

## 1. Einleitung

Unter Lernen wird im allgemeinen ein Vorgang verstanden, durch den ein Mensch oder ein Tier aufgrund von Erfahrungswerten oder Erkenntnissen über die Umwelt, sein Verhalten verändert. Unter Gedächtnis wird die Fähigkeit bezeichnet, diese Informationen zu speichern, beziehungsweise bewußt wieder abrufen zu können. Es wird dabei zwischen Kurzzeit- und Langzeitgedächtnis unterschieden. Das Kurzzeitgedächtnis bezieht sich lediglich auf Lerneffekte, die nur für eine verhältnismäßig kurze Zeit, also im Bereich von Minuten bis Stunden, vorhanden sind, während unter Langzeitgedächtnis jene Informationen zusammengefaßt werden, die auch nach Jahren bewahrt und wieder abgerufen werden können. Es existieren im Gehirn eine Vielzahl verschiedener anatomisch und neurophysiologisch differenzierter, eigenständiger Signalkreisläufe die Lerneffekte induzieren und verarbeiten können (Dickinson, 1980; Hilgard et. al. 1975; Mackintosh, 1983). Grundsätzlich wird das Gedächtnis in zwei Kategorien eingeteilt: Explizites bzw. deklaratives Gedächtnis, in dem das Erinnerungsvermögen für bekannte Personen, Orte und Dinge abgelegt wird. Implizites bzw. nichtdeklaratives Gedächtnis ist die andere Kategorie. Hier findet u.a. der unbewußte Rückgriff auf motorische Fertigkeiten und Geschicke statt. Des weiteren werden dort einfache assoziative Formen des Lernens, wie klassische Konditionierung und nichtassoziative Formen des Lernens, wie Sensibilisierung und Habituation abgespeichert. Beiden Formen des Gedächtnisses scheinen unterschiedliche neuronale Kreisläufe im Gehirn zugrunde zu liegen. Obwohl alle Regionen anatomisch differenziert sind, herrscht in der Literatur Übereinstimmung, dass bei allen ablaufenden Lernprozessen die zugrundeliegenden neuronalen Mechanismen auf funktionell ähnlichen Änderungen synaptischer Plastizität beruhen. Die molekularen und zellulären Mechanismen, die den Lernvorgängen zugrunde liegen, sind bis heute erst ansatzweise untersucht worden. Seit Pavlov (1927) seine ersten Untersuchungsergebnisse vorstellte, und daraus die Theorie über eine integrative Fähigkeit des Gehirns ableitete, ist diese Theorie in den letzten Jahrzehnten durch intensive Forschungsbemühungen und Erkenntnisse weiterentwickelt worden. Durch neue Untersuchungsergebnisse hat sich aus diesem Ansatz die Konnektivitätstheorie entwickelt. Sie hat sich als tragfähigste Grundvorstellung erwiesen, nach der alle funktionellen Äusserungen der Hirntätigkeit auf charakteristische Verbindungen von Nervenzellpopulatio

nen und den sich daraus ergebenden räumlich/-zeitlichen Erregungsmustern von Erregungsbahnen zurückzuführen sind. Das Einspeichern von Informationen in ein neuronales Netzwerk kann, im Sinne der Netzwerktheorie, als das Anlegen eines Aktivitätsvektors in einem  $n$ -dimensionalen Beziehungsraum verstanden werden. Verhalten und funktionelle neuronale Strukturen korrespondieren durch die Anzahl und Charakteristika der einzelnen Elemente, als auch durch deren Potenz Verbindungen und Beziehungen untereinander zu verändern. In diesem Modell sind Veränderungen funktioneller Strukturen die Basis für Verhaltensänderungen. Jede Verhaltensveränderung und jeder Lernprozeß wird vor diesem Hintergrund als funktionsabhängige Änderung der neuronalen Konnektivität definiert. Die Änderung synaptischer Eigenschaften von Neuronen beruht dabei auf die vermutlich universelle Eigenschaft von Nervenzellen, der synaptischen Plastizität, wodurch eine dauernde Veränderung der Erregungsleitung ermöglicht wird. Unter neuronaler Plastizität wird jede Funktionsänderung einer Nervenzelle verstanden, welche die Prozesse der primären Erregungsbildung überdauert, und damit die Grundlagen für eine dauerhafte, zumindest über einen längeren Zeitraum anhaltende Informationsspeicherung bietet (Dudai 1989, Kandel 1989; Kandel et.al 1982).

### 1.1 Das Modell der posttetanischen Langzeitpotenzierung (LTP)

Die posttetanische Langzeitpotenzierung ist das erste experimentelle Modell für Lernen und Gedächtnis im Wirbeltiergehirn. Neben einer Vielzahl anderer Charakteristika synaptischer Transmission ist die Langzeitpotenzierung, die zuerst von Lomo und Bliss (1973) im Hippocampus entdeckt und dokumentiert wurde, ein wichtiges physiologisches Substrat für Erinnerungsbildung im Zentralnervensystem (Andersen und Hvalby 1986, Squire 1986, Teyler und DiScenna 1984). Dabei wird Langzeitpotenzierung als eine funktionell- / plastische Veränderung im Mechanismus der synaptischen Transmission definiert, welche zu langanhaltenden Veränderungen in der Wirksamkeit synaptischer Übertragung führt (Bliss und Lomo 1973, Collinridge und Bliss 1995, Teyler und DiScenna 1984). Die posttetanische Langzeitpotenzierung stellt eine stabile und relativ langanhaltende postsynaptische Steigerung synaptischen Antwortverhaltens nach tetanischer Stimulation afferenter präsynaptischer Fasern dar. Die Intensität und Dauer

der ausgelösten Langzeitpotenzierung hängt dabei sowohl von der Intensität und Dauer der Einzelimpulse des tetanischen Reizes, als auch von seiner Frequenz ab. Langzeitpotenzierung unterscheidet sich durch seine Persistenz über einen längeren Zeitraum deutlich von anderen funktionellen Veränderungen synaptischer Transmission. Bei der Langzeitpotenzierung wird das postsynaptische Neuron durch wiederholte Stimulationen präsynaptischer Neurone für eine anschließende Reizung empfindlicher. Diese Empfindlichkeitssteigerung kann über mehrere Stunden bis zu einigen Tagen beobachtet werden. Seit der Erstbeschreibung des Modells der LTP im Hippocampus durch Lomo und Bliss (1973), konnte es zwischenzeitlich auch in anderen Hirnstrukturen nachgewiesen werden und ist heute als weit verbreitetes Funktionsprinzip anerkannt (Alger und Teyler 1976, Kuba und Kumamoto 1990, Shibuki und Okada 1992, Tsumoto 1992). Neben der Existenz von LTP im Hippocampus, konnte diese Funktionsänderung synaptischer Übertragung auch in peripheren Synapsen außerhalb des ZNS festgestellt werden. Bis zum heutigen Tag sind die Mechanismen der Langzeitpotenzierung nicht vollständig aufgeklärt. Die bisherigen Untersuchungsergebnisse geben deutliche Hinweise darauf, dass es sich bei LTP um keinen einheitlichen Prozeß handelt. Vielmehr lassen sie die Hypothese zu, dass die der Langzeitpotenzierung zugrundeliegenden Mechanismen durch assoziative (Barrionuevo und Brown 1983, Bliss und Lynch 1988), eingangsspezifische (Andersen et al. 1977, Bliss und Collinridge 1993) und kooperative (Levy und Steward 1979, McNaughton et al. 1978, Teyler und DiScenna 1984) Eigenschaften charakterisiert werden können. Durch Untersuchungen, die sich neben den elektrophysiologischen Veränderungen bei LTP auch mit der Aufklärung der zugrundeliegenden zellulären Mechanismen auseinandersetzen, konnte eine Differenzierung in eine Auslösungs- und eine Aufrechterhaltungsphase vorgenommen werden. Matthies (1989) und Reymann et al. (1988) entwickelten ein Modell, wonach LTP durch drei Phasen mit unterschiedlichen Mechanismen charakterisiert werden kann. Diesem Modell zufolge wird LTP in eine Phase der Kurzzeitpotenzierung (STP), die nicht länger als 1 h anhält, eine Intermediärphase, die über einen Zeitraum von 3-6 h, und eine länger anhaltende Potenzierung (LTP), welche für einen längeren Zeitraum, >6 h anhält, eingeteilt. Die zellulären Vorgänge in den einzelnen Phasen sind bis zum heutigen Tage nicht vollständig untersucht. Erwiesen ist es, dass in der Initialisierungsphase zunächst eine präsynaptisch vermittelte Depolarisierung der postsynaptischen Zelle eintritt und die Aktivierung

ihrer NMDA-Rezeptoren durch das während der Tetanisierung freigesetzte Glutamat erfolgt (Watkins und Evans 1981, Collinridge et al.1983 a, b, Harris et al.1984). Die Tatsache, dass aufgrund der elektrischen Stimulation eine Depolarisation der postsynaptischen Membran eintritt, ist eine Voraussetzung dafür, dass LTP in der CA1- Region induziert wird. Hierdurch wird im zum NMDA-Rezeptor gehörenden Ionenkanal zunächst Magnesium aus der Bindung freigesetzt. Zugleich öffnet sich der Kanal durch die Aktivierung des NMDA-Rezeptors und es dringt Calcium in das Neuron ein. Der komplexe NMDA-Rezeptor-Ionenkanal stellt damit einen Koinzidenzdetektor dar, der nur aktiviert ist, wenn zwei Ereignisse, in enger zeitlicher und räumlicher Kumulation auftreten, die Depolarisierung der Membran und die Aktivierung des NMDA-Rezeptors durch Glutamat (Bliss und Collinridge 1993, Herron et al.1986, Wigström und Gustafsson 1984, Wigström et al. 1986). Durch den Calciumioneneinstrom wird die Potenzierung des exzitatorischen postsynaptischen Potentials herbeigeführt (Dunwiddie und Lynch 1978, Feasey et al.1986, Frank und Greenberg 1994, Silva et al.1992, Wu et al.1995). Über die sich anschließenden Mechanismen, die letztendlich zu den synaptischen Aktivitätssteigerungen führen, bestehen eine Vielzahl verschiedener Theorien. Einige Autoren ziehen eine vermehrte Transmitterfreisetzung (Dolphin et al.1982, Ito et al.1991, Lynch et al.1985), Aktivierung von Proteinkinasen (Akers et al. 1986, Greengard et al.1991, Lovinger et al.1987, Malinow et al.1989, Reymann et al. 1988), die Veränderung synaptischer Strukturen (Agnihotri et al.1998, Applegate et al.1987, Desmond et al.1986a.b, Fifkova und van Harrefeld 1977), Veränderungen der Eigenschaften von Synapsen (Meshul und Hopkins 1990) bzw. Rezeptoren (Baudry et al.1980, Davies et al.1989, Lynch und Baudry 1984) in Betracht. Einige Autoren vertreten die Auffassung, dass die Veränderungen während der Langzeitpotenzierung auf Veränderungen des präsynaptischen Bereichs basieren. Wiederum andere Autoren vermuten Veränderungen im postsynaptischen Neuron, während eine dritte Gruppe Veränderungen im prä- und postsynaptischen Neuron verantwortlich macht (Bliss und Lynch 1988, Bliss und Collinridge 1993, Errington et al.1987, Kauer et al.1988, Manabe und Nicoll 1994, Stevens und Wang 1994). Andere Autoren favorisieren die Wirkung retrograder Botenstoffe (Bliss und Collinridge 1993, Fazelli 1992, Williams und Johnston 1989). Daraus kann der Schluß gezogen werden, dass es sich bei LTP um einen komplizierten, multifaktoriellen Prozeß handelt, bei dem zahlreiche prä- und postsynaptische Mechanismen zu-

sammenwirken. Übereinstimmung besteht hingegen darüber, dass die erste Phase im Verlauf der LTP im wesentlichen durch die Aktivierung existierender Proteine aufrechterhalten wird. Raymond et al. 1993 vermuten, dass die frühe Phase der LTP über die Aktivität von PKA vermittelt wird. Dabei soll PKA die Phosphorylierung existierender Proteine in den Synapsen, als auch von Ionenkanälen bewirken. Greengard et al. 1993 halten die Aktivierung von synaptischen Vesikelproteinen für bedeutsam. Zusätzlich werden Fucosylationen und Isoprenylationsvorgängen eine große Bedeutung eingeräumt (Bailey et al.1996, Matthies et al.1997b). Die Tatsache, dass LTP in *in vivo* Experimenten über mehrere Tage beobachtet werden konnte, führte zu der allgemeinen Feststellung, dass die Erscheinung LTP nicht alleine auf Modifikationen existierender Proteine beruhen kann. Nur durch die Induktion der zellulären Proteinsynthese ist die Langzeitpersistenz des erhöhten neuronalen Aktivitätsstatus erklärlich (Davis und Squire 1984, Krug et al .1984, Montarolo et al.1986). Die Bedeutung der Proteinsynthese für die Konsolidierung von LTP konnte auch durch eine Vielzahl weiterer Untersuchungen mit verschiedenen Proteinsyntheseinhibitoren z.B. Cycloheximide (Stanton und Sarvey 1984) untermauert werden, bei denen die Spätphase der LTP sowohl *in vitro* als auch *in vivo* durch den Einsatz spezifischer Inhibitoren unterbunden werden konnte (Frey et al.1988, Krug et al. 1984, Otani und Ben-Ari 1993, Stanton und Sarvey 1984). Die *de novo* Synthese von Proteinen ist eine existenzielle Voraussetzung für die Aufrechterhaltung der Langzeitpotenzierung (Castelucci et al.1989, Crow und Forrester 1990, Flexner und Flexner 1966, Montarolo et al.1986, Nguyen et al.1994, Squire und Barondes 1973, Tully et al. 1994). Zu kritischen Zeitpunkten im Verlauf der Langzeitpotenzierung ist die RNA Transkription unverzichtbar (Frey et al. 1988, Krug et.al 1984, Otani und Ben-Ari 1993, Otani und Abraham 1989).

## 1.2 Dekrementale und nichtdekrementale Form der LTP

Langzeitpotenzierung hat zwei unterschiedliche Erscheinungsformen: eine dekrementale (1-3 h) und eine nichtdekrementale Form (> 3 h) (Collinridge und Bliss 1995, Matthies et al. 1990). Während die dekrementale Form der LTP durch hochfrequente Einzelreize hervorgerufen werden kann, und im wesentlichen auf kovalente Modifikationen an vor-

handenen Proteinen, zum Beispiel durch die Wirkung von Kinasen und Phosphatasen hervorgerufen wird, ist die nichtdekrementale Form, die über mehrere Tage erhalten bleiben kann, von einer *de novo* Proteinsynthese abhängig. Dies konnte in Untersuchungen festgestellt werden, bei denen Transkriptions- und Translationsinhibitoren zum Einsatz kamen und die Konsolidierung der Spätphase der Langzeitpotenzierung verhierten (Frey et al. 1988, Krug et al. 1984, Matthies et al. 1990, Nguyen et al. 1994). Inhibitoren der cyclischen-Adenosin-Mono-Phosphat (cAMP) abhängigen Proteinkinase (PKA) verminderten sowohl die Ausprägung der Früh- / als auch der Spätphase von nichtdekrementaler LTP. Hingegen zeigten die Inhibitoren bei dekrementaler LTP keine Wirkung (Blitzer et al. 1995, Frey et al. 1993, Huang und Kandel 1994, Matthies und Reymann 1993). Durch die Behandlung vitaler Hippocampusschnitte mit Stimulatoren der PKA konnte die Ausbildung nichtdekrementaler LTP in der CA1-Region im Hippocampus (Frey et al. 1993, Slack und Walsh 1995) induziert werden. Diese Ergebnisse lassen die Vermutung zu, dass eine cAMP vermittelte Transkription für die Aufrechterhaltung der nichtdekrementalen Form der Langzeitpotenzierung von Bedeutung ist. Das würde bedeuten, dass eine mehrere Reaktionsschritte umfassende Reaktionskette in Gang gesetzt wird, durch die, über die Regulation der Genexpression, eine dauerhafte Veränderung der synaptischen Übertragung realisiert wird.

### 1.3 Regulation der Genexpression

Die Regulation der Transkriptionsrate eines Gens stellt eine effektive Kontrolle über die Proteinsynthese dar. Die Kontrolle der Transkription kann auf verschiedenen Ebenen erfolgen. Im eukaryotischen Gen sind verschiedene regulatorische Elemente vorhanden, die die Transkriptionsrate beeinflussen. Das wichtigste Element ist der Promotor, an den die RNA-Polymerase II bindet und die Überschreibung der DNA in RNA initiiert. Die Bindung der RNA-Polymerase II und deren Aktivierung wird durch sogenannte generelle Transkriptionsfaktoren ermöglicht. Änderungen der Zahl und Art dieser Faktoren betreffen alle Gene einer Zelle gleichermaßen und sind somit zur spezifischen Genregulation ungeeignet. Im Bereich der regulatorischen Sequenzen enthalten einzelne Gene Bindungsstellen für zellspezifische Transkriptionsfaktoren. Neuronale Aktivität führt fast

immer zu Änderungen der Genexpression. Ausgangspunkt hierfür sind vielfach die G-Protein gekoppelten Rezeptoren, die über intrazelluläre Botenstoffe ihre Wirkung entfalten. So wird über steigende cAMP-Konzentrationen die Transkription einer ganzen Reihe von Genen reguliert. Voraussetzung für die Regulation eines Gens durch die cAMP Konzentration ist die Präsenz eines spezifischen Enhancers in seiner Promotorregion, der CRE genannt wird. Diese DNA Sequenz ( 5`-TGACGTCA-3`) ist ausreichend, um die Transkription eines Gens über die cAMP- Konzentration regulieren zu können. Dabei ist vorausgesetzt, dass die Zelle das nukleäre CRE- bindende Protein besitzt. cAMP-Konzentrationen beeinflussen nicht die Bindung des CREB-Proteins an den Enhancer, wohl aber die Effizienz, mit der CREB die Transkription stimuliert. Außer über CREB kann cAMP die Genexpression auch über die Phosphorylierung des Transkriptionsfaktors AP-2 beeinflussen. Der AP-2 Komplex bindet an die Enhancer Sequenz 5`CCCCAGGC-3`. CREB wie AP-2 wirken mit anderen Transkriptionsfaktoren zusammen. Die Regulation der Genexpression ist für die dauerhafte Änderung neuronaler Plastizität von entscheidender Bedeutung. Spezielle Regulationsproteine sind nötig, die sowohl die Aktivierung als auch die Hemmung der Expression spezifischer Gene kontrollieren können. Die Aktivität dieser regulierenden Proteine wird durch die Anzahl zur Verfügung stehender Rezeptoren in oder auf der Zelle reguliert. Diese Rezeptoren erkennen die entsprechenden Signalmoleküle. Die „Enhancer“-Elemente, die zellspezifische regulatorische Proteine binden, werden auch „response“ (Antwort)-Elemente genannt. Ein solches Element stellt CRE, also cyclisches Adenosinmonophosphat response element dar, das CREB-Proteine erkennt, die durch die Phosphorylierung unter der Kontrolle der cAMP abhängigen Proteinkinase aktiviert werden.

#### 1.4 CREB

Das cyclische Adenosin-Monophosphat-Response-Element-Binding-Protein (CREB) ist bei der transkriptionalen Regulation vieler Gene beteiligt (Kilbourne et al. 1992, Sheng et al.1991). CREB-Bindungsstellen sind sowohl in der Promotorregion von „immediate early genes“ (IEG), zum Beispiel bei c-Fos (Sassone-Corsi et al.a,b 1988, Ginty et al.1994) als auch in anderen Genen gefunden worden (Somatostatin: Gonzales und

Montminy 1989). Ein kritischer, entscheidender Schritt zur Aktivierung des CREB ist die Phosphorylierung am Serin-133 als Antwort auf intrazellulär ansteigende Calcium oder cAMP-Konzentrationen (de Groot et al.1993, Deutsch et al.1987, Hoeffler et al.1988, Montminy und Bilezikjian 1987, Sheng et al.1991, Silver et al.1987). CREB wird durch eine Vielzahl verschiedener Proteinkinasen *in vitro* phosphoryliert (Abel et al.1997, Frey et al.1988, Huang und Kandel 1994, Nguyen et al 1994). Bisher liegen allerdings lediglich für PKA Ergebnisse *in vivo* vor (Hagiwara et al 1993, Sheng et al 1991, Sun et al. 1994). Durch Untersuchungen konnte nachgewiesen werden, dass CREB sowohl für die Proteinkinasen A und C, die CaMKinase II und IV als auch für RSK Bindungsstellen besitzt. *In vitro* konnte gezeigt werden, dass PKA und einige  $Ca^{2+}$ -/ Calmodulinabhängige Proteinkinasen die Aminosäure Serin-133 direkt phosphorylieren können (Dash et al.1991). Die Phosphorylierung von Serin-133 führt zu einer Aktivierung von CREB, welche bewirkt, dass CREB in den Zellkern transloziert und anschließend die CRE-Region bindet. Diese Kopplung bewirkt eine Aktivierung der RNA-Polymerase II an der Promotorregion und damit einen Anstieg der Transkription. Hingegen bewirkt eine Phosphorylierung von Serin-142 eine Hemmung der Transkriptionsaktivität. Die Phosphorylierung von Serin-133 bedarf eines weiteren Faktors, des CREB-Bindungsproteins und dessen Anlagerung (Arias et al. 1994, Kwok et al. 1994). In der Forschung besteht Übereinstimmung, dass CREB eine wesentliche Bedeutung in der Spätphase der LTP hat (Bailey et al 1996, Bito et al. 1996, Bourtchuladze et al.1994, Frank and Greenberg 1994, Frey et al. 1993 Stevens 1994). Die Bedeutung der CREB-vermittelten Transkription für die Aufrechterhaltung der Langzeitpotenzierung konnte im Hippocampus von transgenen Mäusen mit mutierten CREB-Proteinen dargestellt werden, die eine verminderte Langzeiterinnerung, aufgrund mutierter CREB Proteine, zeigten (Bourtchuladze et al. 1994). Transgene Mäuse, die einen CRE Reporterkonstrukt besaßen, zeigten, dass CRE-vermittelte Genexpression in der Tat mit Stimulationen, die die Spätphase von LTP induzieren, ansteigen (Impey et al.1996, 1998). Neben der Bedeutung im Wirbeltiergehirn, wird CREB ebenfalls eine Bedeutung bei der Konsolidierung von Erinnerung bei Fliegen der Gattung *Drosophila* zugeschrieben (Yin et al.1995). Hier konnte mit Experimenten an transgenen *Drosophilastämmen* die Erscheinung des Langzeitgedächtnisses der Fliegen durch die Manipulation von CREB direkt beeinflusst werden. Bei Schnecken der Gattung *Aplysia* konnte durch die Injektion von CRE-„antisense“-



Oligonucleotiden in den präsynaptischen Nucleus die Langzeitverstärkung von Neuronen blockiert werden (Dash et al. 1990).

Ziel der vorliegenden Arbeit ist die Untersuchung der molekularbiologischen Abläufe im Zellkern tetanisierter Neuronen während hippocampaler LTP. Es wird dabei auf intrazelluläre second-messenger Systeme, deren Bedeutung für die Induktion und der Aufrechterhaltung von LTP bekannt sind (Lovinger et al.1987, Reymann et al.1988), und auf deren Bedeutung für die Aktivierung des Transkriptionsfaktors CREB eingegangen. Die Rolle des Transkriptionsfaktors CREB als möglicher Umschalter von Kurzzeit- in Langzeitplastizität soll mit der vorliegenden Arbeit durch die zeitliche und räumliche Aktivierung von CREB nach hippocampaler LTP *in vivo* und *in vitro* dargestellt werden. In der Arbeit wird versucht, eine mögliche Beteiligung des MAP-Kinase Signalweges als zusätzlicher Signalweg für die Phosphorylierung von CREB an Serin-133 aufzuklären. Dass die MAP-Kinase in verschiedenen Signalwegen im Modell LTP beteiligt ist, gilt als unstrittig (English und Sweatt 1996, Kornhauer und Greenberg 1997). Weiterhin wird versucht, durch die Konstruktion einer neuartigen Messkammer, mit der erstmals zeitgleich elektrophysiologische und molekularbiologische Untersuchungen an bis zu 30 Hippocampuschnitten durchgeführt werden können, ein repräsentatives Verfahren für die Untersuchung von neuronalen Signalkaskaden im Hippocampusgewebe zu etablieren. Durch die neu geschaffene Möglichkeit über eine Vielzahl vitaler Hippocampuschnitte nach unterschiedlicher elektrophysiologischer Manipulation zeitgleich verfügen zu können, konnte die Bearbeitung molekularbiologischer zeitabhängiger Signalverläufe verbessert werden.