

## 2. Einleitung

### 2.1 Lernen und Gedächtnis

Die Einzigartigkeit der Nervensysteme höherentwickelter Tiere und des Menschen liegt in ihrer Fähigkeit, sich den ständig wechselnden Anforderungen anzupassen, die die Umwelt an den Organismus stellt. Diese Eigenschaft beruht darauf, dass das Nervensystem lernen, d. h. neue Informationen aus der Umwelt wahrnehmen und verarbeiten, und das Erlernte wieder abrufbar speichern kann, sprich ein Gedächtnis dafür formt. Die Ergründung der Phänomene „Lernen und Gedächtnis“ beschäftigt Physiologen, Psychologen und Philosophen gleichermaßen schon seit langer Zeit. So stellte Hippokrates bereits 400 v. Chr. erstmals die These auf, dass das Gehirn für die Verarbeitung der Sinneseindrücke verantwortlich sei und nicht das Herz. Substantielle Erkenntnisgewinne auf dem Gebiet der Gedächtnisforschung setzten allerdings erst während der vergangenen 50 Jahre ein. Diese basieren einerseits auf dem Zusammenschluss jener Natur- und Geisteswissenschaften, die sich mit dem Gehirn beschäftigen, zu dem interdisziplinären Forschungszweig „Neurowissenschaften“. Andererseits profitieren sie von der rasanten Entwicklung der Molekularbiologie, die ein zentraler Bestandteil der Neurowissenschaften wurde (Milner et al., 1998). Einen vorläufigen Höhepunkt stellte die Vergabe des Nobelpreises für Medizin im Jahre 2000 dar, der zu einem Teil für die Erkenntnisse der molekularen Zusammenhänge auf dem Gebiet der synaptischen Übertragungseffizienz und ihrer Modifikation vergeben wurde, die dem Lernen und Gedächtnis zugrunde liegen. Die vorliegende Arbeit über die Rolle des aktivitätsregulierten Gens Arg3.1 bei Lern- und Gedächtnisvorgängen beruht auf den Theorien und bedient sich der Methoden von drei wesentlichen Disziplinen der Neurowissenschaften: der kognitiven Neuropsychologie, der funktionellen Neuroanatomie und der molekularen Neurobiologie. Diese sollen daher im Folgenden kurz abgehandelt werden.

Die experimentellen Psychologen, und hier insbesondere die *Behavioristen*, konzentrierten sich Ende des 19. Jahrhunderts ausschließlich auf das empirisch messbare Antwortverhalten von Tieren nach sensorischer Reizung. Die neuronalen Vorgänge zwischen Stimulation und Reaktion wurden vollständig ignoriert. So blieb die Ergründung mentaler Prozesse, wie Wahrnehmung, Aufmerksamkeit, Entscheidungsfindung aber auch Gedächtnisbildung, vorerst der Philosophie vorbehalten. Die naturwissenschaftliche Gedächtnisforschung machte dann in den 1960er Jahren einen großen Schritt mit der Einführung der kognitiven Psychologie durch

George Miller, Ulric Neisser und Herbert Simon. Sie konzentrierten sich auf die Informationsprozessierung, die sich zwischen sensorischer Reizaufnahme und Handlung im Gehirn abspielt. Dafür mussten freilich zuerst die neuronalen Korrelate der Reizweiterleitung und der Informationsspeicherung aufgedeckt werden. Einen wichtigen Beitrag lieferte hier der kanadische Psychologe Donald O. Hebb, der aufgrund theoretischer Überlegungen seine Hypothese für ein Langzeitgedächtnis-Modell formulierte, in der sich Neuronenverbände bei Lernvorgängen funktionell zu höheren Einheiten verbinden. Darin verstärken zwei Neurone, die gleichzeitig aktiv sind, ihre synaptischen Verbindungen. Bei erneuter Aktivierung der präsynaptischen Nervenzelle ist die Übertragung der Erregung zur postsynaptischen Nervenzelle verstärkt, der Neuronenverband hat „gelernt“ (Hebb, 1949).

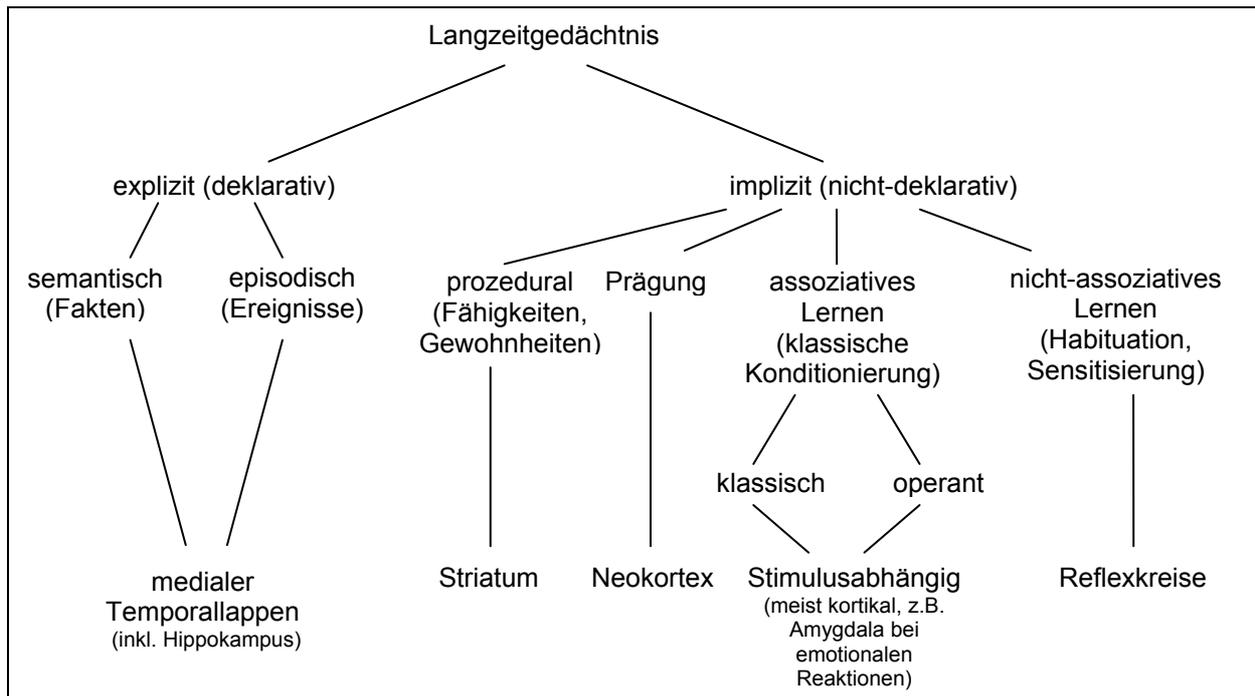
Die kognitive Psychologie erforderte also ein detailliertes Wissen über die anatomischen Zusammenhänge im Gehirn, was zu einer Renaissance der funktionellen Neuroanatomie führte. Diese beschäftigt sich seit dem 19. Jahrhundert mit der Frage, ob mentale Prozesse im Gehirn bestimmten Regionen zugeordnet werden können, oder ob diese morphologisch nicht eingrenzbar über das ganze Parenchym verteilt sind. Die einschlägigsten Erkenntnisse, beispielsweise über den Ort von Lernen und Gedächtnis im Gehirn, lieferten dabei neurologische Läsionsstudien. Bereits Anfang des 20. Jahrhunderts postulierte der amerikanische Psychologe Karl Lashley, dass einzelne Lernvorgänge nicht bestimmten kortikalen Hirnregionen zugeordnet werden können. Dafür durchtrennte er Ratten verschiedene kortikale Strukturen bevor oder nachdem er sie einem Lernversuch unterzog und untersuchte dann die Auswirkungen der Läsion auf den Erwerb und die Speicherung der neuen Information. So kam er zu dem Ergebnis, dass der Grad an Gedächtnisverlust nicht auf eine bestimmte Region als vielmehr auf die Größe des geschädigten Hirnareals zurückzuführen ist (Lashley, 1929).

In den frühen 1950er Jahren begann der amerikanische Neurochirurg Wilder Penfield damit, zur Linderung von epileptischen Anfällen, Teile des Frontal- oder Temporallappens aus dem Gehirn seiner Patienten zu entfernen. Operationen am Temporallappen schlossen dabei meist eine Läsion der hippokampalen Formation ein. Penfield und die britische Neuropsychologin Brenda Milner stellten fest, dass solche Eingriffe zwar das Auftreten der epileptischen Anfälle reduzierte, aber auch eine leichte Gedächtnisschwäche bei den Betroffenen hinterließ (Penfield und Milner, 1958). Überraschenderweise gab es aber auch Patienten, die nach der Operation ein schweres Defizit in der Neuformation von Langzeitgedächtnisinhalten zeigten. Nähere Untersuchungen ergaben, dass bei diesen Patienten eine bereits bestehende Atrophie

der nichtläsionierten hippokampalen Formation vorlag, so dass der chirurgische Eingriff zu einer beidseitigen Schädigung des Hippokampus führte. Brenda Milner führte ausgiebige Studien bei diesen Patienten durch und leistete mit ihren Erkenntnissen einen wertvollen Beitrag zum Verständnis von Lernen und Gedächtnis. So konnte sie an ihrem bekanntesten Fall, dem Patienten H.M., der noch heute lebt, zusammen mit dem behandelnden Chirurgen William Scoville zeigen, dass eine bilaterale Hippokampusektomie nur ganz bestimmte Formen des Langzeitgedächtnisses beschädigt. Dabei handelt es sich um eine anterograde, die expliziten Lerninhalte betreffende Amnesie (Scoville und Milner, 1957). H.M. kann also keine bewussten Gedächtnisspuren für Ereignisse bilden, die nach der Operation stattgefunden haben, während seine Erinnerungen an prä-operative Ereignisse ebenso intakt sind wie sein Kurzzeitgedächtnis und die Fähigkeit zu unbewusstem (impliziten) Lernen. So verweigerte H.M. Scoville den täglichen Begrüßungshandschlag, nachdem dieser ihn dabei einmal mit einem Elektroschock verletzte. Er konnte seinem Arzt, der sich ihm übrigens jeden Tag erneut vorstellen musste, aber nicht erklären, warum er dies tat. Da auch Ereignisse, die sich kurz vor dem chirurgischen Eingriff zugetragen haben von der Amnesie betroffen waren, folgerten Milner und Scoville, dass der Hippokampus bei Menschen eine entscheidende Rolle für den Erwerb und die Konsolidierung expliziter Langzeitgedächtnisspuren spielt. Bei dem mit einem Schmerz verbundenen Handschlag handelte es sich um eine unbewusst gebildete Assoziation, die unabhängig vom Hippokampus gebildet wird.

Ein Teil der Kategorisierung des Nervensystems auf der Ebene seiner mnemischen Funktionen, wie sie von der Neuropsychologie eingeführt wurde, konnte mit Hilfe solcher Studien experimentell abgesichert werden. Danach unterscheidet man also zwei qualitativ getrennte Prozesse des Lernens und der Gedächtnisbildung: implizites (nicht-deklaratives) und explizites (deklaratives) Lernen (Milner et al., 1998). Beim impliziten Lernen finden Veränderungen in spezifischen motorischen und sensorischen Systemen statt, die am Erlernen von motorischen Fähigkeiten und perzeptuellen Strategien beteiligt sind. Das implizite Lernen findet unbewusst statt. Beim expliziten Lernen, dem Lernen über Fakten, Personen, Orte oder Ereignisse, kommt dem Hippokampus und dem zerebralen Kortex eine entscheidende Bedeutung zu. Explizite Lerninhalte werden bewusst gebildet (Abb. 2.1).

Bei beiden Lernvorgängen werden folgende, zeitlich definierte Gedächtnisformen gebildet, deren Ausbildungen aufeinander aufbauen: das sensorische Gedächtnis (Millisekunden bis Sekunden), das Kurzzeitgedächtnis (Sekunden bis Minuten) und das Langzeitgedächtnis (theoretisch ein Leben lang abrufbar).



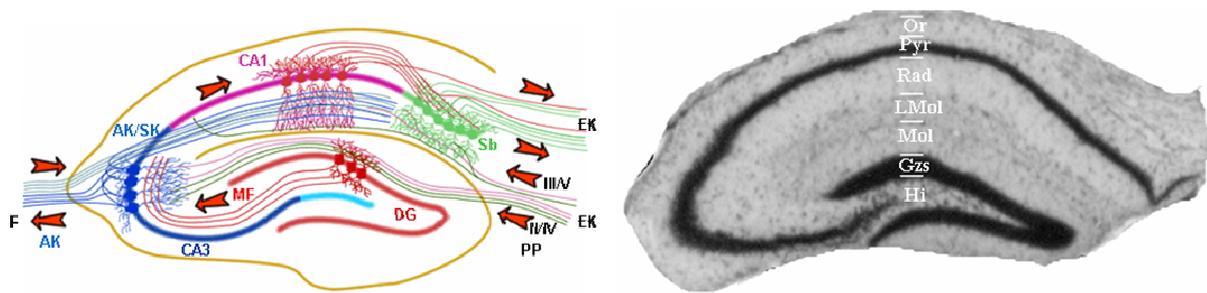
**Abbildung 2.1: Taxonomie des Langzeitgedächtnissystems bei Säugetieren und seine anatomischen Korrelate** (nach Milner et al., 1998).

Die kognitive Neuropsychologie und die funktionelle Neuroanatomie beschäftigen sich also mit den systemischen Fragen der Gedächtnisforschung: welche temporalen und qualitativen Gedächtnisformen gibt es und wo werden diese gebildet und gespeichert? Dem schließt sich die Frage an, wie das Gedächtnis geformt wird, die besonders von der molekularen Neurobiologie bearbeitet wird. In den sich dahinter verbergenden Disziplinen der Zellbiologie, Biochemie und molekularen Genetik haben sich Techniken entwickelt, die die Untersuchung der zellulären und molekularen Zusammenhänge beim Lernen und der Gedächtnisbildung erlauben. Ein zentraler Punkt stellt dabei die Aufklärung der molekularen Signalkaskaden dar, die der inter- und intraneuronalen Informationsweiterleitung dienen. Erste Studien beschäftigten sich mit den molekularen Grundlagen der nicht-deklarativen Gedächtnisformen bei Invertebraten, doch bald schon wurden diese auf die deklarativen Aspekte bei Säugetieren ausgedehnt. Dabei wurden zwei wichtige Entdeckungen für die Bildung des Langzeitgedächtnisses gemacht: Erstens, im Gegensatz zum Kurzzeitgedächtnis, ist die Konsolidierung von Lerninhalten im Langzeitgedächtnis von der Transkription und Translation abhängig (Goelet et al., 1986; Sheng und Greenberg, 1990). Das bedeutet, dass

bei der Transformation von Informationen aus dem Kurzzeit- in das Langzeitgedächtnis durch die Bildung neuer mRNAs und Proteine zelluläre Mechanismen in Gang gesetzt werden, die zu den Verstärkungsprozessen an den beteiligten Synapsen beitragen. Die zweite herausragende Charakteristik des Langzeitgedächtnisses ist die Tatsache, dass seine Bildung mit morphologischen Veränderungen der synaptischen Struktur einher geht (Lamprecht und LeDoux, 2004; diese Aspekte werden in Kapitel 2.3 noch ausgiebiger beschrieben).

## **2.2 Der Hippokampus**

Ursprünglich bezeichnete der Terminus Hippokampus nur die Cornu ammonis Regionen eins bis drei (CA1-3), die zusammen mit Gyrus dentatus, Subikulum, Präsubikulum, Parasubikulum und entorhinalen Kortex die hippocampale Formation bilden. In Anlehnung an die sich in der Fachliteratur durchsetzende Terminologie steht der Begriff Hippokampus im folgenden Text für die Einheit aus den CA1-3 Regionen, Gyrus dentatus und Subikulum. Aufgrund seiner Anatomie ging man schon vor den Entdeckungen Brenda Milners von einer zentralen Rolle des Hippokampus beim Lernen und Gedächtnis aus, da hier Informationen aus verschiedenen sensorischen Systemen konvergieren. So weist der Hippokampus umfangreiche Verbindungen zu Teilen des Neokortex, insbesondere zu den Assoziativkortexen, auf. Afferente Signale der Sinnesorgane erreichen zuerst subkortikale und periphere sensorische Kortexregionen und gelangen von dort über die Assoziationskortexen in den entorhinalen Kortex und weiter in den Hippokampus. Innerhalb des Hippokampus verläuft der Informationsfluss unilateral durch einen trisynaptischen Schaltkreis, wie in Abbildung 2.2 schematisch dargestellt. Efferente Signale verlassen die Struktur über die CA3- bzw. der CA1-Region und fließen in den entorhinalen Kortex und weiter in neokortikale Areale (Amaral, 1993; Freund und Buszáki, 1996). So gelangen multimodale, also von diversen Sinnesorganen stammende Informationen, die bereits in vorgeschalteten Regionen verarbeitet wurden, in den Hippokampus, können dort miteinander assoziiert werden und fließen modifiziert wieder zurück in den Kortex. Mittlerweile haben umfassende Studien gezeigt, dass der Hippokampus aufgrund dieses neuronalen Verknüpfungsmusters eine wichtige Rolle bei der Assoziation verschiedener Reize und der Konsolidierung von Gedächtnisinformationen spielt (s. als Reviews: Squire et al., 1993; Eichenbaum, 2001). Die Speicherung dieser Informationen erfolgt dann zumeist im Kortex. Aktuelle Studien weisen aber darauf hin, dass dem Hippokampus eine erneute Funktion beim Reaktivieren der gespeicherten Gedächtnisinhalte zukommt (Debiec et al., 2002; Nader, 2003).



## Abbildung 2.2: Hippokampusanatomie

Die Abbildung zeigt eine schematische Darstellung der Verschaltung (links) und eine Kresylviolett-Färbung (rechts) des Hippokampus (Cornu ammonis Regionen 1-3 (CA1-3)), Gyrus dentatus (DG) und Subikulum (Sb). Afferente Informationen erreichen den Hippokampus über den Tractus perforans (perforanter Pfad, PP) aus dem entorhinalen Kortex (EK). Dabei projizieren die Kortexschichten II und IV auf das Stratum moleculare (Molekularschicht, Mol) des Gyrus dentatus bzw. das Stratum radiale (Radialschicht, Rad) der CA3-Region. Die Schichten III und V terminieren im Subikulum und in der CA1-Region. Die der Molekularschicht zugehörigen Granulärzellen stellen die größte Zellpopulation im Gyrus dentatus dar und formieren sich zur Granulärzellschicht (Gzs). Sie senden ihre Axone über die Moosfasern (MF), die den Gyrus dentatus über die Hilus-Region (Hi) verlassen, in die Radialschicht der CA3-Region. Im Hilus befinden sich hauptsächlich Zellkörper exzitatorischer Interneurone, ebenso wie im Stratum lacunosum moleculare (LMol), wo allerdings auch inhibitorische Interneurone liegen. In der CA3-Region bilden die Moosfasern Verknüpfungen mit den Pyramidenzellen aus. Die Zellkörper der Pyramidenzellen von CA1-4 liegen im Stratum pyramidale (Pyr, Pyramidalzellschicht). Die Axone der CA3-Pyramidenzellen wiederum weisen mehrere Projektionszielorte auf: zum einen verlassen sie den Hippokampus via Fornix (F) und zum anderen projizieren sie auf benachbarte CA3- und auf die Radialschicht vorgeschalteter CA1-Pyramidenzellen. Dabei verlaufen die Axone in der assoziativen Kommissur (AK), bzw. den Schaffer-Kollateralen (SK). Die CA1-Pyramidenzellen projizieren über das Stratum oriens (Or) wieder Richtung Subikulum (Sb) und entorhinalen Kortex. Verändert nach Muller und Martin ([www.bris.ac.uk](http://www.bris.ac.uk)) und „The Mouse Brain Library“ ([www.mbl.org](http://www.mbl.org)).

Im Rahmen der Bildung expliziter Gedächtnisinhalte kommt dem Hippokampus eine besondere Rolle bei der Verarbeitung räumlicher Informationen zu. So bilden Tiere, wie auch der Mensch, eine sog. „kognitive Landkarte“ der Umgebung, die entscheidend für eine erfolgreiche Orientierung ist. Der Begriff der „kognitiven Landkarte“ stützt sich auf die Arbeiten der Neurophysiologen John O’Keefe und Lynn Nadel, die mittels elektrophysiologischer Messungen Neurone im Hippokampus von Ratten identifizierten („*place cells*“), die ihre stärkste Aktivität immer dann zeigten, wenn sich das Tier in einer ganz bestimmten räumlichen Position („*place field*“) befand (O’Keefe, 1976). Je näher das Tier dem Zentrum des „*place field*“ kam, desto stärker war die Aktivität der verantwortlichen „*place cell*“. Aus der Gesamtaktivität der verschiedenen „*place cells*“ ergibt sich dann eine

exakte räumliche Karte. Eine Besonderheit der „*place cells*“ besteht darin, dass ihre Zuordnung für ein „*place field*“ nicht starr an einen Ort gebunden ist, sondern dass sie sich einem neuen Kontext anpassen und immer andere Lokalisierungen repräsentieren können. Diese Eigenschaft beruht auf den Prozessen der synaptischen Plastizität, sprich der Fähigkeit von Nervenzellen, die Effizienz ihrer synaptischen Kontakte zu modifizieren.

### **2.3 Die molekularen Grundlagen der synaptischen Plastizität**

Im menschlichen Gehirn sind ca.  $10^{11}$  Nervenzellen über  $10^{14}$ - $10^{15}$  Synapsen miteinander verknüpft. Das heißt, dass jedes Neuron durchschnittlich 1000 - 10 000 Kontakte mit anderen Neuronen ausbildet. Dieses hochkomplexe Netzwerk, das in der Entwicklung angelegt wird, ist nicht starr, sondern unterliegt einer ständigen Modulation. Während der Ontogenese sind genetische (intrinsische) Faktoren für die Synaptogenese verantwortlich. Dabei kommt es zu einer Überproduktion an Nervenfasern und Synapsen. Externe Stimuli (extrinsische Faktoren) sorgen dann während eng begrenzter Zeitfenster, sog. kritischer Perioden, postnatal für die Modulation der Verschaltungen, die durch das spätere Lernen (epigenetische Faktoren) einer lebenslangen Feinregulierung unterworfen sind. Während dieser regulatorischen Phasen werden synaptische Kontakte, in Abhängigkeit von der neuronalen Aktivität die sie vermitteln, verstärkt oder abgeschwächt, neu formiert oder aufgelöst. Diesen Vorgang nennt man synaptische Plastizität. Es wird angenommen, dass die synaptische Plastizität an einer Vielzahl physiologischer und pathophysiologischer Prozesse im Gehirn beteiligt ist, inklusive Lernen und Gedächtnis, Epilepsie, Ischämie, Drogenabhängigkeit oder neurodegenerativen Krankheiten (Hyman und Malenka, 2001; Johnston, 2004).

Vor 30 Jahren entdeckten die Neurophysiologen Tim Bliss und Terje Lømo, dass eine kurze repetitive Stimulation afferenter Fasern des Tractus perforans im Hippokampus von Säugetieren zu einer lang anhaltenden Verstärkung der synaptischen Übertragung auf die nachgeschalteten Granulärzellen führt (Bliss und Lømo, 1973). Sie bezeichneten dieses Phänomen als Langzeit-Potenzierung (LTP). Die LTP stellt ein zelluläres Korrelat für einen Hebb'schen Neuronenverbund dar und wurde zu einem etablierten Modell für die elektrophysiologischen Grundlagen der synaptischen Plastizität (Bliss und Collingridge, 1993). Obwohl mittlerweile auch in anderen Strukturen nachgewiesen, stützt sich der überwiegende Teil der Forschung über die zellulären und molekularen Grundlagen der LTP auf den Hippokampus. Wie von Hebb postuliert, wird LTP durch koinzidente prä- und

postsynaptische Aktivität induziert. Als molekularer Detektor dieser Koinzidenz konnte der NMDA-Rezeptor identifiziert werden: das vom präsynaptischen Neuron infolge der Stimulation ausgeschüttete Glutamat bindet an postsynaptisch lokalisierte Rezeptoren, wie die NMDA- oder auch AMPA-Rezeptoren. Im Gegensatz zum AMPA- erfolgt die Öffnung des NMDA-Rezeptors, der einen stark erhöhten Einstrom von Kalzium-Ionen in die postsynaptische Zelle bewirkt, aber nur bei zeitgleicher Depolarisierung der postsynaptischen Zellmembran. Diese wird aufgrund der repetitiven Stimulation durch die vorherige Aktivierung der AMPA-Rezeptoren erreicht. Der von NMDA-Rezeptoren vermittelte Anstieg an intrazellulärem Kalzium ist Grundvoraussetzung für die Induktion der LTP (Lynch et al., 1983; Malenka et al., 1992). So führen die erhöhten Kalzium-Level beispielsweise zur Autophosphorylierung und damit konstitutiven Aktivierung der  $\text{Ca}^{2+}$ /Calmodulin-abhängigen Proteinkinase II (CaMKII), zur Phosphorylierung der Proteinkinase A (PKA) durch cAMP und zur Aktivierung der Proteinkinase C (PKC) (Malinow et al., 1989; Frey et al., 1993; Huang et al., 1994; Abel et al., 1997). Mittlerweile weiß man, dass es verschiedene Formen der LTP gibt, inkl. solcher, die unabhängig von der Aktivierung der NMDA-Rezeptoren sind, und auch dass eine präsynaptische Komponente zur Aufrechterhaltung gewisser LTP-Formen beiträgt. Diese werden hier aber nicht weiter behandelt.

Wie das Gedächtnis, so hat auch die LTP mindestens zwei zeitliche Komponenten: eine kurz andauernde, frühe Phase (E-LTP) und eine lang anhaltende, späte Phase (L-LTP). Die E-LTP ist bis zu drei Stunden stabil und basiert auf post-translationellen Modifikationen bereits existierender Proteine an der postsynaptischen Membran. Dazu gehören beispielsweise die oben genannten Kinasen. So kommt es u. a. zur Phosphorylierung von Ionenkanälen, die für eine erhöhte Leitfähigkeit der Kanäle sorgt (Soderling und Derkach, 2000; Lisman et al., 2002). Dies wiederum führt zu einer potenzierten Antwort bei erneuter Transmitterausschüttung. Die L-LTP, deren Ausbildung eine mehrfach tetanische Stimulation erfordert, ist dagegen über Stunden bis Tage stabil und zeichnet sich durch zwei distinkte Charakteristika aus. Erstens benötigt sie die Synthese neuer mRNAs und Proteine, zweitens geht ihre Ausbildung mit der morphologischen Veränderung der aktivierten Synapsen einher (Krug et al., 1984; Goelet et al., 1986; Frey et al., 1988, 1996; Nguyen und Kandel, 1996; Osten et al., 1996; Engert und Bonhoeffer, 1999; Toni et al., 1999). Es existieren also neben der zeitlichen Komponente grundlegende Parallelen zwischen dem zellulären Modell der L-LTP und der Ausbildung des Langzeitgedächtnisses, denn das langfristige Speichern von Informationen ist ebenfalls von der Transkription und Translation aktivierter Gene abhängig

und zieht Strukturveränderungen nach sich. Einen direkten Zusammenhang zwischen der NMDA-Rezeptor vermittelten LTP im Hippokampus und der Ausbildung des Langzeitgedächtnisses zeigten Beobachtungen an Mäusen und Ratten, in denen der NMDA-Rezeptor blockiert oder genetisch manipuliert wurde. Diese Tiere können keine LTP ausbilden und in Lernexperimenten, wie z. B. dem räumlichen Orientierungslernen, bei dem der Hippokampus eine wichtige Rolle spielt, zeigen sie große Defizite bei der Konsolidierung eines Langzeitgedächtnisses (Morris et al., 1986; Tsien et al., 1996b; s. auch Kap. 2.8).

## **2.4 Die postsynaptische Dichte**

Der NMDA-Rezeptor ist ein Teil der postsynaptischen Dichte (PSD), welche ein komplexes Proteinnetzwerk darstellt, das in den dendritischen Dornen (*spines*) exzitatorischer Neurone mit der postsynaptischen Membran verknüpft ist (Kennedy, 2000). Der Dorn stellt eine Ausstülpung und damit Kompartimentierung des Dendriten dar, die den synaptischen Kontakt mit dem axonalen Bouton herstellt. Innerhalb der PSD befinden sich verschiedene funktionelle und rezeptorassoziierte Proteinnetzwerke, die untereinander verknüpft sind. Am Beispiel des NMDA-Rezeptors konnte mittels einer proteomischen Studie eine umfassende Aufstellung der Interaktionspartner eines solchen Rezeptor-Komplexes beschrieben werden (Husi et al., 2000). Dieser setzt sich aus fünf Proteinklassen zusammen (Rezeptoren, Adhäsionsmoleküle, Struktur- und zytoskelettale Proteine, Enzyme), die seine beiden Hauptfunktionen aufzeigen: Strukturbildung und Signalprozessierung. Aufgrund einiger bereits bekannter Proteininteraktionen der identifizierten Proteine zeichnet sich ein erstes Bild über die Hierarchie des Komplexes ab. So interagiert der NMDA-Rezeptor direkt mit dem Strukturprotein PSD-95 (auch bekannt als SAP90; Kornau et al., 1995), das über diverse Proteininteraktionen den Rezeptor mit (1) dem Zytoskelett, (2) anderen Rezeptorfamilien und (3) Signaltransduktionsmolekülen verbindet. Eine gut charakterisierte Kaskade läuft über die Bindungsfolge der Strukturproteine PSD-95–GKAP–Shank. Shank wiederum knüpft diesen Komplex an das Zytoskelett, metabotrope Glutamat-Rezeptoren und intrazelluläre Kalziumspeicher (Brenman et al., 1996; Kim et al., 1996, 1997; Naisbitt et al., 1999; Tu et al., 1999; Chen et al., 2000; Matus, 2000; Bayer et al., 2001; Schnell et al., 2002; s. als Review Husi und Grant, 2001).

Sowohl bei der Ausbildung von Langzeitgedächtnisspuren als auch nach L-LTP induzierender Stimulation kommt es zu komplexen Veränderungen der morphologischen Struktur an den

Synapsen (als Review s. Lamprecht und LeDoux, 2004). Nach plastizitätsinduzierender Stimulation beobachtet man eine Zweiteilung der PSD („perforierte Synapse“), die in der Aufspaltung des postsynaptischen Dorns endet („*multiple spine boutons*“, Toni et al., 1999; 2001). Das Zusammenspiel der Proteine in der PSD bildet die Grundlage für diese morphologischen Veränderungen, von denen man annimmt, dass sie der Aufrechterhaltung der synaptischen Verstärkung zugrunde liegen (Sheng und Kim, 2002). So gehen der morphologischen Umstrukturierung diverse Veränderungen in der molekularen Zusammensetzung der PSD voraus. Dazu gehört die Rekrutierung von Signalmolekülen, die Membraninsertion von Rezeptoren oder die Verknüpfung bzw. Auflösung von Verbindungen des Zytoskeletts. Die PSD ist also aktivitätsregulierten Veränderungen unterworfen, die sowohl die Komposition der Proteine als auch deren Interaktionen betreffen (Siekevitz, 1985; Sheng und Kim, 2002). Da die neuronale Plastizität spezifisch an den aktivierten Synapsen stattfindet, müssen solche Veränderungen zeitlich und räumlich auf diese begrenzt werden. Eine mögliche Steuerung dieser Prozesse könnte demnach solchen Proteinen zukommen, die erst durch neuronale Aktivität induziert und im Anschluss daran selektiv an der stimulierten Synapse wirken. Um welche Gene/Proteine handelt es sich dabei, wie wird ihre spezifische Wirkungsweise erreicht und welche Funktionen haben sie?

## **2.5 Aktivitätsregulierte Gene**

Basierend auf der Erkenntnis, dass neu synthetisierte Proteine für die stabilen Veränderungen der synaptischen Übertragungseffizienz nötig sind, können Einblicke in die Funktionen aktivitätsregulierter Genprodukte Aufschluss über die molekularen Zusammenhänge der synaptischen Plastizität geben. Kurzfristige Veränderungen beruhen auf der Modulierung existierender Proteine. Lang anhaltende Veränderungen an der Synapse sind dagegen abhängig von der Synthese neuer mRNAs bzw. Proteine. Da sich diese Abhängigkeit aber nur auf einen kurzen Zeitraum nach der Stimulation beschränkt, liegt der Fokus bei der Identifizierung möglicher Kandidaten auf solchen Genen, deren Transkription unmittelbar nach synaptischer Aktivität einsetzt. Man spricht von unmittelbar früh exprimierten Genen oder *immediate-early genes* (IEGs). Diese definieren sich darüber, dass ihre Induktion unabhängig von neuer Proteinsynthese ist und auf der Aktivierung bereits existierender Transkriptionsfaktoren beruht.

Die bereits genannten, vom Kalzium-Einstrom induzierten Signalkaskaden führen u. a. zur Aktivierung der Proteinkinasen CaMKIV, PKA, und MAPK (*mitogen activated protein kinase*). Die CaMKIV und PKA translozieren daraufhin in den Zellkern, wo sie den Transkriptionsfaktor CREB (*cAMP responsive element binding protein*) direkt aktivieren (Deisseroth et al., 1996; Impey et al., 1996; Grewal et al., 2000; Kang et al., 2001). Die MAPK bewirkt ebenfalls eine Aktivierung von CREB, allerdings auf indirektem Wege über weitere Signalmoleküle. Außerdem aktiviert die MAPK die synergistisch wirkenden Transkriptionsfaktoren SRF (*serum response factor*) und TCF (*ternary complex factor*) (Xia et al., 1996). Solche, mittlerweile ausführlich charakterisierten Signalkaskaden leiten die Information von der aktivierten Synapse zum Zellkern weiter und induzieren dort die Expression aktivitätsregulierter Gene (Deisseroth et al., 2003). So wird die Expression des Transkriptionsfaktors c-fos, der zu den ersten identifizierten IEGs gehört, infolge neuronaler Stimulation durch die Aktivierung von SRF und TCF induziert (Morgan et al., 1987; Dragunow et al., 1989; Worley et al., 1993). Schätzungen gehen davon aus, dass im Gehirn von Säugetieren ca. 30-40 Gene zu den IEGs gehören (Lanahan und Worley, 1998). Diese lassen sich in zwei Klassen kategorisieren: Transkriptionsfaktoren und Effektorproteine. Die Transkriptionsfaktoren, zu denen neben c-fos z. B. auch zif268, c-jun oder jun-B gehören, ermöglichen wiederum die Transkription weiterer Gene, so genannter *late-response genes*, und erweitern so die Breite der über die Genexpression gesteuerten Antwort des aktivierten Neurons. Effektorproteine üben dagegen eine Funktion außerhalb des Zellkerns aus und können über die Modulierung der synaptischen Stärke direkten Einfluss auf die plastizitätsinduzierten Veränderungen an der Synapse nehmen. Als Beispiel seien t-PA, das erste Effektorprotein, dessen Induktion nach LTP Stimulation von Kuhl und Mitarbeitern identifiziert wurde (Qian et al., 1993), und Homer1a angeführt (Xiao et al., 1998). Der Gewebe-Plasminogen-Aktivator t-PA ist eine Serin-Protease, die nach Sezernierung die extrazelluläre Protease Plasminogen aktiviert. Diese unterstützt die morphologischen Veränderungen, die sich bei plastischen Vorgängen an der Synapse abspielen. Homer1a ist eine Spleißvariante der Homer Genfamilie, die metabotrope Glutamat-Rezeptoren mit dem Strukturprotein Shank und intrazellulären Kalziumspeichern verknüpft (Tu et al., 1999). Homer1a gehört als einziges der Homer-Gene zu den IEGs (Brakeman et al., 1997) und bewirkt, über einen dominant negativen Effekt auf die genannten Verknüpfungen, strukturelle Veränderungen an der Synapse.

Ein weiteres Effektorprotein stellt Arg3.1 dar, das eine besondere Stellung unter den IEGs einnimmt.

## 2.6 Das aktivitätsregulierte Gen Arg3.1

Das Gen Arg3.1 wurde zeitgleich in den Laboren von Prof. Dietmar Kuhl bzw. Prof. Paul Worley identifiziert (Link et al., 1995; Lyford et al., 1995). Unser Labor nannte es Arg3.1 (*activity-regulated gene of 3.1 kb transcription length*), Prof. Worley Arc (*activity-regulated cytoskeleton-associated protein*). Wie bei vielen IEGs der Fall, wurde die aktivitätsregulierte Genexpression von Arg3.1 ursprünglich nach Einsetzen einer pharmakologisch bzw. elektrisch ausgelösten *grand mal* Epilepsie (generalisierter epileptischer Anfall) gefunden. Arg3.1 wird darüber hinaus von einer Vielzahl weiterer Stimuli angeschaltet, wozu auch die Induktion von LTP, Applikation von Drogen und physiologische Reize gehören (Link et al., 1995; Tan et al., 2000; Kelly und Deadwyler, 2002; Klebaur et al., 2002; Pinaud et al., 2002). Dabei führt eine NMDA-Rezeptor vermittelte Stimulation generell zur Induktion der Arg3.1 Expression. Unser Labor konnte zeigen, dass diese Genexpression, die bereits wenige Minuten nach der synaptischen Aktivierung einsetzt, von der Aktivierung der PKA und MAPK abhängig ist (Waltereit et al., 2001). Dabei zeigt die mRNA ein bemerkenswertes Verteilungsmuster: Arg3.1 ist das einzige aktivitätsregulierte Gen, dessen Transkript nach neuronaler Stimulation in den Dendriten lokalisiert ist (s. Abb. 3.1 und 3.2). Oswald Steward und Paul Worley konnte darüber hinaus zeigen, dass diese Verteilung nicht ungerichtet ist, sondern dass die Arg3.1 mRNA spezifisch in solchen dendritischen Bereichen akkumuliert, in denen die synaptische Aktivierung stattgefunden hat (Steward und Worley, 2001). Dabei erreicht sie die aktivierten Regionen zu einem Zeitpunkt, der kritisch ist für den Übergang der E-LTP in die L-LTP (Wallace et al., 1998). Diese Eigenschaften weisen auf eine mögliche Rolle für Arg3.1 in der Konsolidierungsphase bei synaptischer Plastizität hin. Ein weiterer wichtiger Hinweis für eine solche Funktion stammt aus den Beobachtungen, dass die Induktion von Arg3.1 direkt an informationsprozessierende Mechanismen im Gehirn gekoppelt ist. John Guzowski und seine Kollegen konnten zeigen, dass Arg3.1 nach räumlicher Exploration selektiv in einzelnen hippokampalen Neuronen von Ratten induziert wird. Das Muster dieser Arg3.1 positiver Zellen ist dabei streng an die räumliche Umgebung gekoppelt, eine Verteilung, die den in elektrophysiologischen Ableitungen gefundenen „*place cells*“ ähnlich ist (Guzowski et al., 1999).

Die Proteinsequenz von Arg3.1 weist eine entfernte Homologie zu dem Zytoskelett-Protein  $\alpha$ -Spectrin auf. Es wurde daher spekuliert, dass es bei den morphologischen Veränderungen an der Synapse mitwirken könnte. Eine partielle Abschwächung der Arg3.1 Expression durch *antisense*-Oligonukleotide gegen die Arg3.1 mRNA in Ratten resultierte in einer Abschwächung der LTP und einer Störung des Langzeitgedächtnisses in einer räumlichen Lernaufgabe (Guzowski et al., 2000). Die *antisense*-Technik führte aber lediglich zu einer 50 % Deletion der Proteinexpression.

Aufgrund dieser besonderen Eigenschaften ist Arg3.1 Gegenstand intensiver Forschung. Diese spaltet sich in zwei Themenkomplexe, wobei auf der einen Seite Arg3.1 als Markergen neuronaler Aktivität eingesetzt wird und andererseits die Rolle von Arg3.1 bei den Prozessen der synaptischen Plastizität aufgeklärt werden soll. Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit der funktionellen Analyse von Arg3.1.

## **2.7 Dendritische Lokalisierung und Translation von mRNAs**

Neben Arg3.1 gibt es eine kleine Anzahl weiterer Gene, deren Transkripte ebenfalls dendritisch lokalisiert sind, die allerdings nicht einer aktivitätsregulierten Expression unterliegen. Zu den ersten mRNAs, die in Dendriten gefunden wurden, zählen die MAP2 (*microtubule-associated protein 2*) (Garner et al., 1988) und die  $\alpha$ -CaMKII (Burgin et al., 1990) Transkripte. Einige Jahre zuvor wurde bereits die Existenz von synapsenassoziierten Polyribosomalen Komplexen demonstriert (SPRCs), also Polyribosomen, die sich selektiv an den dendritischen Dornen befinden (Steward und Levy, 1982). Diese Befunde weisen auf eine lokale Translation der mRNAs an den Synapsen hin, die für verschiedene Mechanismen verantwortlich sein könnte. So nimmt man an, dass die lokale Proteinsynthese eine Voraussetzung für die räumlich und zeitlich begrenzten Prozesse ist, die die plastizitätsinduzierten Veränderungen an aktivierten Synapsen vermitteln (Kuhl und Skehel, 1998). Auffälligerweise kodieren viele der inzwischen identifizierten dendritischen mRNAs für Proteine, die eine Rolle direkt an der Synapse spielen. Dazu gehören beispielsweise das Strukturprotein Shank1 (Sheng und Kim, 2002), die NMDA-Rezeptor-Untereinheit 1 (NR1; Benson et al., 1997) oder Arg3.1 (Link et al., 1995; für eine vollständige Liste der bis heute identifizierten dendritischen mRNAs s. Steward und Schuman, 2003).

Die ersten Studien, die die Abhängigkeit der L-LTP und des Langzeitgedächtnisses von Transkription und Translation zeigten, konnten noch keinen Aufschluss darüber geben, ob die

Proteinsynthese im Zellkörper oder in den Dendriten stattfindet. Erste Befunde, die eine Verbindung zwischen lokaler Translation und synaptischer Plastizität aufzeigten, stammen aus *in vitro* Studien an Vertebraten und Invertebraten. Bei Vertebraten wurde die Notwendigkeit für die Proteinsynthese an der Synapse an einer speziellen Form der LTP nachgewiesen. Dabei handelt es sich um eine über den Wachstumsfaktor BDNF induzierte Potenzierung. Die lokale Applikation von BDNF an Synapsen führt zu einer starken und lang anhaltenden Form von LTP (BDNF-LTP) in der hippocampalen CA1-Region. Hjevin Kang und Erin Schuman gelang es, in hippocampalen Schnitten das synaptische Neuropil der CA1-Region von der Zellkörperschicht zu trennen und so die plastischen Fähigkeiten von isolierten Synapsen zu analysieren (Kang und Schuman, 1996). Auch in der Abwesenheit der Translationsmaschinerie des Zellkörpers konnte eine BDNF-induzierte Potenzierung ausgelöst werden. Diese ist von der dendritischen Translation abhängig, da sie von der lokalen Applikation des Proteinsynthesehemmers Anisomycin inhibiert wird.

Bei den Invertebraten sind die molekularen und verhaltensbiologischen Grundlagen der Sensitivierung in der Meeresschnecke *Aplysia* sehr ausführlich untersucht worden. In einem speziellen Zellkultursystem konnten drei Zellen dieses Systems, ein sensorisches Neuron, das mit zwei räumlich getrennten Motorneuronen synaptische Kontakte ausbildet, gezüchtet werden. Durch gezielte Applikation des modulatorischen Neurotransmitters Serotonin auf eine Kontaktstelle wurde eine lang anhaltende Verstärkung (*facilitation*), die der LTP im Hippokampus von Vertebraten vergleichbar ist, ausschließlich an der stimulierten Synapse erreicht. Auch diese synaptische Potenzierung ist translationsabhängig und kann durch gezielte Gabe eines Proteinsynthesehemmers unterbunden werden (Martin et al., 1997).

## **2.8 Zielgerichtete Genmutationen in der Maus**

Um die molekularen Zusammenhänge aufzudecken, die den Prozessen der synaptischen Plastizität zugrunde liegen, wurden Ansätze entworfen, mit denen sich einzelne Gene bzw. ihre Genprodukte ausschalten lassen. Diese umfassen zahlreiche Methoden, wie z. B. (1) die pharmakologische Hemmung von Rezeptoren, Ionenkanälen oder Enzymen, (2) antikörpervermittelte Inhibition von Proteinen oder (3) die Inhibition der Translation auf Nukleotidebene durch *antisense*-Oligonukleotide, Ribozyme oder die noch neue Technik des RNAi (*RNA interference*). Alle genannten Techniken bringen aber entscheidende Nachteile mit sich, die die Interpretation der Ergebnisse stark beeinflussen. Neben unspezifischen

Nebenwirkungen oder einer starken Reaktion des Immunsystems (vor allem auf fremde Nukleinsäuren) liegt dabei das größte Problem in der meist unvollständigen und zeitlich unkontrollierbaren Wirkungsweise, die eine komplette Inhibition des Zielgens bzw. -proteins nicht zulassen (Robinson, 2004). Man spricht in Anspielung auf die verminderte Genexpression auch von „*gene-knockdown*“ Effekten.

Eine weitere Möglichkeit, die Expression eines Gens zu manipulieren, ist die gezielte Einführung sequenzspezifischer Modifikationen in das Genom von Säugerzellen mittels homologer Rekombination (*gene targeting*). Dabei ersetzt eine im Labor hergestellte DNA-Sequenz (*targeting construct*) die endogen vorliegende Sequenz im Chromosom. Ein Gen kann so gezielt und vollständig deletiert werden; man spricht von einem „*gene-knockout*“. Aus technischen Gründen wurden *knockout*-Ansätze bei Wirbeltieren zuerst ausschließlich bei Mäusen realisiert. Inzwischen wurden auch erste *knockout*-Ratten veröffentlicht, deren Generierung aber auf einem grundsätzlich unterschiedlichen Verfahren basiert (Zan et al., 2003). Die ersten, für die Ausbildung von LTP und Lernen und Gedächtnis relevanten *knockout*-Mäuse waren Nullmutanten der  $\alpha$ -CaMKII (Silva et al., 1992) bzw. der Tyrosinkinase fyn (Grant et al., 1992). Zur Analyse der kognitiven Fähigkeiten dieser Mäuse wurde das *Morris water maze* verwendet, ein häufig eingesetzter Verhaltenstest, der auf das räumliche Gedächtnis der Tiere abzielt. Dabei muss ein Tier in einem runden Wasserbecken eine unterhalb der Wasseroberfläche versteckte Plattform finden. Zur Navigation dienen ausschließlich außerhalb des Pools angebrachte Orientierungshilfen. Die Tiere lernen während einer Trainingsphase die exakte Plattformposition und das gebildete Gedächtnis wird dann, während eines Testdurchgangs, für den die Plattform entfernt wird, überprüft (Transfertest). Dabei wird gemessen, wie intensiv die trainierten Mäuse den ursprünglichen Ort der Plattform absuchen, sprich wie gut ihr Gedächtnis für die Plattformlokalisierung ist (Morris, 1984). Wie bereits in Kap. 2.2 und 2.3 angesprochen, ist die Integrität des Hippokampus für das räumliche Lernen erforderlich, das der Bewältigung einer solchen Aufgabe zugrunde liegt. Sowohl bei den  $\alpha$ -CaMKII als auch den fyn *knockout*-Mäusen korrelierte eine gestörte LTP-Ausbildung im Hippokampus mit Defiziten im Erlernen der *Morris water maze* Aufgabe.

In den folgenden Jahren wurde eine große Anzahl genetisch manipulierter Mauslinien generiert, die im Zusammenhang mit synaptischer Plastizität analysiert wurden (Lipp und Wolfer, 1998; Silva, 2003). Typischerweise werden dabei biochemische, elektrophysiologische und verhaltensbiologische Aspekte einbezogen. Bei den oben

beschriebenen konventionellen *knockout*-Ansätzen ist das Gen bereits während der Entwicklungsphase ausgeschaltet. Dabei kann es zu Defekten während der Entwicklung kommen, die häufig die Letalität des Embryos nach sich ziehen. Daher wurde der konventionelle Ansatz modifiziert und es entstanden konditionale *knockout*-Mauslinien. Hier wird das Zielgen im genomischen Locus von den Erkennungssequenzen (loxP) einer Cre-Rekombinase am 5' und 3' Ende flankiert („gefloxt“). Die Cre-Rekombinase (*causes recombination*) aus dem Bakteriophagen P1 bewirkt dann das Ausschneiden der Gensequenz. Über den Einsatz spezifischer Promotoren kann die Expression der Rekombinase und damit die Deletion des Gens räumlich und zeitlich kontrolliert werden. Dafür wird eine Mauslinie, die die Rekombinase unter einem selektiven Promotor exprimiert, in eine das homozygot loxP-flankierte Zielgen tragende Mauslinie hineingekreuzt. Durch die Wahl eines geeigneten Promotors kann man die Expression der Cre-Rekombinase und damit die Deletion des gefloxten Gens sowohl zeitlich als auch räumlich steuern. In diesem Zusammenhang findet der  $\alpha$ -CaMKII Promotor häufige Verwendung, da er erst zu einem postnatalen Zeitpunkt in einem begrenzten Bereich um die hippocampale CA1-Region aktiviert wird (Tsien et al., 1996a; Casanova et al., 2001).

## **2.9 Zielsetzung der Arbeit**

Das aktivitätsregulierte Gen Arg3.1 besitzt eine Reihe von Eigenschaften, die auf eine zentrale Rolle bei den plastizitätsinduzierten Veränderungen hinweisen, die sich nach neuronaler Aktivität an den Synapsen des zentralen Nervensystems von Säugetieren abspielen. So ist die Expression von Arg3.1 an Stimulationen gekoppelt, die zu lang anhaltenden Veränderungen in der synaptischen Stärke führen. Die Arg3.1 mRNA wird in die Dendriten transportiert und lokalisiert dort selektiv im Bereich der aktivierten Synapsen. Arg3.1 repräsentiert damit ein aktivitätsreguliertes Effektorgen, das an der Ausbildung lang anhaltender Formen der synaptischen Verstärkung, wie der Langzeitpotenzierung oder dem Langzeitgedächtnis, beteiligt sein könnte. Zu Beginn dieser Arbeit war nur sehr wenig über die Funktionsweise des Arg3.1 Proteins und dessen Rolle bei den Prozessen der synaptischen Plastizität bekannt.

In dieser Arbeit sollte ein Beitrag zur funktionellen Charakterisierung von Arg3.1 geleistet werden, wobei die Aufgabenstellung zwei thematisch getrennte Projekte umfasste: 1) Es sollte das Arg3.1 Protein in Hinblick auf seine genaue Lokalisation in Neuronen unter

verschiedenen Stimulationsbedingungen und auf seine Proteininteraktionen analysiert werden. Dabei sollte die Verteilung mit Hilfe von histochemischen Färbetechniken im Gewebe und durch biochemische Fraktionierungen von Zellkompartimenten verfolgt werden. Interaktionspartner sollten durch affinitätschromatographische Experimente identifiziert werden. 2) Parallel dazu sollten die Auswirkungen einer Arg3.1 Deletion mit Hilfe einer *knockout*-Mauslinie im Rahmen eines multidisziplinären Ansatzes analysiert werden. Bei den Tieren handelte es sich um Nullmutanten des Gens, die aus einer konditionalen *knockout*-Linie hervorgegangen sind. Die Generierung sowohl der konditionalen als auch der kompletten *knockout*-Mauslinie wurde in unserem Labor bereits bis zur Geburt chimärer Tiere durchgeführt. Die anschließende Aufgabe bestand darin, eine stabile Mauslinie zu erzeugen und diese zu analysieren. Dabei wurden molekularbiologische, biochemische und verhaltensbiologische Studien angewendet, die von elektrophysiologischen Experimenten in Kollaboration mit Dr. Ora Ohana sowie Prof. Tim Bliss und Mick Errington ergänzt wurden.