc/Arg3.1-Effekt auf das AMPAR-*trafficking* nicht vollständig erklären. Die erhöhte hippocampale LTP-Induktion in der frühen Phase und die reduzierte LTD-Induktion in der CA1-Region bzw. der Verlust der L-LTD stimmen zwar gut mit einer reduzierten AMPAR-Endozytose und demzufolge einer erhöhten synaptischen Rezeptor-Expression überein, die fehlende L-LTP im Hippokampus von Knockout-Tieren ist aber mit diesem molekularen Mechanismus nicht erklärbar. Interessanterweise ist die Protein-Expression von Arc/Arg3.1 gerade in der frühen Phase der LTP bzw. der LTD nicht stark induziert. Das heißt, die Erhöhung der E-LTP und die Reduktion der LTD resultieren aus einer fehlenden konstitutiven Arc/Arg3.1-Expression in den Knockout-Tieren. Die verlorene L-LTP der Knockout-Tiere lässt uns andere molekulare Arc/Arg3.1-Funktionen nach der Induktion von Arc/Arg3.1 durch synaptische Aktivierung vermuten. Drittens muss ein mögliches Zusammenwirken von Arc/Arg3.1 und PSD-95/SAP90 bei der synaptischen Übertragung bzw. bei der synapsenspezifischen Modifizierung durch die neuronale Aktivität Gegenstand weiterer Untersuchungen sein.

4.4 Unterschiedliche Bedeutung der dendritischen Arc/Arg3.1-Synthese für verschiedene Gedächtnis-Systeme

Durch die Blockierung des mRNA-Transports wird in den tg-Mäusen die dendritische Arc/Arg3.1-Synthese unterbunden, während die somatische Protein-Synthese davon nicht beeinträchtigt ist, somit bleibt die konstitutive Arc/Arg3.1-Expression dieser Tiere unter nicht-stimulierender Bedingung unverändert. Dies bildet die Grundlage für die Analyse der Auswirkungen der verhinderten dendritischen Arc/Arg3.1-Synthese auf die kognitiven Gehirn-Funktionen bei Lernen und Gedächtnis.

Die Lernfähigkeit und die Retention des erworbenen Gedächtnisses der tg-Mäuse bzw. ihrer *ko-littermates* wurden bisher in drei verschiedenen Lernparadigmen, nämlich dem *novel object recognition* (NO), der kontextabhängigen Angstkonditionierung und der *conditioned taste aversion* (CTA) untersucht. Davon sind die Objekt-Erkennung und die kontextabhängige Angstkonsolidierung zwei hippokampusabhängige Lernaufgaben (Broadbent et al., 2004; LeDoux, 2000; Rudy et al., 2004). Die aversive Geschmackskonditionierung ist hingegen eine implizite Lernaufgabe, deren Retention vom Hippokampus unabhängig ist (Welzl et al., 2001). Die kurzfristige Speicherung neuer Informationen während der Akquisition und das Kurzzeit-Gedächtnis bleiben in den tg-Tieren wie auch in den ko-Tieren intakt. Die in unserem Labor beobachteten Störungen in der Bildung des Langzeit-Gedächtnisses der Arc/Arg3.1-Knockout-Mäuse (Plath et al., 2006) wurden für alle drei Lernaufgaben bestätigt. Damit wird die essentielle Funktion von Arc/Arg3.1 sowohl für die explizite hippokampusabhängige als auch für die implizite hippokampusunabhängige Langzeit-Gedächtnisbildung in dieser Arbeit erneut belegt. Die Unterschiede der tg-Mäuse gegenüber ihren *ko-littermates* liefern uns weiterhin erstaunliche Hinweise für den Beitrag der dendritischen Arc/Arg3.1-Synthese zur Konsolidierung des Langzeit-Gedächtnisses. In der NO-Aufgabe zeigen die tg-Mäuse eine vergleichbar beeinträchtigte Langzeit-Retention der Objekt-Erkennung wie die ko-Tiere. Im Gegensatz dazu bleibt bei der CTA-Aufgabe das Ausmaß der Aversion gegen den konditionierten Geschmack in den tg-Mäusen gleich groß wie in den Kontroll-wt-Tieren, in den ko-Mäusen ist dies aber stark reduziert. Außerdem weisen die tg-Mäuse und die ko-Mäuse einen partiellen Verlust des intermediären Gedächtnisses in der kontextabhängigen

Angstkonditionierung auf. Diese Ergebnisse geben Hinweise auf eine unterschiedliche Bedeutung der dendritischen Arc/Arg3.1-Synthese für verschiedene Gedächtnis-Systeme. Die Induktion der dendritischen Translation der Arc/Arg3.1-mRNA während des Lernprozesses ist einerseits essentiell für hippocampusabhängige Langzeit-Gedächtnisformen, wird aber andererseits von der hippocampusunabhängigen Langzeit-Gedächtnisbildung nicht benötigt. Um diese Aussage weiter zu überprüfen, müssen die tg-Mäuse gegenüber den ko-Tieren noch in weiteren anderen Verhaltensparadigmen analysiert werden, in denen unterschiedliche Gedächtnis-Systeme angesprochen werden. Allgemein liefern uns die Ergebnisse einen wichtigen Hinweis, dass unterschiedliche molekulare Mechanismen für die Konsolidierung des Langzeit-Gedächtnisses in unterschiedlichen Gedächtnis-Systemen engagiert sind. Überraschenderweise ist die induzierte Protein-Synthese in den Dendriten für die Langzeit-Gedächtnisbildung in bestimmten Gedächtnis-Systemen nicht notwendig. Die unveränderte Ängstlichkeit bzw. Motivation und das normale Explorationsverhalten der tg-Mäuse bzw. der ko-Mäuse schließen mögliche Abnormalitäten der sensorischen bzw. motorischen Funktionen aus, die das Verhalten der Tiere beeinträchtigen könnten. Daher sind die aufgezeigten Verhaltensstörungen eindeutig auf eine Veränderung von kognitiven Gehirn-Funktionen zurückzuführen.

Eine kritische Phase der neuen Protein-Synthese ist für die Konsolidierung des Langzeit-Gedächtnisses erforderlich (Sutton und Schuman, 2006). Die Ergebnisse dieser Arbeit heben die Tatsache hervor, dass die Translation der Arc/Arg3.1-mRNA in den Dendriten eine Komponente der benötigten Protein-Synthese ist. Eine durch die Aktivität während des Lernens induzierte Arc/Arg3.1-Protein-Synthese in den Dendriten ist unentbehrlich für die Retention und das Ausmaß des erworbenen hippocampusabhängigen Gedächtnisses. Der spezifische Beitrag der dendritischen Arc/Arg3.1-mRNA-Expression wird aus dem Zeitverlauf der Gedächtniskonsolidierung in den tg-Mäusen sichtbar. Diese zeigen eine schwere selektive Reduktion des intermediären Gedächtnisses (24 h), wobei aber die langfristige Konsolidierung des Gedächtnisses (2 Wochen) im Vergleich zu wt-Tieren unverändert ist. Daher konnte ich zum ersten Mal im Säugetier eine intermediäre Phase der Gedächtniskonsolidierung nachweisen. Darüber hinaus belegen meine Studien, dass diese Phase von der dendritischen Arc/Arg3.1-Expression abhängig ist. Intermediäre Prozesse sind bei Invertebraten bereits als wichtige, unabhängige Komponenten der

Gedächtniskonsolidierung etabliert und intensiv erforscht. Dieser Aspekt wird in dem nächsten Kapitel ausführlich diskutiert.

4.5 Ein intermediärer Prozess während der Gedächtniskonsolidierung ist von der dendritischen Arc/Arg3.1-Synthese abhängig

4.5.1 Intermediäre Prozesse in der Gedächtnisbildung bei Invertebraten

1995 wurde in der *Aplysia* eine intermediäre Form der synaptischen Plastizität durch die Pionierarbeit von Ghirardi et al. entdeckt. In dieser Studie konnten die Autoren zum ersten Mal eine intermediäre Phase der synaptischen Verstärkung (*intermediate-term facilitation*; ITF) demonstrieren, die durch gezielte Applikation des Neuromodulators Serotonin auf eine definierte Synapse zwischen einem sensorischen Neuron und einem Motorneuron induziert wurde. ITF hielt für einige Stunden an und benötigte die Synthese von neuen Proteinen aber keine Transkription. Einige Jahre später beschrieb Sutton et al. eine analoge intermediäre Gedächtnisform für die Sensitisierung (*intermediate-term memory*; ITM) in *Aplysia*. Er machte deutlich, dass die Induktion des ITM ebenfalls von der Protein-Synthese aber nicht von der mRNA-Synthese abhängig ist (Sutton et al., 2001). Mittlerweile sind zwei Gedächtnis-Typen in der intermediären Zeitdomäne der Gedächtnisbildung für die Sensitisierung bekannt, die sich in der Induktionsbedingung und im molekularen Bedarf unterscheiden. Das RT-ITM (*repeated-trial ITM*) wird durch mehrere Schockbehandlungen am Schwanz der Schnecke induziert. Diese Induktion ist von Translation abhängig (Sutton et al., 2001), während die Induktion des SS-ITM (*site-specific ITM*) über einen einzigen Schock unter einer aktivitätsabhängigen Modulation erfolgt und keine neue Protein-Synthese verlangt (Sutton et al., 2004). Das synaptische Analog für das SS-ITM ist als AD-ITF (*activity-dependent ITF*) beschrieben (Sutton et al., 2000). Interessanterweise ist die Aktivierung verschiedener Kinasen bei der Induktion bzw. der Expression der zwei Typen des ITM involviert. Die Aktivierung der MAPK bzw. PKA ist jeweils für die Induktion bzw. für die Expression des Translation-abhängigen RT-ITM essentiell (Sharma et al., 2003; Sutton et al., 2001). Die Aktivität der PKC ist hingegen für die stabile Expression des Protein-Synthese-unabhängigen SS-ITM entscheidend (Sutton et al., 2004).

Die Erkenntnisse über die intermediären Prozesse während der Gedächtnisbildung werden auch durch Untersuchungen in einigen anderen Invertebraten-Systemen verstärkt. So konnten in *Drosophila* in einem assoziativen olfaktorischen Lernparadigma vier unabhängige Phasen der Gedächtnisbildung identifiziert werden (McGuire et al., 2005; Liu und Davis, 2006). Das assoziative olfaktorische Gedächtnis der *Apis* konnte nach mehreren Trainingsperioden als drei separate Prozesse charakterisiert werden (Menzel, 2001; Schwärzel und Müller, 2006). Auch in diesen Tier-Modellen sind die Synthese von neuen Proteinen bzw. die Aktivierung unterschiedlicher Kinasen in den verschiedenen intermediären Prozessen differentiell beteiligt. Einen detaillierten Überblick über die Forschungsergebnisse in Invertebraten-Systemen liefert der Review-Artikel von Stough et al., 2006.

4.5.2 Ein intermediärer Prozess während der hippocampusabhängigen Gedächtniskonsolidierung der Mäuse ist von der dendritischen Arc/Arg3.1-Protein-Synthese abhängig

Im Folgenden möchte ich auf das Experiment der kontextabhängigen Angstkonditionierung zurückkommen und den Zeitverlauf der Gedächtniskonsolidierung in den tg-Mäusen und in den ko-Mäusen genauer analysieren. Die tg-Tiere und die ko-Tiere weisen einen vergleichbar großen Verlust des intermediären Gedächtnisses bei einem 24-stündigen Retentionsintervall auf. Sowohl in den ko-Tieren als auch in den tg-Tieren ist der Verlust des intermediären Gedächtnisses nicht vollständig. Dies deutet darauf hin, dass es mindestens zwei parallel laufende Prozesse für die intermediäre Gedächtniskonsolidierung geben muss. Einer dieser Prozesse ist abhängig von dendritischer Arc/Arg3.1-Expression, während der andere Prozess Arc/Arg3.1-unabhängig verläuft und vermutlich auf kovalente Modifikation von prä-existierenden Proteinen beruht. Hier können wir eine faszinierende Ähnlichkeit zwischen der intermediären Phase der hippocampusabhängigen Gedächtnis-Retention der Mäuse und den in der *Aplysia* beschriebenen intermediären Prozessen der Gedächtnisbildung feststellen. Zu einem späteren Zeitpunkt (in dieser Arbeit wurde die 2-wöchige Gedächtnis-Retention untersucht) ist das Langzeit-Gedächtnis trotz des intermediären Verlustes in den tg-Mäusen unbeeinträchtigt. Im Gegensatz dazu zeigen die ko-Tiere einen vollständigen Gedächtnis-Verlust zu diesem späten Zeitpunkt. Da sich die tg-Mäuse und die ko-Mäuse nur in dem somatisch synthetisierten Arc/Arg3.1-Protein unterscheiden, spielt das somatisch

synthetisierte Arc/Arg3.1 in dem Prozess, der zur Konsolidierung des hippocampusabhängigen Langzeit-Gedächtnis führt, eine wesentliche Rolle. Allgemein weist uns der Zeitverlauf der Gedächtniskonsolidierung der tg- bzw. der ko-Tiere darauf hin, dass mehrere molekulare Prozesse durch das Lernen in Gang gesetzt werden können, die aufgrund ihrer unterschiedlichen zeitlichen Abläufe für verschiedene Phasen der Gedächtniskonsolidierung zuständig sind. Das Arc/Arg3.1-Protein übernimmt dabei eine wichtige Rolle für das intermediäre Gedächtnis und eine Schlüsselrolle für das Langzeit-Gedächtnis.

Die Notwendigkeit der dendritischen Arc/Arg3.1-Expression für einen intermediären Prozess der hippocampusabhängigen Gedächtniskonsolidierung wird durch einen erstaunlichen Befund von Messaoudi et al. gut unterstützt. In dieser Studie konnten die Autoren an Mäuseversuchen demonstrieren, dass die lokale Applikation eines Arc/Arg3.1-spezifischen AS ODN fünf Minuten vor oder 15 Minuten nach der Induktion einer *in vivo* LTP im Gyrus dentatus nur zu einer transienten Unterdrückung der LTP führte, während zwei Stunden nach der LTP-Induktion infundierte AS ODNs einen permanenten Verlust der LTP verursachte (Messaoudi et al., 2007). Hier werden wahrscheinlich je nach der Applikationszeit verschiedene Arc/Arg3.1-abhängige Prozesse während der LTP-Konsolidierung durch das AS ODN betroffen.

4.5.3 Ein zelluläres Modell der hippocampusabhängigen Konsolidierung des Langzeit-Gedächtnisses

Aufgrund der bisher gewonnenen Erkenntnisse über die aktivitätsabhängige Arc/Arg3.1-Expression und über die funktionellen Rollen des Arc/Arg3.1-Proteins für die Konsolidierung des hippocampusabhängigen Langzeit-Gedächtnisses können wir hier ein zelluläres Modell für die Gedächtniskonsolidierung hinsichtlich der Funktionen von Arc/Arg3.1 vorstellen.

Durch neuronale Aktivität während des Lernens werden NMDA-Rezeptoren in spezifischen Synapsen eines Neurons aktiviert, was weiterhin multiple molekulare Prozesse in dem Neuron auslösen kann. Der Beitrag der posttranslationalen Modifizierung der bereits vorhandenen synaptischen Proteine (zum Beispiel die Phosphorylierung des AMPA-Rezeptors) zur spezifischen Veränderung der synaptischen Übertragungsstärke und somit zum Kurzzeit-

Gedächtnis ist bereits gut untersucht. Eine lang anhaltende Modifizierung der synaptischen Effizienz verlangt aber die Synthese neuer Proteine. Dazu wird zuerst die lokale Translation der bereits dendritisch lokalisierten mRNA durch großenteils noch unbekannte Mechanismen aktiviert. Die dendritische Synthese des Arc/Arg3.1-Proteins hat sich als ein wesentlicher molekularer Prozess zur Aufrechterhaltung synapsenspezifischer Modifizierungen einer intermediären Phase und somit zur Konsolidierung des intermediären Gedächtnisses erwiesen. Auf eine robuste synaptische Aktivierung reagiert das Neuron dann mit massiven Veränderungen der Genexpression. Dabei wird die Transkription des Arc/Arg3.1-Gens stark induziert und eine große Menge Arc/Arg3.1-Protein somatisch produziert. Das somatisch synthetisierte Arc/Arg3.1 gelangt über den Protein-Transport in die Synapsen und trägt hier zur Stabilisierung der modifizierten Synapsen bzw. zur Etablierung des Langzeit-Gedächtnisses bei. Dieses zelluläre Modell ist in der Abbildung 4.1 illustrativ dargestellt.

In diesem Modell reagiert ein Neuron mit verschiedenen molekularen Prozessen auf synaptische Aktivierung, wobei die Entscheidung, welcher dieser Prozesse aktiviert wird, von der Stärke der neuronalen Aktivität abhängig und der zeitliche Ablauf für diese Prozesse unterschiedlich ist. Die in dieser Arbeit isolierte intermediäre Phase der hippocampusabhängigen Gedächtniskonsolidierung in der kontextabhängigen Angstkonditionierung liefert uns ein starkes Argument für dieses Modell.

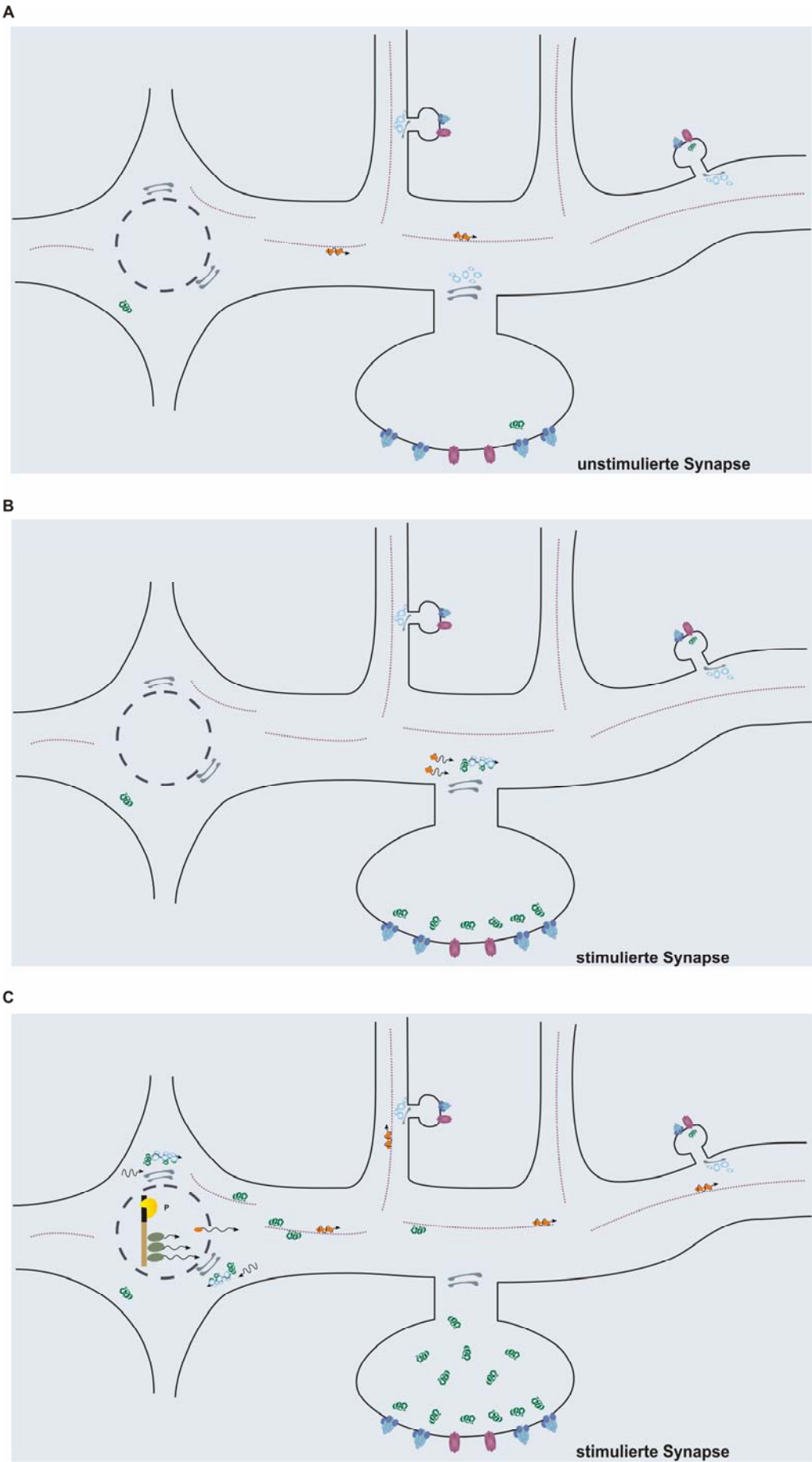


Abbildung 4.1: Zelluläres Modell zur Arc/Arg3.1-abhängigen Gedächtniskonsolidierung.

Mehrere Arc/Arg3.1-abhängige zelluläre Prozesse zur synapsenspezifischen Modifizierung werden nach synaptischer Aktivierung eingeleitet. **A.** zeigt die konstitutive Arc/Arg3.1-Expression in einem Neuron unter nicht-stimulierender Bedingung, die von der somatischen, aber nicht von der dendritischen Protein-Synthese abhängig ist. In **B.** ist die unmittelbar frühe Induktion der lokalen Translation dendritischer Arc/Arg3.1-mRNA essentiell für einen intermediären Prozess zur Gedächtniskonsolidierung. Dieser Prozess ist jedoch unabhängig von der mRNA-Synthese. Die nachfolgende transkriptionelle Aktivierung des Arc/Arg3.1-Gens (in **C.**) führt zur robusten somatischen Synthese des Arc/Arg3.1-Proteins, das über einen aktiven Mechanismus in aktivierte Synapsen transportiert wird. Dieser Prozess ist unentbehrlich für die Konsolidierung des Langzeit-Gedächtnisses. Ausführliche Erklärungen zu diesem Modell sind den Kapiteln 4.2.3 und 4.5.3 zu entnehmen.

4.6 Ausblick

Im Rahmen dieser Arbeit wurde eine transgene Tg(ARC-zif3UTR)-Mauslinie etabliert. Die Charakterisierungen dieser Mäuse auf der molekularen und Verhaltensebene liefern uns eine Serie faszinierender Kenntnisse über die Bedeutung von Arc/Arg3.1 für die Konsolidierung des Langzeit-Gedächtnisses. Gleichzeitig wird eine Reihe von Fragestellungen für darauf aufbauende Fortsetzungsstudien eröffnet. Diese Fragestellungen betreffen alle in dieser Arbeit behandelten Themengebiete, von der Aufklärung des dem Arc/Arg3.1-Protein-Transport zugrunde liegenden molekularen Mechanismus, über die Aufschlüsselung der molekularen Funktionen von Arc/Arg3.1 für die Stabilisierung der synaptischen Plastizität bis hin zur weiteren Charakterisierung des Phänotyps der tg-Mäuse hinsichtlich des Lernens und der Gedächtnisbildung.

1. Die konstitutive synaptische Expression von Arc/Arg3.1 in den tg-Mäusen deutet auf einen Transport des Arc/Arg3.1-Proteins in die Synapsen hin. Ein solcher Mechanismus war bisher für das Arc/Arg3.1-Protein unbekannt. Der für den Protein-Transport zuständige molekulare Mechanismus muss weiter untersucht werden. Die daraus gewonnenen Kenntnisse werden uns erlauben, die durch die synaptische Aktivität präzise regulierte Arc/Arg3.1-Expression besser zu verstehen.
2. Ein Schwerpunkt zukünftiger Forschungen besteht in der Aufklärung der molekularen Funktionen des Arc/Arg3.1-Proteins für die Stabilisierung der aktivitätsmodifizierten Synapsen. Diese Aufgabe ist von zentraler Bedeutung, um die über Arc/Arg3.1 vermittelten Prozesse der Gedächtniskonsolidierung zu verstehen. Die etablierten

Immunpräzipitationen bieten uns einen optimalen Startpunkt, die molekularen Assoziationspartner des Arc/Arg3.1 zu identifizieren und dadurch wichtige Hinweise über die Wirkungsweisen von Arc/Arg3.1 zu gewinnen.

3. Die bisherigen Verhaltensanalysen liefern uns aufregende Ergebnisse, die unser Verständnis über die hippocampusabhängige Konsolidierung des Langzeit-Gedächtnisses im Säugetier grundlegend erweitert. Viele Aspekte bleiben aber noch offen. Das unbeeinträchtigte implizite CTA-Gedächtnis der tg-Tiere deutet darauf hin, dass verschiedene Gedächtnis-Systeme unterschiedliche molekulare Prozesse verlangen. Um diese Aussage weiter zu überprüfen, muss die Funktion anderer Gedächtnis-Systeme, zum Beispiel in der Amygdala oder im Striatum, in den tg-Mäusen untersucht werden.

Neuere Forschungen zeigen, dass Arc/Arg3.1, neben seinen Funktionen in der Konsolidierung des Langzeit-Gedächtnisses, auch in anderen plastischen Prozessen des Gehirns involviert ist. So spielt Arc/Arg3.1 bei der erfahrungsabhängigen Netzwerk-Plastizität des visuellen Kortex eine essentielle Rolle, wie Wang et al. 2006 demonstrierte. Pandey et al. zeigte 2008, dass Arc/Arg3.1 in der Amygdala eine kritische Rolle bei pathologischen Prozessen des Alkoholismus übernimmt. Die Funktion von Arc/Arg3.1 in mentalen Prozessen weiter aufzuschlüsseln stellt die Arc/Arg3.1-Forscher im Rahmen der kognitiven Neurowissenschaften vor vielversprechende und spannende Aufgaben.