

Investigation of Cellular Mechanisms of Hippocampal LTP and LTD

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades

Doctor rerum naturalium
(Dr. rer. nat)

genehmigt durch

**die Fakultät für Naturwissenschaften
der Otto-Von-Guericke-Universität Magdeburg**

von Sheeja Navakkode Gangadharan, Master of Science,
Kerala, India

Eingereicht am : 26. 09. 2005

Untersuchungen zellulärer Prozesse bei hippocampaler LTP und LTD

Zusammenfassung

Gedächtnisformierung und -konsolidierung unterliegen sehr wahrscheinlich langfristigen plastischen Prozessen, welche die synaptische Übertragungsrate zwischen Neuronen modulieren. Die bisher am besten untersuchten Modelle synaptischer Plastizität sind die Langzeitpotenzierung (LTP) und die Langzeitdepression (LTD). Die bisherige Kenntnis der zellulären und molekularen Mechanismen die der LTP und LTD unterliegen, wurden überwiegend an hippocampalen Schnittpräparaten in vitro gewonnen.

Meine ersten Studien konzentrierten sich auf den Effekt von Rolipram, einem Hemmer der Typ IV-spezifischen cAMP-Phosphodiesterase (PDE), auf späte Phasen funktioneller plastischer Prozesse in der CA1 Region hippocampaler Schnittpräparate der Ratte. Ich konnte zeigen, dass die frühe Phase der LTP (early-LTP) die normalerweise innerhalb von 2 h - 3 h auf baseline-Niveau abklingt in eine späte Form der LTP (late-LTP) transformiert wird (> 6 h), wenn während der Tetanisierung Rolipram appliziert wurde. Diese Rolipram-verstärkte LTP (RLTP) ist NMDA-Rezeptor- und proteinsynthese-abhängig. Da die Aktivierung der cAMP-Signalkaskade während der Induktion eine late-LTP Dopaminrezeptoraktivität (D1/D5) in der CA1-Region erfordert (Frey et al., 1989; Frey et al., 1990), überprüften wir, ob die RLTP von dopaminerger Aktivität abhängt. Da die RLTP ebenso wie die konventionelle späte LTP von Proteinsynthese abhängt, untersuchte ich, ob Rolipram Prozesse des synaptic tagging beeinflusst. Hemmung der PDE und nachfolgende Induktion einer RLTP in einer Population von Synapsen (S1) erlaubte die Transformation einer early-LTP in eine late-LTP in einer zweiten, von der ersten unabhängigen Synapsenpopulation (S2) derselben Neuronenpopulation. Dieses

Ergebnis unterstützt unsere Hypothese, daß cAMP-abhängige Prozesse unmittelbar in die Synthese plastizitätsrelevanter Proteine (PRPs) involviert sind.

In neueren Studien wurden Interaktionen zwischen LTP und LTD über synaptic tags nachgewiesen (Sajikumar & Frey, 2004a) und als „cross-tagging“ in die Literatur eingeführt. Da der tag der durch die Induktion der frühen Phase einer der beiden Formen der synaptischen Plastizität von PRPs profitieren kann, deren Synthese durch die Induktion der späten Phase von LTP oder LTD angestossen wurde, stellte sich die Frage nach der Rolle prozeß-unspezifischer und –spezifischer Proteine. Wir konnten PKM ζ als erstes LTP-spezifisches Protein nachweisen, das sowohl nötig als auch hinreichend für die Aufrechterhaltung der late-LTP aber nicht der late-LTD ist (Sajikumar et al., 2005). Da wir zeigen konnten, daß eine PDE-Inhibierung zur Verstärkung der early-LTP führt, stellte sich nun die interessante Frage, ob es auch zu einer LTD-Verstärkung führen kann (RLTD).

In der vorliegenden Arbeit zeige ich, daß in der CA1-Region hippocampaler Schnittpräparate adulter Ratten die Gabe von Rolipram während des Tetanus ebenso zu einer Transformation einer early-LTD in eine late-LTD führt. Zudem konnte ich zeigen, daß diese Transformation NMDAR- und proteinsyntheseabhängig ist, sowie eine dopaminerge Aktivierung erfordert und somit ähnlichen Mechanismen zu unterliegen scheint, wie eine elektrisch induzierte late-LTD. Daher stellte sich die Frage, ob synaptic tagging während einer RLTD nachzuweisen ist. Ich konnte zeigen, daß in S1 eine LTD-Verstärkung zu beobachten ist, wenn in S2 eine early-LTD in Anwesenheit von Rolipram induziert wird. Somit wären die Kriterien von synaptic tagging für die RLTD erfüllt.

Während die molekularen Mechanismen verschiedener Formen der LTP relativ gut untersucht sind, ist dies für die LTD nicht der Fall. Wir begannen daher, die

Mechanismen des Rolipram-Effektes auf die LTD genauer zu untersuchen. Wir konnten durch Einsatz von Inhibitoren (U0126 und PD98059) der mitogen-aktivierten Proteinkinase (MAPK) zeigen, daß die durch extrazelluläre Signale regulierte Kinase (ERK1/ERK2) induzierte Signalkaskade in RLTD involviert ist. Außerdem studierten wir die Rolle spezifischer Kaskaden durch die ERK1/ERK2 während RLTD aktiviert wird und fanden eine spezifische Rolle der Rap/PKA abhängigen Kaskade. Wir konnten unter Einsatz von spezifischen Inhibitoren des Ras/Raf-1 Signalweges (Manumycin) und des Rap/B-Raf Pfades (LT-82) zeigen, das die MAPK-Aktivierung während RLTD ausgelöst wird durch die synergistische Interaktion der der NMDAR und D1/D5-Rezeptor abhängigen Rap/B-Raf Signalwege, jedoch nicht des Ras/Raf1 Pfades. Zusammenfassend zeigen diese Ergebnisse, daß PDE4B3 ein prozeß-unspezifisches Protein ist, welches die Ausbildung einer LTP und/oder LTD reguliert.

In einem nächsten Schritt interessierte uns die grundlegende Frage: was ist der synaptic tag? Gibt es spezifische tags für LTP und LTD? Viele Forschergruppen haben spekuliert, das der tag die aktivierte, phosphorylierte Form eines Proteins sein könnte oder auf Änderungen des Zytoskeletts wie etwa spine-Durchmesser oder Aktin-Filamente beruhen könnte. Wir studierten die Rolle zweier vielversprechender Kandidaten CaMKII und ERK1/ERK2 (MAPK) als LTP- oder LTD-spezifische tags. Zunächst bestätigten wir die Ergebnisse anderer Labors, daß die Inhibierung der CaMKII oder MAPK nach Induktion von LTP oder LTD keine Rolle auf deren Aufrechterhaltung hat. Wir konnten erstmals zeigen, das p42/44 MAPK auch für die Aufrechterhaltung der LTD benötigt wird.

Ebenso konnten wir durch Einsatz eines spezifischen Hemmers (KN-62) zeigen, das das Setzen eines tags oder tag-Komplexes während LTP jedoch nicht LTD ein CaMKII-vermittelter Prozeß ist. Zusätzlich zu dem klassischen tagging-Experiment,

sicherten wir dieses Ergebnis ab, indem in beiden Inputs (S1 und S2) eine late-LTP induzierten, in S2 allerdings in Gegenwart von KN-62. Während in S2 late-LTP geblockt wird, bleibt late-LTP in S1 erhalten. Induktion von late-LTD in beiden Inputs in Gegenwart von KN-62 in S2 hatte jedoch keinen Einfluß auf deren Aufrechterhaltung.

Nach Klärung der Rolle von CaMKII im Setzen des tags während LTP stellte sich die Frage nach einer spezifischen Kinase die das Setzen eines LTD-tags vermittelt. Wir wiederholten die gleichen Experimente wie für CaMKII oben beschrieben mit zwei spezifischen MEK-Hemmern (U0126 und PD98059). Wir konnten zeigen, daß im Gegensatz zu CaMKII, MAPK keinen Einfluß auf das Setzen LTP-spezifischer tags hat, jedoch die Aktivierung LTD-spezifischer tags vermittelt.

Als nächstes untersuchten wir die Frage, ob mit cross-tagging die weitere Prozeß-Spezifität der tags charakterisiert werden kann. Hierzu induzierten wir late-LTD in S1 und nach 45 min early-LTP in S2 in der Gegenwart eines CaMKII-Hemmers (KN-62 und Autocatamide 2-inhibitory peptide, AIP). Es zeigte sich keine Transformation in eine late-LTP in S2, es fand also kein cross-tagging statt. Die Durchführung des gleichen Experimentes in Gegenwart von MAPK-Hemmern (U0126 und PD98059) führte zudem zu keiner Transformation der early-LTD in eine late-LTD, was die spezifische Rolle für MAPK während LTD-taggings bestätigt. Zusammenfassend konnten wir zeigen, das LTP-tagging durch CaMKII vermittelt wird, während MAPK in LTD-tagging involviert ist.