

1. Einleitung

Unsere Umwelt unterliegt ständigen Veränderungen. Um angemessen auf diese Einflüsse zu reagieren, das heißt im extremsten Fall zu überleben, muss der Mensch tagtäglich eine große Menge an Informationen aufnehmen, auswerten und speichern. Diese Aufgabe übernimmt das Gehirn, das über ca. 100 Milliarden Nervenzellen und 100 Billionen Synapsen verfügt. Es ist damit zentrale Schaltstelle für alle äußeren und inneren Reize sowie die daraus resultierenden Prozesse im Körper. Solche bemerkenswerten Fähigkeiten beruhen auf der enormen Plastizität des Gehirns, die sich von der variablen Genexpression bis hin zur flexiblen Morphologie der Neuronen erstreckt. Die für viele Menschen wohl faszinierendsten Aspekte dieser Anpassungsfähigkeit des Gehirns sind Mechanismen wie Lernen und Gedächtnisbildung, da sie als Maß für die menschliche Intelligenz gelten. Die Ansätze zur Entschlüsselung dieser Prozesse reichen von morphologischen Studien zur Größe des Gehirns bis hin zur Identifizierung einzelner Gene, die die Lernfähigkeit beeinflussen sollen. Letztendlich wird die Aufklärung der molekularen Hintergründe, die zu synaptischer Plastizität führen, Einblick in diese Vorgänge geben und so möglicherweise auch eine Grundlage für die Heilung neurodegenerativer Krankheiten bilden.

1.1 Anatomische Grundlagen von Lernen und Gedächtnis

Die Gehirne intellektuell herausragender Menschen, wie Voltaire, Gauß oder Goethe, waren schon früh Studienobjekt von Wissenschaftlern, die sich dadurch Aufschluss über den Ort und die morphologische Beschaffenheit von „Intelligenz“ erhofften. Bereits im 18. Jahrhundert wurde die Vermutung geäußert, dass intellektuelle Fähigkeiten mit der Größe des Gehirns korrelieren. Zu Beginn dieser Analysen hat man sich auf Vermessen des Schädels Lebender beziehungsweise Vermessen und Wiegen des Gehirns Toter beschränkt. E.A. Spitzka hat Anfang des 20. Jahrhunderts Untersuchungen durchgeführt, die besagten, dass die Gehirne von 130 herausragenden Männern durchschnittlich 100 g schwerer waren als die Gehirne Normalsterblicher (Spitzka, 1909). Im Laufe der Jahrzehnte wurden seine Ergebnisse und die ähnlicher Arbeiten immer wieder in Frage gestellt und selbst heutzutage, im Zeitalter von Computertomographie und MRI, wurde trotz diverser neuer Studien noch keine Einigkeit über den Zusammenhang zwischen Gehirngröße und Intelligenz erzielt (Peters, 1993; Rushton

und Ankeny, 1995; MacLulich et al., 2002). Fortschritte hat man dagegen im Bereich der Zuordnung spezifischer mentaler Prozesse zu bestimmten Gehirnstrukturen gemacht, wie im Folgenden erläutert werden soll.

Die ersten Studien zur Lokalisation kognitiver Fähigkeiten wurden zu Beginn des 19. Jahrhunderts von Franz Joseph Gall durchgeführt (Milner et al., 1998). Er war Begründer der so genannten Organologie, die anhand der Struktur der Schädeloberfläche speziell begabter Menschen einzelnen Gehirnregionen besondere Funktionen zuwies. Auch wenn die meisten dieser Assoziationen aus heutiger Sicht falsch waren, ist es doch der Verdienst Galls, dass das Gehirn erstmals nicht mehr nur als zentralistisch arbeitende Einheit, sondern als ein nach einzelnen Funktionen in verschiedene Regionen unterteilbares Organ angesehen wurde (Lokalisationstheorie). Gall ging sogar so weit, den einzelnen Regionen auf der Großhirnrinde Charaktereigenschaften zuzuweisen. Sein Mitarbeiter Spurzheim prägte später den Begriff der Phrenologie für diesen Zusammenhang zwischen Schädelform und Charakter. Als der französische Wissenschaftler Pierre Flourens um 1820 diese Theorie experimentell mit Hilfe von spezifischen Läsionen in Gehirnen von Tieren nicht bestätigen konnte, entwickelte sich als Antithese die Äquipotentialtheorie des Gehirns. Diese Theorie sah sämtliche Einzelaspekte der Kognition, wie zum Beispiel Vorstellungskraft, Wille und Emotion, als ein und dieselbe Fähigkeit an, die vom Gehirn als Einheit erbracht wurde. Diese Äquipotentialtheorie war jahrzehntelang vorherrschende Meinung. Erst Mitte des 19. Jahrhunderts begannen Neurologen wie Jackson, Broca und Wernicke anhand von krankheitsbedingten, gehirnregionenspezifischen Läsionen die Äquipotentialtheorie zu Gunsten der Lokalisationstheorie zu widerlegen. Jackson konnte anhand klinischer Studien fokaler Epilepsien zeigen, dass verschiedene Teile der Großhirnrinde für bestimmte motorische und sensorische Prozesse zuständig sind. Broca und Wernicke untersuchten Schlaganfallpatienten, die an unterschiedlichen Formen der Aphasie (neurologisch bedingte Sprachstörung) litten, und identifizierten so Areale auf der Großhirnrinde, die verschiedene Aspekte des Sprachvermögens kontrollieren. Aber erst in den 50er Jahren des zwanzigsten Jahrhunderts gelang es, auch so elementaren Vorgängen wie bestimmten Formen von Lernen und Gedächtnis spezifische Gehirnregionen zuzuweisen. Einen Meilenstein im Rahmen dieser Erkenntnis stellten Untersuchungen an Patienten mit Temporallappenepilepsie dar, denen Teile des Frontal- oder Schläfenlappens operativ entfernt worden waren. Dieses Operationsverfahren, das noch heute bei schweren Formen dieser Epilepsie zum Einsatz kommt, wurde von Wilder Penfield entwickelt. Zusammen mit Brenda Milner entdeckte er, dass seine Patienten nach der Operation zwar von der Epilepsie geheilt waren, aber dafür

schwere Beeinträchtigungen bei der Bildung von Langzeitgedächtnis zeigten (Penfield und Milner, 1958). Brenda Milner konnte in detaillierten Analysen der Gedächtnisstörungen dieser Patienten zeigen, dass sich das Defizit speziell auf explizites, also bewusstes Lernen neuer Informationen bezog, während implizite Gedächtnisformen wie das Erlernen motorischer Fähigkeiten intakt geblieben waren (Milner et al., 1968). Dieses Phänomen war eindeutig zurückzuführen auf Läsionen der hippocampalen Formation und demonstrierte erstmals die Bedeutung dieser Gehirnstruktur für die Ausbildung des expliziten Langzeitgedächtnisses. Die hippocampale Formation liegt im Temporallappen und setzt sich zusammen aus dem Ammonshorn (*Cornu ammonis*, bestehend aus den Regionen 1-3), dem *Gyrus dentatus*, dem *Subiculum*, dem *Präsubiculum*, dem *Parasubiculum* und dem entorhinalen Kortex. Sie zählt zu den evolutionär ältesten Strukturen des Gehirns. Im weiteren Verlauf dieser Arbeit werden der *Gyrus dentatus* und die CA-Region kurz als Hippokampus bezeichnet (Abb. 1.1).

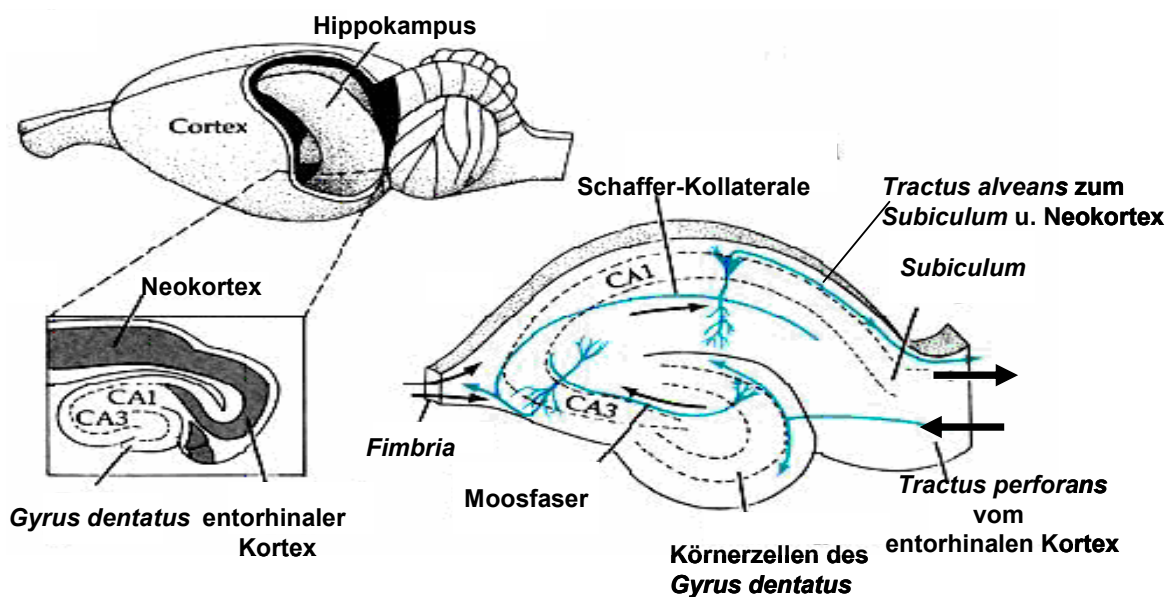


Abb. 1.1: Der Hippokampus

In dieser Abbildung sind die dreidimensionale Lage des Hippokampus im Gehirn der Ratte, ein zweidimensionaler Querschnitt und ein Schema des trisynaptischen Schaltkreises dargestellt. Der Hippokampus ist eine kortikale Struktur, die aus den *Cornu ammonis* Regionen CA1-3 und dem *Gyrus dentatus* besteht. Die Signalweiterleitung im Hippokampus läuft im Wesentlichen über den trisynaptischen Schaltkreis. Dieser wird über die den *Tractus perforans* bildenden Axone aus dem entorhinalen Kortex innerviert. Sie projizieren auf die Dendriten der Körnerzellen des *Gyrus dentatus*, die über ihre Axone, die Moosfasern, das Signal weiter auf die Pyramidenzellen der CA3-Region leiten. Die Axone dieser Neuronen bilden die Schaffer-Kollateralen, die auf die Dendriten der CA1-Region projizieren. Das Signal verlässt den Hippokampus über den *Tractus alveans* und wird zum Neokortex und *Subiculum* weitergeleitet (modifiziert nach <http://wwwk.dongguk.ac.kr/~Moonis/lecture/00-HC/00-hippocampal%20formation.htm>).

In einer Vielzahl von Experimenten konnten bis heute verschiedenen, auch kleineren Regionen des Gehirns spezielle Aufgaben zugeteilt werden. Zum Beispiel ist die Amygdala (Mandelkern) wichtig für emotionales Lernen (Davis, 1992), während der *Nucleus Accumbens*, eine Region im Striatum, verantwortlich für Mechanismen der Motivation, Belohnung und Sucht ist (Thomas und Malenka, 2003). Durch die in den letzten Jahrzehnten entwickelten bildgebenden Verfahren können die einzelnen Regionen des Gehirns außerdem im lebenden Objekt visualisiert und das Ausmaß ihrer Aktivität beobachtet werden. Mit Hilfe dieser Techniken wird die weitere anatomische Aufklärung der Funktionsweise des Gehirns zukünftig erleichtert werden (Giove et al., 2003; Matthews und Jezzard, 2004).

1.2 Zelluläre Grundlagen von Lernen und Gedächtnis

Das Gehirn ist ein Netzwerk aus einzelnen Zellen, den Neuronen, die über Synapsen miteinander verschaltet sind. Diese zelluläre Struktur des Gehirns war lange umstritten. Mit Einführung der Lichtmikroskopie im 18. Jahrhundert wurde die noch von dem römischen Arzt Claudius Galenus stammende Annahme, das Nervengewebe habe eine drüsenähnliche Funktion, verworfen. Erst Mitte des 19. Jahrhunderts jedoch konnte Karl Deiters nachweisen, dass die lichtmikroskopisch erkennbaren Nervenfasern mit den Zellkörpern verbunden waren und in Dendriten und Axone unterteilt werden konnten (Kandel et al., 1995; Sotelo, 2003). Selbst zu diesem Zeitpunkt nahmen die meisten Wissenschaftler noch an, das Gehirn sei ein durchgehendes Netzwerk von Nervenfasern. Gegen Ende des 19. Jahrhunderts konnte Ramón y Cajal mit Hilfe einer 1873 von Camillo Golgi entwickelten Silberfärbung zeigen, dass das Gehirn aus individuellen Nervenzellen besteht, und begründete damit die Neuronentheorie (Ramón y Cajal, 1888). Auf Grund dieser Erkenntnis formulierte 1897 der Neurophysiologe Sir Charles Sherrington den Begriff der „Synapse“ als Kontakt zwischen den einzelnen Nervenzellen (Bennett, 1999). Ungefähr 50 Jahre später stellte der Kanadische Psychologe Donald Hebb wesentliche Theorien zur Funktion der Neuronen auf (Hebb, 1949). Er nahm an, dass Lernen und Gedächtnis nicht in einer einzelnen Gehirnregion lokalisiert sind, sondern dass ganze Gruppen von Neuronen, die über größere kortikale Bereiche verteilt sind, in Netzwerken zusammenarbeiten und so Informationen repräsentieren (Milner et al., 1998). Außerdem formulierte er eine wesentliche Regel zur synaptischen Plastizität, wonach Zellen, die koinzident aktiv sind, ihre synaptischen Verbindungen verstärken. Diese Hebbsche Regel wurde 24 Jahre später mit der Entdeckung der Langzeitpotenzierung (LTP, *long-term potentiation*) bestätigt (Bliss und Lomo, 1973). Bei der LTP wird durch kurze, hochfrequente

Reizung der präsynaptischen Neuronen eine lang anhaltende Erhöhung der Effizienz der exzitatorischen Signalübertragung auf die nachgeschalteten, postsynaptischen Neuronen erzeugt, die über Stunden und Tage hinweg beobachtet werden kann. Die Langzeitpotenzierung wurde erstmals anhand der Signalweiterleitung vom *Tractus perforans* auf die Dendriten der Molekularschicht des *Gyrus dentatus* entdeckt. Der *Tractus perforans* entstammt dem entorhinalen Kortex und ist der Hauptsignaleingang zum Hippokampus. Ausgehend vom *Gyrus dentatus* durchlaufen die Signale den so genannten trisynaptischen Schaltkreis (Abb. 1.1) und projizieren zurück in den Neokortex sowie über das angrenzende *Subiculum* in das *Diencephalon* und die Amygdala (Kandel et al., 1995). LTP kann in allen drei Nervenbahnen des Hippokampus ausgelöst werden und gehört zu den best untersuchten molekularen Vorgängen an der Synapse. Sie wird mittlerweile als ein etabliertes zelluläres Modell für synaptische Plastizität und Langzeitgedächtnis angesehen (Bliss und Collingridge, 1993). Dennoch kann man nicht immer eindeutige Korrelationen zwischen der Ausbildung von LTP und der Fähigkeit zu lernen nachweisen. Hauptursache für diesen scheinbaren Widerspruch könnte die schon von Hebb postulierte hohe Vernetzung der Neuronen innerhalb des Gehirns sein. Komplizierte Vorgänge wie das Erlernen und Abrufen neuer Aufgaben werden vermutlich nicht nur durch die synaptische Übertragung einzelner Neuronengruppen beeinflusst, sondern vom Zusammenspiel ganzer neuronaler Netzwerke (Goosens und Maren, 2002).

Elektronenmikroskopische Untersuchungen haben gezeigt, dass eine andauernde Verstärkung der synaptischen Übertragung zu morphologischen Veränderungen auf zellulärer Ebene führt. Davon sind vor allem die Dornfortsätze der Dendriten, auch *Spines* genannt, betroffen, auf denen sich der überwiegende Teil exzitatorischer glutamaterger Synapsen im zentralen Nervensystem (ZNS) befindet (Harris und Kater, 1994). Diese *Spines* sind röhren- und pilzförmige Ausstülpungen der dendritischen Membran, die in Hinblick auf Ionenzusammensetzung und Signalkaskaden eine biochemische Kompartimentalisierung des Dendriten darstellen (Koch und Zador, 1993). Die Synapsen innerhalb der *Spines* besitzen auf dendritischer Seite so genannte postsynaptische Dichten (PSD), eine elektronendichte Struktur, bestehend aus Glutamatrezeptoren, spannungsabhängigen Ionenkanälen und Strukturproteinen, die die Transmembranproteine mit intrazellulären Signalmolekülen wie Kinasen und Phosphatasen verbinden (Sheng, 2001). PSDs wurden zunächst elektronenmikroskopisch identifiziert (Akert et al., 1969), lassen sich aber auch biochemisch über differentielle Zentrifugationen aufreinigen (Cotman et al., 1974). Ein wesentlicher Bestandteil der PSD ist der NMDA-Rezeptorkomplex (Husi et al., 2000). Ausgelöst durch

synaptische Aktivität in Form von LTP kann es zu einer Erhöhung der Zahl der Synapsen, sowie zu Vergrößerungen, Neu- und Umbildungen der *Spines* und zur kurzfristigen Veränderung der postsynaptischen Dichten kommen (Lynch et al., 1977; Lee et al., 1980; Nieto-Sampedro et al., 1982; Buchs und Muller, 1996; Geinisman et al., 1996). Die morphologischen Veränderungen der PSD äußern sich in einer so genannten perforierten Synapse, deren postsynaptische Dichte nicht kompakt und scheibenförmig ist, sondern komplex und segmentiert. Solche perforierten PSDs besitzen eine größere Anzahl ligandenabhängiger Ionenkanäle und sind effizienter in der Übertragung synaptischer Impulse (Ganeshina et al., 2004). Neben dieser durch physiologische Reize ausgelösten morphologischen Plastizität gibt es auch durch Krankheiten verursachte strukturelle Veränderungen der Neuronen. Ein Beispiel ist das *Fragile-X-Syndrom*, eine der weltweit am häufigsten auftretenden vererbaren Geisteskrankheiten, die auf das Fehlen des RNA-bindenden Proteins FMRP zurückzuführen ist (Antar und Bassell, 2003). Sowohl *Fragile-X*-Patienten als auch Mäuse, bei denen das *fmr1*-Gen deletiert wurde, zeigen eine erhöhte Anzahl von *Spines*, die untypisch lang und dünn sind (Irwin et al., 2000).

Lang andauernde synaptische Plastizität im Gehirn äußert sich also nicht nur in modifizierter synaptischer Übertragung, sondern auch in elektronenmikroskopisch nachweisbaren morphologischen Veränderungen der Neuronen. Diese strukturelle Plastizität der Nervenzellen ist ein eindrucksvoller Beweis für die Flexibilität des Gehirns und die Aufklärung der molekularen Hintergründe dieser plastischen Vorgänge sollte einen wesentlichen Beitrag zum Verständnis seiner Funktion leisten.

1.3 Molekulare Grundlagen von Lernen und Gedächtnis

Die Entwicklung neuer molekularbiologischer und molekulargenetischer Methoden machte es möglich, die Vorgänge innerhalb einzelner Neuronen auf der Ebene von DNA und Protein zu untersuchen. Auch wenn bei diesem Ansatz die oben erwähnte Vernetzung der Neuronen missachtet wird, erhofft man sich dennoch durch die Analyse molekularer Prozesse, die synaptischer Plastizität unterliegen, Aufschlüsse über die Funktionsweise des Gehirns. Wie schon erwähnt, ist die Ausbildung von LTP einer der am gründlichsten untersuchten Mechanismen der Nervenzelle. Ein wichtiger Aspekt von LTP ist die von Hebb geforderte koinzidente prä- und postsynaptische Aktivität der beteiligten Neuronen. Als molekularer Koinzidenzdetektor wurde der NMDA-Rezeptor identifiziert (Harris et al., 1984; Malenka und Nicoll, 1993). Dieser ligandenabhängige Ionenkanal ist unter Ruhepotentialbedingungen

durch Magnesiumionen blockiert und benötigt für seine Aktivierung, d.h. also Öffnung, neben extrazellulärem Glutamat (präsynaptische Aktivität) auch postsynaptische Depolarisation (postsynaptische Aktivität) (Mayer et al., 1984). Der nach der Öffnung des NMDA-Rezeptors erfolgende Kalziumeinstrom in die postsynaptische Zelle ist elementar für die Induktion von LTP (Malenka et al., 1992) und führt zu einer Reihe komplexer molekularer Veränderungen, die in der Verstärkung der synaptischen Effizienz resultieren. Anhand der elektrophysiologischen Eigenschaften und der Art der molekularen Veränderungen innerhalb des Neurons unterscheidet man zwei Phasen der LTP, nämlich die frühe Phase (*early*, E-LTP), die auf der Modifikation bereits vorhandener Proteine beruht und ein bis drei Stunden anhält, und die späte Phase (*late*, L-LTP), die auf die Synthese neuer mRNA und Proteine angewiesen ist und über Tage hinweg andauert (Bailey et al., 1996). Diese molekularen Vorgaben entsprechen denen des Kurz- und Langzeitgedächtnisses. Während das Kurzzeitgedächtnis (Minuten bis Stunden) unabhängig von Transkription und Translation ist, wird die Ausbildung von Langzeitgedächtnis (Tage, Wochen und Jahre) durch Transkriptions- und Translationsinhibitoren gehemmt (Davis und Squire, 1984). Einige der an der Langzeitpotenzierung beteiligten Moleküle und Signaltransduktionswege, die zu posttranslationaler Modifikation beziehungsweise veränderter Transkription und Translation führen und zum Teil auch an der Ausbildung von Langzeitgedächtnis beteiligt sind, wurden bereits identifiziert und sollen anhand von Beispielen im Folgenden näher beschrieben werden.

Eine zentrale Rolle spielen kalziumregulierte Kinasen wie die Kalzium/Calmodulin abhängige Kinase II (CaMKII) oder die Protein Kinase C (Malinow et al., 1989). Durch den LTP-vermittelten Einstrom von Kalziumionen kommt es zu einer Autophosphorylierung und damit zu einer konstitutiven Aktivierung der CaMKII, die auch nach Absinken des Kalziumpegels längere Zeit aktiv bleibt und damit als eine Art aktivitätsregulierter Schalter funktioniert (Braun und Schulman, 1995). Ein Substrat der CaMKII ist zum Beispiel die AMPA-Rezeptoruntereinheit GluR1 (Tan et al., 1994; Mammen et al., 1997). AMPA-Rezeptoren sind ebenso wie NMDA-Rezeptoren ligandenabhängige Ionenkanäle, die in der postsynaptischen Membran lokalisiert sind. Im Gegensatz zu NMDA-Rezeptoren ist die Bindung von Glutamat ausreichend für ihre Öffnung, sie vermitteln daher die schnelle exzitatorische Antwort der Postsynapse auf einen präsynaptischen Reiz. Die Phosphorylierung der AMPA-Rezeptoren durch CaMKII führt zu einer Verstärkung des AMPA-vermittelten Stroms durch Erhöhung der Ionenleitfähigkeit und damit zu einer schnelleren und stärkeren Depolarisierung der postsynaptischen Membran (Soderling und Derkach, 2000). Neben dieser Regulation durch

Phosphorylierung besteht ein weiterer wichtiger Regulationsmechanismus der AMPA-Rezeptor-vermittelten Antwort auf präsynaptisch sekretiertes Glutamat in der aktivitätsabhängigen Insertion neuer AMPA-Rezeptoren in die postsynaptische Membran (Bredt und Nicoll, 2003). Dieser Vorgang impliziert die Theorie der „stillen Synapse“, nach der bestimmte Synapsen im Ruhezustand keine AMPA-Rezeptoren besitzen. Diese werden erst durch LTP-auslösende synaptische Aktivierung in die postsynaptische Membran eingebaut (Nicoll, 2003). Wesentlich beteiligt an diesen Prozessen sind das AMPA-Rezeptor-bindende Transmembranprotein Stargazin und sein Interaktionspartner PSD95 (Chen et al., 2000).

Ein weiteres für die Ausbildung von LTP wichtiges Signaltransduktionsmolekül ist die Proteinkinase A (Frey et al., 1993; Huang et al., 1995; Abel et al., 1997). Die PKA wird durch das Signalmolekül cAMP aktiviert, dessen Bindung das Abdissoziieren der inhibitorischen regulatorischen Untereinheiten der PKA bewirkt (Krauss, 1997). Der so genannte *second messenger* cAMP wiederum wird von der membranständigen Adenylatzyklase gebildet, die durch G-Protein gekoppelte Transmembranrezeptoren oder durch Phosphorylierung der CaMKII aktiviert wird (Cali et al., 1994; Krauss, 1997). Ein prominentes Substrat der Proteinkinase A ist der Transkriptionsfaktor CREB, der an die CRE-Sequenz innerhalb des Promotorbereiches verschiedener Gene bindet und so ihre Transkription aktiviert (Montminy, 1997). CREB kann allerdings ebenfalls durch CaMKII phosphoryliert werden (Deisseroth et al., 1996) und ist damit Schnittstelle verschiedener Signaltransduktionswege. Seine Bedeutung für die Ausbildung von Langzeitpotenzierung und Langzeitgedächtnis ist viel untersucht und umstritten. Während in Invertebraten, wie der Meeresschnecke *Aplysia californica*, der Fruchtfliege *Drosophila melanogaster* und der Honigbiene *Apis mellifera*, klare Hinweise auf eine essentielle Beteiligung an diesen Prozessen vorliegen (Dash et al., 1990; Yin et al., 1994; Bartsch et al., 1995; Fiala et al., 1999; Eisenhardt et al., 2001), ist bei Vertebraten wie Mäusen die Beziehung nicht so eindeutig. *Knockout*-Mäuse, die weder die α - noch die δ -Isoform von CREB exprimierten, zeigten Defizite in der hippocampalen LTP und der Bildung von hippocampusabhängigem Langzeitgedächtnis (Bourtchuladze et al., 1994). Dagegen ließ die Analyse von Mäusen, bei denen die Expression sämtlicher im Gehirn vorkommender CREB-Isoformen (α , β und δ) reduziert oder vollständig aufgehoben war, auf eine nicht essentielle Rolle dieses Transkriptionsfaktors bei der Ausbildung von LTP oder Gedächtnis schließen (Balschun et al., 2003). Als Grund für diese Beobachtung wird eine Kompensation der CREB-Deletion durch andere Transkriptionsfaktoren, wie zum Beispiel CREM diskutiert. Dennoch wird seit der Entdeckung von negativen Regulatoren der CREB-

vermittelten Transkription dieser Signalweg als Ansatzpunkt für Pharmazeutika zur Verbesserung von krankheits- oder altersbedingt verminderter Gedächtnisleistung vorgeschlagen (Abel et al., 1998; Chen et al., 2003). Der therapeutische Nutzen und die ethische Rechtfertigung solcher „Gedächtnispillen“ sind allerdings stark umstritten (Farah et al., 2004).

Ein weiterer Signaltransduktionsweg, der durch synaptische Aktivität reguliert wird, ist der Ras/MAPK-Weg (Thomas und Huganir, 2004). Er wird unter anderem durch NMDA-vermittelten Kalziumeinfluss angeschaltet und aktiviert über eine Phosphorylierungskaskade Transkriptionsfaktoren wie SRF und Elk-1 (Xia et al., 1996). In *Aplysia* wurde beispielsweise nach der Induktion von Langzeitfaszilitierung, einer lang anhaltenden Verstärkung der synaptischen Übertragung, die vergleichbar ist mit LTP, die Aktivierung und nukleäre Translokation der MAP Kinase beobachtet (Martin et al., 1997; Michael et al., 1998). An Gehirndünnschnitten von Ratten konnte gezeigt werden, dass die pharmakologische Inhibition dieses Signaltransduktionsweges die Aufrechterhaltung von LTP blockiert (English und Sweatt, 1997). Der Ras/MAPK-Weg wird im Laufe dieser Arbeit noch näher beschrieben werden.

1.4 Aktivitätsregulierte Transkription unmittelbar früh exprimierter Gene

Die bisher aufgeführten, durch synaptische Aktivierung induzierten Signaltransduktionswege über CaMKII, PKA/CREB, und Ras/MAPK resultieren unter anderem in verstärkter Transkription. Tatsächlich spielen Gene, die unmittelbar nach einem ausreichend starken synaptischen Reiz exprimiert werden, eine besondere Rolle bei der Entstehung von lang anhaltenden neuronalen Veränderungen wie LTP und Langzeitgedächtnis (Dragunow, 1996; Lanahan und Worley, 1998). Die Transkription dieser so genannten unmittelbar frühen Gene (*immediate early genes*, IEG) ist unabhängig von der Proteinsynthese und läuft ausschließlich über posttranslationale Modifikationen vorhandener Proteine zum Teil durch die oben beschriebenen Signaltransduktionswege. IEGs können entweder als Transkriptionsfaktoren fungieren, welche die proteinsyntheseabhängige Expression der späten unmittelbar frühen Gene (*late IEGs*) anschalten, oder selber Effektormoleküle sein. Der zeitliche Verlauf der Induktion ist bei allen zu der Gruppe der IEGs gehörenden Genen ähnlich. Eine Stunde nach dem Stimulus ist die Expression ihrer mRNA stark erhöht, um nach einigen Stunden wieder

auf Kontrollniveau abzusinken. Zu den durch synaptische Aktivität unmittelbar früh exprimierten Transkriptionsfaktoren gehören c-Fos, c-Jun, Jun-B, und Zif268 (Cole et al., 1989). Studien an *Knockout*-Mäusen, bei denen das Gen Zif268 spezifisch deletiert wurde, haben gezeigt, dass dieser Transkriptionsfaktor wichtig für die Konsolidierung von Langzeitgedächtnis und die späte Phase von L-LTP ist (Bozon et al., 2002; Davis et al., 2003). IEGs mit Effektorfunktion sind zum Beispiel der Gewebefibrinolyse-Aktivator t-PA (Qian et al., 1993), ein Mitglied der Ras-Superfamilie Rheb (Yamagata et al., 1994), der Wachstumsfaktor BDNF (Lauterborn et al., 1996), das synaptische Gerüstprotein Homer 1a (Brakeman et al., 1997) sowie mehrere in unserem Labor identifizierte Proteinkinasen. Zu diesen gehören Pim-1, die für die Konsolidierung von LTP notwendig ist (Konietzko et al., 1999), und die Polo-Kinasen SnK und FnK (Kauselmann et al., 1999).

Ein besonders interessantes unmittelbar früh exprimiertes Effektorgen ist Arg3.1, das in unserem Labor (Arg3.1, *activity regulated gene 3.1*, Link et al., 1995) und zeitgleich im Labor von Paul Worley (Arc, *activity-regulated cytoskeleton-associated protein*, Lyford et al., 1995) identifiziert wurde. Seine mRNA wird nach Induktion bis in die distalen Dendriten der Neuronen des Hippokampus transportiert, eine Eigenschaft, die es einzigartig unter den aktivitätsregulierten Genen macht (Abb. 1.2). Über die genaue Effektorfunktion von Arg3.1 ist noch nicht viel bekannt. Das Protein ist entfernt mit α -Spektrin verwandt (Link et al., 1995) und über seine Assoziation an Actin mit dem Zytoskelett verbunden (Lyford et al., 1995). Außerdem bindet es an PSD95, ein Gerüstprotein der postsynaptischen Dichte (Plath et al., 2003) und an die schon erwähnte Kinase CaMKII (Donai et al., 2003). Die konstitutive Expression der Arg3.1-mRNA ist in den Schichten II, III, IV und VI des okzipitalen, parietalen und temporalen Kortexes von Rattengehirnen hoch, während sie im Hippokampus sehr gering ist. Ihre Transkription lässt sich durch diverse Stimuli induzieren. So führen zum Beispiel pharmakologisch ausgelöste epileptische Krampfanfälle zu einer dramatischen Erhöhung der Zahl der Arg3.1-Transkripte im Hippokampus und Kortex. Die hochfrequente Reizung des *Tractus perforans* resultiert in einem starken, räumlich begrenzten Anstieg der Menge an mRNA-Molekülen in den Körnerzellen des *Gyrus dentatus* (Link et al., 1995; Lyford et al., 1995). Darüber hinaus wird die Transkription von Arg3.1 durch Präsentation visueller und sensorischer Reize sowohl im Kortex, als auch im Hippokampus hochreguliert (Pinaud et al., 2001), ebenso nach dem Erlernen von Verhaltensparadigmen (Kelly und Deadwyler, 2002, 2003). Abgesehen davon wird eine Beteiligung des Arg3.1-Proteins an der Wirkungsweise von Psychopharmaka und Drogen diskutiert, da es nach Stimulation des 5-HT-Rezeptors sowie nach Applikation von Kokain, Methamphetaminen, Amphetaminen und

Antidepressiva ebenfalls zu einer Induktion der Arg3.1-Expression kommt (Fosnaugh et al., 1995; Kodama et al., 1998; Pei et al., 2000; Tan et al., 2000; Wirtshafter und Sheppard, 2003).

Das Protein Arg3.1 ist Bestandteil der postsynaptischen Dichte (Plath et al., 2003) und assoziiert mit dem NMDA-Rezeptorkomplex (Husi et al., 2000; Plath et al., 2003). *Knockout*-Studien in unserem Labor haben gezeigt, dass die Deletion dieses Gens in Mäusen zu Störungen bei der Ausbildung von LTP und bei der Gedächtniskonsolidierung führt (Plath et al., 2003). Die hippocampale LTP dieser Tiere ist in der frühen Phase zunächst stark erhöht, fällt dann aber deutlich ab und erreicht nach 90 bis 120 Minuten wieder Grundlinienwerte. Zusätzlich ist die Ausbildung von Langzeitgedächtnis dieser Mäuse bei räumlichem Lernen, sowie bei hippocampusabhängiger und -unabhängiger Furchtkonditionierung stark behindert. Diese Ergebnisse entsprechen in Grundzügen einer vorhergehenden Untersuchung von Guzowski und Kollegen, bei der die Expression von Arg3.1 im Hippokampus von Ratten durch *Antisense*-Oligonukleotide unterdrückt wurde. Dies resultierte in der Inhibition der Aufrechterhaltung von LTP und der Konsolidierung des räumlichen Langzeitgedächtnisses (Guzowski et al., 2000). So gibt es also einige Hinweise darauf, dass das unmittelbar früh exprimierte Gen Arg3.1 eine wichtige Rolle bei der Ausbildung lang anhaltender Formen synaptischer Plastizität, wie zum Beispiel der Gedächtnisbildung spielen könnte.

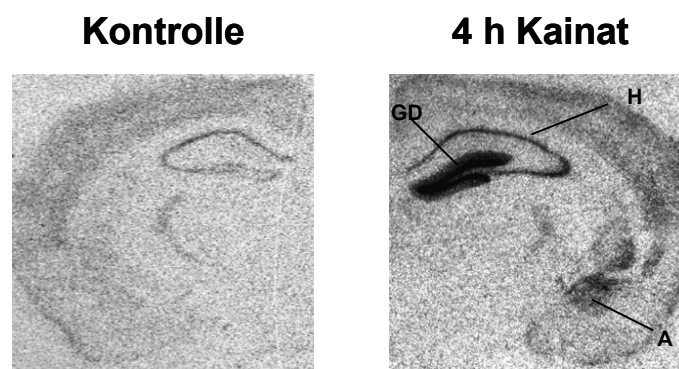


Abb.1.2: Die Arg3.1-mRNA wird nach synaptischer Aktivität in die Dendriten von Neuronen transportiert.

Die Abbildung zeigt die Expression der Arg3.1-mRNA unter Kontrollbedingungen und vier Stunden nach kainatinduziertem Krampfanfall. Die radioaktive *in situ* Hybridisierung mit Arg3.1-spezifischen *Antisense*-Oligonukleotiden auf Gehirndünnschnitten von Mäusen zeigt den starken Anstieg der Arg3.1-Transkription besonders im Hippokampus (*H*) und der Amygdala (*A*) vier Stunden nach kainatinduziertem Krampfanfall. Die mRNA wird nach synaptischer Aktivierung bis in die distalen Bereiche der Dendriten transportiert. Dies ist besonders eindrucksvoll im *Gyrus dentatus* (*GD*) zu sehen.

1.5 Aktivitätsregulierte Translation

Die bisher beschriebenen molekularen Kaskaden führen entweder zu posttranslationalen Modifikationen oder zu verstärkter Transkription. Wie schon erwähnt, sind sowohl LTP als auch Langzeitgedächtnis aber ebenso von der Proteinsynthese abhängig. Das führt zu der Annahme, dass durch neuronale Aktivität auch Signaltransduktionswege angeschaltet werden, die in verstärkter Translation resultieren. Tatsächlich gibt es Hinweise auf solche Mechanismen, wie anhand der folgenden Beispiele erläutert werden soll.

Ein Protein, das in diesem Zusammenhang eine zentrale Rolle spielen könnte, ist mTOR. Diese Ser/Thr-Proteinkinase ist Bestandteil einer Signaltransduktionskaskade, die essentiell für die Ausbildung von L-LTP im Hippokampus ist (Tang et al., 2002; Cammalleri et al., 2003). Außerdem aktiviert sie durch die Phosphorylierung diverser Proteine die Translation. Die Substrate von mTOR, die an der Regulation der Translation beteiligt sind, sind die S6-Kinase S6K1 sowie die Translationsfaktoren 4E-BP1 und eIF-4E. Die Phosphatase PP2A, die 4E-BP1 und S6K1 dephosphorylieren kann und dadurch einen gegenteiligen Effekt hat, wird durch mTOR-Phosphorylierung inaktiviert (Jacinto und Hall, 2003). Einen ersten Hinweis zur Regulation der Aktivität der mTOR-Kinase liefern neuere Studien zu dem schon erwähnten IEG Rheb, einem aktivitätsregulierten Mitglied der Ras-Superfamilie, dessen Transkription durch NMDA-abhängige synaptische Potenzierung induziert wird (Yamagata et al., 1994). Wie kürzlich mehrfach beschrieben wurde, wird die Kinasefunktion von mTOR über Rheb aktiviert (Saucedo et al., 2003; Stocker et al., 2003; Patel et al., 2003; Tabancay et al., 2003). Diese durch ein IEG vermittelte Aktivierung von mTOR schafft eine Verknüpfung zwischen plastizitätsauslösenden Stimuli und der Kontrolle der Translation. Die mTOR-abhängige Proteinsynthese reguliert spezifisch die Translation der so genannten 5' TOP-mRNAs, die eine pyrimidinreiche Konsensussequenz an ihrem 5'-Ende tragen (Loreni et al., 2000).

Ein weiterer aktivitätsregulierter Prozess zur Translationsinduktion betrifft das Protein CPEB (Wells et al., 2001; Huang et al., 2002). Dieser von Joel Richter und Mitarbeitern ursprünglich in *Xenopus* Oozyten im Zusammenhang mit der embryonalen Entwicklung identifizierte Mechanismus beruht darauf, dass bestimmte mRNAs in einer Art „Ruhezustand“ im Zytoplasma vorliegen und erst nach Polyadenylierung des 3'-Endes translatiert werden (Stebbins-Boaz et al., 1999; Cao und Richter, 2002). Die Polyadenylierung wird durch Bindung von CPEB an das zytoplasmatische Polyadenylierungselement CPE innerhalb der 3'UTR der mRNAs reguliert (de Moor und Richter, 1999). Eine dieser so kontrollierten mRNAs ist zum Beispiel CaMKII α , die zwei CPEs in ihrer 3'UTR besitzt (Wu et al., 1998).

Im ruhenden Zustand bindet CPEB an CPE-enthaltende mRNAs und ist über das Protein Maskin an den Translationsinitiationsfaktor eIF4E gebunden, wodurch die für die Initiation der Translation essentielle Assoziation von eIF4G und eIF4E blockiert ist. Ein NMDA-Rezeptor vermitteltes Signal aktiviert die Aurora-Kinase, die CPEB phosphoryliert. Dies führt zur Rekrutierung und Bindung des Proteins CPSF und zur Dissoziation des Proteins Maskin. Dadurch wird zum einen die Poly(A)-Polymerase aktiviert und die mRNA polyadenyliert, zum anderen kann der Initiationsfaktor eIF4G nun an eIF4E binden und die Translation initiieren. Abgesehen von dieser Aktivierung durch Phosphorylierung wurde kürzlich ein völlig neuer Mechanismus zur Regulation der CPEB-kontrollierten Translation vorgeschlagen. Kandel und Mitarbeiter haben eine neuronale Isoform von CPEB in *Aplysia* identifiziert, die an der Aufrechterhaltung der Langzeitfaszilitierung beteiligt ist (Si et al., 2003a). Sie konnten zeigen, dass dieses Protein prionähnliche Eigenschaften hat und seine Fähigkeit, Translation zu aktivieren, in der Prionkonformation am größten ist (Si et al., 2003b). Auf Grund dieser Daten postulieren sie, dass eine durch Stimulierung der Synapsen induzierte Konformationsänderung von CPEB zu lang anhaltender Translationsaktivierung führen kann. Prione wurden bisher nur im Zusammenhang mit infektiösen neurodegenerativen Krankheiten wie BSE und Creutzfeldt-Jacob bekannt (Aguzzi und Polymenidou, 2004), eine Beteiligung an der Ausbildung synaptischer Plastizität stellt daher eine völlig neuartige, erstmals auch nicht pathologische Funktion dieser Proteine dar.

Auch der schon erwähnte Ras/MAPK-Weg beeinflusst die Translation, zum Beispiel über die Phosphorylierung der ribosomalen S6 Kinasen (RSK) (Frodin und Gammeltoft, 1999), seine genaue Funktion wird aber in der Diskussion noch näher beleuchtet werden (s. hierzu Kap. 3.6).

Die bisher beschriebenen molekularen Signalkaskaden zur Regulation der Proteinsynthese betreffen die *cap*-abhängige Translationsinitiation, bei der die mRNAs einen 7-Methyl-Guanosinrest (eine *Cap*-Struktur) am 5'-Ende tragen, der den ribosomalen Initiationskomplex rekrutiert. Neben dieser Art der Translationsinitiation gibt es noch eine *cap*-unabhängige, IRES-vermittelte Translation, bei der die Ribosomen direkt an bestimmte mRNA-Strukturen innerhalb der 5'UTR, die *internal ribosomal entry sites* (IRES), binden und so die Translation initiieren. Auch bei dieser Art der Translationsinitiation gibt es Hinweise auf eine besondere Regulation in Neuronen. So werden die IRES-enthaltenden Gene connexin-32 ausschließlich und N-myc verstärkt in neuronalen Zellen exprimiert (Hudder und Werner, 2000; Jopling und Willis, 2001). Darüber hinaus konnte in *Aplysia* sogar eine aktivitätsregulierte IRES-vermittelte Translation nachgewiesen werden, denn dort wechselt nach elektrischer

Stimulierung die Translation des *egg-laying hormone* (ELH) von einem *cap*-abhängigen zu einem IRES-vermittelten Mechanismus (Dyer et al., 2003).

All diese durch synaptische Reize regulierten Mechanismen zur Translationskontrolle zeichnet aus, dass sie nicht die allgemeine Proteinsynthese erhöhen, sondern nur die Translation ganz spezifischer mRNAs, die eine bestimmte Konsensussequenz tragen (5'TOP, CPE oder IRES). Dadurch könnte gewährleistet werden, dass durch neuronale Reize nur ein kleiner Teil der Proteine verstärkt synthetisiert wird, der dann spezifische Aufgaben in der Zelle übernehmen kann.

In den vorangehenden Kapiteln wurde die Weiterleitung eines Signals von der Synapse zum Zellkern beschrieben. Bei diesem Prozess wird beispielsweise eine durch die Bindung eines Liganden ausgelöste Veränderung der Ionendurchlässigkeit bestimmter Membranrezeptoren, die in erhöhten Kalziumpegeln innerhalb der Synapse resultieren, in eine verstärkte Transkription oder Translation umgewandelt. Ein sehr wichtiger Aspekt aktivitätsabhängiger Plastizität ist aber die Frage, auf welche Weise ein Ereignis wie Transkription oder Translation, das eigentlich im Zellkern beziehungsweise Zellkörper stattfindet, Auswirkung auf die Übertragungseffizienz an den weit entfernten Synapsen der dendritischen Verzweigungen haben kann. Die folgenden zwei wesentlichen Entdeckungen konnten Licht ins Dunkle dieses Phänomens bringen. Einen ersten mechanistischen Hinweis für die Übertragung des Signals aus dem Kern zu den Synapsen brachte die Entdeckung dendritisch lokalisierter mRNAs (Garner et al., 1988; Burgin et al., 1990). Durch den Transport des Transkripts in die Dendriten könnte eine im Kern entstandene Information zu den Synapsen gelangen. Der zweite Hinweis war die Identifizierung so genannter synapsenassoziierter Polyribosomenkomplexe (SPRCs, Steward und Levy, 1982), die eine lokale Translation von mRNAs an Synapsen möglich machen. Diese beiden Entdeckungen wurden in den folgenden Jahren durch weitere Studien belegt, so dass heute der dendritische Transport und die synapsenspezifische Translation bestimmter mRNAs als wesentliche Bestandteile der Ausbildung der synaptischen Plastizität diskutiert werden (Kuhl und Skehel, 1998; Steward und Schuman, 2001; Richter und Lorenz, 2002; Steward und Schuman, 2003).

1.6.1 Mechanismen des dendritischen mRNA-Transports

In den letzten Jahren sind einige dendritisch lokalisierte mRNAs identifiziert worden und zum Teil konnten auch schon Elemente, die für den Transport bedeutsam sind, isoliert werden. Dabei spielen bestimmte Sequenzmotive innerhalb der mRNA, so genannte *cis*-agierende Elemente, eine ebenso wichtige Rolle wie die daran bindenden Proteine, die *trans*-agierenden Faktoren. In einigen Fällen konnten den für den Transport wichtigen Proteinen direkt die spezifischen *cis*-agierenden Sequenzen auf mRNA-Seite zugeordnet werden. So ist zum Beispiel das Protein ZBP1 für die Lokalisierung seines Bindungspartners, der β -actin-mRNA, in Wachstumskegeln von Neuriten und in Dendriten verantwortlich (Zhang et al., 2001). Wird seine Expression über *Antisense*-Oligonukleotide unterdrückt, dann wird ebenfalls der dendritische Transport der β -actin-mRNA inhibiert (Eom et al., 2003). Als für den Transport verantwortliches *cis*-Element auf Seiten der mRNA konnte zunächst ein 54 Nukleotide umfassendes Sequenzmotiv, der *zip code*, innerhalb der 3'UTR identifiziert werden (Kislauskis et al., 1994). ZBP1, das entsprechende *trans*-Element wurde erst später isoliert (Ross et al., 1997). Ein anderes Beispiel ist die MBP-mRNA, die in die Ausläufer von Oligodendrozyten transportiert wird und ein 21-bp-Transportsignal in ihrer 3'UTR enthält, das so genannte A2RE-Sequenzmotiv (Ainger et al., 1993; Ainger et al., 1997; Munro et al., 1999). Die Bindung des Proteins hnRNP A2 an diese Sequenz ist essentiell für den Transport der mRNA in die Dendriten. Verhindert man die Interaktion durch Mutationen der mRNA oder Antikörperinjektion, ist auch der dendritische Transport gestört (Shan et al., 2003). Dieses *cis*-agierende Element ist in ähnlicher Form in diversen dendritisch lokalisierten mRNAs vorhanden, wie zum Beispiel in MAP2A, CaMKII α , Neurogranin, in der nicht translatierten BC1-mRNA, in der mRNA der GABA-Rezeptoruntereinheit α und auch in der Arg3.1-mRNA (Shan et al., 2003). Allerdings konnte die tatsächliche Bedeutung dieser Sequenz hinsichtlich des Transports für die meisten dieser mRNAs, einschließlich Arg3.1, noch nicht geklärt werden (Munro et al., 1999). Eine der früh entdeckten und am häufigsten untersuchten dendritischen mRNAs ist die CaMKII α -mRNA (Burgin et al., 1990; Benson et al., 1992). Die 3'UTR ist essentiell, aber auch ausreichend für die dendritische Lokalisierung dieser mRNA (Mayford et al., 1996; Rook et al., 2000). Das Protein GFP wird zum Beispiel dendritisch lokalisiert, wenn dessen cDNA an die 3'UTR von CaMKII α fusioniert wurde (Aakalu et al., 2001). Es konnten zwei bestimmte Sequenzabschnitte der 3'UTR isoliert werden, die für den Transport zuständig sind und mit den oben erwähnten A2REs überlappen (Mori et al., 2000; Shan et al., 2003). Mit Hilfe von transgenen Mäusen, bei denen die 3'UTR der CaMKII-mRNA deletiert worden war und die keine dendritische Lokalisierung des

CaMKII α -Transkripts mehr aufwiesen, wurde die Bedeutung des Transports der CaMKII α -mRNA in die Dendriten für die Formation von LTP und Langzeitgedächtnis gezeigt (Miller et al., 2002). Dies könnte ein erster Beweis für die essentielle Rolle sein, die die dendritische Lokalisation einer mRNA bei der Ausbildung von synaptischer Plastizität spielen kann. Eine andere dendritische RNA, die relativ früh entdeckt wurde, ist die nicht translatierte RNA BC1 und ihr humanes Homolog BC200 (Tiedge et al., 1991; Tiedge et al., 1993). Diese überwiegend im Gehirn exprimierten RNAs sind Polymerase-III-Transkripte, deren Funktion noch weitgehend unbekannt ist. Möglicherweise spielen sie eine Rolle bei der Translationsregulation (Wang et al., 2002b; Zalfa et al., 2003). BC1 RNA liegt in den Dendriten in Form von so genannten Ribonukleoproteinpartikeln (RNPs) vor (Tiedge et al., 1991; Cheng et al., 1996). Es konnte gezeigt werden, dass diese RNPs das mikrotubulibindende Protein TB-RBP (auch bekannt unter dem Namen Translin) enthalten (Muramatsu et al., 1998). Dieses Protein bindet ein in der 3'UTR bestimmter mRNAs liegendes Y-Element und führt so zur Assoziation der mRNAs mit dem Zytoskelett (Han et al., 1995a; Han et al., 1995b). Bei Blockade der Proteinsynthese von TB-RBP in hippokampalen Neuronen mittels *Antisense*-Oligonukleotiden wird der dendritische Transport bestimmter mRNAs, wie zum Beispiel der CaMKII α - und der Ligatin-mRNA, die Bestandteil der TB-RBP enthaltenden RNPs sind, gestört (Severt et al., 1999). RNAs liegen häufig in Form solcher Ribonukleopartikel vor. Diese spielen eine wichtige Rolle beim Transport von RNA und Proteinen innerhalb der Zelle. In Dendriten von Neuronen sind RNPs erstmals im Zusammenhang mit der RNA BC1 beschrieben worden (Tiedge et al., 1991). Ihr Transport ist ein ATP-abhängiger Prozess (Davis et al., 1987), der eine Geschwindigkeit von 10-400 $\mu\text{m}/\text{h}$ erreicht und wahrscheinlich Kinesin- und Dynein-Motorproteine involviert (Severt et al., 1999). Proteine, die in diesen Ribonukleokomplexen vorliegen, sind häufig essentiell für den Transport der RNAs. Das Protein Staufeu zum Beispiel ist in solchen hochmolekularen RNPs lokalisiert und gilt daher als eine wichtige Komponente für den mRNA-Transport. Staufeu wurde zunächst in der Fruchtfliege *Drosophila* als notwendiger Faktor für den Transport der *prospero*-mRNA in Neuroblasten identifiziert (St. Johnston et al., 1991; Li et al., 1997). Auch in diesem Organismus werden RNA und Proteine über Ribonukleoproteinpartikel transportiert (Ferrandon et al., 1994). Michael Kiebler und seine Mitarbeiter konnten Staufeu-enthaltende RNPs aus dem Gehirn der Ratte isolieren und nachweisen, dass sich diese in denselben Gelfiltrationsfraktionen wie das Motorprotein Kinesin anreichern (Mallardo et al., 2003). Eine Rolle des Proteins Staufeu beim aktiven mRNA-Transport wird durch diese Experimente zunehmend wahrscheinlicher. Eine ähnliche Funktion wird mittlerweile auch dem schon

erwähnten FMRP zugesprochen. Das mRNA-bindende Protein FMRP und sein Transkript *fmr1* wandern ebenfalls in Form von RNPs entlang der Dendriten (Ceman et al., 1999) und es gibt Hinweise, dass Staufen und FMRP in den gleichen Partikeln vorliegen (Ohashi et al., 2002). Kürzlich konnte gezeigt werden, dass der Transport FMRP-enthaltender Ribonukleoproteinpartikel abhängig von synaptischer Aktivität ist und durch die Stimulation metabotroper Glutamatrezeptoren verstärkt wird (Antar et al., 2004). Obwohl diese Beispiele einige Hinweise auf die Mechanismen und die beteiligten Komponenten des dendritischen Transports von mRNAs in Neuronen geben, bleiben noch wesentliche Fragen offen. Der Transport der Arg3.1-mRNA zum Beispiel ist noch völlig ungeklärt. Wie schon erwähnt, nimmt Arg3.1 eine besondere Rolle unter den dendritisch lokalisierten mRNAs ein, da seine mRNA erst nach synaptischer Aktivität bis in die distalen Bereiche aktivierter Neuronen transportiert wird (Link et al., 1995; Lyford et al., 1995). Weitere Studien konnten sogar zeigen, dass die Arg3.1-mRNA selektiv nur zu aktivierten Synapsen transportiert wird, während inaktive Bereiche des Dendriten ausgespart bleiben (Steward et al., 1998). Die Aufklärung solcher aktivitätsregulierten Transportmechanismen wird vermutlich einen wesentlichen Beitrag zum Verständnis der plastizitätsinduzierten Vorgänge an Synapsen leisten.

1.6.2 Mechanismen der lokalen Translation dendritischer mRNAs

Die dendritische Lokalisation von mRNA ist ein Prozess, der einen hohen Energieaufwand für Neuronen mit sich bringt. Dieser Verbrauch an Energie könnte aber von großem Nutzen sein, da er unter anderem eine lokale Translation der entsprechenden Proteine ermöglicht und damit ein geeignetes Mittel für synapsenspezifische Modifikationen darstellen könnte. Die große Zahl an Synapsen einer Nervenzelle deutet auf deren Fähigkeit hin, viele verschiedene Informationen auf einmal zu speichern. Die in elektrophysiologischen Studien beobachtete Eingangsspezifität war ein erster Hinweis für die Richtigkeit dieser Annahme. Die Verstärkung der synaptischer Effizienz einer bestimmten Gruppe von Afferenten, die auf eine postsynaptische Zelle projiziert, führt nicht zur verstärkten synaptischen Effizienz einer räumlich getrennten Gruppe von Afferenten, die auf die gleiche postsynaptische Zelle projiziert (Steward und Schuman, 2001). Ein Beispiel hierfür ist die laminaspezifische Stimulierung der Molekularschicht des *Gyrus dentatus* (Steward, 1976), die auch zur selektiven Lokalisation von Arg3.1-mRNA und Protein an den aktivierten Synapsen führt (Steward et al., 1998; Plath et al., 2003). In den letzten Jahren hat sich die Theorie eines synaptischen Markers oder auch „tags“ etabliert, der bestimmte, aktivierte Synapsen einer

Zelle für weitere Modifikationen markiert (Martin et al., 1997; Frey und Morris, 1997). Eine wichtige Rolle bei dieser synaptischen Markierung (*synaptic tagging*) spielt vermutlich die lokale, synapsenspezifische Translation (Martin und Kosik, 2002). Schon sehr früh konnten Komponenten des Translationsapparates, zum Beispiel Ribosomen und die für posttranslationale Modifikationen notwendigen Organellen wie endoplasmatisches Retikulum und der Golgi-Apparat in Dendriten nachgewiesen werden (Palay, 1956). Die Weiterentwicklung licht- und elektronenmikroskopischer Techniken bestätigte die Lokalisation dieser Zellbestandteile in den dendritischen Kompartimenten der Neuronen (Steward et al., 1996; Gardiol et al., 1999). Fluoreszenzmikroskopische Studien konnten zeigen, dass die dendritische Translation in so genannten „*hot spots*“, also räumlich abgegrenzt und nicht gleichmäßig verteilt, in der Nähe von Synapsen stattfindet (Aakalu et al., 2001; Job und Eberwine, 2001). Mit Hilfe biochemischer Aufreinigungen synaptischer Fraktionen und mechanischer Isolierung einzelner Dendriten konnte deren Fähigkeit zur Proteinsynthese unabhängig vom Zellkörper gezeigt werden (Martin et al., 2000; Steward und Schuman, 2001; Job und Eberwine, 2001). Crino und Kollegen zum Beispiel trennten Dendriten von isolierten hippocampalen Neuronen ab und transfizierten sie mit myc-CREB-mRNA. Immunocytochemische Färbungen mit myc-Antikörpern demonstrierten die dendritische Synthese des Proteins (Crino et al., 1998). Bagni und Kollegen konnten die Translation des CaMKII α -Proteins in durch differentielle Zentrifugation isolierten Synaptosomen nachweisen (Bagni et al., 2000). Die Analyse der schon erwähnten transgenen Mäuse, denen die 3'UTR der CaMKII α -mRNA fehlt, wies darauf hin, dass die 3'UTR nicht nur für die dendritische Lokalisation der CaMKII α -mRNA zuständig ist, sondern auch deren Translation in dieser Region vermittelt (Mayford et al., 1996). Weitere Studien geben Anlass zu der Annahme, dass die Translation an Synapsen offensichtlich aktivitätsabhängig ist, da pharmakologische Aktivierung metabotroper Glutamatrezeptoren (Job und Eberwine, 2001), pharmakologische und elektrophysiologische Aktivierung von NMDA-Rezeptoren (Ouyang et al., 1999; Scheetz et al., 2000) und Stimulation mittels BDNF (Bagni et al., 2000; Aakalu et al., 2001) zu verstärkter synaptischer Translation führen. Im vorherigen Abschnitt sind einige Mechanismen zur aktivitätsregulierten Translation beschrieben worden, deren Komponenten auch in Dendriten und an Synapsen isoliert werden konnten. Zum Beispiel wurden in biochemischen Fraktionierungen Komponenten des mTOR-Weges, nämlich das Protein mTOR und sein Substrat 4E-BP, in der postsynaptischen Dichte nachgewiesen (Asaki et al., 2003). Ebenso gibt es Hinweise, dass der CPEB-regulierte Weg über Polyadenylierung auch lokal an Synapsen stattfindet. Die CaMKII α -mRNA, deren Translation NMDA-Rezeptor-

abhängig ist und von CPEB reguliert wird, wird beispielsweise in isolierten Synaptosomen polyadenyliert (Huang et al., 2002). Neben der *cap*-vermittelten Translation gibt es auch Hinweise auf IRES-abhängige Translation in Dendriten. So wurden insgesamt fünf dendritisch lokalisierte mRNAs identifiziert, die eine IRES-Sequenz innerhalb ihrer 5'UTR tragen, nämlich Arg3.1, CaMKII α , Dendrin, Neurogranin und MAP2A. Es konnte gezeigt werden, dass diese mRNAs über beide Mechanismen translatiert werden (Pinkstaff et al., 2001).

Die spezifische Synthese bestimmter Proteine nur an aktivierten Synapsen impliziert, dass die Translation ihrer mRNAs streng kontrolliert wird. Auf ihrem Weg entlang des Dendriten und solange die Synapsen keinen Reiz erfahren, darf das Protein nicht synthetisiert werden. Daher liegt die Vermutung nahe, dass es neben Mechanismen, die die Translation anschalten, auch Faktoren gibt, die inhibierend wirken. Über solche negativen Translationsregulatoren ist noch relativ wenig bekannt. Ein möglicher Faktor ist das schon erwähnte RNA-bindende Protein FMRP, das *in vitro* die Translation hemmt (Laggerbauer et al., 2001) und in Form von Ribonukleoproteinpartikeln entlang der Dendriten wandert (Ohashi et al., 2002). *In vitro* Studien weisen daraufhin, dass die Translation von Arg3.1 ebenfalls durch FMRP inhibiert werden könnte (Zalfa et al., 2003). Abgesehen davon gibt es Untersuchungen, die besagen, dass die Proteinsynthese von Arg3.1 in Synaptoneurosomen durch BDNF (Bagni et al., 2000) und Reelin (Dong et al., 2003) induziert wird. Ansonsten ist über die Translationsregulation, ähnlich wie über den Transport der Arg3.1-mRNA noch relativ wenig bekannt.

1.7 Das Arg3.1-mRNA-bindende Zinkfingerprotein Zinki

RNA-bindende Proteine können einen wesentlichen Beitrag zur Regulation von mRNAs leisten. Da die Induktion und die Lokalisation der Arg3.1-mRNA und des Arg3.1-Proteins von synaptischer Aktivität abhängen und daher streng kontrolliert werden müssen, könnte die Isolierung und vor allem funktionelle Charakterisierung von Proteinen, die an die Arg3.1-mRNA binden, ein erster Schritt zur Klärung der molekularen Mechanismen Arg3.1-involvierender synaptischer Plastizität sein. Eine in der Handhabung einfache Methode zur Identifikation und Klonierung RNA-bindender Proteine wurde in unserem Labor entwickelt, das Hefe Tri-Hybrid-System (Putz et al., 1996). Das Tri-Hybrid-System beruht auf den gleichen Prinzipien wie das Zwei-Hybrid-System zur Detektion von Proteininteraktionen (Fields und Song, 1989). Dieses basiert auf der Aktivierung spezieller Reportergene (His3 und LacZ) durch den Transkriptionsfaktor GAL4, der in Form zweier voneinander

unabhängiger Fusionsproteine aus der DNA-Bindungsdomäne bzw. der Aktivierungsdomäne in Hefen transformiert wird. Werden die GAL4-DNA-Bindungsdomäne und -DNA-Aktivierungsdomäne durch Interaktion der Fusionsproteine in räumliche Nähe zueinander gebracht, entsteht ein funktioneller Transkriptionsfaktor und die Expression der Reportergene kann detektiert werden. Auf diese Weise können Proteininteraktionspartner identifiziert werden. Im Tri-Hybrid-System macht man sich außerdem die Bindung zwischen dem HIV-RevM10-Protein und der RRE-mRNA zunutze. Zusätzlich zu den beiden Fusionsproteinen, die zum einen aus der GAL4-DNA-Bindungsdomäne und dem Protein RevM10, zum anderen aus der GAL4-DNA-Aktivierungsdomäne und einem putativen RNA-Bindungsprotein bestehen, gibt es noch ein RNA-Hybrid, das sich aus der RRE-RNA und der zu untersuchenden RNA zusammensetzt und von der Polymerase II transkribiert wird. Nur wenn alle drei Komponenten miteinander interagieren, werden die Reportergene abgelesen. Da RevM10 und RRE auch unter den Bedingungen des Hefesystems miteinander interagieren, hängt die Aktivierung der Reportergene also ausschließlich von der Bindung zwischen der zu untersuchenden RNA und dem putativen RNA-Bindungsprotein ab (Abb. 1.3).

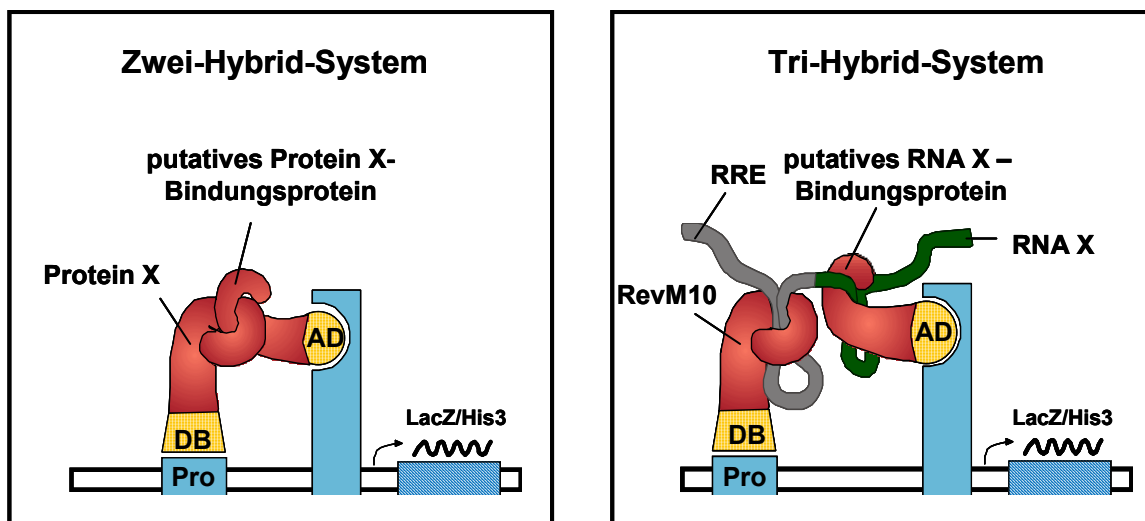


Abb.1.3: Schematische Darstellung des Zwei- und Tri-Hybrid-Systems

Die Abbildung zeigt eine schematische Übersicht über die Funktionsweise des Hefe Zwei- bzw. Tri-Hybrid-Systems. **Zwei-Hybrid-System:** Das erste Hybridprotein besteht aus der GAL4-DNA-Bindungsdomäne (DB) und dem Protein X, das zweite aus der GAL4-Aktivierungsdomäne (AD) und einem putativen Protein X-Bindungsprotein. Bei Interaktion der beiden Hybride miteinander entsteht ein vollständiger Transkriptionsfaktor, der an den GAL4-Promotor (*Pro*) bindet und die Expression der Reportergene LacZ und His3 aktiviert. **Tri-Hybrid-System:** Das erste Hybridprotein setzt sich zusammen aus der GAL4-DNA-Bindungsdomäne (DB) und dem Protein RevM10, das RNA-Hybrid besteht aus der RevM10-bindenden RNA RRE und einer RNA X und das zweite Hybridprotein besteht aus der GAL4-Aktivierungsdomäne (AD) und einem putativen RNA X-Bindungsprotein. Nach Bindung aller drei Hybride entsteht wie beim Zwei-Hybrid-System der funktionelle GAL4-Transkriptionsfaktor, der die Expression der Reportergene LacZ und His3 aktiviert. (modifiziert nach Putz et al., 1996)

Ulrich Putz hat während seiner Diplom- und Doktorarbeit im Labor von Dietmar Kuhl das Tri-Hybrid-System entwickelt und dazu verwendet, mit dem vollständigen Arg3.1-Transkript eine hippokampale cDNA-Bank, die aus pentylentetrazolinduzierten Ratten isoliert worden war, zu durchmustern. Dabei hat er das bis zu diesem Zeitpunkt unbekannte Zinkfingerprotein Zinki isoliert, das spezifisch an die Arg3.1- und CamKII α -mRNA bindet, nicht aber an andere dendritische mRNAs wie BC1 und MAP2B, beziehungsweise an die Kontroll-mRNAs RRE und GAPDH (Putz, 1999). Als Minimalbindungssequenz auf Seiten von Arg3.1 konnten die Nukleotide 1000 bis 3018 identifiziert werden, die für die 130 C-terminalen Aminosäuren des Proteins codieren und die gesamte 3'UTR beinhalten. Ulrich Putz konnte insgesamt sechs Spleißvarianten von Zinki isolieren, die sich alle innerhalb ihrer 5'UTR unterscheiden. Die längste Isoform besitzt 3215 Nukleotide mit einem sehr großen 5'-untranslatierten Bereich (1-1597). Das Protein besteht aus einer trunkierten KRAB-A-Domäne und vierzehn Zinkfingern, wobei die mRNA-Bindung über die zwölf C-terminalen Zinkfinger vermittelt wird. Es hat eine Molekularmasse von ca. 54 kDa und seine Expression im Rattengehirn ist konstitutiv. Die Lokalisierung von Zinki im Kortex und Hippokampus ist somatodendritisch. Außer im Gehirn kann seine mRNA lediglich in Testes identifiziert werden. In hippokampalen Primärkulturen ist die Lokalisation von Zinki ebenfalls somatodendritisch und es konnte keine Kollokalisierung mit dem präsynaptischen Marker Synaptophysin festgestellt werden. Western-Blot-Analysen von Gehirnllysaten der Maus mit Zinki-spezifischem Antiserum zeigten eine deutliche Bande bei 54 kD, die der im Rattengehirnllysate detektierten Bande entsprach und darauf schließen ließ, dass ein Homolog von Zinki auch in der Maus existiert. Die Bindung zwischen Zinki und der Arg3.1-mRNA konnte *in vitro* in einem North Western Blot bestätigt werden. Bei dieser Methode wurde rekombinant exprimiertes Zinki-Protein über SDS-PAGE aufgetrennt, auf eine Nitrocellulose-Membran geblottet und mit radioaktiv markierter Arg3.1-mRNA inkubiert. Die Protein-RNA-Komplexe wurden dann autoradiographisch detektiert. Die Spezifität der Bindung wurde dadurch bestätigt, dass sie lediglich durch Inkubation mit nicht radioaktiv markierter Arg3.1-mRNA kompetitiert werden konnte, nicht aber durch tRNA oder DNA. Abgesehen von diesen ersten Experimenten zur mRNA-Bindung und Expression von Zinki wurden in unserem Labor bisher nur wenig weiterführende Analysen durchgeführt, so dass über die genauere physiologische Bedeutung und Funktion der Bindung von Zinki an die Arg3.1-mRNA bisher noch nichts bekannt ist.

1.8 Zielsetzung der Arbeit

Arg3.1 ist ein aktivitätsreguliertes Gen, das eine elementare Rolle bei der Ausbildung lang anhaltender plastizitätsproduzierender Modifikationen an Synapsen des zentralen Nervensystems spielt. Die Arg3.1-mRNA wird durch neuronale Aktivität induziert und bis in die distalen Bereiche der Dendriten transportiert, wo sie ebenso wie das Arg3.1-Protein spezifisch an aktivierten Synapsen akkumuliert. Die Prozesse wie der dendritische Transport der Arg3.1-mRNA und die Regulation seiner Translation, die diesen einzigartigen Eigenschaften zugrunde liegen, sind noch weitgehend unerforscht. Die Identifizierung und Klonierung des Arg3.1-mRNA-bindenden Zinkfingerproteins Zinki war ein erster und wichtiger Ansatzpunkt zur Aufklärung dieser Mechanismen. In einem nächsten Schritt ist es nun notwendig, die Funktion dieser Protein-mRNA-Bindung vor allem hinsichtlich seiner Bedeutung für die Ausbildung synaptischer Plastizität näher zu untersuchen. Ziel dieser Arbeit war daher die funktionelle Analyse des Arg3.1-mRNA-bindenden Proteins Zinki. Diese Analyse sollte im Wesentlichen zwei Themengebiete beinhalten, nämlich erstens die funktionelle Charakterisierung der Bindung von Zinki an die Arg3.1-mRNA und zweitens die Identifikation putativer Proteinbindungspartner von Zinki.

Im ersten Teil der Arbeit sollte das Zinki-Protein hinsichtlich der Eigenschaften und Funktionen seiner Arg3.1-mRNA-Bindung genauer analysiert werden. Dazu sollte zunächst die mRNA-Bindungsdomäne von Zinki mit Hilfe des Tri-Hybrid-Systems näher bestimmt und die für die Interaktion essentiellen Zinkfinger isoliert werden. Durch die Charakterisierung der Minimalbindungsdomäne erhoffte man sich Aufschluss über die unterschiedlichen Eigenschaften der vierzehn Zinkfinger von Zinki. Außerdem sollte die Interaktion in einem weiteren, vom Tri-Hybrid-System unabhängigen Assay bestätigt werden. In einem nächsten Schritt sollte eine mögliche funktionelle Bedeutung der Bindung zwischen dem Zinki-Protein und der Arg3.1-mRNA untersucht werden. Anhand eines *in vitro* Systems sollte daher der Einfluss Zinkis auf die Translation von Arg3.1 überprüft werden. Um die funktionelle Rolle Zinkis *in vivo* beurteilen zu können, sollte seine Expression und subzelluläre Verteilung in der Maus, auch nach Induktion synaptischer Aktivität, mittels immunohistochemischer Färbungen auf Gehirndünnschnitten und biochemischer Fraktionierungen von Gehirnlisaten dokumentiert werden.

Im zweiten Teil dieser Arbeit sollten Proteininteraktionspartner von Zinki mit Hilfe des Hefe Zwei-Hybrid-Systems identifiziert und weiter analysiert werden. Zunächst sollten die auf diese Weise gefundenen Zinki-Bindungsproteine in unabhängigen *in vitro* und *in vivo* Assays

bestätigt und die Minimalbindungsdomänen mit Hilfe des Zwei-Hybrid-Systems näher bestimmt werden. Außerdem sollte anhand immunohistochemischer Färbungen von Gehirndünnschnitten und biochemischen Zellfraktionierungen die subzelluläre Verteilung der Interaktionspartner mit der von Zinki verglichen werden. Daran anschließend sollte, wenn dies möglich war, die funktionelle Bedeutung der Proteininteraktion in weiteren Experimenten aufgeklärt werden.

Die Charakterisierung des Arg3.1-mRNA-bindenden Proteins Zinki könnte zur Aufklärung der Mechanismen beitragen, die zur aktivitätsabhängigen Regulation der Arg3.1-mRNA führen. So könnte die Analyse der subzellulären Verteilung von Zinki, seiner funktionellen Bedeutung und seiner Einbindung in Proteinkomplexe Aufschluss hinsichtlich des gerichteten Transports und der regulierten Translation der Arg3.1-mRNA geben.