

# 1. Einleitung

1.1	Lernen und Gedächtnis	1
1.2	Der Hippokampus	5
1.3	Die molekularen Grundlagen der synaptischen Plastizität	8
1.4	Die postsynaptische Dichte	10
1.5	Aktivitätsregulierte Gene	11
1.6	Das aktivitätsregulierte Gen Arc/Arg3.1	13
1.7	Dendritische Lokalisation und Translation von mRNAs	16
1.8	Zielsetzung der Arbeit	17

### 1.1 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 Erlernete 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, die Lernen und Gedächtnis zugrunde liegen, vergeben wurde. Die vorliegende Arbeit über die Rolle des aktivitätsregulierten Gens Arc/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 Reaktionsverhalten 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 hierzu lieferte der kanadische Psychologe Donald O. Hebb, der aufgrund theoretischer Überlegungen seine Hypothese für ein Langzeit-Gedächtnis-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 wird 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, sondern 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 reduzierten, aber auch eine leichte Gedächtnisschwäche bei den Betroffenen hinterließen (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 eine beidseitige Schädigung des Hippokampus zur Folge hatte. 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 Langzeit-Gedächtnisses beschädigt. Dabei handelt es sich um eine anterograde, die expliziten Lerninhalte betreffende Amnesie (Scoville und Milner, 1957). H.M. konnte also keine bewussten Gedächtnisspuren für Ereignisse bilden, die nach der Operation stattfanden, während seine Erinnerungen an prä-operative Ereignisse ebenso intakt waren wie sein Kurzzeit-Gedächtnis 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 hatten von der Amnesie betroffen waren, folgerten Milner und Scoville, dass der Hippokampus bei Menschen eine entscheidende Rolle für den Erwerb und die Konsolidierung expliziter Langzeit-Gedächtnisspuren spielt. Bei dem mit einem Schmerz verbundenen Handschlag handelt 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 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.

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

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 besonders von der molekularen Neurobiologie bearbeitete Frage an, wie das Gedächtnis geformt 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 Langzeit-Gedächtnisses gemacht: Erstens, im Gegensatz zum Kurzzeit-Gedächtnis, ist die Konsolidierung von Lerninhalten im Langzeit-Gedächtnis 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 Langzeit-Gedächtnis 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 Langzeit-Gedächtnisses ist die Tatsache, dass seine Bildung mit morphologischen Veränderungen der synaptischen Struktur einhergeht (Lamprecht und LeDoux, 2004; diese Aspekte werden in der Kapitel 1.3 noch ausgiebiger beschrieben).

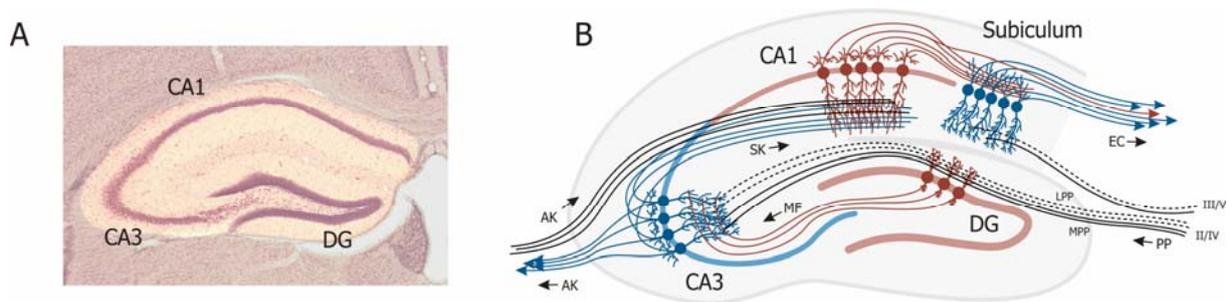
## 1.2 Der Hippokampus

Ursprünglich bezeichnete der Terminus Hippokampus nur die Cornu ammonis Regionen eins bis drei (CA1-3), die zusammen mit Gyrus dentatus, Subikulum, Präsubikulum, Parasubikulum und entorhinalem 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 1.1 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; Bird et al., 2008).

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 die Tiere in einer ganz bestimmten räumlichen Position („*place field*“) befanden (O'Keefe, 1976). Je näher das Tier dem Zentrum des „*place field*“ kam, desto stärker war die Aktivität der verantwortlichen „*place cells*“. 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.



**Abbildung 1.1: Grundlegende Anatomie des Hippokampus.**

Als Hippocampus werden heute im allgemeinen der Gyrus dentatus (DG), das Cornu ammonis mit den Regionen CA1-3, sowie das Subiculum zusammengefasst. **A.** zeigt einen mit Hämatoxylin-Eosin gefärbten coronalen Schnitt durch den Hippocampus, der zur besseren Abgrenzung gegen das restliche Gehirngewebe optisch etwas aufgehellt wurde. In **B.** sind schematisch die neuronale Verschaltung innerhalb des Hippocampus sowie die wichtigsten Faserverbindungen zu anderen Teilen des Gehirns dargestellt. Der Hauptteil der afferenten Informationen erreicht den Hippocampus über den Tractus perforans (*perforant path*, PP) aus dem entorhinalen Kortex (EC). Dabei projiziert die Kortexschicht II und IV auf das Stratum moleculare (Molekularschicht) des Gyrus dentatus (*dentate gyrus*). MPP: *medial perforant path*, LPP: *lateral perforant path*. Die der Molekularschicht zugehörigen Körnerzellen stellen die größte Zellpopulation im Gyrus dentatus dar und formieren sich zur Körnerzellschicht. Sie senden ihre Axone über die Moosfasern (*mossy fibres*, MF), die den Gyrus dentatus über die Hilus-Region verlassen, in das Stratum radiale (Radialschicht) der CA3-Region. In der CA3-Region bilden die Moosfasern Verknüpfungen mit den Pyramidenzellen aus. Die Zellkörper der Pyramidenzellen von CA1-3 liegen im Stratum pyramidale (Pyramidalzellschicht). Die Axone der CA3-Pyramidenzellen wiederum weisen mehrere Projektionszielorte auf: Sie projizieren zum einen über die Kommissurfasern (*commissural fibres*, AK) auf die kontralateralen CA3- bzw. CA1-Pyramidenzellen und zum anderen über die Schaffer-Kollateralen (*schaffer collaterals*, SK) auf die ipsilaterale Radialschicht vorgeschalteter CA1-Pyramidenzellen. Es besteht außerdem ein dicht assoziatives Netzwerk zwischen den CA3-Pyramidenzellen auf derselben Seite. Die CA1-Pyramidenzellen projizieren über das Stratum oriens wieder Richtung Subiculum und entorhinalen Kortex.

### 1.3 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 des Gehirns angelegt ist, ist nicht starr, sondern unterliegt einer ständigen Modulierung. 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 Modulierung 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 neurodegenerativer 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 Neuronenverband 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 (N-Methyl-D-Aspartat)-Rezeptor identifiziert werden: das vom präsynaptischen Neuron infolge der Stimulation ausgeschüttete Glutamat bindet sich an postsynaptisch

lokalisierte Rezeptoren, wie die NMDA- oder AMPA (alpha-Amino-3-Hydroxy-5-Methyl-4-Isoxazol-Propionat)-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 Langzeit-Gedächtnisses, 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 über

den NMDA-Rezeptor vermittelten LTP im Hippokampus und der Ausbildung des Langzeit-Gedächtnisses 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., 1996).

### 1.4 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/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 Langzeit-Gedächtnisspuren 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?

## 1.5 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 *egr1/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 Beispiele seien hier genannt der t-PA, das erste Effektorprotein, dessen Induktion nach LTP Stimulation von Kuhl und Mitarbeitern identifiziert wurde (Qian et al., 1993), das Homer1a (Xiao et al., 1998) sowie die Kinasen Pim-1, SNK und FNK (Konietzko et al., 1999; Kauselmann et al., 1999). 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. Die enzymatische Aktivität der Serin-Threonin-Kinasen,

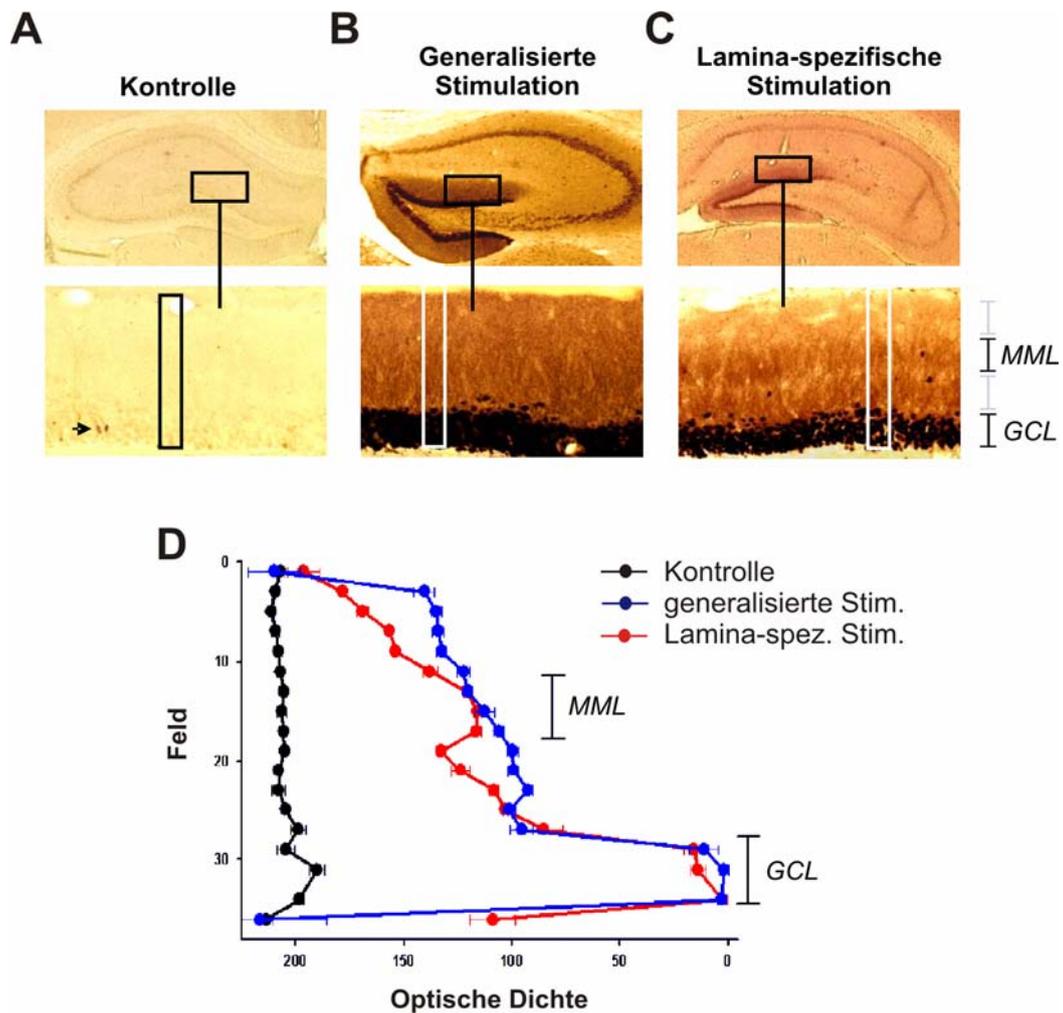
Pim-1, SNK (*serum-inducible kinase*) und FNK (*FGF-inducible kinase*), ist für die Konsolidierung der synaptischen Plastizität notwendig.

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

## 1.6 Das aktivitätsregulierte Gen Arc/Arg3.1

Das Gen Arc/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 Arc/Arg3.1 ursprünglich nach Einsetzen einer pharmakologisch bzw. elektrisch ausgelösten *grand mal* Epilepsie (generalisierter epileptischer Anfall) gefunden. Das Arc/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 über den NMDA-Rezeptor vermittelte Stimulation generell zur Induktion der Arc/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: Arc/Arg3.1 ist das einzige aktivitätsregulierte Gen, dessen Transkript nach neuronaler Stimulation in den Dendriten lokalisiert ist. Oswald Steward und Paul Worley konnten darüber hinaus zeigen, dass diese Verteilung nicht ungerichtet ist, sondern dass die Arc/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). Ein ähnliches Verteilungsmuster in den Dendriten konnte für das Arc/Arg3.1-Protein in unserem Labor demonstriert werden (Plath 2004, Abbildung 1.2). Diese Eigenschaften weisen auf eine mögliche Rolle für das Arc/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 Arc/Arg3.1 direkt an informationsprozessierende Mechanismen im

Gehirn gekoppelt ist. John Guzowski und seine Kollegen konnten zeigen, dass das Arc/Arg3.1 nach räumlicher Exploration selektiv in einzelnen hippocampalen Neuronen von Ratten induziert wird. Das Muster dieser Arc/Arg3.1-positiven 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). Einige Jahre später wurde die essentielle Rolle von Arc/Arg3.1 bei der Konsolidierung der synaptischen Plastizität und des Langzeit-Gedächtnisses in den in unserem Labor generierten Arc/Arg3.1-defizienten Mäusen bestätigt (Plath et al., 2006). Die Arc/Arg3.1-Knockout-Mäuse sind nicht in der Lage, ein stabiles Langzeit-Gedächtnis für verschiedene explizite und implizite Lernaufgaben zu bilden. Die hippocampale LTP dieser Tiere im Gyrus dentatus und in der CA1-Region ist durch eine erhöhte frühe Phase und eine abwesende späte Phase charakterisiert. Darüber hinaus konnte Jason Shepherd et al. in den hippocampalen Neuronen demonstrieren, dass eine langsam verlaufende Form der synaptischen Plastizität, das sogenannte homöostatische *synaptic scaling*, in den Neuronen der Arc/Arg3.1-Knockout-Tiere aufgrund reduzierter Endozytose des synaptischen AMPA-Rezeptors beeinträchtigt ist (Shepherd et al., 2006).



**Abbildung 1.2: Selektive Lokalisation des Arc/Arg3.1-Proteins an aktivierten Synapsen.**

(A-C) Immunhistochemische Analyse der Arc/Arg3.1-Expression im Hippokampus (obere Reihe) mit Vergrößerungen der Molekular- und Körnerzellschicht des Gyrus dentatus (untere Reihe) unter verschiedenen Stimulationsbedingungen.

(A) Basalexpression des Arc/Arg3.1-Proteins unter Kontrollbedingungen. Die einzelnen immunreaktiven Zellen der Körnerzellschicht (Pfeilkopf) geben Aufschluss über kürzlich aktivierte Neuronen im Hippokampus.

(B) Arc/Arg3.1-Expressionsmuster 4 h nach einem Kainat-induzierten generalisierten Krampfanfall.

(C) Verteilung des Arc/Arg3.1-Proteins 4 h nach LTP-induzierender Stimulation des mittleren Tractus perforans. Das Arc/Arg3.1-Protein ist selektiv an den Synapsen der aktivierten mittleren Molekularschicht angereichert.

(D) Densitometrische Analyse der Arc/Arg3.1-Protein-Verteilung im Hippokampus der lichtmikroskopisch erstellten Aufnahmen aus A, B und C.

Abkürzungen: *MML*: mittlere Molekularschicht; *GCL*: Körnerzellschicht.

## 1.7 Dendritische Lokalisation und Translation von mRNAs

Neben Arc/Arg3.1 gibt es eine kleine Anzahl weitere 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 Proteine, die eine Rolle direkt an der Synapse spielen. Dazu gehören beispielsweise das Strukturprotein Shank1 (Sheng und Kim, 2002), die synapsenspezifische Kinase alpha-CaMKII (Lisman et al., 2002) oder Arc/Arg3.1 (Link et al., 1995).

Die ersten Studien, die die Abhängigkeit der L-LTP und des Langzeit-Gedächtnisses 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 der Proteinsynthese an der Synapse für eine spezielle Form der LTP nachgewiesen. Dabei handelt es sich um eine über den Wachstumsfaktor BDNF (*brain-derived neurotrophic factor*) 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. Hyejin 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 Sensitisierung 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).

In einer späteren *in vivo* Studie hat Stephan Miller et al. die spezielle Rolle der dendritisch synthetisierten alpha-CaMKII in der Konsolidierung der synaptischen Plastizität und des Langzeit-Gedächtnisses untersucht (Miller et al., 2002). Die Knockin-Mäuse, in denen durch den Austausch der 3'UTR-Sequenz die dendritische Translokation der CaMKII $\alpha$ -mRNA verhindert ist, besitzen eine stark reduzierte alpha-CaMKII-Expression in den Synapsen. Das beeinträchtigte Leistungsverhalten dieser Mäuse in den *Morris water maze* bzw. in der kontextabhängigen Angstkonditionierung und die reduzierte L-LTP in deren hippocampalen Schnitten deuten auf eine Notwendigkeit der lokalen alpha-CaMKII-Synthese für die Konsolidierung des hippocampusabhängigen Langzeit-Gedächtnisses und für die Stabilisierung der synaptischen Plastizität hin.

## 1.8 Zielsetzung der Arbeit

Arc/Arg3.1 repräsentiert ein aktivitätsreguliertes Effektorgen, das unmittelbar an der Stabilisierung lang anhaltender plastischer Veränderungen der Synapsen, wie LTP und LTD, und an der Konsolidierung des Langzeit-Gedächtnisses beteiligt ist. Arc/Arg3.1 besitzt eine Reihe von Eigenschaften, die auf eine zentrale Rolle bei den plastizitätsinduzierten molekularen Veränderungen hinweisen, die sich nach neuronaler Aktivität an den Postsynapsen des zentralen Nervensystems von Säugetieren abspielen. So wird die neuronale Expression von Arc/Arg3.1 durch Stimulationen induziert, die zu lang anhaltenden

Veränderungen in der synaptischen Stärke führen. Die Arc/Arg3.1-mRNA wird in die Dendriten transportiert und dort selektiv im Bereich der aktivierten Synapsen lokalisiert. Dies deutet auf eine lokale Synthese des Arc/Arg3.1-Proteins in den Dendriten hin.

In dieser Arbeit sollte der Beitrag der dendritischen Protein-Synthese zur Bildung des Langzeit-Gedächtnisses bzw. zur Stabilisierung der synaptischen Plastizität anhand des Arc/Arg3.1-Gens *in vivo* untersucht werden. Dafür sollten im ersten Teil dieser Arbeit transgene Mäuse (tg) generiert werden, die ein *P1 derived artificial chromosome* (PAC) besitzen, in dem die für den dendritischen Transport der mRNA zuständige 3' nicht-translatierte Region (3'UTR) des Arc/Arg3.1-Gens mit einer anderen 3'UTR-Sequenz ausgetauscht werden sollte. Für die funktionellen Analysen sollten diese tg-Mäuse dann in den Arc/Arg3.1-Knockout-Hintergrund hineingekreuzt werden.

Im anschließenden zweiten Teil der Arbeit sollten anhand dieser tg-Mäuse die Auswirkungen der Verhinderung der dendritischen Arc/Arg3.1-Synthese im Rahmen eines multidisziplinären Ansatzes analysiert werden. Dabei sollten molekularbiologische, biochemische und verhaltensbiologische Studien angewendet werden.