

Zusammenfassung der Dissertation

Synaptic Plasticity in Mature Cultured Hippocampal-Entorhinal Cortex Slices:
Activity-Dependent Regulation of cAMP Response-Element Binding Protein

Master of Science, Jill K. Leutgeb

Die Mechanismen, die zur Protein- und Genexpression nach Lernen und in der Folge zu lang anhaltenden synaptischen Veränderungen sowie der Gedächtniskonsolidierung führen, sind noch weitgehend unbekannt. Falls die späten Phasen der Langzeitpotenzierung (LTP, engl.: long-term potentiation) zu dauernden strukturellen synaptischen Veränderungen und daher zur Langzeitgedächtnisbildung führen, ist das Verständnis dieser Prozesse wichtig, aber auch methodisch schwierig zu untersuchen. Zusätzlich zu akut präparierten Hippokampusschnitten von adulten Organismen werden daher auch hippokampale Zell- und Gewebekulturen, die bisher von embryonalen und juvenilen Organismen gewonnen wurden, für Untersuchungen der LTP verwendet. Kulturen von juvenilem Gewebe zeigen allerdings nicht nur in der anatomischen und zellulären Entwicklung Unterschiede zur ontogenetischen Entwicklung des Tieres, sondern auch im Hinblick auf die zur synaptischen Plastizität führenden Mechanismen. Wichtig ist daher die Suche nach einem Forschungsmodell, das auch adultes Gewebe in vitro Experimenten zugänglich zu macht. Daher war es Ziel der vorliegenden Dissertation, hippokampales Gewebe mit bereits ausgebildeten synaptischen Verbindungen zu kultivieren und organotypische Schnittkulturen von jung-adulten Ratten als zusätzliches Modell zum Studium der LTP zu etablieren. Für diese Präparation wurde Gewebe von 25 bis 30 Tage alten Tieren verwendet, da die Entwicklung des Gehirns zu diesem Zeitpunkt größtenteils abgeschlossen ist. Außerdem wurden die elektrophysiologischen Eigenschaften der Schnittkulturen und speziell die synaptische Plastizität untersucht.

In der vorliegenden Arbeit wurden zunächst die Effekte verschiedener Präparationsmethoden und Kultivierungsbedingungen auf die morphologischen und funktionellen Eigenschaften der kultivierten Hippokampusschnitte von jung-adulten Ratten beschrieben. Mit Hilfe elektrophysiologischer und immunohistochemischer Methoden wurde festgestellt, ob nach der Kultivierung physiologisch aktive Synapsen vorhanden sind und ob die Einführung optimierter Methoden die elektrophysiologischen Eigenschaften von hippokampalen Schnitten verbesserte. Mit den modifizierten Protokollen war es möglich auch nach 2-wöchigem Kultivieren der Hirnschnitte funktionell intakte Synapsen zwischen Tractus perforans und Granularzellen im Gyrus dentatus, Moosfasern und CA3 Zellen als auch an den Verbindungen zwischen Schafferschen Kollateralen und CA1 Pyramidenzellen zu gewährleisten. Die elektrophysiologischen Eigenschaften der adulten Schnittkulturen wurden wiederholt geprüft, insbesondere um Stimmulationssequenzen für die Induktion einer mehrstündigen LTP in der CA1 Region zu finden. Mit den hier entwickelten Protokollen konnte die LTP in CA1, wie in akut präparierten Schnitten, erstmalig auch in adulten Schnittkulturen verlässlich nach extrazellulärer Stimulation induziert werden. Ihre Induktion war NMDA-Rezeptor-abhängig und ihre Aufrechterhaltung lang andauernd (> 4 Stunden). In den neu entwickelten hippokampal-entorhinalen Hirnschnittkulturen von jung-adulten Ratten bleiben daher die für die Langzeitpotenzierung erforderlichen Eigenschaften erhalten, und die Kulturen erlauben in vitro Untersuchungen der Plastizität neuronaler Verbindungen, deren ontogenetische Entwicklung vor der Präparation weitgehend abgeschlossen war.

Die Phosphorylierung des Transkriptionsfaktors CREB (engl.: cAMP response element binding protein) wird sowohl für die synaptische Plastizität als auch für Gedächtnisprozesse als wesentlich erachtet. Die hippokampal-entorhinalen Schnittkulturen von adultem Gewebe wurden nun verwendet, um die Beziehung zwischen der lang anhaltenden LTP und der zeitlichen und räumlichen Dynamik der CREB Phosphorylierung zu visualisieren. Die Dynamik der CREB-Aktivierung wurde durch die Verwendung von immunhistologischen Methoden und konfokalen bildgebenden Verfahren erstmalig auch mit zellulärer Auflösung

beobachtet. Die Methode wurde zunächst nach Erhöhung der cAMP Konzentration durch die Zugabe von Forskolin getestet. Eine Normalisierung und Quantifizierung der relativen CREB-Phosphorylierung war durch das Bestimmen des Verhältnisses zwischen phosphoryliertem CREB (pCREB) und nicht phosphoryliertem CREB möglich, und nach der Applikation von Forskolin wurde eine stetige Erhöhung der pCREB/CREB Immunfluoreszenz in der gesamten Population der hippocampalen Pyramidenzellen beobachtet. Nach elektrischer Stimulation des CA1 Areal mit einer Frequenz von 100 Hz (Tetanisierung) konnte eine lang anhaltende LTP induziert werden und ebenfalls eine signifikante Erhöhung des Anteils von pCREB detektiert werden. Zudem stieg der durchschnittliche pCREB/CREB Wert während der Aufrechterhaltung der lang andauernden LTP weiter an. Eine erhöhte CREB Phosphorylierung wurde nach der LTP Induktion nur im CA1 Gebiet beobachtet, und die Werte zeigten eine hohe Variabilität zwischen einzelnen, auch benachbarten CA1 Neuronen. Im Gegensatz zu den Ergebnissen nach Forskolin Applikation wurden nach der LTP Induktion keine Unterschiede zu Kontrollwerten für Messungen im CA3 Areal und im Gyrus dentatus gefunden. Die für das CA1 Areal spezifische CREB-Phosphorylierung weist darauf hin, dass weder die antidrome Stimulation noch spezifische Messbedingungen für die Induktion der CREB-Phosphorylierung nach der Tetanisierung ausreichend waren. Es wurde außerdem kein Anstieg des pCREB/CREB-Wertes gemessen, wenn die Tetanisierung während der Applikation von APV erfolgte und nur eine posttetanische Potenzierung induziert wurde. Sowohl die Aktivierung von CREB als auch die LTP Induktion in Schnittkulturen adulter Ratten sind daher NMDA-Rezeptor-abhängig. Durch die hier verwendeten Methoden konnte erstmalig gezeigt werden, dass die Induktion der LTP zu unterschiedlicher CREB Aktivierung in einzelnen Pyramidenzellen führt und während der gesamten Dauer der LTP in der CA1 Zellpopulation weiter zunimmt. Die Hypothese, dass die CREB-Aktivierung eine wichtige Rolle während der Expression und Aufrechterhaltung von lang andauernder LTP spielt, wird durch die vorliegenden Resultate weitgehend unterstützt.

In der vorliegenden Dissertation habe ich gezeigt, dass die molekularen und elektrophysiologischen Eigenschaften der Schnittkulturen denen jung-adulter Organismen entsprechen und in vitro untersucht werden können. Mit der Entwicklung der hippocampal-entorhinalen Schnittkulturen von jung-adulterem Gewebe ist der Einsatz von Techniken möglich, die in anderen Modellen der Langzeitplastizität nur begrenzt anwendbar sind. Diese experimentellen Möglichkeiten können für weitere Untersuchungen von großer Bedeutung sein, insbesondere im Hinblick auf nun möglich werdende Untersuchungen der für die Langzeitplastizität wesentlichen Signaltransduktionswege zwischen der Synapse und dem Nukleus.