

Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf

Zentrum für Experimentelle Medizin  
Institut für Anatomie I:  
Zelluläre Neurobiologie

Leiterin: Prof. Dr. med. Gabriele M. Rune

# **Zur Rolle des Calciums bei Estrogen-vermittelter synaptischer Plastizität**

## **Dissertation**

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin  
der Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg vorgelegt von

**Corinna Voets**  
**aus Düsseldorf, Nordrhein-Westfalen**

Hamburg 2008

Angenommen von der Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg am: 19.05.09

Veröffentlicht mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg

Prüfungsausschuss: die Vorsitzende: Prof. Dr. G. Rune

Prüfungsausschuss: 2. Gutachter: PD. Dr. S. Kindler

Prüfungsausschuss: 3. Gutachter: PD. Dr. R. Bender

## Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS</b> .....	<b>5</b>
<b>2</b>	<b>EINLEITUNG</b> .....	<b>8</b>
2.1	Einführung.....	8
2.2	Der Hippocampus der Ratte.....	8
2.3	Spines.....	11
2.4	Spineapparat und Synaptopodin.....	12
2.5	Langzeitpotenzierung und synaptische Plastizität.....	14
2.6	Estrogene im Hippocampus.....	15
2.6.1	Estrogensynthese.....	15
2.6.2	Aromatase.....	15
2.6.3	Estrogeneffekte im ZNS.....	16
2.7	Calcium im Hippocampus.....	17
2.7.1	Thapsigargin.....	18
2.7.2	plasma membrane calcium ATPase.....	19
2.8	Arbeitshypothese und Fragestellung.....	20
<b>3</b>	<b>MATERIAL</b> .....	<b>21</b>
3.1	Arbeitsmaterialien, Geräte und Software.....	21
3.2	Chemikalien.....	22
3.3	Lösungen.....	23
<b>4</b>	<b>METHODEN</b> .....	<b>25</b>
4.1	Präparation der hippocampalen Dispersionskultur.....	25
4.2	Hippocampale Dispersionskultur.....	25
4.3	Stimulation und Inhibition.....	26
4.4	Quantitative Estrogen-Bestimmung mittels Radioimmunoassay (RIA).....	27
4.5	Fixierung der Dispersionskultur.....	28
4.6	Immuncytochemie der Dispersionskultur.....	29
4.7	Mikroskopische Messung und Bildanalyse.....	30
4.8	Quantitative Auszählung.....	31
4.9	Nachweis apoptotischer Zellen mittels TUNEL.....	31
<b>5</b>	<b>ERGEBNISSE</b> .....	<b>33</b>
5.1	Synaptopodin.....	33
5.1.1	Synaptopodinexpression unter dem Einfluss von Estradiol.....	33
5.1.2	Synaptopodinexpression unter Thapsigargin ( $10^{-6}$ M, $10^{-7}$ M, $10^{-8}$ M, $10^{-9}$ M) ..	34
5.1.3	TdT-mediated dUTP-biotin nick end labeling-Test (TUNEL).....	36

---

5.1.4	Synaptopodinexpression unter Thapsigargin Stimulation.....	39
5.1.5	Synaptopodinexpression unter Thapsigargin in Kombination mit Estradiol.....	39
5.1.6	Quantitative Auszählung Synaptopodin-positiver Zellen unter Thapsigargin ...	40
5.2	Aromatase.....	41
5.2.1	Evaluation des Antikörpers .....	42
5.2.2	Aromatase-Expression unter dem Einfluss von Thapsigargin .....	43
5.2.3	Aromatase-Expression unter dem Einfluss von Thapsigargin und Estradiol.....	44
5.2.4	Quantitative Estrogen-Bestimmung im Medium unter Thapsigargin .....	45
5.3	plasma membrane calcium ATPase (PMCA).....	46
5.3.1	PMCA-Expression unter dem Einfluss von Estradiol und Letrozol.....	47
<b>6</b>	<b>DISKUSSION .....</b>	<b>49</b>
6.1	Estradiol reguliert die Synaptopodinexpression herunter.....	50
6.2	Der Calcium-Release reguliert die Synaptopodinexpression .....	52
6.3	Thapsigargin stimuliert die Estrogensynthese.....	54
6.4	Estrogen reguliert die Aromatase .....	56
6.5	Welche Rolle spielt PMCA? .....	56
6.6	Unsere Ergebnisse im wissenschaftlichen Kontext - Die Rolle von Calcium und Synaptopodin auf die synaptische Plastizität.....	57
6.7	Klinischer Ausblick: Der Einfluss von Calcium auf neurodegenerative Erkrankungen.....	59
<b>7</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG.....</b>	<b>61</b>
<b>8</b>	<b>LITERATURVERZEICHNIS .....</b>	<b>62</b>
<b>9</b>	<b>DANKSAGUNG .....</b>	<b>73</b>
<b>10</b>	<b>LEBENS LAUF .....</b>	<b>74</b>
<b>11</b>	<b>EIDESSTATTLICHE VERSICHERUNG .....</b>	<b>75</b>

# 1 Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
AMPA	$\alpha$ -Amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazol-propionacid
bFGF	basic fibroblast growth factor
BSA	bovine serum albumin
bzw.	beziehungsweise
°C	Grad Celsius
Ca <sup>2+</sup>	Calcium
CA1-3	Cornu ammonis Region 1-3
ca.	circa
CICR	calcium-induced calcium release
cm	Zentimeter
Cy3	Indocarbocyanin 3 (rot fluoreszierend)
DAPI	4', 6-Diamidino-2-Phenylindol
dest.	<i>destillata</i> (destilliert)
d.h.	das heißt
DHEA	Dehydroepiandrosteron
DIV	days <i>in vitro</i>
DNA	deoxyribonucleic acid
E <sub>2</sub>	17 $\beta$ -Estradiol
EDTA	ethylenediaminetetraacetic acid
ER	Estrogenrezeptor/en
<i>et al.</i>	<i>et alii</i> (und andere)
evtl.	eventuell
g	Gramm
G-Protein	GTP-bindendes Protein
h	Stunde
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Wasserstoffperoxid
HCl	Salzsäure
IgG	Immunglobuline der Klasse der Gammaglobuline
IP3	Inositol-1,4,5-trisphosphat
kDa	Kilo Dalton
KM	Kulturmedium
l	Liter

---

LSM	laser scanning microscope
LTP	long term potentiation
M	molare Masse
MAP2	Microtubule-associated protein 2
mg	Milligramm
min	Minute
ml	Milliliter
µl	Mikroliter
µm	Mikrometer
mM	Millimolar
mol	Mol (1 mol = 6,023 x 10 <sup>23</sup> Moleküle)
mRNA	messenger ribonucleic acid
n	Anzahl
NaOH	Natriumhydroxid (Natriumlauge)
NGF	nerve growth factor
NGS	normal goat serum
NMDA	N-Methyl-D-Aspartat
Nr.	Nummer
p	Signifikanzniveau
PBS	phosphate buffered saline
pH	<i>pondus Hydrogenii</i>
PMCA	plasma membrane calcium ATPase
PSD	post-synaptic density
RIA	Radioimmunoassay
RT	Raumtemperatur
S.	Seite
SEM	standard error of the mean
SERCA	sarcoplasmic endoplasmic reticulum calcium ATPase
SER	smooth endoplasmic reticulum
SPSS	Statistical Package for the Social Sciences
StAR	steroidogenic acute regulatory protein
TdT	Terminal Deoxynucleotidyl Transferase
TUNEL	TdT- mediated dUTP- biotin nick end labeling
z.B.	zum Beispiel

U	Umdrehung
UKE	Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf
ZNS	Zentrales Nervensystem

## 2 Einleitung

### 2.1 Einführung

Das Gehirn koordiniert als Zentrales Nervensystem (ZNS) mehr als geschätzte  $10^{10}$  Neurone und bestimmt durch deren Vernetzung Emotionen, Verhalten und Gedanken eines jeden Lebewesens. Angesichts dieser enormen Gesamtzahl von Neuronen können die Prozesse der synaptischen Plastizität nicht vollständig genetisch determiniert sein, sondern scheinen von lokalen Faktoren moduliert zu werden. Eine Struktur im Gehirn ist insbesondere bei der Gedächtnisbildung von zentraler Bedeutung: der Hippocampus. Die Tatsache, dass der Hippocampus selbst über die Fähigkeit verfügt, Estrogene *de novo* zu synthetisieren, begründet das zunehmende Interesse an diesem Steroid (Prange-Kiel *et al.*, 2003). Verschiedene Studien belegen, dass es unter Estrogeneinfluss im Hippocampus zu morphologischen Veränderungen, wie der Synapto- und Spinogenese kommt, dem anatomischen Korrelat der synaptischen Plastizität (Woolley *et al.*, 1990; Pozzo-Miller *et al.*, 1999; McEwen, 2001, 2004; Segal und Murphy, 2001). Durch die vielfach beschriebene neuroprotektive Funktion von Estrogenen gibt es Hinweise, dass sie degenerative Erkrankungen hippocampaler Strukturen, wie z.B. Morbus Alzheimer, aber auch depressive Zustände sowie traumatische, neuronale Verletzungen therapieren können (Garcia-Segura *et al.*, 2001; Suzuki *et al.*, 2006). Die Aromatase, als Schlüsselenzym der Estrogensynthese, scheint hierbei eine bedeutende Rolle zu spielen, da sie in diesen Situationen verstärkt exprimiert wird.

Neuere Studien deuten darauf hin, dass die Estrogen-vermittelte synaptische Plastizität über Calcium moduliert wird (Zhao *et al.*, 2005). Der Spineapparat, eine elektronendichte Zellorganelle in den Spines, der vermutlich als Calciumspeicher fungiert, scheint essentiell an diesen Prozessen beteiligt zu sein (Deller *et al.*, 2007).

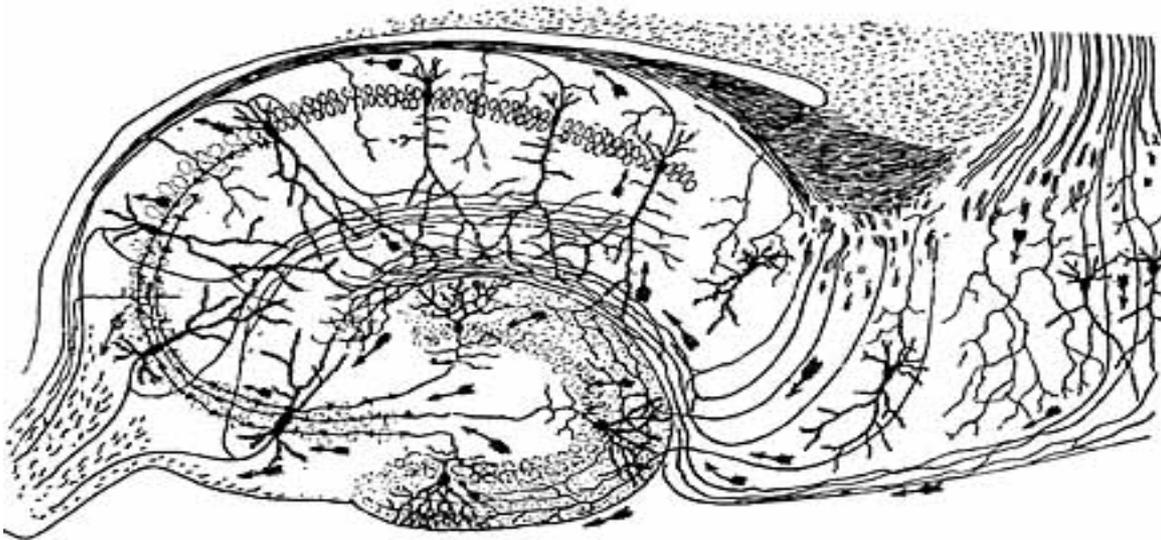
Mit dieser Arbeit soll an hippocampalen Dispersionskulturen der Ratte die Rolle des Calciums auf die Estrogen-vermittelte synaptische Plastizität untersucht werden und die Funktion der Aromatase näher erläutert werden.

### 2.2 Der Hippocampus der Ratte

Der Hippocampus gehört in seiner Gesamtheit zum limbischen System und zählt evolutionär zu den ältesten Strukturen des Gehirns.

Aufgrund der phylogenetischen Differenz der Ratte zum Menschen, bei dem der Hippocampus die mediale Randzone des Temporallappens bildet, befindet sich der Hippocampus der Ratte weiter kranial unmittelbar unter dem Kortex und durchzieht beide Hemisphären von rostral nach kaudal entlang einer C-förmigen Achse (Amaral und Wittwer, 1989).

Die Hippocampusformation der Nagetiere besteht aus sechs verschiedenen Strukturen, die denen des Menschen in ihrem histologischen Aufbau sehr ähnlich sind: Gyrus dentatus, Ammonshorn, Subiculum, Präsubiculum, Parasubiculum und entorhinaler Kortex. Das Ammonshorn wird nochmals in die Regionen Cornu ammonis 1 bis 3 (CA1-CA3) aufgeteilt.



**Abb. 1:** Zeichnung der neuronalen Verbindungen des Nagetier-Hippocampus von Santiago Ramón y Cajal (1911).

Der Gyrus dentatus und das Ammonshorn entsprechen dem phylogenetisch älteren Allocortex, der im Gegensatz zu dem sechsschichtigen Isocortex nur drei Schichten aufweist.

Histologisch besteht der überwiegende Teil der CA-Region aus Pyramidenzellen, so dass dieser Bereich als Stratum pyramidale bezeichnet wird. Auf der konvexen Seite wird das Stratum pyramidale vom Stratum oriens, durch die die Axone zum Fornix ziehen, und nach innen vom Stratum radiatum und Stratum lacunosum-moleculare begrenzt. Der Gyrus dentatus unterscheidet sich insofern von diesem histologischen Aufbau, als dass das Stratum pyramidale aufgrund seiner zahlreichen Körnerzellen hier als Stratum granulare bezeichnet wird (Benninghoff und Drenckhahn, 2004).

Weitere zelluläre Bestandteile des Hippocampus sind Gliazellen, wie Astrozyten, Oligodendrozyten und Mikroglia. Sie übernehmen die Aufrechterhaltung der Blut-Hirn-Schranke und versorgen die Neurone mit Nährstoffen.

Der trisynaptische Kreislauf bildet den Haupterschaltungsweg innerhalb des Hippocampus. Afferenzen erhält der Hippocampus aus dem entorhinalen Kortex, aber auch aus dem Thalamus, dem Subiculum, dem Gyrus cinguli und dem medialen Septum. Diese afferenten Fasern erreichen über den Tractus perforans die Dendriten der Körnerzellen im Gyrus dentatus (1. Synapse). Die Körnerzellen projizieren über ihre Axone, die Moosfasern, zu Pyramidenzellen der CA3-Region (2. Synapse) und gelangen schließlich über die Schaffer-Kollateralen zu CA1-Pyramidenzellen (3. Synapse). Die Axone der CA1-Pyramidenzellen ziehen entweder in Richtung des Fornix aus dem Hippocampus heraus oder projizieren zurück zum entorhinalen Kortex. Die im Fornix verlaufenden Efferenzen des Hippocampus enden, nachdem sie Teilfasern an das Septum, Corpus amygdaloideum und den Hypothalamus abgegeben haben, in die Corpora mamillaria. Hier werden die Impulse auf das Vicq d'Azyr-Bündel umgeschaltet, das zum Nucleus anterior thalami zieht. Dieser projiziert zur Rinde des Gyrus cinguli. Die Faserbündel des Cingulums ziehen zurück zum Hippocampus, wodurch sich der so genannte Papez-Neuronenkreis schließt. Papez (1937) und später auch Klüver und Bucy (1939) stellten die Theorie auf, dass dieser Erregungskreis die Affektgestaltung maßgeblich beeinflusst und somit das neuroanatomische Korrelat bei der Ausbildung von Emotionen, Lern- und Gedächtnisprozessen darstellen könnte.

Als Teil des limbischen Systems ist der Hippocampus an allen neuronalen Vorgängen, die das Verhalten bestimmen und bei emotionalen Zuständen ablaufen, beteiligt. Als wichtigste Schaltstelle nimmt er Einfluss auf verschiedene vegetative Körperfunktionen, wie z.B. auf das Wachsein, Schlafen, Erregung und Aufmerksamkeit.

Der Hippocampus verfügt über die Fähigkeit neue Verbindungen zwischen bestehenden Nervenzellen, aber auch neue Neurone zu schaffen, die sog. Synapto- bzw. Neurogenese (Altman *et al.*, 1965). Diese Funktion ist eng mit dem Erwerb von Gedächtnisinhalten verknüpft und bildet somit die Basis der synaptischen Plastizität.

Erkrankungen des Hippocampus haben in der Regel weitreichende Konsequenzen. Es wurde herausgefunden, dass Erkrankungen des schizophrenen Formenkreises sowie Morbus Alzheimer durch Störungen hippocampaler Strukturen hervorgerufen werden. Da der Hippocampus der Teil des Gehirns mit der höchsten Krampfbereitschaft ist, führen dortige Veränderungen häufig zu Epilepsieerkrankungen.

## 2.3 Spines

Spines sind kleine, dornenähnliche Protrusionen, die an den Dendriten hippocampaler Neurone zu finden sind. Sie bilden das postsynaptische Element der Mehrheit exzitatorischer Synapsen (Gray, 1959). Als Ausstülpung der Dendritenmembran vergrößern Spines erheblich die neuronale Fläche, die für synaptische Kontakte zur Verfügung steht.

Grundsätzlich verfügen alle Spines über einen ähnlichen Aufbau. Sie bestehen aus einem ovalen Bulbus, der an einem gestielten engen Halsteil aus dem Dendritenschaft hervor wächst (Gray, 1959; Nimchinsky *et al.*, 2002). Morphologisch lassen sich kurze (stubby), dünne (thin) und pilzförmige (mushroom shaped) Spines unterscheiden, wobei letztgenannte aufgrund ihrer Funktion auch als „memory Spines“ bezeichnet werden.

Dendritische Spines besitzen durch ein spezielles Zytoskelett die Fähigkeit, mit einer hohen Dynamik ihre Morphologie zu verändern (Segal, 2005). Als Hauptbestandteil dieses Zytoskeletts konnte in großen Mengen Aktin nachgewiesen werden (Fifková und Delay, 1982; Matus *et al.*, 1982; Fifková, 1989). Fischer *et al.* (1998) beobachteten an Spines lebender Neurone, dass sich ihre Form innerhalb von Sekunden verändern kann. Aufgrund dieser vermutlich Aktin-vermittelten Fähigkeit stellten Matsuzaki *et al.* (2001, 2004) die Hypothese auf, dass Spines das morphologische Korrelat des Gedächtnisses darstellen.

Viele Vorgänge, die die Funktion und Aktivität von Aktin steuern, sind Calcium-abhängig. Durch Veränderung des intrazellulären Calciumspiegels kann die Aktin-abhängige Beweglichkeit und Stabilität der Spines koordiniert werden (Fifková 1989; Holcman *et al.*, 2004; Oertner *et al.*, 2005; Segal *et al.*, 2005). 1998 hat Berridge herausgefunden, dass die Spineform und die Calciumkonzentration in gegenseitiger Wechselwirkung zueinander stehen. Zum einen bewirkt eine hohe Calciumkonzentration eine Spinelängenzunahme, zum anderen beeinflusst die Spineform die Kinetik des Calciumeinstromes in den Spine. Ihre spezifische Form ermöglicht es dem Spine bei einer Erregung eine schnelle isoliert transitorische Calciumerhöhung im Spinekopf zu gewährleisten, ohne dass Calcium in den benachbarten Spine entweicht. Der langsame Abfall der Calciumkonzentration verläuft über Diffusion in den Spinehals oder über Calciumpumpen nach extrazellulär.

## 2.4 Spineapparat und Synaptopodin

In durchschnittlich 20% aller dendritischen Spines des Hippocampus findet man einen Spineapparat bestehend aus aufeinander geschichteten, glatten endoplasmatischen Retikulum (SER) mit dazwischen liegendem elektronenmikroskopisch dichtem Material (Spacek und Harris, 1997; Deller *et al.*, 2003).

Die meisten Spineapparate pro Spine finden sich in den großen, ausdifferenzierten mushroom Spines, den so genannten „memory Spines“. In 80% dieser Spines der CA1-Region adulter Ratten kommt ein Spineapparat vor (Spacek *et al.*, 1997).

Die Funktion des Spineapparates in Neuronen ist bis heute nicht genau bekannt. Es wird vermutet, dass es sich um einen intrazellulären Calciumspeicher handelt (Svoboda und Mainen, 1999), der unter erhöhter Exzitation Calcium aus seinen Speichern freisetzt (Calcium-vermittelte Calciumfreisetzung; Emptage *et al.*, 1999). Außerdem scheint der Spineapparat essentiell an Prozessen der synaptischen Plastizität beteiligt zu sein, da häufig seine Rolle in der Synthese und Modifikation von Proteinen diskutiert wird (Pierce *et al.*, 2001; Steward und Schuman, 2001). Für diese These spricht, dass sich nach einer induzierten Läsion des entorhinalen Kortex im Hippocampus der Ratte eine deutliche Verringerung von Spineapparaten findet, da vermutlich die verminderte neuronale Aktivität der einstrahlenden Afferenzen zu einer Degeneration von Spineapparaten führt (Deller *et al.*, 2006).



**Abb. 2:** Elektronenmikroskopische Aufnahme eines Spineapparates im Stratum radiatum der CA1-Region einer Organoidkultur des Hippocampus der Ratte (→ kennzeichnet den Spineapparat).

Die Ausbildung der elektronendichten Platten zwischen den Lamellen des Spineapparates in den Neuronen ist an das Protein Synaptopodin gekoppelt, welches in 95% der Spines mit Spineapparat vorhanden ist (Bas Orth *et al.*, 2005).

Synaptopodin ist ein 100 kDa großes, Prolin reiches (20%) Protein, das erstmals 1997 von Mundel in renalen Podozyten beschrieben wurde. In das Zytoskelett entlang der Aktinmikrofilamente eingebunden, koordiniert es den kontraktilen Apparat der Podozytenfüßchen (Mundel *et al.*, 1997).

Lokalisiert ist es im Gehirn neben dem Hippocampus im Bulbus olfactorius, im cerebralen Kortex und im Striatum. Da es sich nicht im Kleinhirn und in anderen Regionen des ZNS nachweisen lässt, muss man davon ausgehen, dass seine Expression auf telencephale Strukturen beschränkt bleibt. Im Hippocampus findet man Synaptopodin vor allem in den dendritischen Spines des Cornu ammonis und des Gyrus dentatus und es ist dort im Spinehals mit dem Spineapparat assoziiert (Mundel *et al.*, 1997; Deller *et al.*, 2000). Sowohl die messenger RNA (mRNA) von Synaptopodin, als auch das Protein selbst sind jedoch nicht nur in den Dendriten, sondern auch im Zellkörper von Neuronen zu finden.

Synaptopodin scheint essentiell für die Bildung des Spineapparates zu sein, da bei der Synaptopodin-Knockout-Maus, welche homozygot für eine spezielle Synaptopodindeletion ist, kein Spineapparat in den dendritischen Spines nachweisbar ist (Deller *et al.*, 2003). Deller *et al.* (2003) konnten an dieser Knockout-Maus zeigen, dass Synaptopodin scheinbar für die Ausrichtung der elektronendichten Platten zwischen Lamellen des Spineapparates verantwortlich ist. Auf die Spinedichte, -anzahl oder -länge hat die Synaptopodindeletion hingegen keine Auswirkung. Interessanterweise kam es zu einer Reduktion hippocampaler Langzeitpotenzierung (LTP), wodurch diese Mäuse vermutlich bei Lern- und Verhaltenstests ein schlechteres Ergebnis erzielten als die Kontrollgruppe. Synaptopodin scheint somit über seine Assoziation zum Spineapparat einen essentiellen Faktor zur Ausbildung einer LTP zu spielen. Diese These wird gestützt durch Untersuchungen von Spacek (1985). Er beschrieb, dass sich im Kleinhirn keine LTP induzieren ließen, was auf die fehlende Expression von Synaptopodin und damit auch auf das Fehlen des Spineapparates zurückzuführen sein könnte. Nach einer stattgefundenen LTP im Hippocampus kann eine verstärkte Expression von Synaptopodin (Yamazaki *et al.*, 2001; Fukazawa *et al.*, 2003), sowie eine *de novo* Ausbildung dendritischer Spines (Engert und Bonhoeffer, 1999) beobachtet werden, was die potentielle Rolle von Synaptopodin in der synaptischen

Plastizität nahe legt. Die Hochregulation von Synaptopodin ist von einer verstärkten Expression von Aktin begleitet. Wie in der Niere, tritt Synaptopodin auch im ZNS kolokalisiert mit Aktin auf, da die Verteilung von Synaptopodin im Spine den Regionen mit einem hohen Aktin Gehalt entspricht (Mundel *et al.*, 1997; Kaech *et al.*, 2001; Asanuma *et al.*, 2005). Wyszynski (1998) und Racca (2000) fanden heraus, dass über Aktin der Spineapparat ebenfalls mit dem N-Methyl-D-Aspartat-Rezeptor (NMDA) verbunden ist. Die Aktivierung dieses Rezeptors führt über einen intrazellulären Calciumeinstrom und verschiedene Second messenger Prozesse zu einer erhöhten Proteinbiosynthese und schließlich zu Synapsenveränderungen, dem morphologischen Korrelat einer LTP. Somit sind die Veränderungen von Synaptopodin, dem Spineapparat, der LTP und schließlich der synaptischen Plastizität vermutlich Calcium-abhängig.

## **2.5 Langzeitpotenzierung und synaptische Plastizität**

Bereits 1949 beschrieb Hebb, dass die Speicherung von Gedächtnisinhalten auf eine Veränderung der Stärke synaptischer Verbindungen und auf Bildung neuer Synapsen beruhen muss („The organization of behaviour“, 1949). Die so genannte Langzeitpotenzierung - long term potentiation (LTP) - wurde später als Grundlage dieser Aussage gefunden. Dabei kommt es durch wiederholte Reizdarbietungen zu einer Verstärkung der synaptischen Effektivität und schließlich zu strukturellen Veränderungen.

In der späten Phase einer LTP (I-LTP) kommt es zu einer veränderten Genexpression und zu verstärkter Proteinbiosynthese. Dies führt sowohl zu einer Stabilisierung vorhandener neuronaler Synapsen, als auch zur vollständigen Neubildung. Verschiedene Autoren deuten diese Veränderungen als Grundlage der Informationsspeicherung im ZNS (Collin *et al.*, 1997; Muller *et al.*, 2000; Martin *et al.*, 2000). Welche Mechanismen genau zur Induktion einer LTP führen bedarf weiterer Forschung. Bekannt ist jedoch, dass Estrogene über ein verstärktes Spinewachstum, über die Senkung des Schwellenwertes einer LTP und über eine relative erhöhte NMDA-Rezeptoraktivität eine LTP begünstigen (Good *et al.*, 1999, Zamani *et al.*, 2000).

## 2.6 Estrogene im Hippocampus

### 2.6.1 Estrogensynthese

Estrogene sind Steroidhormone mit 18 C-Atomen, die aus Androgenen synthetisiert werden. Bereits 1971 fand Naftolin heraus, dass das Gehirn, so auch der Hippocampus, über eine eigenständige lokale Steroidbiosynthese verfügt, da nach Entfernung der Gonaden Estrogene im ZNS nachweisbar waren.

Ausgangssubstanz aller Steroide ist das Cholesterol, das von Neuronen selbst produziert werden kann (Saito *et al.*, 1987; Vance *et al.*, 1994). Cholesterol wird zunächst in den Mitochondrien durch das Trägerprotein steroidogenic acute regulatory protein (StAR) zur inneren Mitochondrienmembran transportiert. Dort wird es mit Hilfe der Desmolase zu Pregnenolon hydroxyliert, was den geschwindigkeitsbestimmenden Schritt der Estrogensynthese darstellt (Sugawara *et al.*, 1996).

Die weitere Synthese erfolgt im endoplasmatischen Retikulum, wo über verschiedene Zwischenschritte Testosteron produziert wird. Durch die Abspaltung der Methylgruppe C19 und Aromatisierung des Ringes A erfolgt schließlich die Synthese von 17 $\beta$ -Estradiol, dem wirksamen Steroid. Schlüsselenzym dieser Katalyse von Estradiol aus Testosteron ist die Aromatase (Cytochrom P450aro).

### 2.6.2 Aromatase

Die Aromatase, ein Enzym der Cytochrom P450 Familie (CYP19), katalysiert irreversibel die Synthese von Estrogen aus Testosteron.

Lokalisiert ist sie im endoplasmatischen Retikulum Estrogen produzierender Zellen in verschiedensten Geweben des Körpers, so auch im Gehirn. Bereits vor mehr als 30 Jahren wurde herausgefunden, dass neben dem Hypothalamus, der Amygdala und Bereichen des Neokortex auch der Hippocampus über eine eigene Aromataseaktivität verfügt. Hier ist die Aromatase besonders in den Synapsen der CA3-Region und entlang der post-synaptic density (PSD) zu finden (Naftolin *et al.*, 1971, 1975; MacLusky *et al.*, 1985; Prange-Kiel *et al.*, 2006). In unseren Kulturen konnte Aromataseaktivität immunocytoologisch in den Zellsomata, sowie den hippocampalen Dendriten nachgewiesen werden. Kürzlich konnte die Aromatase im Hippocampus auch in prä- und postsynaptischen Regionen von Pyramiden- und Körnerzellen dokumentiert werden (Hojo *et al.*, 2004; Mukai *et al.*, 2006). Naftolin *et al.* (1975) stellten die Hypothese auf,

dass die Divergenz der Aromatase-lokalisierung im Gehirn zu unterschiedlichen neuroendokrinen Funktionen der verschiedenen Bereiche führt.

Reguliert wird die Aromataseaktivität in Abhängigkeit von der intrazellulären Calciumkonzentration durch die Calmodulin-Kinase, sowie durch die Proteinkinasen A und C. Durch den NMDA- und AMPA-vermittelten Calciumeinstrom werden diese Calcium-abhängigen Kinasen stimuliert und bewirken durch die Phosphorylierung des Enzyms eine Herunterregulation der Aromataseaktivität innerhalb von Minuten (Balthazart *et al.*, 2006).

Durch Zugabe des reversiblen Aromataseinhibitors Letrozol kann die endogene Estrogensynthese der Zellen unterdrückt werden (Prange-Kiel *et al.*, 2003). Letrozol hat keine agonistischen Effekte, wie es bei anderen Antiestrogenen beobachtet wurde (Nilsson und Gustafsson, 2002).

Die Aromatase scheint essentiell an der synaptischen Plastizität mitzuwirken. So konnte gezeigt werden, dass die Aromatase-Knockout-Maus eine reduzierte Anzahl von Spines und Spinesynapsen aufweist (Kretz *et al.*, 2004). Ferner wird die Aromatase nach neuronalen Traumata verstärkt exprimiert, was einen weiteren Hinweis geben könnte (Suzuki *et al.*, 2006). Diese These stützt, dass unter Anwesenheit eines Aromataseinhibitors keine LTP ausgelöst werden können (Glassmeier *et al.*, 2008, in press)

### 2.6.3 Estrogeneffekte im ZNS

Prange-Kiel *et al.* (2003) stellten fest, dass es sich bei der Estrogensynthese in hippocampalen Dispersionskulturen, wie sie in der vorliegenden Arbeit verwendet wurden, um eine *de novo* Synthese aus Cholesterol handelt, da Estrogene in einem primär steroidfreien Medium nachgewiesen werden konnten.

Zwei Formen von Estrogenrezeptoren (ER $\alpha$  und ER $\beta$ ) sind bekannt. Die mRNA dieser Rezeptoren konnte mittels *in situ* Hybridisierung in Slice- und Dispersionskulturen nachgewiesen werden und befindet sich somit in den untersuchten Präparaten (Wehrenberg *et al.*, 2001; Prange-Kiel *et al.*, 2003).

ER $\alpha$  und ER $\beta$  gehören zur Familie der Steroidhormonrezeptoren und wirken über den für sie typischen Genregulationsmechanismus. Der Estrogenrezeptor liegt im Zytoplasma in einer inaktiven Form vor und bewegt sich nach Bindung durch seinen spezifischen Liganden in den Nukleus. Dort induziert er die Transkription verschiedener

Gene durch Bindung an ein estrogen response element der DNA. Die Synthesezeit kann zwischen Stunden und ca. einem Tag dauern.

Demgegenüber werden Second messenger gesteuerte schnelle Mechanismen der Estrogenwirkung diskutiert. *In vitro* Versuche mit hippocampalen Slicekulturen zeigten unter Estrogenstimulation zunächst einen Anstieg der NMDA- und AMPA-Rezeptoraktivität und schließlich eine Erhöhung der LTP binnen Sekunden (Kim *et al.*, 2002). Diese schnellen Effekte werden wahrscheinlich über einen membrangebunden Estrogenrezeptor vermittelt, der G-Protein-gekoppelt verschiedene Proteine phosphoryliert und somit die strukturelle Umsetzung der Estrogenantwort bewirkt (Qui *et al.*, 2003).

Die Wirkung von Estrogen ist vielfältig und kann hier nicht detailliert beschrieben werden. Bezogen auf Spines bewirken Estrogene am Hippocampus unter anderem einen Zuwachs der Spinedichte und -anzahl (Segal und Murphy, 1999, 2001; McEwen, 2001, 2004). Endogenes Estradiol reguliert sowohl die Neurogenese, als auch apoptotische Vorgänge im Hippocampus und ist ein essentieller Faktor für den Synapsenerhalt.

Seit einigen Jahren wird vermutet, dass diese Estrogenwirkung Calcium-vermittelt abläuft. So beschrieben Zhao *et al.* (2005), dass es nach  $17\beta$ -Estradiolgabe zu einem signifikanten Calciumeinstrom in hippocampale Spines kommt. Ferner wurde ein GPR30-Estrogenrezeptor beschrieben, der in der Wand des endoplasmatischen Retikulums lokalisiert ist und nach Stimulation durch Estrogen Calcium aus seinen Speichern freigibt (Revankar *et al.*, 2005; Funakoshi *et al.*, 2006).

Nach einer Verletzung neuronalen Gewebes kommt es zu einer Hochregulation der lokalen Aromatase, was ein Hinweis für die neuroprotektive Wirkung von Estrogenen, aber auch der Aromatase selbst sein kann (Garcia-Segura *et al.*, 2001; Azcoitia *et al.*, 2001). So sollen Estrogene durch Induktion der Synaptogenese positiv bei Morbus Alzheimer sowie Erkrankungen des schizophrenen Formenkreises wirken und das Neuritenwachstum nach epileptischen Anfällen beschleunigen (Garcia-Segura *et al.*, 2001; Ryan *et al.*, 2008; Singh *et al.*, 2008).

## 2.7 Calcium im Hippocampus

Calcium ( $\text{Ca}^{2+}$ ) ist einer der wichtigsten Second messenger der Zelle. Wie bereits erwähnt, scheint es eine entscheidende Rolle bei der Regulation der Spinemotilität, der LTP-Induktion und schließlich der synaptischen Plastizität im Hippocampus zu spielen

(Frenguelli *et al.*, 1996; Schulz *et al.*, 1997). Aber auch zahlreiche zelluläre Funktionen, wie z.B. Hormonsekretion, Zellproliferation, Genexpression, Apoptose und Muskelkontraktion werden durch dieses Kation gesteuert (Kennedy, 1989; Meyer, 1991; Berridge, 2003).

Für die zuverlässige Ausführung seiner Aufgaben ist generell die Regulation der freien intrazellulären Calciumionenkonzentration ( $[Ca^{2+}]_i$ ) entscheidend. Im hippocampalen Spine kann diese auf verschiedenen Wegen sowohl von extrazellulär, als auch durch Entleerung intrazellulärer Speicher gesteuert werden. Für den Einstrom aus dem Extrazellulärraum sind membranöse Calciumkanäle bedeutsam, die entweder auf Spannungsänderungen - voltage operated calcium channel (VOCC) -, auf eine Änderung der Calciumionenkonzentration im endoplasmatischen Retikulum - store operated calcium channel (SOCC) - oder auf die Bindung eines spezifischen Liganden, wie z.B. Glutamat (receptor operated calcium channel, ROCC), reagieren.

Aus intrazellulären Speichern kann Calcium durch Aktivierung eines Inositol-1,4,5-trisphosphat-Rezeptors (IP3) bzw. eines Ryanodinrezeptors (RyR) freigesetzt werden (Yuste *et al.*, 2000; Korkotian und Segal, 2006). Hier spricht man von einer Calcium-induzierten Calciumfreisetzung, da diese Rezeptoren selbst durch Calcium aktiviert werden (CICR- Emptage *et al.*, 1999).

Nach der Depolarisation gelangen ca. 20% des freigesetzten Calciums durch aktiven Transport entweder über  $Na^+/Ca^{2+}$ -Austauscher oder über  $Ca^{2+}$ -ATPasen der Plasmamembran - plasma membrane calcium ATPase (PMCA) - aus der Zelle heraus in den Extrazellulärraum (Carafoli, 1994). Die restlichen 80% des freigesetzten Calciums werden über eine sarkoendoplasmatische Retikulum Calcium ATPase (SERCA) aktiv in das endoplasmatische Retikulum aufgenommen. Zu den pharmakologischen Hemmstoffen der SERCA zählt unter anderem das Pflanzenextrakt Thapsigargin (Thastrup *et al.*, 1990).

### 2.7.1 Thapsigargin

Thapsigargin ist ein Sesquiterpen-Lakton aus der Pflanze *Thapsia garganica* (Hakii *et al.*, 1986). Es hemmt als potenter Inhibitor des katalytischen Zyklus bereits in niedrigsten Dosen spezifisch die  $Ca^{2+}$ -ATPasen des endoplasmatischen- und des sarkoplasmatischen Retikulums (SERCA4) und blockiert somit die Wiederaufnahme des freigesetzten Calciums. Über eine initiale Entleerung der intrazellulären Speicher

mit zytosolischem Calciumanstieg führt Thapsigargin durch eine Hemmung der Wiederaufnahme von Calcium zu einer Blockade des intrazellulären Calcium-Release (Behnisch und Reymann, 1995; Kovalchuk *et al.*, 2000). Die Funktion der Calciumkanäle bleibt dabei unbeeinträchtigt (Nelson *et al.*, 1994). Bei sehr hohen Konzentrationen ( $10^{-5}$  M) wirkt es stark apoptotisch (Takemura *et al.*, 1989).

Die Bedeutung der intrazellulären Calciumfreisetzung für die Induktion von LTP wird in einer Arbeit von Matias (2002) verdeutlicht: Nach Thapsigargin-Behandlung konnte eine deutliche Reduzierung tetanisch evozierter Calciumströme in der CA1-Region gemessen und somit eine LTP-Induktion effektiv verhindert werden. Dies zeigt, dass die Ausbildung der LTP auf eine Calciumfreisetzung aus intrazellulären Calciumspeichern angewiesen ist.

### **2.7.2 plasma membrane calcium ATPase**

Die plasma membrane calcium ATPase (PMCA) ist ein 134 kDa großes Protein, das nach einer Stimulation unter ATP-Verbrauch den Transport von Calcium aus dem Zytoplasma nach extrazellulär katalysiert, um das zytosolische Ruhemembranpotential wiederherzustellen.

Bei Ratten werden im Gegensatz zum Menschen, der vier Isoformen besitzt, drei Isoformen exprimiert, wobei PMCA1 am häufigsten im Hippocampus vertreten ist (Stahl *et al.*, 1992; Zacharias *et al.*, 1997). Das unterschiedliche Verteilungsmuster der Isoformen ist wahrscheinlich auf die spezifischen Anforderungen der jeweiligen Calciumhomöostase zurückzuführen.

Reguliert wird PMCA unter anderem über das Signalprotein Calmodulin, welches bei hohen intrazellulären Calciumspiegeln die PMCA-Aktivität steigert (Osborn *et al.*, 2004). In Nierenzellen konnten Dick *et al.* (2003) zeigen, dass PMCA ebenfalls durch  $17\beta$ -Estradiol induziert werden kann.

Häufig werden neuroprotektive Aspekte von PMCA diskutiert. So haben Wanigasekara *et al.* (2006) herausgefunden, dass PMCA die Calcium-vermittelte Zytotoxizität reduziert und die Abwesenheit von PMCA folglich zur Apoptose führt.

## 2.8 Arbeitshypothese und Fragestellung

Der Hippocampus ist unter anderem durch seine Fähigkeit zur Synapto- und Spinogenese eng mit der synaptischen Plastizität verknüpft. Spineapparate scheinen im Hippocampus essentiell bei der synaptischen Plastizität mitzuwirken (Pierce *et al.*, 2001; Deller *et al.*, 2003). Da Synaptopodin exklusiv an den Spineapparat bindet, kann es als Marker für das Vorhandensein des Spineapparates verwendet werden.

Durch verschiedene Vorarbeiten in unserem Labor wissen wir, dass es durch Hemmung der Aromatase zum Verlust von Spineapparaten kommt. Ferner wird diskutiert, dass der Spineapparat als Calcium speichernde Zellorganelle eine wichtige Funktion bei der Calciumhomöostase des Spine ausübt.

Um diesen Zusammenhang zwischen der Calciumhomöostase, der Estradiolsynthese, und der synaptischen Plastizität im Hippocampus näher zu untersuchen, soll in dieser Dissertation untersucht werden, ob in neuronalen Dispersionskulturen:

1. die Synaptopodinexpression unter dem regulatorischen Einfluss von Estradiol steht?
2. die Synaptopodinexpression unter dem regulatorischen Einfluss von intrazellulär freigesetztem Calcium steht?
3. die Aromataseexpression unter dem regulatorischen Einfluss von intrazellulär freigesetztem Calcium steht?
4. die PMCA durch den Estradiolspiegel reguliert wird?

### 3 Material

#### 3.1 Arbeitsmaterialien, Geräte und Software

Adobe Photoshop 7.0 (Software)	Adobe
Aluminiumfolie	Lager UKE
Brutschrank WTC	Binder
Cutfix Surgical Disposable Scalpel, Skalpell	Braun
Deckgläser, 24 x 32 mm	Marienfeld
PC/Macintosh-Systeme	verschiedene Hersteller
Einmalspritzen, verschiedene Größen	Braun
Excel 2003 (Software)	Microsoft
epTIPS Standard, verschiedene Größen	Eppendorf AG
Falcon Cell Strainer, 40 µm Nylon	Becton Dickinson Labware
Falcon Tissue Culture Plate, 24 Well	Becton Dickinson Labware
Falcon Tubes, 15 ml und 50 ml	Becton Dickinson Labware
Gefrierschrank, -25°C und -80°C	Liebherr
Handschuhe	Kimberly-Clark
Heidemannspatel	Aesculap de (Braun)
Histobond Adhäsions-Objektträger	Marienfeld
ImageTool 3.0 (Software)	University of Texas Health Science Center/ San Antonio
Instrumentenkasten	Merck
Kosmetiktücher Samtes	Wepa
Kühlschrank, 4°C	Bosch
LSM 5 Image Browser (Software)	Zeiss
Mikroskop Axiovert 25	Zeiss
Mikroskop Axioskop 2, HBO100, MC80, EBQ100	Zeiss
Neubauer-Zählkammer: Tiefe 0,1 mm; 0,0025 mm <sup>2</sup>	Brand Germany
Openlab 3.1.5 (Software)	Improvision
Parafilm M	Pechiney Plastic Packaging
Pasteurpipetten, 25 cm	Merck
Phasenkontrastmikroskop	Leitz
Pinzette nach Dumont	Merck
Pipetten, diverse	Gilson
Pipettenspitzen 5 ml, 10 ml und 25 ml	Becton Dickinson Labware

Reaktionsgefäße 3810X, 1,5 ml	Eppendorf AG
Rüttler	Bühler, Labortechnik
Schere	Aesculap de (Braun)
Sicherheitswerkbank der Stufe 2	Heraeus
SPSS für Windows (Software)	SPSS GmbH Software
Vortex-Genie 2	Scientific Industries
Waage	Sartorius
Wasserbad mit Schüttler	GFL
Windows XP, Word 2000 (Software)	Microsoft
Zellstofftücher	Wepa
Zentrifuge Universal 32R und EBA1R	Hettrich

### 3.2 Chemikalien

albumin, bovine serum (BSA), A7906	Sigma
Alexa Fluor 488, monoklonal, goat anti-mouse	Molecular Probes
Alexa Fluor 488, polyklonal, goat anti-rabbit	Molecular Probes, Invitrogen
Aqua ad iniectabilia, 1 Liter	Baxter Deutschland
Aromatase, polyklonal, Host: rabbit	Azcoitia, Madrid
B27 Supplement	Gibco/Invitrogen
Barrycidal 36, Desinfektionsmittel	Helmut Schröder
17 $\beta$ -Estradiol-Water soluble, 100 mg, E4389	Sigma
basic fibroblast growth factor (bFGF), Human Rekombinat	Strahtmann
Cy3, monoklonal, goat anti-mouse	Jackson Immuno Research
Cy3, polyklonal, goat anti-rabbit	Jackson Immuno Research
DakoCytomation Fluorescent Mounting Medium	DakoCytomation
DAPI	Sigma
Ethanol 70% und 96%	Apotheke UKE
Formaldehydlösung 37%	Merck
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Merck
L-Glutamin, 200 mM	Gibco/Invitrogen
Letrozol	Novartis
MAP2, polyklonal, Host: rabbit	Chemicon

Neurobasal A Medium mit und ohne Phenolrot	Gibco/Invitrogen
normal goat serum (NGS)	Sigma
nerve growth factor 2.5S (NGF 2.5S)	Gibco/Invitrogen
PBS Tabletten	Gibco/Invitrogen
Penicillin/ Streptomycin 15140-122	Gibco/Invitrogen
PMCA, monoklonal, clone 5F10, Host: mouse	Upstate Biotechnology
Poly-d-Lysin, P-6407	Sigma
Synaptopodin, monoklonal, Host: mouse	Progen Biotechnik
Cat.No.65194	
Thapsigargin, T9033	Sigma
Triton- X-100	Merck
Trypsin/EDTA, L2163	Biochrom
TUNEL Kit, Cat. No. 11 684 795 910	Roche

### 3.3 Lösungen

#### **bFGF (human basic fibroblast growth factor)**

- 50 µg bFGF in 2,5 ml Aqua dest. lösen und in 50 µl Tubes aliquotierten
- 50 µl aliquotiertes bFGF in 50 ml Neurobasal lösen
- Bei -25°C lagern

#### **BSA (bovine serum albumin)**

- 3% BSA in PBS (pH 7,4)

#### **Fixierung**

- 3,7% Formaldehyd PBS (pH 7,4)

#### **Kulturmedium für Dispersionskulturen**

- 50 ml Neurobasal A
- 500 µl Penicillin / Streptomycin
- 500 µl B27
- 125 µl L-Glutamin
- 50 µl bFGF

**NGS (normal goat serum)**

- 2% NGS in PBS (pH 7,4)

**PBS (phosphate buffered saline)**

- 8 g NaCl
- 0,2 g KCl
- 1,44 g Dinatriumhydrogenphosphat
- 0,2 g Kaliumhydrogenphosphat
- in 1 Liter Aqua dest. (pH 7,4) bei Raumtemperatur

alternativ:

- 500 ml Aqua dest. (pH 7,4)
- 1 PBS Tablette
- Titration bis pH 7,4 mit NaOH (1 mol/l) bzw. HCL (1 mol/l)

**Thapsigargin**

- 1 mg Thapsigargin in 1,54 ml Ethanol auflösen
- diese Lösung 1:100 mit PBS verdünnen ( $10^{-5}$  M)

## 4 Methoden

### 4.1 Präparation der hippocampalen Dispersionskultur

Die Präparation der hippocampalen Dispersionskultur erfolgte unter semisterilen Bedingungen an fünf Tage alten Ratten des Zuchtstammes WISTAR. Pro Versuchsreihe verwendete man im Durchschnitt zehn Ratten. Die Ratten wurden in der spezifisch pathogenfreien Einrichtung (SPF) des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf gezüchtet und unter Berücksichtigung des deutschen Tierschutzgesetzes behandelt.

Zunächst wurden die Ratten decapitiert und die Haut über der Schädelkalotte von dorsal nach ventral entfernt. Mit einer feinen Schere eröffnete man das Schädeldach median-sagittal und fixierte es seitlich mit den Fingern, um keine cerebralen Strukturen zu verletzen. Das so freipräparierte Gehirn wurde mit Hilfe eines Heidemann-Spatels entnommen und auf einen mit PBS getränkten, sterilen Schwamm gelegt.

Anschließend wurden Hirnstamm und Kleinhirn mit einem Skalpell entfernt und beide Hemisphären sagittal voneinander getrennt. Nach Entfernung des Mittelhirns konnte der freiliegende Hippocampus mit einem Heidemann-Spatel herauspräpariert werden. Dieser wurde in auf Eis gekühlte PBS-Lösung gegeben, um Ischämieschäden zu verringern.

### 4.2 Hippocampale Dispersionskultur

Die Präparation der hippocampalen Dispersionskulturen wurde nach der Methode von G. J. Brewer (Brewer, 1997) mit Modifikation nach J. Prange-Kiel (Prange-Kiel *et al.*, 2003) unter sterilen Bedingungen durchgeführt.

Einen Tag vor der Präparation wurde in jede Kavität einer 24 Well Platte ein Glasplättchen gegeben und mit je 600 µl Poly-d-Lysin beschichtet. Nach einer Stunde wurde das Poly-d-Lysin mit einer Pipette entfernt und die Kavitäten mit Neurobasal A gespült. Über Nacht ließ man die Platten unter der Sicherheitswerkbank bei Raumtemperatur trocknen.

Durch mehrmaliges Spülen der Hippocampi mit PBS ließ sich überschüssiges Gewebe und Erythrozyten entfernen. Die gespülten Hippocampi wurden zunächst in einer Petri-Schale mit einer Klinge zerkleinert und anschließend mit 25 ml PBS in ein 50 ml Falconröhrchen überführt. Diese Zellsuspension wurde bei 4°C mit 5000 U/min für fünf Minuten zentrifugiert.

Der entstandene Überstand wurde verworfen. Zum Pellet wurde pro Hippocampus 500 µl vorgewärmtes Trypsin/EDTA (37°C) gegeben und unter mehrmaligem Schütteln alle 30 Sekunden in einem 37°C warmen Wasserbad für zweieinhalb Minuten inkubiert. Der Verdauprozess ermöglichte es den Zellen sich aus ihrer extrazellulären Matrix voneinander zu lösen. Durch Zugabe von 25 ml Neurobasal A wurde dieser Prozess gestoppt und die Zellsuspension durch ein 40 µm Nylonsieb (Cell Strainer) gegeben, um größere unverdaute Zellbestandteile zurückzuhalten.

Es folgten zwei weitere Zentrifugationen bei 4°C mit 5000 U/min für fünf Minuten. Der Überstand über dem Pellet wurde verworfen, durch 25 ml Neurobasal A Medium ohne Phenolrot ersetzt und resuspendiert. Phenolrot wurde nicht verwendet, da es im Verdacht steht, Estrogen ähnliche Wirkungen zu haben. Dieser Waschgang wurde einmal wiederholt.

Nach Durchmischung der Zellsuspension erfolgte die Bestimmung der Zellzahl mit Hilfe einer Neubauer-Zählkammer. Bei allen folgenden Versuchen wurde mit einer Zelldichte von 100.000 Zellen/ml gearbeitet. Jeweils 1 ml dieser Suspension (entspricht 100.000 Zellen) wurde nach vorherigem vortexen auf die mit Poly-d-Lysin beschichteten Glassplättchen in die Wells gegeben.

Die Zellkulturplatte wurde nun für eine Stunde bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> im Brutschrank inkubiert, um das Absetzen und Anheften der Zellen an den Glasplättchen zu ermöglichen. Nach einer Stunde überführte man die Glasplättchen mit den Zellen in ein neues Well, überschichtete dieses mit je 1 ml Neurobasal Kulturmedium und lagerte es im Brutschrank.

Nach 24 Stunden wurde die Platte zwei- bis dreimal mit jeder Längsseite gegen die Tischkante geklopft, um die Zelltrümmer zu lösen und anschließend das Kulturmedium gewechselt. Der weitere Wechsel des Kulturmediums erfolgte alle 48 Stunden.

Bei diesem Prozess ist eine Dispersionskultur entstanden, die zu 80% aus Neuronen und zu 12% aus Astrozyten besteht (von Schassen *et al.*, 2006).

### **4.3 Stimulation und Inhibition**

Nach drei Tagen Vorkultur (DIV) wurden die Zellen dreimal im Abstand von 48 Stunden stimuliert bzw. inhibiert.

In den Versuchen wurden die neuronalen Zellen der Dispersionskultur mit  $17\beta$ -Estradiol in einer Konzentration von  $10^{-7}$  M bzw. mit Letrozol  $10^{-7}$  M, einem reversiblen, nicht steroidal Aromataseinhibitor, behandelt.

Um die Auswirkung des SERCA-Hemmstoffs Thapsigargin konzentrationsabhängig sowohl auf die Expression von Synaptopodin, als auch auf die Expression von Aromatase zu simulieren, wurde zunächst 1 mg Thapsigargin mit Ethanol versetzt, um eine 1 mM Lösung zu erreichen. Diese wurde mit Neurobasal A (ohne Phenolrot) so verdünnt, dass man folgende Konzentrationen im Kulturmedium erhielt:  $10^{-6}$  M,  $10^{-7}$  M,  $10^{-8}$  M,  $10^{-9}$  M,  $10^{-10}$  M. In einigen Versuchsreihen wurde Thapsigargin zum Teil simultan mit  $17\beta$ -Estradiol ( $10^{-7}$  M) appliziert.

Die Stimulation bzw. Inhibition erfolgte an den Tagen vier, sieben, neun und endete am Tag elf nach der Präparation mit der Fixierung.

Zur exakten Auswertung wurden bei allen Experimenten unbehandelte Kulturen als Kontrollniveau mitgezüchtet, bei welchen jeweils nur das Kulturmedium ersetzt wurde.

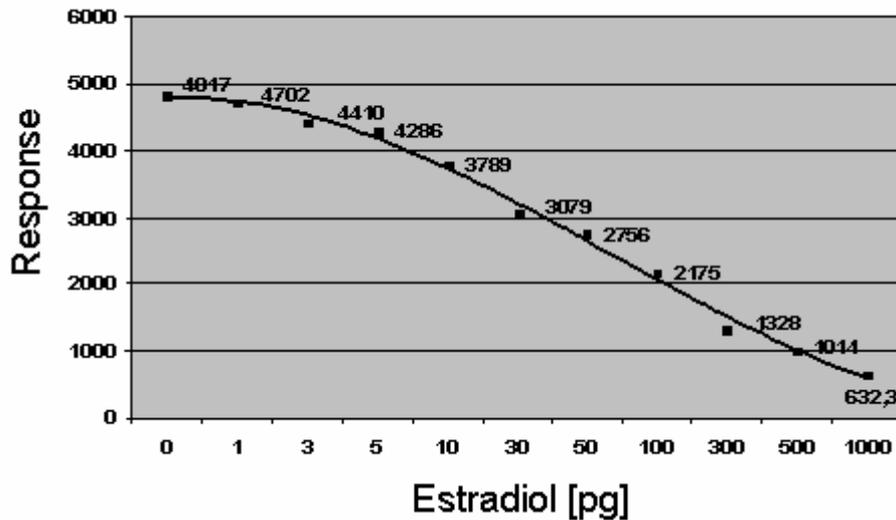
Nach dieser Stimulation wurde mittels Immunocytochemie die Wirkung auf die Expression von Synaptopodin, Aromatase und PMCA untersucht.

#### **4.4 Quantitative Estrogen-Bestimmung mittels Radioimmunoassay (RIA)**

Aufgrund seiner hohen Empfindlichkeit und Spezifität ermöglicht der RIA den Nachweis von Hormonen bis zu einer Konzentration von  $10^{-18}$  mol/l und ist somit für eine quantitative Bestimmung des Estrogengehaltes im Kulturmedium geeignet.

Dafür wurde bei jedem Mediumwechsel mindestens 8 ml Kulturmedium aufgefangen und eingefroren. Somit wurden über den Kulturzeitraum von 11 Tagen, jeweils einmal vor und dreimal mit der Stimulation Kulturmedium der Thapsigarginkonzentrationen  $10^{-7}$  M,  $10^{-8}$  M,  $10^{-9}$  M,  $10^{-10}$  M sowie der unstimulierten Kontrolle gesammelt. Die Proben wurden fortlaufend nummeriert und in einem Blindversuch mit einem Radioimmunoassay ausgewertet.

Um eine Standardkurve zu erstellen, wurde unbehandeltes Kulturmedium verwendet. Durch stufenweise Erhöhung der  $17\beta$ -Estradiolkonzentration (X-Achse) konnte mit Hilfe des Radioimmunoassays ein Responsewert (Y-Achse) ermittelt werden. Diese Standardkurve diente als Grundlage für die weiteren Messungen.



**Abb. 3:** Standardkurve als Grundlage für die weiteren quantitativen Estrogen-Bestimmungen.

Von jeder Probe wurden 5 ml Medium getrocknet und mit 250  $\mu$ l Peptid-Puffer versetzt. Mit Hilfe einer SEP-PAK C18 Säule wurde dem Medium  $17\beta$ -Estradiol entzogen und mit Methanol versetzt, um es anschließend mit dem RIA zu quantifizieren. Der RIA wurde unter Verwendung des Standardprotokolls durchgeführt und mit einem Gamma Counter analysiert.

#### 4.5 Fixierung der Dispersionskultur

Die Fixierung der hippocampalen Dispersionskultur erfolgte nach mikroskopischer Begutachtung, bei der Wachstum und interneuronale Verbindungen beurteilt wurden, elf Tage nach der Präparation.

Zunächst wurden hierfür eine 3,7%ige Formaldehydlösung in PBS angesetzt und jedes Well mit je 1 ml für zehn Minuten inkubiert. Im Anschluss wurde jede Kavität dreimal für jeweils fünf Minuten mit sterilem PBS gespült, wobei nach der letzten Spülung PBS in den Wells belassen wurde.

Die so fixierten Zellen wurden mit Parafilm umschlossen und waren für ca. drei Monate im Kühlschrank bei 4°C haltbar, sollten jedoch so schnell wie möglich verarbeitet werden.

## 4.6 Immuncytochemie der Dispersionskultur

Die Immuncytochemie wurde unter semisterilen Bedingungen durchgeführt. Zunächst wurde die Zellkultur einmal mit je 1 ml PBS pro Well gespült und anschließend bei Raumtemperatur mit 2%igem normal goat serum (NGS) blockiert, um unspezifische Immunreaktionen zu verhindern. Es wurde jeweils das Serum aus dem Tier verwendet, aus dem der Sekundärantikörper bestand. Das NGS wurde nach 30 Minuten durch eine Primärantikörperlösung ersetzt. Als Primärantikörper wurden Synaptopodin (monoklonal) unverdünnt und MAP2 (polyklonal 1:500 in Synaptopodin) verwendet und je 50 µl auf ein Glasplättchen gegeben, das zuvor auf einen Objektträger in eine Feuchtkammer überführt wurde. MAP2 diente zur Detektion neuronaler Zellen bei der anschließenden Bildauswertung. Während der 24 stündigen Inkubationszeit lagerte die Feuchtkammer bei 4°C im Kühlschrank. Zur Kontrolle der Immunhistochemie wurde jeweils eine Negativkontrolle durchgeführt, die ebenfalls mit PBS behandelt wurde, jedoch keinen Primärantikörper erhielt.

Am nächsten Tag wurden die Glasplättchen wieder in die 24 Well Platten zurückgeführt und dreimal fünf Minuten mit je 1 ml PBS gespült. Danach erfolgte die Inkubation mit je 250 µl pro Well des Sekundärantikörpers. Hierzu wurde ein monoklonaler Cy3-Antikörper (1:2 in Glycerol) in einer Verdünnung von 1:350 in PBS und ein polyklonaler Alexa Fluor 488-Antikörper im Verhältnis 1:500 in PBS verwendet. Die Kulturen wurden so eine Stunde bei Raumtemperatur in Dunkelheit inkubiert. Daraufhin wurde der Sekundärantikörper entfernt und dreimal fünf Minuten mit je 1 ml PBS gespült.

Die Kernfärbung erfolgte mit 500 µl DAPI (1:100.000 in PBS) je Well für drei Minuten. Nach abschließendem Spülen (dreimal fünf Minuten mit PBS) wurden die Glasplättchen aus den Kavitäten entnommen und auf die vorher beschrifteten Objektträger gelegt. Auf das Glasplättchen wurde ein Tropfen DakoCytomation Fluorescent Mounting Medium gegeben und mit einem Deckglas blasenfrei verschlossen. Die Objektträger konnten in lichtundurchlässigen Mappen ca. drei Monate im Kühlschrank gelagert werden.

Die beschriebene Vorgehensweise entsprach dem Standardprotokoll der vorliegenden Arbeit. Zum Nachweis der Aromataseexpression wurde dieses Schema geringfügig verändert. Die Blockung wurde mit 3%igem bovine serum albumin (BSA) in PBS durchgeführt. Es erfolgte eine Doppelinkubation mit Synaptopodin (monoklonal, unverdünnt) und Aromatase (polyklonal, 1:200 in Synaptopodin), die zeitgleich auf die

Dispersionskultur gegeben wurden. Als Sekundärantikörper verwendete man Cy3- (monoklonal, 1:700 in PBS) und Alexa 488-Antikörper (monoklonal, 1:500 in PBS), die in PBS angesetzt in einem Volumen von 250  $\mu$ l in jedes Well gegeben wurden.

Für den Nachweis der Expression von PMCA wurde ebenfalls, wie oben beschrieben, 2%iges NGS in PBS zur Blockierung verwendet. Als Primärantikörper setzte man eine Suspension aus PMCA (monoklonal) 1:750 und MAP2 (polyklonal) 1:500 in PBS an und inkubiert jedes Well mit 250  $\mu$ l. Nach 24 Stunden gab man Alexa 488- (monoklonal) 1:500 und Cy3-Antikörper (polyklonal) 1:350 in PBS auf die Zellen.

#### **4.7 Mikroskopische Messung und Bildanalyse**

Zur Intensitätsmessung der Immuncytochemie wurde zunächst die Kultur mit Hilfe eines Laser Scanning Mikroskops (LSM, Meta 5, Carl Zeiss, Inc.) mit einem 63x/1.4NA Objektiv (Öl Immersion) fotografiert. Um subjektive Beeinflussungen der Ergebnisse zu vermeiden, wurden die Objektträger verblindet. Bei der Bilderfassung wurden zunächst die optimalen Einstellungen für das Scannen der Zellen ermittelt und während der Auswertung beibehalten, so dass die mit Fluorochrom markierten Antikörper immer bei gleicher Intensität und Wellenlänge des Lasers gemessen wurden (543 nm für Cy3, 488 nm für Alexa und 370 nm für DAPI). Pro Untersuchungsgruppe wurden 50 Zellen gescannt ( $n = 50$ ). Bei Doppelinkubationsversuchen wurden jeweils MAP2-positive Zellen für die PMCA- und Synaptopodinexpression und die Synaptopodin-positiven Zellen für die Aromataseexpression ausgewählt.

Die so gewonnenen Daten wurden mit dem Improvision Programm Openlab 3.1.5 semiquantitativ ausgewertet. Dieses Programm verrechnete die Fläche eines Signals mit der jeweiligen Intensität, woraus sich der relative staining index ergab. Bei der Auswertung wurde eine immer gleich große Fläche ausgewählt (25 x 25 Pixel) und diese willkürlich fünfmal pro Zelle platziert, so dass Schwankungen aufgrund unterschiedlicher Zellgrößen vermieden und Inhomogenitäten der Zellfärbung berücksichtigt wurden.

Mit Hilfe von Excel 2003 wurde der Mittelwert der pro Zelle errechneten staining indices berechnet und prozentual zur Kontrolle als optical density angegeben.

Die weitere statistische Auswertung erfolgte mit dem Programm SPSS einfaktoriell nach ANOVA, das für die Versuchsreihen den jeweiligen Mittelwert, die Standardabweichung und das Signifikanzniveau ( $p \leq 0,05$ ) nach Dunnett (zweiseitig) im

Vergleich zur Kontrolle berechnete. Alle Daten wurden als Mittelwerte  $\pm$  SEM („standard error of the mean“) mit Excel (2003) und Power Point (2003) graphisch dargestellt.

#### **4.8 Quantitative Auszählung**

Um zu untersuchen, ob Thapsigargin einen Einfluss auf die Anfärbarkeit von Synaptopodin-positiven Zellen hat, wurden die Dispersionskulturen nach der Immunocytochemie mit einem Fluoreszenzmikroskop mit der jeweils spezifischen Wellenlänge (370 nm für DAPI, 543 nm für Cy3) und Belichtungszeit fotografiert. Man wählte bei 10-facher Vergrößerung in einem Bildausschnitt zum einen die DAPI angefärbten Zellkerne, um die Gesamtanzahl der Zellen zu bestimmen und zum anderen die Synaptopodin-positiven Zellen aus. Die Anzahl der beiden Zellgruppen wurden mit Hilfe des Programms ImageTool 3.0 standardisiert bestimmt, indem man ein Schwellenwert für die Intensität der Zellen bestimmt hat, welche als positive Zellen gezählt werden sollten. Dieser Schwellenwert wurde bei allen Untersuchungsgruppen beibehalten. So konnte der prozentuale Anteil der Synaptopodin-positiven Zellen an den DAPI-positiven Zellen ermittelt werden.

Die Signifikanzen wurden mit SPSS einfaktoriell nach ANOVA bestimmt und die Ergebnisse graphisch mit Excel (2003) und Power Point (2003) dargestellt.

Mit dieser Methode konnte man erkennen, wie groß der Anteil Synaptopodin-positiver Zellen im Verhältnis zu allen in einem Areal befindlichen Neuronen war und inwiefern eine Behandlung mit Thapsigargin einen Einfluss auf die Anzahl positiver Zellen hat.

#### **4.9 Nachweis apoptotischer Zellen mittels TUNEL**

Der TUNEL-Test (TdT-mediated dUTP-biotin nick end labeling) identifiziert DNA-Einzelstrangbrüche nach der Apoptose, indem er in einer enzymatischen Reaktion modifizierte Nukleotide an freie 3'-OH Enden der DNA bindet.

Die TdT (Terminal Deoxynucleotidyl Transferase) katalysiert die Polymerisation von Nukleotiden an freie 3'-OH- DNA Enden und ist daher geeignet, DNA-Strangbrüche, die bei der Apoptose entstehen, darzustellen. Durch den Zusatz von Fluorescein- dUTP können solche Nucleotidpolymere mikroskopisch bzw. mittels Durchflusszytometrie quantitativ analysiert werden.

Für den TUNEL-Test wurden die bereits fixierten Zellen dreimal für jeweils zehn Minuten mit sterilem PBS (pH 7,4) gespült. Daraufhin erfolgte für zehn Minuten die Blockierung mit 200 µl pro Well H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, das zuvor mit 3%igem Methanol verdünnt wurde. Nach einmaligem Waschen mit PBS erfolgte die Permeabilisierung mit Triton X-100. Sie diente dazu, die Kernmembran für die Farbpigmente durchlässig zu machen. Hierzu löste man 0,1%iges Triton X-100 in 0,1%igen Natriumcitrat und inkubierte die Zellen mit jeweils 1 ml pro Well für zwei Minuten auf Eis. Nach erneutem zweimaligem Waschen wurde das TUNEL-Kit vorbereitet. Dieses musste während des gesamten Versuches auf Eis gelagert werden. Zunächst wurde die Enzym Solution im Verhältnis 1:10 mit der Label Solution angesetzt und dann im Verhältnis 1:2 mit PBS verdünnt. Von dieser TUNEL-Lösung gab man jeweils 10 µl auf die Plättchen, die zuvor in eine Feuchtkammer auf Objektträger überführt wurden. Die Negativkontrolle erhielt unverdünnt 10 µl Label Solution. Die Zellen wurden nun im Dunkeln bei 37°C 60 Minuten inkubiert. Als Positivkontrolle behandelte man die Zellen für zehn Minuten bei Raumtemperatur mit DNase I, wodurch der DNA-Verdau und DNA-Strangbrüche induziert wurden. Nachdem die Plättchen wieder in die 24 Well Platte überführt wurden, wurden sie dreimal für jeweils zehn Minuten mit PBS gespült.

Anschließend erfolgte die Kernfärbung mit DAPI, indem die Wells für drei Minuten mit 500 µl DAPI (1:100 000 in PBS) inkubiert und darauf folgend dreimal mit PBS gespült wurden. Das Eindeckeln erfolgte wie bei der Immunhistochemie blasenfrei mit DakoCytomation Fluorescent Mounting Medium.

Zunächst fotografierte man die Zellen mittels eines Fluoreszenzmikroskops, wobei jeweils die gleiche Belichtungszeit und Wellenlänge verwendet wurde. Gleichzeitig wurde mit dem Fluoreszenzmikroskop die Anzahl TUNEL-positiver Kerne ermittelt und durch die Anzahl der DAPI-positiven Kerne geteilt. Die Bildanalyse erfolgte quantitativ mit dem ImageTool 3.0 für Windows. Mittels SPSS wurden, wie bei der Immunhistochemie, die Ergebnisse statistisch ausgewertet und graphisch mit Excel (2003) und Power Point (2003) dargestellt.

## 5 Ergebnisse

### 5.1 Synaptopodin

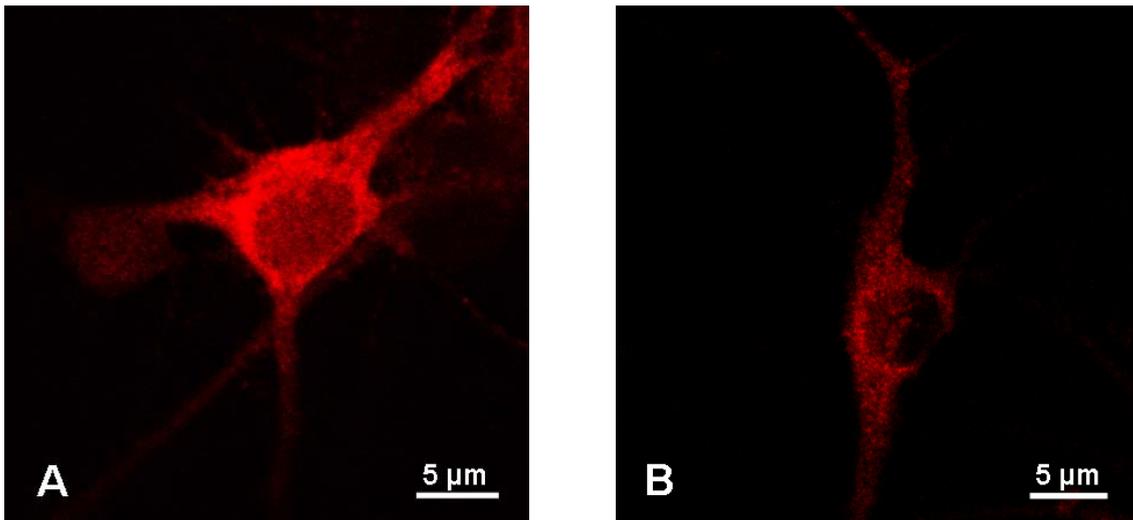
#### 5.1.1 Synaptopodinexpression unter dem Einfluss von Estradiol

Der derzeitige Kenntnisstand lässt vermuten, dass der Spineapparat als intrazellulärer Calciumspeicher fungiert, der Prozesse der synaptischen Plastizität moduliert. Die Existenz des Spineapparates ist an das Protein Synaptopodin gekoppelt (Deller *et al.*, 2003). Da viele Studien einen Zusammenhang von Estradiol und synaptischer Plastizität beschreiben (Warren *et al.*, 1995; Good *et al.*, 1999; Kretz *et al.*, 2004), war es interessant zu sehen, welchen Einfluss Estradiol auf Synaptopodin und somit auf den Spineapparat ausübt.

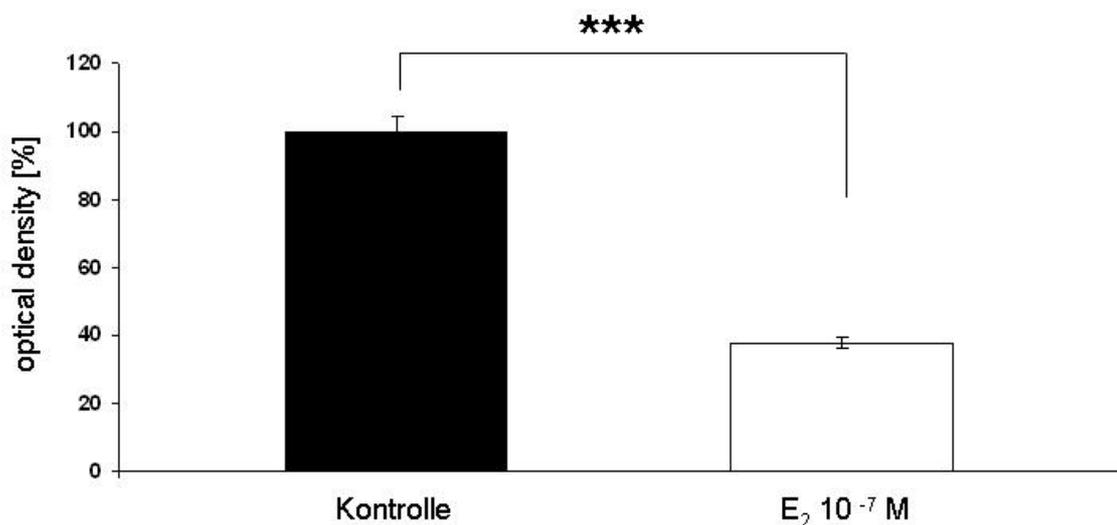
Dafür wurden hippocampale Dispersionskulturen nach drei Tagen Vorkultur (DIV) mit Estradiol in einer Konzentration von  $10^{-7}$  M stimuliert. Nach Immuncytochemie mit Anti-Synaptopodin wurde die Expression von Synaptopodin als relative staining index mittels Openlab 3.1.5 gemessen. Dieses Programm verrechnet die Fläche eines Signals mit der jeweiligen Intensität, woraus sich die optical density berechnet.

Abbildung 4 präsentiert die Expression von Synaptopodin nach Stimulationen mit Estradiol, welche in Abbildung 5 nach Auswertung als optical density graphisch dargestellt ist. Bereits bei der Lasermikroskopie fiel ein deutlich schwächeres Synaptopodin-Signal bei den mit Estradiol behandelten Kulturen auf. Das Synaptopodin-Signal war bevorzugt in den Dendriten und am Axonhügel lokalisiert, jedoch auch im Soma des Zellkörpers zu finden.

Bei der quantitativen Bildanalyse zeigte sich eine signifikante Herunterregulation der Synaptopodinexpression nach Behandlung der hippocampalen Neurone mit Estradiol  $10^{-7}$  M im Vergleich zur Kontrollgruppe.



**Abb. 4:** Synaptopodin-Signale hippocampaler Neurone der Dispersionskultur unter Estradiol-Behandlung ( $10^{-7}$  M) (B) im Vergleich zur Kontrolle (A).



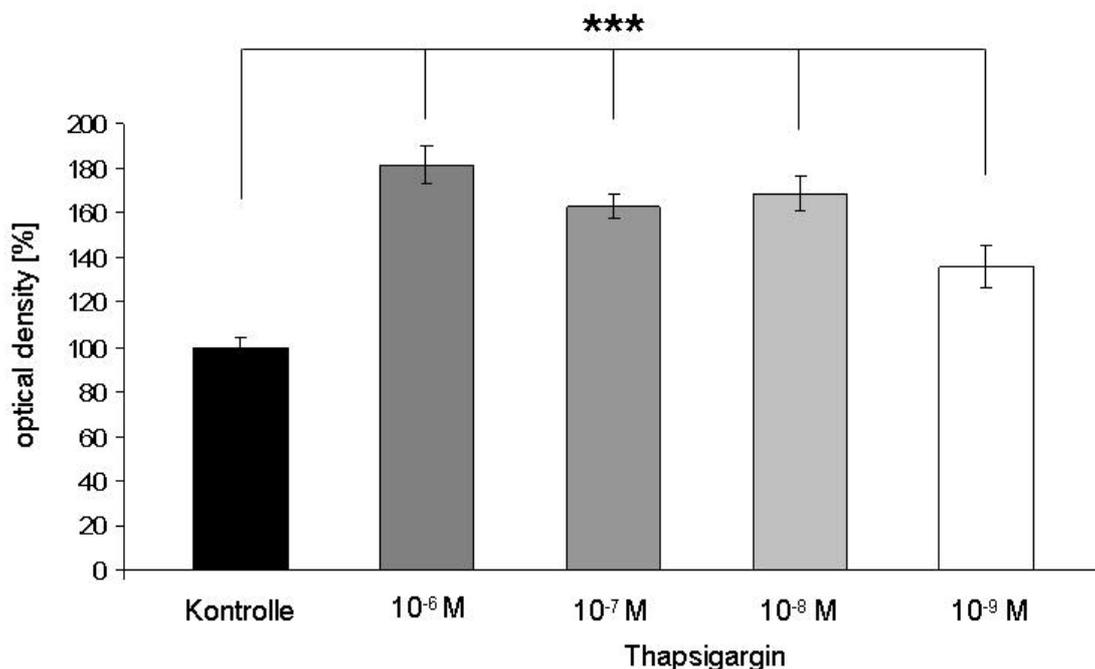
**Abb. 5:** Auswertung der Immuncytochemie mit Synaptopodin-Antikörpern in hippocampalen Dispersionskulturen nach Behandlung mit Estradiol  $10^{-7}$  M. Dargestellt sind Mittelwerte  $\pm$  SEM (n = 45 je Gruppe). Die Sterne weisen auf signifikante Unterschiede hin (\*\*\*)  $p \leq 0,001$ .

### 5.1.2 Synaptopodinexpression unter Thapsigargin ( $10^{-6}$ M, $10^{-7}$ M, $10^{-8}$ M, $10^{-9}$ M)

Die Funktion von Calcium auf die synaptische Plastizität wurde bereits vielfach in der Literatur beschrieben (Oertner und Matus, 2005). Um in die regulativen Mechanismen des Calciumhaushaltes der Zelle eingreifen zu können, wurde Thapsigargin eingesetzt, ein Inhibitor der Calcium-ATPase des sarkoendoplasmatischen Retikulums (SERCA). Es blockiert die Wiederaufnahme von Calcium in den Spineapparat und verhindert langfristig eine Calciumfreisetzung aus den intrazellulären Speichern.

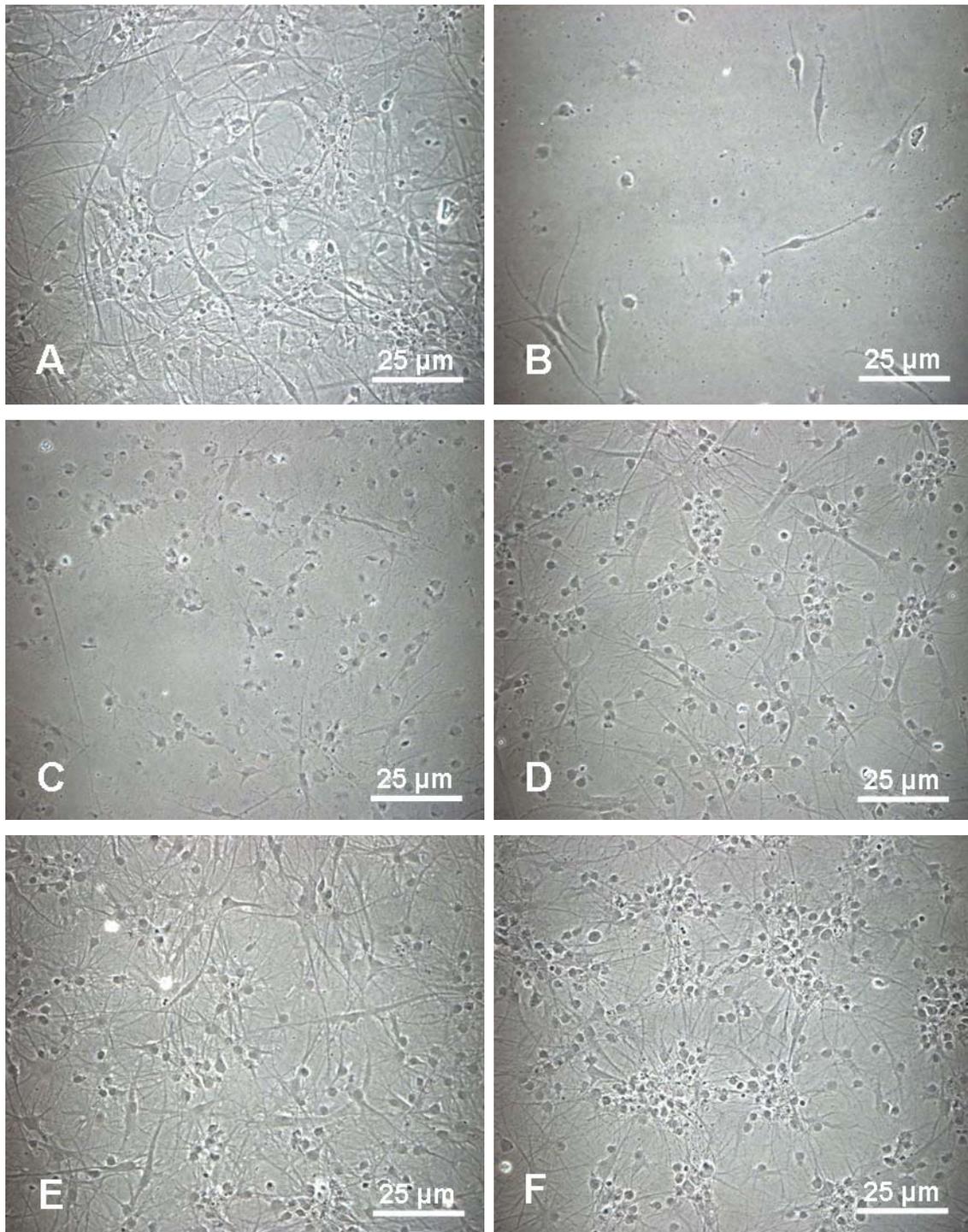
Die hippocampalen Kulturen wurden nach drei DIV jeden zweiten Tag mit Thapsigargin in den Konzentrationen von  $10^{-6}$  M,  $10^{-7}$  M,  $10^{-8}$  M und  $10^{-9}$  M stimuliert. Nach der Fixierung und Immuncytochemie mit Synaptopodin-Antikörpern und MAP2-Antikörpern erfolgte die Bildauswertung mit dem Openlab 3.1.5 Programm. Durch die Doppelinkubation mit MAP2 wurden nur neuronale Zellen ausgewertet.

Es ließ sich deutlich zeigen, dass Thapsigargin eine signifikante Verstärkung der Synaptopodinexpression bewirkt. Die Intensität korrelierte dabei mit den einzelnen Konzentrationsstufen.



**Abb. 6:** Auswertung der Immunreaktion mit Synaptopodin-Antikörpern in hippocampalen Dispersionskulturen nach Behandlung mit Thapsigargin in den Konzentrationen  $10^{-6}$  M,  $10^{-7}$  M,  $10^{-8}$  M,  $10^{-9}$  M. Dargestellt sind Mittelwerte  $\pm$  SEM (n = 25 je Gruppe). Die Sterne weisen auf signifikante Unterschiede hin (\*\*\*)  $p \leq 0,001$ .

Durch seinen Eingriff in den Calciumhaushalt der Zelle wirkt Thapsigargin jedoch auch als Apoptoseinduktor, was man unter Thapsigarginkonzentrationen von  $10^{-6}$  M deutlich anhand des spärlichen, kaum vorhandenen Zellwachstums erkennen konnte. Es überlebte nur eine sehr geringe Anzahl an Zellen die Behandlung, die zur Auswertung gebracht werden konnten. Im Vergleich dazu wuchsen die Neurone, die mit einer niedrigeren Thapsigarginkonzentration stimuliert wurden, morphologisch unauffällig (siehe Abb. 7).



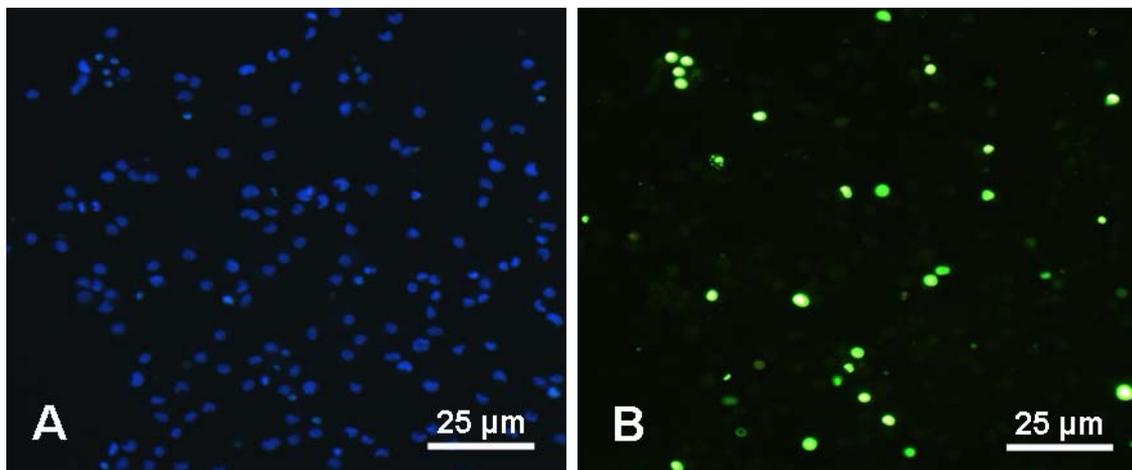
**Abb. 7:** Beispiele für neuronale Dispersionskulturen unter Behandlung von Thapsigargin in den Konzentrationen  $10^{-6}$  M (B),  $10^{-7}$  M (C),  $10^{-8}$  M (D),  $10^{-9}$  M (E),  $10^{-10}$  M (F) im Vergleich zu einer unbehandelten Kultur (A). Aufgenommen durch ein Phasenkontrastmikroskop.

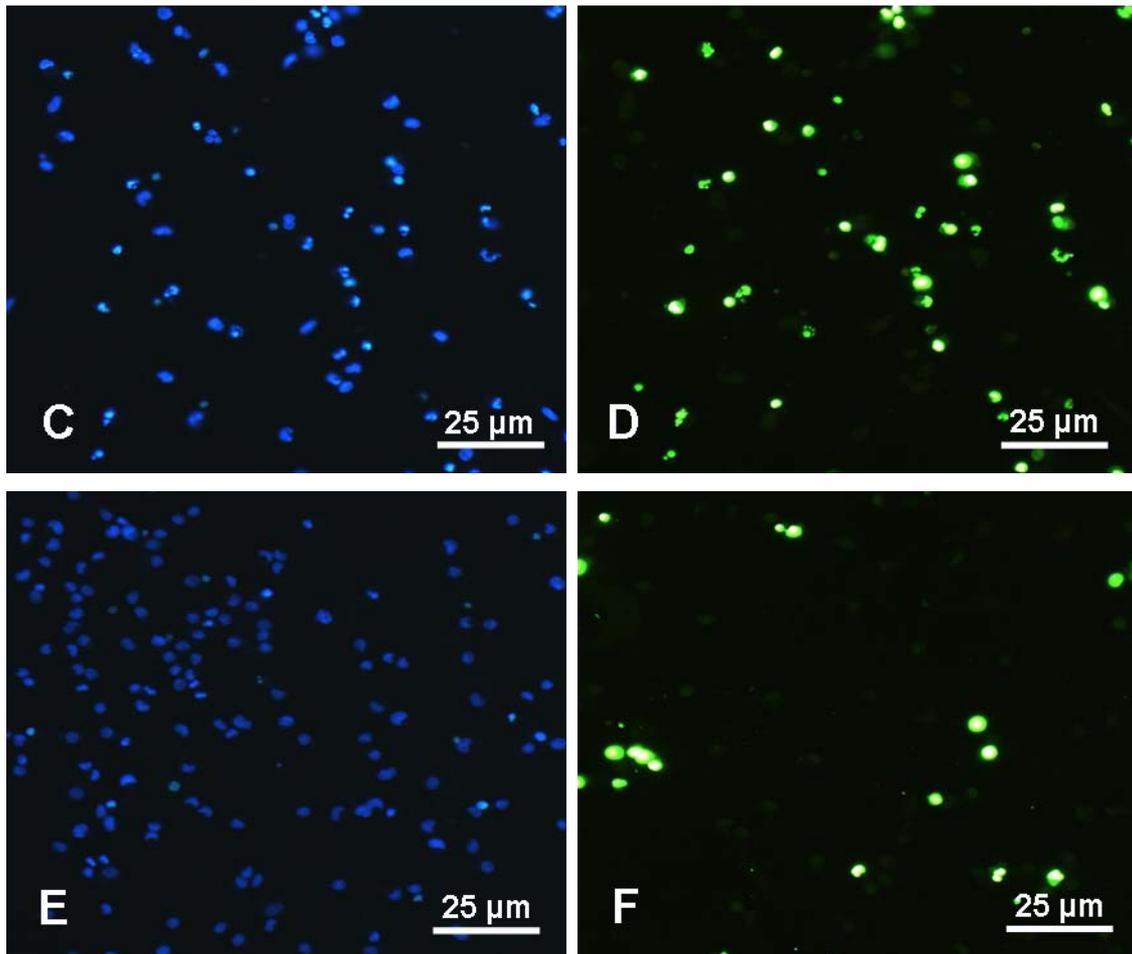
### 5.1.3 TdT-mediated dUTP-biotin nick end labeling-Test (TUNEL)

Zur Quantifizierung der Zellapoptosen unter Thapsigargin-Behandlung wurde der TUNEL-Test eingesetzt, der durch eine enzymatische Reaktion DNA-Strangbrüche nachweisen kann.

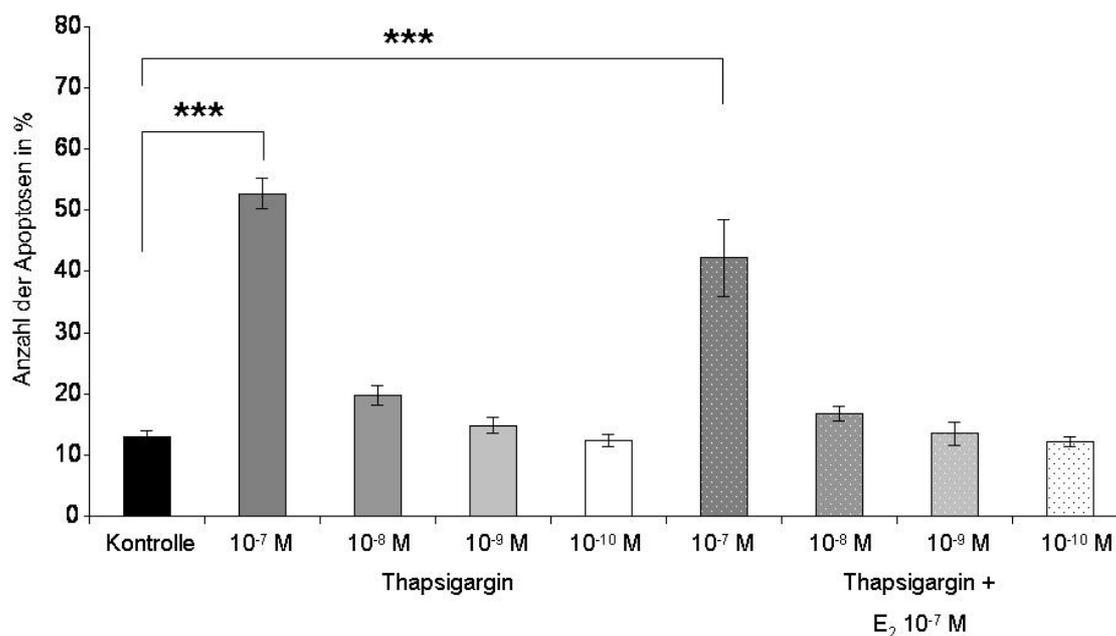
Die Dispersionskulturen wurden zum einen mit Thapsigargin in den Konzentrationen  $10^{-7}$  M,  $10^{-8}$  M,  $10^{-9}$  M,  $10^{-10}$  M, zum anderen in den oben genannten Thapsigarginkonzentrationen und dem Zusatz von Estradiol  $10^{-7}$  M stimuliert. Nach Anwendung des TUNEL-Tests wurden die Zellkerne mit DAPI angefärbt und mittels eines differentiellen Phasenkontrastmikroskops jeweils die DAPI- und die TUNEL-positiven Zellen fotografiert. Hierbei war es wichtig bei der synchronen Auswertung von DAPI- und TUNEL-angefärbten Zellen den jeweiligen Bildabschnitt beizubehalten und die spezifische Wellenlänge und Belichtungszeit der beiden Gruppen nicht zu verändern. Mit Hilfe des Programms ImageTool 3.0 wurden die TUNEL-positiven Neurone berechnet, durch die Anzahl der DAPI-positiven Zellen geteilt und diese als Prozentangabe dargestellt.

Bei einer Thapsigarginkonzentration von  $10^{-7}$  M waren ca. 50% der ausgewerteten Zellen apoptotisch. Ab einer Konzentration von  $10^{-8}$  M und niedriger konnte jedoch keine signifikante Erhöhung der Apoptosen im Vergleich zur Kontrollgruppe gefunden werden. Vergleichbare Ergebnisse haben wir nach gleichzeitiger Behandlung der Kulturen mit Thapsigargin und Estradiol bekommen. Auch hier waren eine hohe Anzahl apoptotischer Zellen bei einer Thapsigarginkonzentration von  $10^{-7}$  M nachweisbar, die in niedrigeren Konzentrationen nicht mehr signifikant waren.





**Abb. 8:** TUNEL-Test: Dargestellt sind DAPI- (blau) bzw. TUNEL-positive Zellen (grün) unterschiedlicher Konzentrationen. A/B = Kontrolle; C/D = Thapsigargin-Behandlung mit  $10^{-7}$  M; E/F = Thapsigargin-Behandlung mit  $10^{-9}$  M.



**Abb. 9:** Auswertung des TUNEL-Tests in hippocampalen Dispersionskulturen nach Behandlung mit Thapsigargin in den Konzentrationen  $10^{-7}$  M,  $10^{-8}$  M,  $10^{-9}$  M,  $10^{-10}$  M und Estradiol  $10^{-7}$  M. Dargestellt sind Mittelwert  $\pm$  SEM (n = 20 je Gruppe). Die Sterne weisen auf signifikante Unterschiede hin (\*\*\*) p  $\leq$  0,001).

### 5.1.4 Synaptopodinexpression unter Thapsigargin Stimulation

Aufgrund der Ergebnisse durch den TUNEL-Test, dass Thapsigargin  $10^{-7}$  M die Apoptoserate deutlich erhöht, wurde bei den folgenden Versuchen Thapsigargin in den Konzentrationen  $10^{-8}$  M und schwächer eingesetzt.

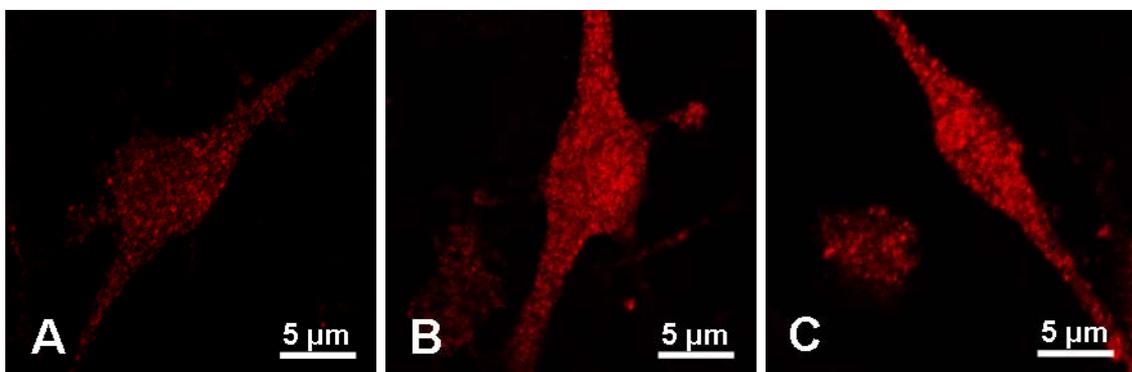
Die Behandlung der hippocampalen Dispersionskulturen erfolgte als Langzeitstimulation jeden zweiten Tag mit Thapsigargin in den Konzentrationen  $10^{-8}$  M,  $10^{-9}$  M,  $10^{-10}$  M. Nach Fixierung und immunocytochemischer Behandlung mit Synaptopodin, erfolgte die Auswertung semiquantitativ mit dem Improvisation Programm Openlab 3.1.5.

Es ließ sich deutlich zeigen, dass die Thapsigargin-Behandlung der Kulturen zu einer konzentrationsabhängigen, signifikanten Heraufregulation der Synaptopodinexpression im Verhältnis zur Kontrolle führt (Abb. 11). Dies war bereits an den mikroskopischen Bildern sichtbar (Abb. 10).

### 5.1.5 Synaptopodinexpression unter Thapsigargin in Kombination mit Estradiol

Mit diesem Versuch sollte untersucht werden, ob Estradiol seine Wirkung auf Synaptopodin und den Spineapparat Calcium-vermittelt ausübt. Nach simultaner Stimulation mit Estradiol  $10^{-7}$  M und Thapsigargin aufsteigender Konzentrationen wurde die Synaptopodinexpression als optical density bestimmt.

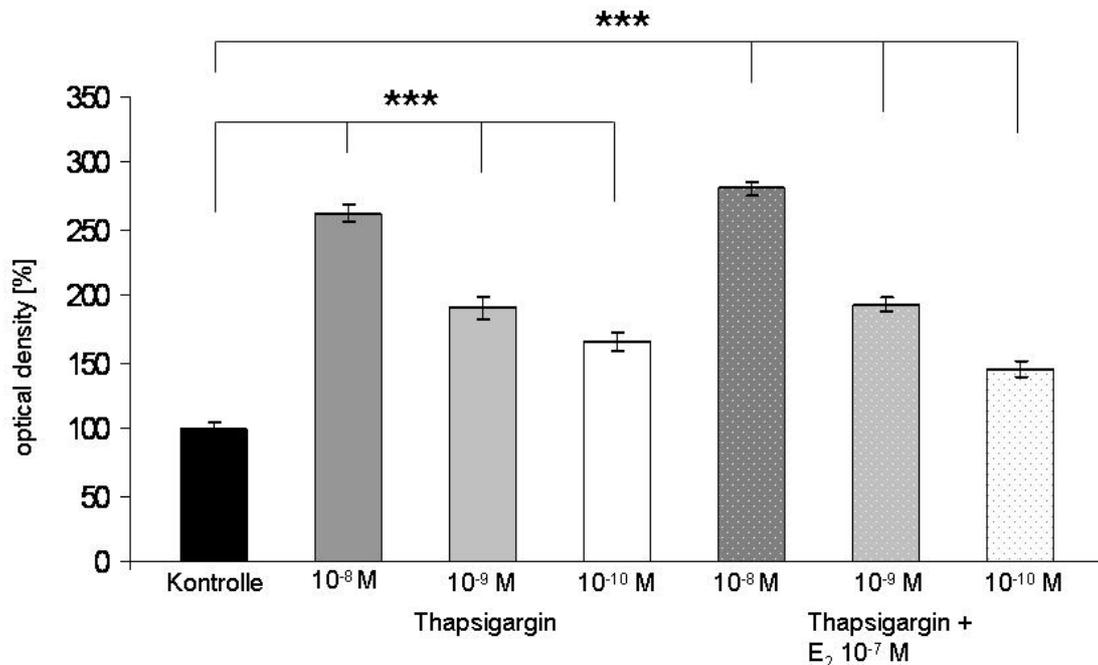
Unter der Stimulation kam es zu einer signifikanten Erhöhung der Synaptopodinexpression gegenüber der Kontrollgruppe.



**Abb. 10:** Synaptopodin-Signale hippocampaler Zellen der Dispersionskultur nach Stimulation mit Thapsigargin in den Konzentrationen  $10^{-8}$  M (B) und  $10^{-8}$  M + E<sub>2</sub>  $10^{-7}$  M (C) im Vergleich zur Kontrolle (A).

Abbildung 11 zeigt der Übersichtlichkeit halber zusammengefasst die unter 5.1.5 und 5.1.6 beschriebenen Ergebnisse.

Eine zusätzliche Estradiolgabe führte zu keinen signifikanten Abweichungen gegenüber Dispersionskulturen mit reiner Thapsigargin-Behandlung.



**Abb. 11:** Auswertung der Immunreaktion mit Synaptopodin-Antikörpern in hippocampalen Dispersionskulturen nach Behandlung mit Thapsigargin in den Konzentrationen 10<sup>-8</sup> M, 10<sup>-9</sup> M, 10<sup>-10</sup> M teilweise unter Zugabe von Estradiol 10<sup>-7</sup> M. Dargestellt sind Mittelwert ± SEM (n = 50 je Gruppe). Die Sterne weisen auf signifikante Unterschiede hin (\*\*\*) p ≤ 0,001).

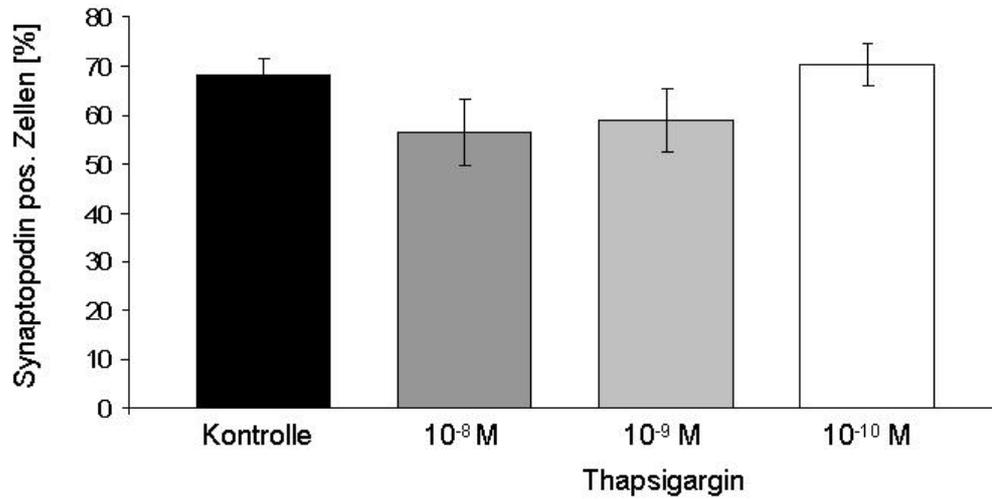
### 5.1.6 Quantitative Auszählung Synaptopodin-positiver Zellen unter Thapsigargin

Um zu untersuchen, ob Thapsigargin einen Einfluss auf die Anzahl Synaptopodin-positiver Neurone hat, wurde als weitere Kontrolle die Dispersionskultur, wie oben beschrieben, mit Thapsigargin behandelt, fixiert und mit Anti-Synaptopodin immunocytochemisch ausgewertet.

Mit einem Fluoreszenzmikroskop wurden sowohl DAPI-, als auch mit Synaptopodin-positiven Zellen fotografiert. Die Anzahl der beiden Zellgruppen wurde mit Hilfe des Programms ImageTool 3.0 bestimmt und der prozentuale Anteil der Synaptopodin-positiven Zellen an der Gesamtanzahl ermittelt.

Es zeigte sich, dass im Durchschnitt ca. 60% der Neurone Synaptopodin-positiv sind und die Thapsigargin-Behandlung keinen signifikanten Einfluss auf die Anzahl

Synaptopodin-positiver Neurone hat. Thapsigargin bewirkt folglich keine Änderung der Anfärbarkeit der Neurone für Synaptopodin.

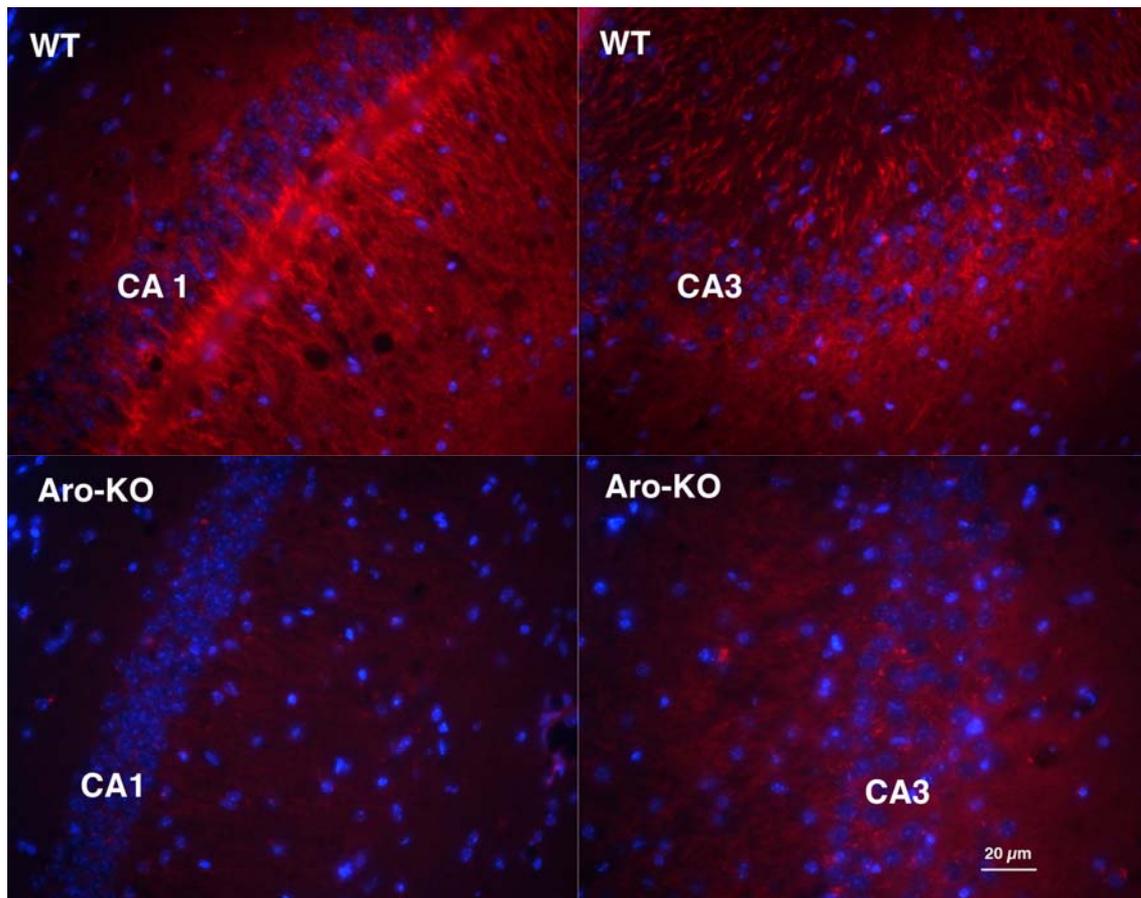


**Abb. 12:** Quantitative Auswertung der Immunhistochemie mit Synaptopodin-Antikörpern in hippocampalen Dispersionskulturen nach Behandlung mit Thapsigargin in den Konzentrationen  $10^{-8}$  M,  $10^{-9}$  M,  $10^{-10}$  M. Dargestellt sind Mittelwert  $\pm$  SEM ( $n = 20$  je Gruppe).

## 5.2 Aromatase

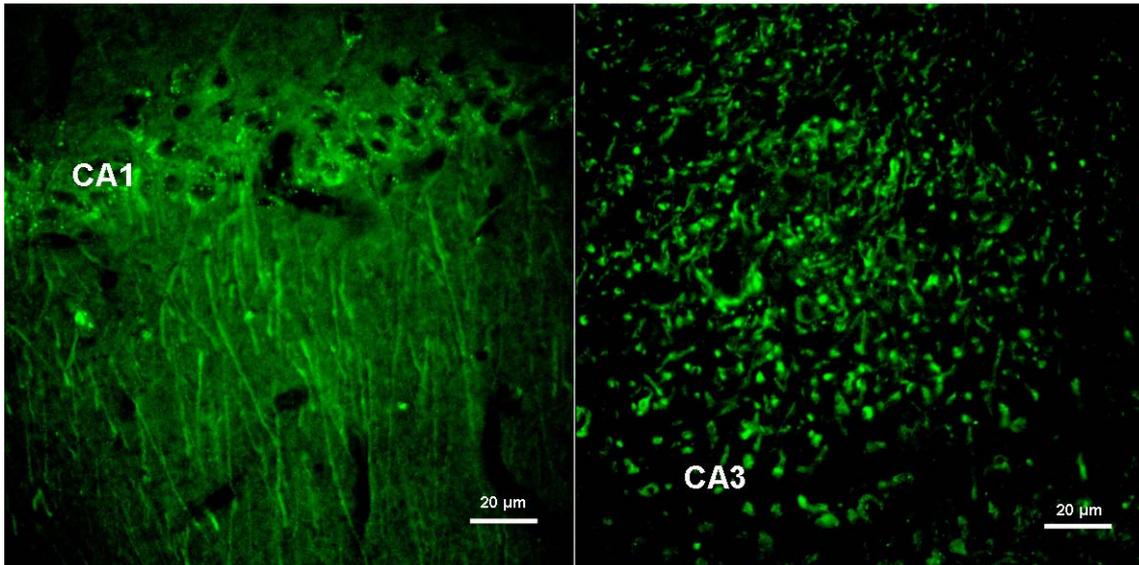
### 5.2.1 Evaluation des Antikörpers

Zur Spezifitätstestung des Aromatase-Antikörpers wurden Schnittkulturen der Aromatase Conditional Knockout-Maus und der Wildtyp-Maus immunocytochemisch behandelt, was in Abbildung 13 dargestellt ist. Es zeigt sich bei der Knockout-Maus eine deutliche Signalreduktion sowohl in der CA1-, als auch in der CA3-Region des Hippocampus gegenüber der Wildtypmaus.



**Abb. 13:** Immunocytochemie mit Aromatase-Antikörpern (rot) an Schnittkulturen der Aromatase-Knockout-Maus und des Wildtyps.

Abbildung 14 zeigt den Aromatase-Antikörper in der CA1- und CA3-Region der in dieser Arbeit verwendeten Ratte (adult) des Zuchtstamms WISTAR.



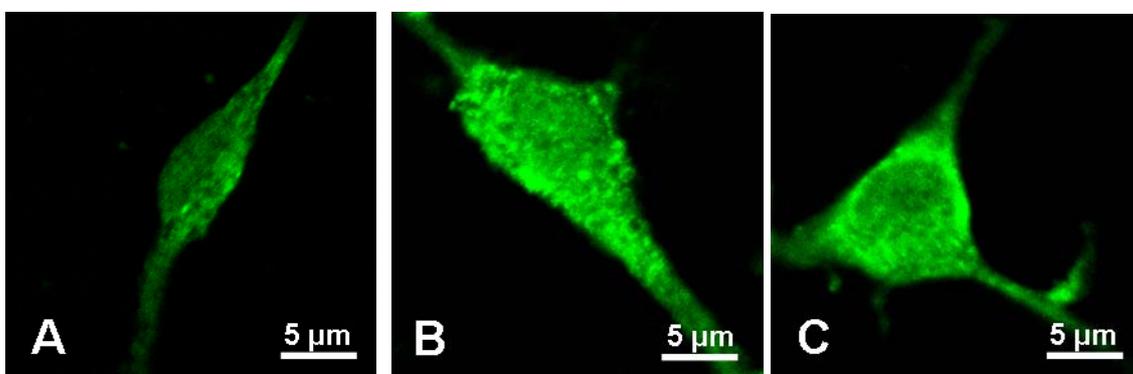
**Abb. 14:** Immuncytochemie mit Aromatase-Antikörpern (grün) an Schnittkulturen der adulten Ratte des Zuchtstamms WISTAR.

### 5.2.2 Aromatase-Expression unter dem Einfluss von Thapsigargin

Studien von Balthazart *et al.* (2003) an Wachteln konnten zeigen, dass die Aromatase, als Schlüsselenzym der Estradiolsynthese, durch Calcium-abhängige Kinasen phosphoryliert und dadurch inhibiert wird. Es sollte nun überprüft werden, ob der Calcium-Release interner Speicher dafür verantwortlich ist.

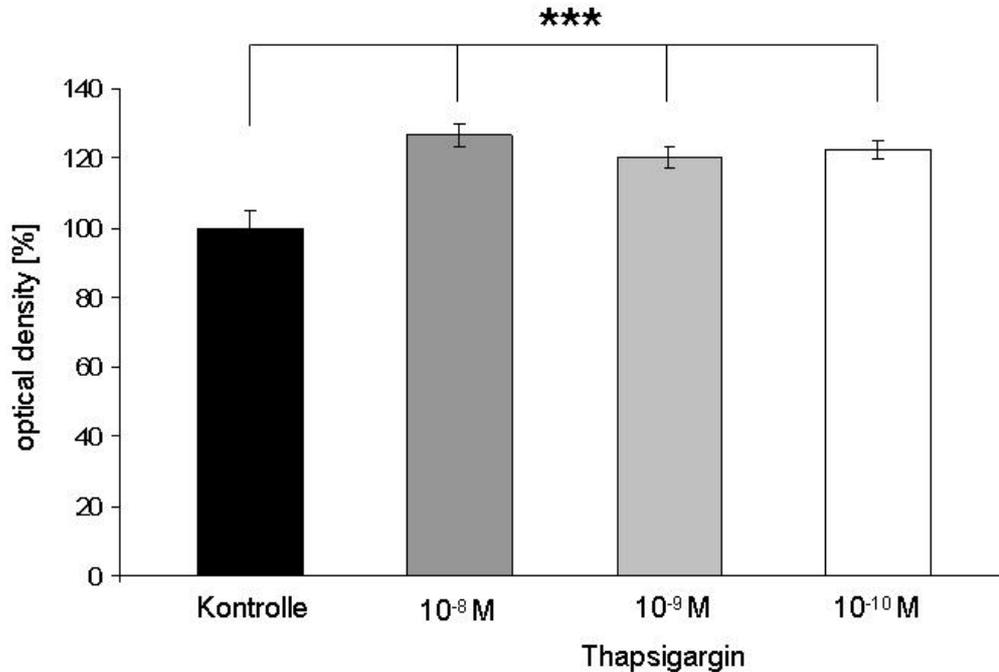
Dafür wurden die Dispersionskulturen sieben Tage lang mit Thapsigargin in den Konzentrationen  $10^{-8}$  M,  $10^{-9}$  M,  $10^{-10}$  M behandelt und immuncytochemisch gefärbt.

Abbildung 15 zeigt die mit dem Fluoreszenzmikroskop angefertigten Bilder. Die Aromatase-Signale der mit Thapsigargin-behandelten Zellen waren deutlich stärker als die der Kontrolle.



**Abb. 15:** Aromatase-Signale hippocampaler Zellen der Dispersionskultur nach Stimulation mit Thapsigargin in den Konzentrationen  $10^{-8}$  M (B) und  $10^{-10}$  M (C) im Vergleich zur Kontrolle (A).

Das Diagramm in Abbildung 16 stellt die Immunreaktion als optical density dar. Unter dem Einfluss von Thapsigargin wurde die Aromataseexpression in allen behandelten Konzentrationen signifikant verstärkt, was sich mit dem starken Aromatase-Signal in Abbildung 15 deckt.

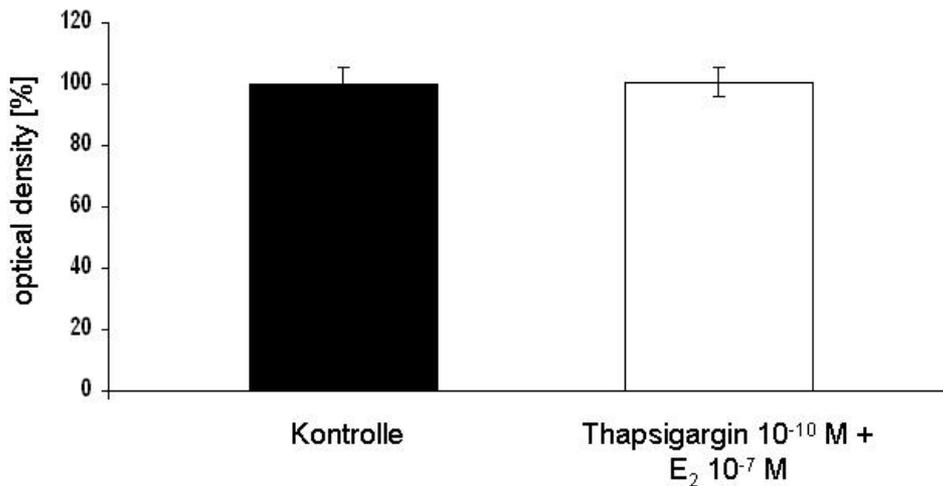


**Abb. 16:** Auswertung der Immunreaktion mit Aromatase-Antikörpern in hippocampalen Dispersionskulturen nach Behandlung mit Thapsigargin in den Konzentrationen  $10^{-8}$  M,  $10^{-9}$  M,  $10^{-10}$  M. Dargestellt sind Mittelwerte  $\pm$  SEM ( $n = 25$  je Gruppe). Die Sterne weisen auf signifikante Unterschiede hin (\*\*\*)  $p \leq 0,001$ .

### 5.2.3 Aromatase-Expression unter dem Einfluss von Thapsigargin und Estradiol

Um herauszufinden, ob Calcium interner Speicher für die Wirkung von Estrogen auf die Aromatase benötigt wird, wurden die Dispersionskulturen zeitgleich mit Thapsigargin  $10^{-10}$  M und Estradiol  $10^{-7}$  M dreimalig stimuliert.

Wie in Abbildung 17 erkennbar, führte eine simultane Applikation von Estradiol und Thapsigargin ( $10^{-10}$  M) zu einer Aufhebung der Thapsigargin-induzierten Heraufregulation der Aromataseimmunreaktivität.



**Abb. 17:** Auswertung der Immunreaktion mit Aromatase-Antikörper in Dispersionskulturen nach Behandlung mit Thapsigargin 10<sup>-10</sup> M unter Zugabe von Estradiol 10<sup>-7</sup> M. Dargestellt sind optical density der Mittelwerte ± SEM (n = 25 je Gruppe).

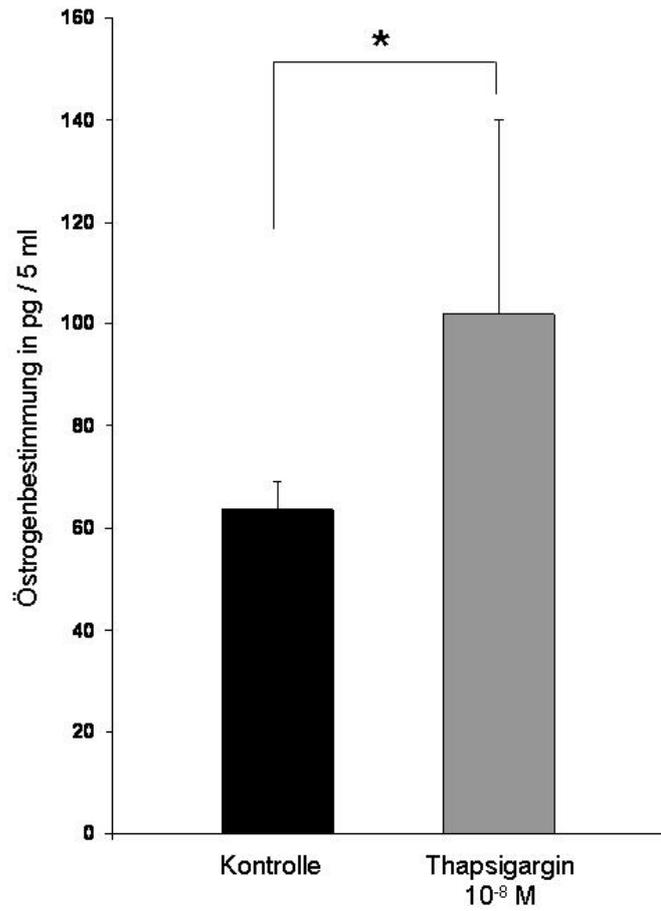
#### 5.2.4 Quantitative Estrogen-Bestimmung im Medium unter Thapsigargin

Im folgenden Experiment wurde zur quantitativen Estrogen-Bestimmung im Medium ein Radioimmunoassay verwendet.

Bei jedem Wechsel, somit auch während der Stimulation mit Thapsigargin (10<sup>-8</sup> M, 10<sup>-9</sup> M, 10<sup>-10</sup> M), wurde Kulturmedium gesammelt, fortlaufend nummeriert und verblindet.

Der RIA wurde unter Verwendung des Standardprotokolls durchgeführt und mit einem Gamma Counter analysiert.

Es zeigte sich eine signifikante Heraufregulation des Estrogengehaltes unter Thapsigargin-Behandlung.



**Abb. 18:** Estrogen-Bestimmung im Kulturmedium hippocampaler Dispersionskulturen unter Thapsigargin-Stimulation mittels RIA. Dargestellt sind Mittelwerte  $\pm$  SEM Die Sterne weisen auf signifikante Unterschiede hin (\*  $p \leq 0,05$ ; \*\*  $p \leq 0,01$ ; \*\*\*  $p \leq 0,001$ ).

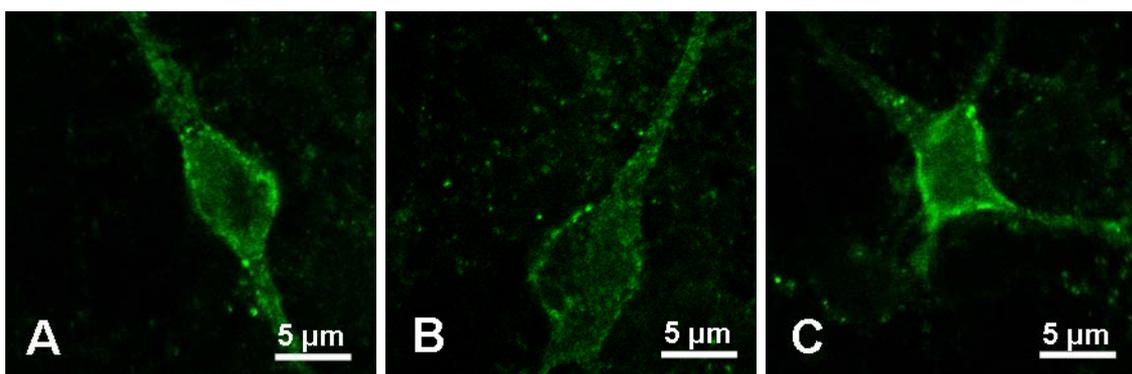
### 5.3 plasma membrane calcium ATPase (PMCA)

#### 5.3.1 PMCA-Expression unter dem Einfluss von Estradiol und Letrozol

In den bisherigen Experimenten haben wir ausschließlich die intrazellulären Calciumspeicher betrachtet. Jedoch gelangt Calcium nach einer zellulären Erregung auch über die Plasmamembran mit Hilfe der PMCA nach extrazellulär, um das Ruhepotential der Zelle wiederherzustellen.

Die hippocampalen Dispersionskulturen wurden für sieben Tage zum einen mit  $17\beta$ -Estradiol ( $10^{-7}$  M) und zum anderen mit Letrozol ( $10^{-7}$  M) behandelt. Als sehr potenter Inhibitor der Aromatase eignet sich Letrozol die endogene Estrogensynthese im Neuron reversibel zu unterbinden. In einer vierten Gruppe neuronaler Zellen wurden beide Substanzen auf die Kulturen gegeben, so dass die Estradiolsynthese gehemmt und gleichzeitig Estradiol zugegeben wurde. Mit diesem Versuch sollte getestet werden, ob die Wirkung von Letrozol durch die Estradiolgabe aufgehoben werden kann und die ursprüngliche Kontrollsituation wiederhergestellt wurde, um einen so genannten „Rescue-Effekt“ zu erzielen. Nach immuncytochemischer Doppelinkubation mit PMCA- und MAP2-Antikörpern zur Detektion neuronaler Zellen, erfolgt die Auswertung mit dem Openlab 3.1.5 und SPSS.

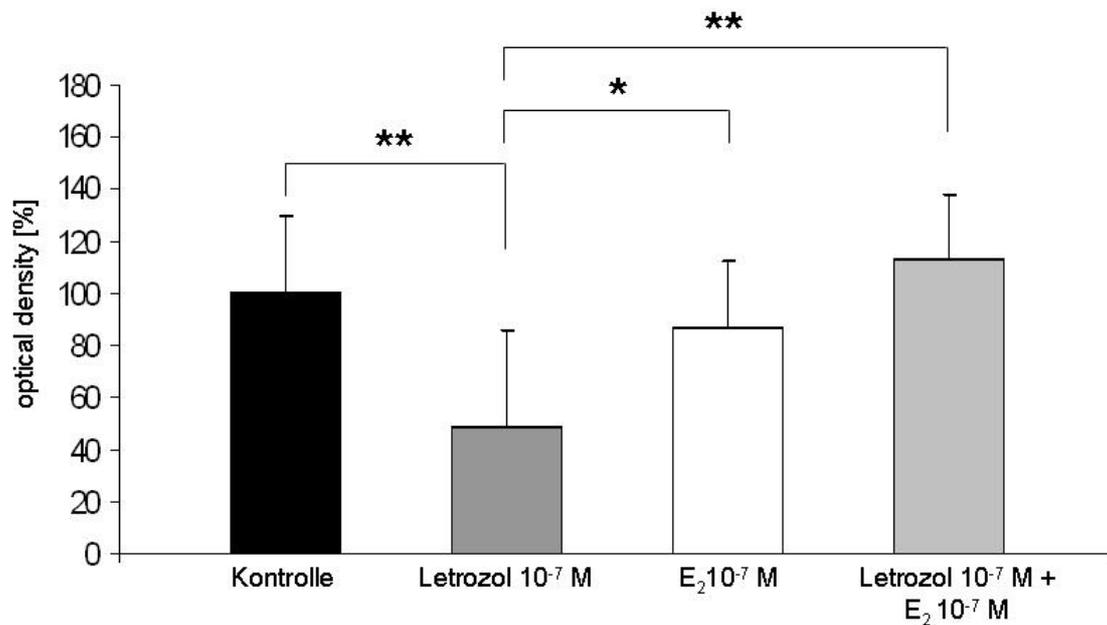
Abbildung 19 zeigt die verschiedenen PMCA-Signale. Wie man erkennen kann, ist PMCA fast ausschließlich membranständig lokalisiert. Es fällt auf, dass die mit Letrozol behandelten Zellen deutlich schwächer gefärbt sind.



**Abb. 19** : PMCA-Signale neuronaler Zellen aus der hippocampalen Dispersionskultur nach Behandlung mit Letrozol  $10^{-7}$  M (B) und Estradiol  $10^{-7}$  M (C) im Vergleich zur Kontrolle (A).

Im Diagramm in Abbildung 20 sind alle Messergebnisse aus vier Stimulationsreihen zusammengefasst. Die Intensität der PMCA-Immunreaktion ist als optical density prozentual angegeben. Dafür wurden von unabhängigen Kulturen die Kontrollwerte

(= 100%) in Beziehung zu ihren jeweils behandelten Kulturen gesetzt und die Mittelwerte aus diesen Auswertungen berechnet. Die Ergebnisse zeigten eine signifikante Abnahme der PMCA-Expression bei den mit Letrozol behandelten Zellen im Vergleich zur Kontrollgruppe. Im Gegensatz dazu fand man unter Estradiol-Behandlung keinen Unterschied zur Kontrolle. Durch die simultane Applikation von Estradiol und Letrozol konnte in allen „Rescue“-Versuchen die Hemmung von Letrozol wieder aufgehoben und die Kontrollsituation wiederhergestellt werden.



**Abb. 20:** Quantitative Auswertung der Immunocytochemie mit PMCA-Antikörpern in hippocampalen Dispersionskulturen nach Behandlung mit Letrozol und Estradiol je  $10^{-7}$  M. Dargestellt sind Mittelwert  $\pm$  SEM (n = 16 pro Gruppe). Die Sterne weisen auf signifikante Unterschiede hin (\*  $p \leq 0,05$ ; \*\*  $p \leq 0,01$ ; \*\*\*  $p \leq 0,001$ ).

## 6 Diskussion

Der Hippocampus hat neben der Übermittlung von Emotionen und Motivation eine entscheidende Funktion an der Gedächtniskonsolidierung, also der Überführung von Gedächtnisinhalten aus dem Kurzzeit- in das Langzeitgedächtnis.

In diesem Zusammenhang sind Spines von besonderem Interesse. Spines sind der postsynaptische Teil der meisten exzitatorischen Synapsen im ZNS und tragen durch ihre Aktin-abhängige, dynamische Morphologie (Spinogenese) zur Ausbildung des Gedächtnisses bei (Matsuzaki *et al.*, 2001, 2004). Der Spineapparat ist eine vermutlich Calcium-speichernde Zellorganelle, welche spezifisch in reifen Spines vorkommt. Er scheint essentiell an den Prozessen synaptischer Plastizität beteiligt zu sein, da sein Fehlen mit eingeschränkten kognitiven Fähigkeiten und mit einer reduzierten Ausbildung der LTP einhergeht (Svoboda und Mainen, 1999; Deller *et al.*, 2003, Jedlicka *et al.*, 2008). Mit Hilfe von Synaptopodin, ein im Spinehals lokalisiertes und mit dem Spineapparat assoziiertes Protein lässt sich der Spineapparat immunocytochemisch nachweisen (Deller *et al.*, 2000, 2003).

Es ist bekannt, dass die Aromatase als Schlüsselenzym der Estradiolsynthese im Zellsoma und in den Dendriten hippocampaler Neurone exprimiert wird (Hojo *et al.*, 2004). Eine von den Gonaden unabhängige Estrogensynthese ermöglicht es dem Hippocampus, Estrogene *de novo* zu synthetisieren (Prange-Kiel *et al.*, 2003). Es ließ sich mehrfach zeigen, dass Estrogene bzw. die Aromatase durch Hochregulation synaptischer Proteine z.B. nach neuronalen Traumata aktiv Prozesse der synaptischen Plastizität induzieren können (Garcia-Segura *et al.*, 1999).

Mittels Immunocytochemie konnte in dieser Studie gezeigt werden, dass die Synaptopodinexpression und somit der Spineapparat durch Estradiol reguliert wird. Dieser Vorgang scheint vom Calcium-Release aus dem Spineapparat abhängig zu sein. Weiterhin konnte diese Arbeit den Einfluss des intrazellulären Calcium-Release auf die endogene Estradiolsynthese in hippocampalen Neuronen demonstrieren. Dabei stehen die Synaptopodinexpression und die Estrogensynthese durch Calcium in einem funktionellen Zusammenhang. Es fanden sich ferner Hinweise, dass die Aromatase im Hippocampus direkt durch ihr Produkt Estrogen reguliert wird. Eine enge Vernetzung von Estradiol- und Calciumhomöostase im Hippocampus lassen ebenfalls unsere Ergebnisse zur PMCA vermuten.

## 6.1 Estradiol reguliert die Synaptopodinexpression herunter

Viele Autoren berichten, dass es unter Einfluss von Estrogenen im Hippocampus zu morphologischen Veränderungen wie der Ausbildung von neuen Spines und Synapsen sowie zur Senkung des Schwellenwertes für LTP kommt, dem elektrophysiologischen Korrelat der synaptischen Plastizität (Good *et al.*, 1999; Zamani *et al.*, 2000; McEwen, 2001, 2004; Segal und Murphy, 1996, 1998, 2001; Smith und McMahon, 2005).

Aufgrund der Lokalisation in Regionen hoher synaptischer Plastizität wie dem Hippocampus, der Assoziation zum Spineapparat und der Bindung an Aktin wird angenommen, dass Synaptopodin an der Aktin-abhängigen Spinemotilität beteiligt ist (Kremerskothen *et al.*, 2005; Deller *et al.*, 2000, 2007; Okubo-Suzuki *et al.*, 2008). Somit scheint Synaptopodin über seinen regulatorischen Einfluss auf Aktin an Prozessen der synaptischen Plastizität im Hippocampus aktiv beteiligt zu sein.

Ausgangsfrage dieser Studie war die potentielle Regulation von Synaptopodin durch Estrogen. Dafür wurden hippocampale Dispersionskulturen mit Estrogen behandelt und die Synaptopodinexpression gemessen. Es wurde die pharmakologische, jedoch nicht toxische Dosis von  $10^{-7}$  M verwendet, da Rune und Mitarbeiter (2006) die Wirkungslosigkeit der physiologischen Estrogenkonzentration von  $10^{-10}$  M bei der weiblichen und  $10^{-11}$  M bei der männlichen Ratte auf die synaptische Plastizität zeigen konnten.

Unter Estrogenbehandlung kam es zu einer signifikanten Herunterregulation der Synaptopodinexpression im Vergleich zur Kontrolle. Synaptopodin steht folglich unter dem regulatorischen Einfluss von Estrogen.

Einige Autoren beschreiben, dass die Synaptopodinexpression als Parameter für das Vorhandensein des Spineapparates verwendet werden kann. So hat Bas Orth (2005) gezeigt, dass die Existenz des Spineapparates in mehr als 95% mit der Synaptopodinexpression korreliert. Dies wird durch die Arbeit von Deller *et al.* (2003) unterstützt, die zeigt, dass in der Synaptopodin-Knockout-Maus keine Spineapparate zu finden sind.

Unsere Ergebnisse können diese These bestätigen. Bei der quantitativen Auswertung der Immunocytochemie mit Synaptopodin-Antikörpern fiel auf, dass sich Synaptopodin intrazellulär verstärkt in den Dendriten und am Axonhügel der Neurone befindet, was mit der Lokalisation von Spineapparaten, wie sie von Gray (1959) und Spacek und Harris (1997) beschrieben wurden, übereinstimmt. Es gibt unterschiedliche Ansichten bezüglich der Lokalisation von Synaptopodin im Spine. In einem aktuellen Review

vertreten Jedlicka *et al.* (2008) die These, dass Synaptopodin ausschließlich in den dendritischen Schichten, nicht aber im Zellkörper lokalisiert ist. Diese Annahme steht im Gegensatz zu unseren Untersuchungen, da wir feststellen konnten, dass sich neben der mRNA auch das Protein Synaptopodin im Soma der Neurone befindet (Deller *et al.*, 2000; Fester *et al.*, 2008).

Anhand der engen Assoziation von Synaptopodin und dem Spineapparat lässt sich folglich davon ausgehen, dass unter Estrogengabe neben der erniedrigten Synaptopodinexpression auch die Größe und/oder die Anzahl der Spineapparate reduziert ist. Zur Überprüfung dieser Hypothese wurden in unserem Institut elektronenmikroskopische Bilder hippocampaler Slicekulturen ausgewertet und das Auftreten des Zellorganells quantifiziert. Hierbei zeigte sich ein deutlich vermindertes Vorkommen von Spineapparaten bei Estrogen-behandelten Slicekulturen (Disteldorf, 2009, Med. Dissertation).

Die exakte Funktion des Spineapparates ist bis heute nicht genau geklärt. Im Hinblick auf die synaptische Plastizität werden ihm zwei wichtige Prozesse zugesprochen. Zum einen beeinflusst er als Calciumspeicher den Calciumhaushalt des Spines (Fifková *et al.*, 1983; Korkotian und Segal, 1998). Zum anderen ist er in die lokale Proteinbiosynthese eingebunden und für die posttranslationale Modifikation von Proteinen verantwortlich (Pierce *et al.*, 2000; 2001; Steward und Schuman, 2001; Sytnyk *et al.*, 2004). Wir wissen, dass das Fehlen des Spineapparates bei der Synaptopodin-Knockout-Maus mit eingeschränkten kognitiven Fähigkeiten und mit einer reduzierten Ausbildung der LTP einhergeht (Deller *et al.*, 2003; Jedlicka *et al.*, 2008). Gleichzeitig findet sich eine verstärkte Expression der Synaptopodin-mRNA nach LTP-Induktion (Yamazaki *et al.*, 2001), was darauf hindeutet, dass der Spineapparat für die neuronale Plastizität eine große Bedeutung hat.

In neueren Studien konnte gezeigt werden, dass die Estrogenwirkung in hippocampalen Neuronen nicht nur über entsprechende nukleäre Estrogenrezeptoren, sondern auch über Calcium als Second messenger vermittelt wird. Zhao *et al.* (2005) beschrieben, dass es nach  $17\beta$ -Estradiolgabe über Membran-gebundene Effekte, unabhängig vom endoplasmatischen Retikulum, zu einem signifikanten Calciumeinstrom in hippocampale Spines kommt. Ferner wurde ein Estrogen-sensitiver GPR30-Rezeptor beschrieben, der, in der Wand des endoplasmatischen Retikulums lokalisiert, nach Stimulation durch Estrogen Calcium aus seinen Speichern freigibt (Revankar *et al.*, 2005; Funakoshi *et al.*, 2006). Somit könnte Estrogen-vermittelt sowohl der schnelle

Calciumeinstrom in den Spine zu einer Calcium-vermittelten Calciumfreisetzung aus den internen Speichern führen (CICR), als auch Estrogen *via* GPR30 direkt zu einem Calcium-Release führen.

Diese Ergebnisse werfen die Frage auf, ob Estrogene genomisch über Estrogenrezeptoren bzw. membranständig über Rapid Effects Synaptopodin regulieren oder ob Synaptopodin in eine Calcium-vermittelte Signalkaskade eingebunden ist, welche durch Estrogene induziert wird.

## **6.2 Der Calcium-Release reguliert die Synaptopodinexpression**

Aufgrund seiner in der Literatur diskutierten Funktion als Calciumspeicher lag die Vermutung nahe, dass die Wirkung von Estrogen auf den Spineapparat und Synaptopodin Calcium-vermittelt abläuft.

Zur Überprüfung des Einflusses von Calcium auf Synaptopodin wurde das Sesquiterpen-Lakton Thapsigargin eingesetzt, das nach einer initialen Calciumfreisetzung aus den internen Calciumspeichern durch Hemmung der SERCA4 eine Wiederaufnahme von Calcium verhindert. Die Funktion der SERCA bleibt dabei unbeeinträchtigt. Unter Thapsigargin-Behandlung kann kein Calcium-Release aus den leeren, internen Calciumspeichern stattfinden.

Geht man von der Theorie des Spineapparates als Calciumspeicher aus, verhindert Thapsigargin ebenfalls den „re-uptake“ von Calcium auch in den Spineapparat (Fifková *et al.*, 1983; Svoboda und Mainen, 1999).

Durch Stimulation der hippocampalen Dispersionskultur mit Thapsigargin konnte eine konzentrationsabhängige, signifikant erhöhte Synaptopodinexpression gemessen werden, was unsere Idee bestätigt, dass Synaptopodin durch Calcium reguliert wird. Erstaunlicherweise wirkt sich jedoch Thapsigargin über seine transient erhöhte cytosolische Calciumkonzentration im Spine positiv auf die Synaptopodinexpression aus. Unsere anfängliche Hypothese, dass die cytosolische Calciumkonzentration die Synaptopodinexpression herunterreguliert, konnte durch dieses Experiment nicht bestätigt werden.

Wir haben daraufhin vermutet, dass nicht die transiente, cytosolische Calciumkonzentrationserhöhung unter Thapsigargin diese Wirkung erzielt, sondern vielmehr die Blockierung des Calcium-Releases, also die lokale, kurzfristige Calciumfreisetzung aus dem Spineapparat. Dafür spricht, dass die Induktion eines

Calcium-Release, wie in unserer Arbeitsgruppe gezeigt werden konnte, einen gegenteiligen Effekt auf die Synaptopodinexpression hervorruft.

Um Verfälschungen dieses Ergebnisses durch einen potentiellen Calciumeinstrom aus dem Medium auszuschließen, wurden Kontrollversuche in unserem Institut mit EDTA durchgeführt, welches extrazelluläres Calcium puffert. Die EDTA-Behandlung führte, simultan zur ursprünglichen Stimulation appliziert, zu identischen Ergebnissen (Ossig, 2009, Med. Dissertation). Folglich ließ sich davon ausgehen, dass nicht Calcium aus dem Medium für die Calciumwirkung im Spine verantwortlich ist. Ferner wussten wir durch die quantitative Auszählung Synaptopodin-positiver Zellen unter Stimulation, dass Thapsigargin keinen Einfluss auf die Anfärbarkeit der Neurone für Synaptopodin hat. Mittels TUNEL-Test ließen sich Verfälschungen durch die Auswertung apoptotischer Zellen annähernd vermeiden.

Da der dendritische Spine durch seine Morphologie des Spinehalses elektrochemisch nahezu isoliert vom restlichen Dendriten fungiert, ist eine Beeinflussung durch Calcium aus dendritischen Speichern ebenfalls unwahrscheinlich (Segal *et al.*, 2005).

Um herauszufinden, ob Estradiol direkt oder Calcium-vermittelt die Wirkung auf Synaptopodin ausübt, wurden simultan Thapsigargin und Estradiol auf die hippocampalen Dispersionskulturen appliziert.

Hierbei zeigte sich eine signifikant erhöhte Synaptopodinexpression gegenüber der Kontrolle. In Verhältnis zur reinen Thapsigargin-Stimulation konnte kein signifikanter Unterschied festgestellt werden.

Durch die simultane Applikation von Estradiol und Thapsigargin war offensichtlich die Herunterregulation von Synaptopodin durch Estradiol aufgehoben. Der Calcium-Release aus dem Spineapparat muss folglich in die Signalkaskade von Estrogen eingebunden sein.

Wie im letzten Kapitel beschrieben, ist Estradiol in der Lage einen CICR auszulösen (Zhao *et al.*, 2005). Dieses Ergebnis lässt vermuten, dass die Estrogen-responsive Herunterregulation von Synaptopodin durch einen CICR ausgelöst wird. Ist dieser nicht auslösbar, wie unter Thapsigargin-Behandlung, wird Estrogen in Bezug auf Synaptopodin wirkungslos.

Ein ähnlicher Mechanismus lässt sich auch nach synaptischer Aktivierung durch NMDA und daraus resultierenden CICR nachweisen. Auch in diesem Fall wurde

Synaptopodin herunterreguliert, ein Effekt, der sich durch Thapsigargin aufheben lässt (Labitzke, 2009, Med. Dissertation).

In bisher nicht veröffentlichten Studien unseres Institutes konnte ferner gezeigt werden, dass durch einen fehlenden Calcium-Release, wie er durch Thapsigargin hervorgerufen wird, nicht nur die Synaptopodinexpression induziert wird, sondern auch die Größe der Spineapparate zunimmt (Disteldorf, 2009, Med. Dissertation).

Folgendes Modell wäre anhand dieser Datenlage und der bisher veröffentlichten Literatur möglich: Estrogene bewirken über GPR30 oder über direkte Membran-assoziierte Prozesse einen Calcium-Release aus dem Spineapparat, was zu einem Auflösen des Spineapparates und zu einer Herunterregulation von Synaptopodin führt. Der Spineapparat scheint auf das Vorhandensein von Calcium in den intrazellulären Speichern angewiesen zu sein, was seine Funktion als Calciumspeicher immer wahrscheinlicher werden lässt. Da Thapsigargin zu einer Entleerung der Calciumspeicher führt, wird Estrogen in Bezug auf die Synaptopodinexpression unwirksam.

### **6.3 Thapsigargin stimuliert die Estrogensynthese**

Die Regulation der Estrogensynthese im Gehirn wird mit hoher Wahrscheinlichkeit bei neuronaler Aktivität über Calcium vermittelt. Balthazart *et al.* (2006) haben herausgefunden, dass auch die Aromatase, das Schlüsselenzym der Estradiolsynthese, durch Calcium reguliert wird. Dabei phosphorylieren Calcium-abhängige Kinasen die Aromatase, was im Gegensatz zu anderen Enzymen zu einer Inaktivierung der Aromatase führt. Neben einem möglichen Einstrom von Calcium *via* NMDA-Rezeptoren, zeichnet sich ab, dass die Aromatase vornehmlich durch Calcium intrazellulärer Speicher reguliert wird (Balthazart *et al.*, 2006).

Durch Versuche in unserem Institut haben wir herausgefunden, dass die Aromatase selbst essentiell an der Spinogenese beteiligt ist, da sie unter anderem die Spinedichte im Hippocampus beeinflusst und somit Prozesse der synaptischen Plastizität induzieren kann (Kretz *et al.*, 2004; Rune *et al.*, 2006). Unter Letrozol, einem potenten Inhibitor der Aromatase, konnte beobachtet werden, dass sowohl die Anzahl insbesondere der mushroom Spines, als auch der Spineapparate signifikant abnimmt (Kretz *et al.*, 2004; Rune und Frotscher, 2005; Rune *et al.*, 2006).

Ferner konnte unter Letrozol festgestellt werden, dass sich keine LTP in hippocampalen Slicekulturen induzieren lassen (Glassmeier *et al.*, 2008, in press). Aufgrund dessen kann man davon ausgehen, dass die Aromatase eine bedeutende Rolle für die synaptische Plastizität darstellt.

Um zu überprüfen, ob sich das Modell von Balthazart, welches *in vitro* mit einem Aromatase-Assay an Wachteln erstellt wurde, auf die hippocampalen Dispersionskulturen übertragen lässt, haben wir die Kulturen konzentrationsabhängig mit Thapsigargin behandelt und die Aromataseexpression quantitativ gemessen in Erwartung einer Zunahme der Estrogensynthese. Durch Versuche von Naftolin *et al.* (1996) wussten wir, dass die Aromatase im Hippocampus exprimiert wird. Es zeigte sich, dass unter Thapsigargin-Behandlung die Aromataseexpression signifikant heraufreguliert wurde. Über den durch Thapsigargin blockierten Calcium-Release werden im Spine die phosphorylierenden Kinasen nicht aktiviert und somit die Aromatase weniger inhibiert.

Es ließ sich hier die Hypothese von Balthazart bestätigen, dass die Aromatase durch Calcium reguliert wird und neu aufzeigen, dass für die Regulation der Aromatase exklusiv der Calcium-Release aus den internen Calciumspeichern verantwortlich ist, da nur diese internen Speicher durch Thapsigargin geblockt werden. Durch Arbeiten unseres Institutes konnten wir auch hier eine Beeinflussung der Ergebnisse durch extrazelluläres Calcium mittels EDTA ausschließen (Ossig, 2009, Med. Dissertation).

Unsere bisherigen Erkenntnisse werden durch die Bestimmung des Estrogengehaltes im Kulturmedium bestätigt. Mit Hilfe des RIA wurde, unter Verwendung des Standardprotokolls und Analyse mit dem Gamma Counter, eine quantitative Bestimmung des Estrogengehaltes im Kulturmedium bei hippocampalen Dispersionskulturen unter Thapsigargin-Behandlung durchgeführt. Es zeigte sich ein erhöhter Estrogengehalt nach Stimulation.

Wie bereits beschrieben, bewirkt Thapsigargin durch den erniedrigten Calcium-Release im Spine eine verminderte Inaktivierung der Aromataseaktivität, die wiederum durch eine verstärkte Estrogenproduktion einen erhöhten Estrogengehalt im Kulturmedium neuronaler Dispersionskulturen bewirkt.

## 6.4 Estrogen reguliert die Aromatase

Die Regulation der Aromatase durch sein Produkt Estrogen ist bereits an permanenten Zellkulturen beschrieben, konnte jedoch bisher nicht an hippocampalen Dispersionskulturen gezeigt werden (Shimizu *et al.*, 1993). Durch unsere vorherigen Ergebnisse lag die Vermutung nahe, dass auch hier Estradiol über einen CICR oder *via* GPR30 Calcium-vermittelt fungiert. Um diese Hypothese zu überprüfen, wurde die Kultur zeitgleich mit Thapsigargin  $10^{-10}$  M und Estradiol  $10^{-7}$  M stimuliert, so dass ein Calcium-Release aus intrazellulären Speichern unterbunden wurde. Erstaunlicherweise konnte kein Unterschied der Aromataseexpression im Vergleich zum Kontrollniveau nachgewiesen werden.

Es scheint, dass Estradiol, um seine Wirkung auf die Aromatase auszuüben, nicht auf den Calcium-Release interner Speicher angewiesen ist. Vermutlich interagiert Estradiol direkt, vermutlich im Rahmen einer Produktinhibition, mit der Aromatase und reguliert diese herunter. Die Thapsigargin-induzierte Heraufregulation der Aromatase wird durch Estradiol aufgehoben, so dass die Aromataseexpression sich auf Kontrollniveau einpendelt.

Zur Überprüfung dieser Hypothese wären weitere Versuche mit EDTA und Estradiol sinnvoll.

## 6.5 Welche Rolle spielt PMCA?

Die plasma membrane calcium ATPase (PMCA) ist ein in den meisten eukaryontischen Zellen exprimiertes Enzym, das den Transport von Calciumionen aus der Zelle katalysiert. Nach stattgefundener Depolarisation führt PMCA die Calciumkonzentration im Spine des Hippocampus wieder auf ein physiologisches Normalniveau. Es ist bekannt, dass PMCA durch die intrazelluläre Calciumkonzentration reguliert wird. Hohe intrazelluläre Calciumkonzentrationen bewirken eine Induktion der PMCA-Aktivität (Osborn *et al.*, 2004; Di Leva *et al.*, 2008).

Durch die in dieser Arbeit bereits untersuchte enge Verknüpfung von Estradiol und Calcium stellte sich die Frage, ob PMCA ebenfalls einer Regulation durch Estradiol unterliegt. Dick *et al.* (2003) lieferten Hinweise dafür. Sie konnten an Zellen des distalen Tubulussystems der Niere zeigen, dass Estrogen zu einer Heraufregulation der PMCA-Aktivität frühestens 24h nach Stimulation führt.

In unseren Versuchsreihen an hippocampalen Dispersionskulturen reduzierte Letrozol signifikant die PMCA-Aktivität. Letrozol blockiert als kompetitiver Inhibitor die Aromatase. Erstaunlicherweise hatte exogen hinzugefügtes Estradiol in einer Konzentration von  $10^{-7}$  M nicht zu einem gegenteiligen Effekt geführt, sondern zeigte keine Auswirkung auf die PMCA-Expression im Vergleich zur Kontrolle. Durch Doppelinkubation von PMCA mit MAP2 wurden ausschließlich neuronale Zellen ausgewertet. Die Theorie von Dick *et al.* (2003) an Nierenzellen lässt sich somit nicht vollständig auf den Hippocampus übertragen.

Es scheint, dass für die Regulation von PMCA nur das endogen produzierte, intrazelluläre Estradiol verantwortlich ist, dessen Bildung durch Letrozol geblockt wird. Nach der Theorie von Zhao *et al.* (2005) würde Estradiol zu einer erhöhten intrazellulären Calciumkonzentration führen, welche dann, um die Homöostase in der Zelle aufrecht zu erhalten, durch eine verstärkte PMCA-Aktivität ausgeglichen werden kann. Es lässt sich vermuten, dass entweder exogen hinzugefügtes Estradiol keinen Effekt auf PMCA hat oder über eine negative Rückkopplung zu einer Inhibition der Aromatase führt, wodurch es den gleichen Effekt wie Letrozol bewirkt. Dieser Prozess könnte länger als unsere Kulturzeit dauern, so dass die Effekte nur im Ansatz sichtbar wären.

## **6.6 Unsere Ergebnisse im wissenschaftlichen Kontext - Die Rolle von Calcium und Synaptopodin auf die synaptische Plastizität**

Folgendes Modell lässt sich nun aus den Ergebnissen dieser Arbeit unter Berücksichtigung der aktuellen Literatur über die Estrogen-vermittelte synaptische Plastizität im Hippocampus erstellen:

Durch neuronale Aktivität dringt Calcium Glutamat-vermittelt *via* NMDA- und AMPA-Rezeptoren in den Spine ein. Diese geringfügig erhöhte Calciumkonzentration im Spine bewirkt einen Calcium-Release aus dem Spineapparat (CICR).

Estradiol scheint neueren Untersuchungen zufolge ebenfalls Calcium aus dem Spineapparat freizusetzen (Zhao *et al.*, 2005). So wird ein GPR30-Estrogenrezeptor beschrieben, der membranständig im endoplasmatischen Retikulum lokalisiert ist. Nach Stimulation aktiviert er eine intrazelluläre, Calcium-abhängige Signalkaskade und führt schließlich zu einem Calcium-Release aus internen Calciumspeichern (Revankar *et al.*, 2005; Funakoshi *et al.*, 2006).

Der Calcium-Release bewirkt über Aktivierung spezifischer Kinasen eine Phosphorylierung und damit Inaktivierung der Aromatase (Balthazart *et al.*, 2006). Der intrazelluläre Estrogengehalt sinkt.

Gleichzeitig führt der Calcium-Release zu einer Herunterregulation der Synaptopodinexpression und einer Verringerung von Spineapparaten.

Durch die in dieser Arbeit gezeigte enge Verbindung *via* Calcium zwischen dem Spineapparat, der vermutlich die Fähigkeit zur Calciumspeicherung besitzt, und der Aromatase, dessen Aktivität über Calcium regulierbar ist, könnte man vermuten, dass diese in gegenseitigem, regulatorischen Verhältnis zueinander stehen. Somit könnte auch die inaktivierte Aromatase zu einer Verringerung der Synaptopodinexpression führen. Diese Theorie gilt es jedoch in weiteren Experimenten zu bestätigen.

Calcium könnte bei seiner Ausschüttung ein Auflösen des Spineapparates triggern, was die Vorstellung des Spineapparates als Calciumspeicher immer wahrscheinlicher werden lässt.

Da die erhöhte Calciumkonzentration nach einem Calcium-Release sich toxisch auf den Spine auswirkt, erfolgt ein schneller Rücktransport in die intrazellulären Calciumspeicher, wie dem Spineapparat, oder nach extrazellulär über PMCA. PMCA wird sowohl von der erhöhten intrazellulären Calciumkonzentration stimuliert (Di Leva *et al.*, 2008), als auch, wie in dieser Studie gezeigt, durch erhöhte, endogen produzierte Estradiolkonzentrationen aktiviert, um die Calciumhomöostase im Spine aufrecht zu erhalten.

Wie in dieser Arbeit gesehen, setzen verstärkte Reizdarbietungen im hippocampalen Spine oder auch eine erhöhte Estradiolkonzentration eine Calcium-vermittelte Signalkaskade in Gang, die vermutlich über Synaptopodin die synaptische Plastizität steuert. Als synaptische Plastizität bezeichnet man einen hoch dynamischen Prozess von Auf- und Umbauprozessen neuronaler Synapsen, die es dem Gehirn ermöglicht, auf veränderte Reizintensitäten reagieren zu können. So konnte in Tierexperimenten gezeigt werden, dass Lernprozesse mit einer vermehrten Anzahl dendritischer Spines, sowie einer veränderten Spinemorphologie einhergingen (Bailey und Kandel, 1993; Engert und Bonhoeffer, 1999). Synaptische Plastizität spielt folglich eine wichtige Rolle bei der Gedächtnisbildung.

Maßgeblich an Veränderungen der Spinemorphologie ist das Aktinzytoskelett im Spine beteiligt. Krucker *et al.* konnten 2000 zeigen, dass LTP im Hippocampus mit einer

Veränderung des Aktinzytoskeletts und einem erhöhten Aktiningehalt einhergehen. Durch Anwendung von Pharmaka, welche zur Depolymerisation von Aktin führen, kommt es zu einer raschen Aufhebung der Spinemotilität und zum Verlust synaptischer Strukturen (Fischer *et al.*, 1998). Aktin scheint somit stabilisierend auf Synapsen zu wirken. Aufgrund seiner Lokalisation in Regionen hoher synaptischer Plastizität (Telencephalon) und seiner Assoziation zu F-Aktin und dem Spineapparat (Mundel *et al.*, 1997), scheint Synaptopodin regulativ auf das Aktinzytoskelett zu wirken und somit Prozesse der synaptischen Plastizität zu induzieren. So reguliert Synaptopodin neben F-Aktin auch die Aktivität von  $\alpha$ -Aktinin, einem Molekül, das essentiell an der Bündelung und Vernetzung von Aktinfilamenten beteiligt ist, eine Grundvoraussetzung für die synaptische Plastizität (Kremerskothen *et al.*, 2005; Asanuma *et al.* 2005, 2006). Diese These unterstützt, dass späte Phasen einer LTP (l-LTP) zu einer verstärkten Synaptopodinexpression führen und bei der Synaptopodin-Knockout-Maus die LTP-Induktion beeinträchtigt ist (Deller *et al.*, 2003).

Mit dieser Arbeit konnte erstmalig gezeigt werden, dass die Estrogen-vermittelte synaptische Plastizität im Hippocampus durch eine Calcium-abhängige Signalkaskade reguliert wird, in die der Spineapparat als interner Calciumspeicher eingebunden ist. In Zukunft könnten diese Vorgänge bei der Behandlung demenzieller Erkrankungen pharmakologisch genutzt werden.

## **6.7 Klinischer Ausblick: Der Einfluss von Calcium auf neurodegenerative Erkrankungen**

Inwiefern kann nun diese Grundlagenforschung für künftige Therapien genutzt werden? Im Fokus stehen dabei demenzielle Erkrankungen. Es ließ sich mit dieser Arbeit zeigen, dass die synaptische Plastizität neuronaler Prozesse durch ein Gleichgewicht aufrechterhalten wird, bei dem Calcium eine zentrale Rolle spielt.

Eine dauerhafte diskrete Erhöhung der freien intrazellulären Calciumionenkonzentration ( $[Ca^{2+}]_i$ ) wie bei Morbus Alzheimer, wirkt dabei ebenso toxisch, wie eine deutliche Calciumüberladung durch akute Ereignisse beispielsweise bei einem Hirninfarkt, Hirntrauma oder im epileptischen Anfall. Diesen Situationen ist gemein, dass die erhöhte Calciumionenkonzentration zu dendritischer Degeneration, zu dem Verlust von Synapsen und zu Änderungen im Zytoskelett sowie zu Apoptosen führt (Khachaturian, 1989).

Da Gehirnregionen, die besonders vulnerabel auf äußere Einflüsse reagieren, eine hohe Dichte an Glutamatrezeptoren besitzen, führen hier schon geringe Überstimulationen dieser Rezeptoren zu großem Schaden.

Auf molekularer Ebene bewirkt eine gestörte Calciumhomöostase durch seine Akkumulation von Calcium eine Aktivierung von Enzymkaskaden und eine Störung der Redoxsysteme mit der Bildung von freien Radikalen (Mattson, 1994). Zusätzlich wirkt sie sich negativ auf die Anzahl an Spineapparaten und auf den Apoptose-Vorgang aus.

Beim Morbus Alzheimer führt eine Aktivitätsänderung Calcium-abhängiger Proteasen und Proteinkinasen zu einer spezifischen Erhöhung des A $\beta$ -Peptides und zu Phosphorylierungen des Tau-Proteins (Querfurth und Selkoe, 1994). Somit wären die pathologischen Hauptmerkmale der Alzheimer Erkrankung (Apoptose, Plaques und Fibrillen mit hyperphosphorylierten Neurofilamentproteinen) als Folge einer alterierten Calciumhomöostase vorstellbar (Viskorf, 2003, Med. Dissertation)

Einige Studien geben Hinweise, dass bei depressiven Erkrankungen nicht nur der Serotoninhaushalt, sondern auch die Calciumhomöostase mit einer erhöhten intrazellulären Calciumkonzentration gestört ist (Dubovsky *et al.*, 1992, 1994; Yamawaki *et al.*, 1996). So wundert es nicht, dass Alzheimer-Patienten häufig unter depressiven Verstimmungen leiden. Therapeutisch könnte diese Erkenntnis erfolgreich genutzt werden, indem man bei Patienten mit einer Koexistenz von Morbus Alzheimer und Depressionen Calciumantagonisten einsetzt (De Vry *et al.*, 1997). Dies hätte insofern Vorteile gegenüber den trizyklischen Antidepressiva, da diese über starke anticholinerge Nebenwirkung verfügen und bei geriatrischen Patienten ihre Wirksamkeit verlieren (Slotkin *et al.*, 1989).

## 7 Zusammenfassung

Die Bildung eines Spineapparates ist auf das assoziierte Protein Synaptopodin zurückzuführen. Der Spineapparat ist ein intrazellulärer Calciumspeicher, welcher spezifisch in reifen Spines vorkommt. Synaptopodin ist in Prozesse synaptischer Plastizität involviert. Dies ist auch für Estradiol bzw. die Aromatase, dem finalen Enzym der Estrogensynthese, nachgewiesen worden. Die Regulation der Aromatase erfolgt durch Calcium bevorzugt aus intrazellulären Speichern, wofür der Spineapparat in Frage käme. Ihre Hemmung bewirkt eine Reduktion der Synaptopodin-Immunreaktivität in hippocampalen Neuronen. Aus der Literatur ist weiterhin bekannt, dass Estradiol einen Calciumeinstrom bewirkt, der zu einem Calcium-induzierten Calcium-Release möglicherweise aus dem Spineapparat führen könnte.

In der vorliegenden Arbeit wurden Experimente zur Calciumhomöostase in hippocampalen Spines im Hinblick auf einen potentiellen Einfluss auf die Estrogenvermittelte synaptische Plastizität durchgeführt.

Mittels Immunocytochemie und quantitativer Bildanalyse ließ sich nachweisen, dass Thapsigargin die Immunreaktivität von Synaptopodin und Aromatase heraufreguliert. Thapsigargin blockiert die Wiederaufnahme von Calcium in intrazelluläre Speicher nach vorausgegangenem Release. Ein vermehrter Estradiolgehalt, der im Medium durch RIA ermittelt werden konnte, bestätigte die Hochregulation der Aromatase. Umgekehrt war die Synaptopodinexpression in hippocampalen Dispersionskulturen nach Estradiol-Behandlung signifikant reduziert.

Simultane Behandlung der Kulturen mit Estradiol und Thapsigargin hatte die Aufhebung der Thapsigargin-induzierten Hochregulation der Aromataseexpression zur Folge, vermutlich das Ergebnis einer Produktinhibition.

Dagegen hatte dieselbe Behandlung keinen Effekt auf die Thapsigargin-induzierte Hochregulation von Synaptopodin, da sehr wahrscheinlich aufgrund der entleerten Speicher nach Thapsigargin-Behandlung kein CICR durch Estradiol ausgelöst werden kann.

Unsere Ergebnisse weisen daraufhin, dass Estradiol über einen CICR die Aromatase hemmt und dadurch Synaptopodin herunterreguliert.

## 8 Literaturverzeichnis

Altman J., Das GD. (1965) Autoradiographic and histological evidence of postnatal hippocampal neurogenesis in rats. *J Comp Neurol* 124: 319-35.

Amaral DG., Wittner MP. (1989) The three-dimensional organization of the hippocampal formation: a review of anatomical data. *Neuroscience* 31: 571-591.

Asanuma K., Kim K., Mundel P. (2005) Synaptopodin regulates the actin-bundling activity of alpha actin in an isoform-specific manner. *J Clin Invest* 115: 1188-1198.

Azcoitia I., Sierra A., Veiga S., Honda S., Harada N., Garcia-Segura LM. (2001) Brain aromatase is neuroprotective. *J Neurobiol* 47: 318-329.

Bailey CH., Kandel ER. (1993) Structural changes accompanying memory storage. *Annu Rev Physiol* 55: 397-426.

Balthazart J., Baillien M., Charlier TD., Ball GF. (2003) Calcium dependent phosphorylation processes control brain aromatase in quail. *J Neurosci* 17: 1591-1606.

Balthazart J., Ball GF. (2006) Is brain estradiol a hormone or a neurotransmitter? *Trends Neurosci* 29: 241-9.

Bas Orth C., Deller T. (2005) Lamina-specific distribution of Synaptopodin, an actin-associated molecule essential for the spine apparatus, in identified principal cell dendrites of the mouse hippocampus. *J Comp Neurol* 487: 227-39.

Bas Orth C., Schultz C., Müller CM., Frotscher M., Deller T. (2007) Loss of the cisternal organelle in the axon initial segment of cortical neurons in synaptopodin-deficient mice. *J Comp Neurol* 504: 441-449.

Behnisch T., Reymann KG. (1995) Thapsigargin blocks long-term potentiation induced by weak, but not strong tetanisation in rat hippocampal CA1 neurons. *Neurosci Lett* 92: 185-8.

Benninghoff A., Drenckhahn D. (2004) Aufl. 16. Anatomie Band 2. Makroskopische Anatomie, Histologie, Embryologie, Zellbiologie. Urban & Fischer bei Elsevier. S. 503-507.

Berridge MJ. (1998) Neuronal calcium signaling. *Neuron* 21: 13-26.

Berridge MJ., Bootman MD., Roderick HL. (2003) Calcium signalling: dynamics, homeostasis and remodelling. *Nat Rev Mol Cell Biol* 4: 517-29.

Birge SJ., McEwen BS., Wise PM. (2001) Effects of estrogen deficiency on brain function. Implications for the treatment of postmenopausal women. *Postgrad Med Spec No*: 11-6.

Brewer GJ. (1997) Isolation and culture of adult rat hippocampal neurons. *J Neurosci* 17: 143-55.

- Carafoli E. (1994) The signaling function of calcium and its regulation. *J Hypertens Suppl* 12: 47-56.
- Collin C., Miyaguchi K., Segal M. (1997) Dendritic spine density and LTP induction in cultured hippocampal slices. *J Neurophys* 77: 1614-23.
- Coss RG., Globus A. (1978) Spine stems on tectal interneurons in jewel fish are shortened by social stimulation. *Science* 200: 787-90.
- Czarnecki K. (2005) Charakterisierung der Expression von Synaptopodin in der postnatalen Entwicklung des Hippocampus. Med. Dissertation. Albert-Ludwigs-Universität Freiburg.
- Deller T., Mundel P., Frotscher M. (2000) Potential role of synaptopodin in spine motility by coupling actin to the spine apparatus. *Hippocampus* 10: 569-581.
- Deller T., Merten T., Roth SU., Mundel P., Frotscher M. (2000) Actin-associated protein synaptopodin in the rat hippocampal formation: Localization in the spine neck and close association with the spine apparatus of principal neurons. *J Comp Neurol* 418: 164-181.
- Deller T., Mundel P., Frotscher M. (2002) Laminar distribution of Synaptopodin in normal and reeler mouse brain depends on the position of spine-bearing neurons. *J Comp Neurol* 453: 33-44.
- Deller T., Korte M., Chabanis S., Drakew A., Schwegler H., Stefani GG., Zuniga A., Schwarz K., Bonhoeffer T., Zeller R., Frotscher M., Mundel P. (2003) Synaptopodin-deficient mice lack a spine apparatus and show deficits in synaptic plasticity. *Proc Natl Acad Sci* 100: 10494-9.
- Deller T., Bas Orth C., Mundel P. (2006) Plasticity of synaptopodin and the spine apparatus organelle in the rat fascia dentata following entorhinal cortex lesion. *J Comp Neurol* 499: 471-484.
- Deller T., Orth BC., Del Turco D., Vlachos A., Burbach GJ., Drakew A., Chabanis S., Korte M., Schwegler H., Haas CA., Frotscher M. (2007) A role for synaptopodin and the spine apparatus in hippocampal synaptic plasticity. *Ann Anat* 189: 5-16.
- De Vry J., Fritze J., Post RM. (1997) The management of coexisting depression in patients with dementia: potential of calcium channel antagonists. *Clin Neuropharm* 20: 22-35.
- Dick IM., Liu J., Glendenning P., Prince RL. (2003) Estrogen and androgen regulation of plasma membrane calcium pump activity in immortalized distal tubule kidney cells. *Mol Cell Endocrinol* 212: 11-8.
- Di Leva F., Domi T., Fedrizzi L., Lim D., Carafoli E. (2008) The plasma membrane Ca(2+) ATPase of animal cells: Structure, function and regulation. *Arch Biochem Biophys* 476: 65-74.
- Disteldorf E. (2009) Stereologische Untersuchung des Spineapparates in hippocampalen Spines unter dem Einfluss von Estradiol. Med. Dissertation. Universität Hamburg.

- Dubovsky SL., Murphy J., Christiano J., Lee C. (1992) The calcium second messenger system in bipolar disorders: data supporting new research directions. *J Neuropsych Clin Neurosci* 4: 3-14.
- Dubovsky SL., Thomas M., Hijazi A., Murphy J. (1994) Intracellular calcium signalling in peripheral cells of patients with bipolar affective disorder. *Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci* 243: 229-34.
- Emptage N., Bliss TV., Fine A. (1999) Single synaptic events evoke NMDA receptor-mediated release of calcium from internal stores in hippocampal dendritic spines. *Neuron* 22: 115-24.
- Engert F., Bonhoeffer T. (1999) Dendritic spine changes associated with hippocampal long-term synaptic plasticity. *Nature* 399: 66-70.
- Fester L., Ribeiro-Gouveia V., Prange-Kiel J., von Schassen C., Böttner M., Jarry H., Rune GM. (2006) Proliferation and apoptosis of hippocampal granule cells require local oestrogen synthesis. *J Neurochem* 97: 1136.
- Fifková E., Delay RJ. (1982) Cytoplasmic actin in neuronal processes as a possible mediator of synaptic plasticity. *J Cell Biology* 95: 345-350.
- Fifková E., Markham JA., Delay RJ. (1983) Calcium in the spine apparatus of dendritic spines in the dentate molecular layer. *Brain Res* 266: 163-168.
- Fifková E., Morales M. (1989) Calcium-regulated contractile and cytoskeletal proteins in dendritic spines may control synaptic plasticity. *Ann N Y Acad Sci* 568: 131-7.
- Fischer M., Kaech S., Knutti D., Matus A. (1998) Rapid actin-based plasticity in dendritic spines. *Neuron* 20: 847-854.
- Frenguelli BG., Malinow R. (1996) Fluctuations in intracellular calcium responses to action potentials in single en passage presynaptic boutons of layer V neurons in neocortical slices. *Learn Mem* 3: 150-9.
- Frotscher M., Zimmer J. (1983) Lesion-induced mossy fibers to the molecular layer of the rat fascia dentata: identification of postsynaptic granule cells by the Golgi-EM technique. *J Comp Neurol* 215: 299-311.
- Fukazawa Y., Saitoh Y., Ozawa F., Ohta Y., Mizuno K., Inokuchi K. (2003) Hippocampal LTP is accompanied by enhanced F-actin content within the dendritic spine that is essential for late LTP maintenance in vivo. *Neuron* 38: 447-60.
- Funakoshi T., Yanai A., Shinoda K., Kawano MM., Mizukami Y. (2006) G protein-coupled receptor 30 is an estrogen receptor in the plasma membrane. *Biochem Biophys Res Commun* 346: 904-10.
- Garcia-Segura LM., Naftolin F., Hutchison JB., Azcoitia I., Chowen JA. (1999) Role of astroglia in estrogen regulation of synaptic plasticity and brain repair. *J Neurobiol* 40: 574-84.

Garcia-Segura LM., Wozniak A., Azcoitia I. (1999) Aromatase Expression by astrocytes after brain injury: implications for local estrogen formation in brain repair. *Neurosci* 89: 567-578.

Garcia-Segura LM., Azcoitia I., DonCarlos LL. (2001) Neuroprotection by estradiol. *Prog Neurobiol* 63: 29-60.

Garcia-Segura LM. (2008) Aromatase in the brain: not just for reproduction anymore. *J Neuroendocrinol* 20: 705-12.

Glassmeier G., Zhou L., Dudzinski D., von Lossow R., Schwarz J., Rune GM. (2008) Aromatase activity is essential for the induction of LTP in hippocampal slice cultures. In press.

Goldin M., Segal M. (2003) Protein kinase C and ERK involvement in dendritic spine plasticity in cultured rodent hippocampal neurons. *Eur J Neurosci* 17: 2529-2539.

Good M., Day M., Muir JL. (1999) Cyclical changes in endogenous levels of oestrogen modulate the induction of LTD and LTP in the hippocampal CA1 region. *Eur J Neurosci* 11: 4476-80.

Gray EG. (1959) Axo-somatic and axo-dendritic synapses of the cerebral cortex: an electron microscopic study. *J Anat* 83: 420-433.

Hakii H., Fujiki H., Suganuma M., Nakayasu M., Tahira T., Sugimura T., Scheuer PJ., Christensen SB. (1986) Thapsigargin, a histamine secretagogue, is a non-12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate (TPA) type tumor promoter in two-stage mouse skin carcinogenesis. *J Cancer Res Clin Oncol* 111: 177-81.

Hebb D. (2002) The organization of behavior. A neuropsychological theory. Erlbaum Books, Mahwah (Nachdruck der Ausgabe New York 1949).

Hojo Y., Hattori TA., Enami T., Furukawa A., Suzuki K., Ishii HAT., Mukai H., Morrison JH., Janssen WG., Kominami S., Harada N., Kimoto T., Kawato S. (2004) Adult male rat hippocampus synthesizes estradiol from pregnenolone by cytochromes P45017alpha and P450 aromatase localized in neurons. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 101: 865-70.

Holcman D., Schuss Z., Korkotian E. (2004) Calcium dynamics in dendritic spines and spine motility. *J Biophys* 87: 81-91.

Holcman D., Korkotian E., Segal M. (2005) Calcium dynamics in dendritic spines, modeling and experiments. *Cell Calcium* 37:467-75.

Jedlicka P., Schwarzacher SW., Winkels R., Kienzler F., Frotscher M, Bramham CR., Schultz C., Bas Orth C., Deller T. (2008) Impairment of in vivo theta-burst long-term potentiation and network excitability in the dentate gyrus of synaptopodin-deficient mice lacking the spine apparatus and the cisternal organelle. *Hippocampus*.

Jedlicka P., Vlachos A., Schwarzacher SW., Deller T. (2008) A role for the spine apparatus in LTP and spatial learning. *Behav Brain Res* 192: 12-9.

Kaech S., Parmar H., Roelandse M., Bornmann C., Matus A. (2001) Cytoskeletal microdifferentiation: a mechanism for organizing morphological plasticity in dendrites. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98: 7086-92.

Kennedy MB. (1989) Regulation of neuronal function by calcium. *Trends Neurosci* 12: 417-20.

Khachaturian ZS. (1989) Calcium, membranes, aging, and Alzheimer's disease. Introduction and overview. *Ann N Y Acad Sci* 568: 1-4.

Kim JS., Kim HY., Kim JH., Shin HK., Lee SH., Lee YS., Son H. (2002) Enhancement of rat hippocampal long-term potentiation by 17 beta-estradiol involves mitogen-activated protein kinase-dependent and -independent components. *Neurosci Lett* 332: 65-9.

Klüver H., Bucy P. (1939) Preliminary analysis of functions of the temporal lobes in monkeys. *Arch Neurol Psych* 42: 979.

Korkotian E., Segal M. (1999) Release of calcium from stores alters the morphology of dendritic spines in cultured hippocampal neurons. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96: 12068-72.

Korkotian E., Holcman D., Segal M. (2004) Dynamic regulation of spine-dendrite coupling in cultured hippocampal neurons. *Eur J Neurosci* 20: 2649-63.

Korkotian E., Segal M. (2006) Spatially confined diffusion of calcium in dendrites of hippocampal neurons revealed by flash photolysis of caged calcium. *Cell Calcium* 40: 441-9.

Kovalchuk Y., Eilers J., Lisman J., Konnerth A. (2000) NMDA receptor-mediated subthreshold  $Ca^{2+}$  signals in spines of hippocampal neurons. *J Neurosci* 20: 1791-9.

Kremerskothen J., Plaas C., Kindler S., Frotscher M., Barnekow A. (2005) Synaptopodin, a molecule involved in the formation of the dendritic spine apparatus, is a dual actin/alpha-actinin binding protein. *J Neurochem* 92: 597-606.

Kretz O., Fester L., Wehrenberg U., Zhou L., Brauckmann S., Zhao S., Prange-Kiel J., Naumann T., Jarry H., Frotscher M., Rune GM. (2004) Hippocampal synapses depend on hippocampal estrogen synthesis. *J Neurosci* 24: 5913-5921.

Krucker T., Siggins GR., Halpain S. (2000) Dynamic actin filaments are required for stable long-term potentiation (LTP) in area CA1 of the hippocampus. *Proc Natl Acad Sci* 97: 6856-61.

Labitzke J. (2009) Einfluss neuronaler Aktivität auf die Expression von Synaptopodin in hippocampalen dendritischen Spines. *Med. Dissertation. Universität Hamburg.*

Li C., Brake WG., Romeo RD., Dunlop JC., Gordon M., Buzescu R., Magarinos AM., Allen PB., Greengard P., Luine V., McEwen BS. (2004) Estrogen alters hippocampal dendritic spine shape and

enhances synaptic protein immunoreactivity and spatial memory in female mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101: 2185-90.

MacLusky NJ., Philip A., Hurlburt C., Naftolin F. (1985) Estrogen formation in the developing rat brain: sex differences in aromatase activity during early post-natal life. *Psychoneuroendocrinology* 10: 355-61.

Martin PD., Shapiro ML. (2000) Disparate effects of long-term potentiation on evoked potentials and single CA1 neurons in the hippocampus of anesthetized rats. *Hippocampus* 10: 207-12.

Matias C., Dionísio JC., Quinta-Ferreira ME. (2002) Thapsigargin blocks STP and LTP related calcium enhancements in hippocampal CA1 area. *Neuroreport* 13: 2577-80.

Matsuzaki M., Ellis-Davies GC., Nemoto T., Miyashita Y., Iino M., Kasai H. (2001) Dendritic spine geometry is critical for AMPA receptor expression in hippocampal CA1 pyramidal neurons. *Nat Neurosci* 4: 1086-92.

Matsuzaki M., Honkura N., Ellis-Davies GC., Kasai H. (2004) Structural basis of long-term potentiation in single dendritic spines. *Nature* 429: 761-6.

Mattson MP. (1994) Calcium and neuronal injury in Alzheimer's disease. Contributions of beta-amyloid precursor protein mismetabolism, free radicals, and metabolic compromise. *Ann N Y Acad Sci* 747: 50-76.

Matus A., Ackermann M., Pehling G., Byers HR., Fujiwara K. (1982) High actin concentrations in brain dendritic spines and postsynaptic densities. *Proc Natl Acad Sci U S A* 79: 7590-7594.

McEwen B., Akama K., Alves S., Brake WG., Bulloch K., Lee S., Li C., Yuen G., Milner TA. (2001) Tracking the estrogen receptor in neurons: implications for estrogen-induced synapse formation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98: 7093-100.

McEwen B. (2001) Effects of estrogen deficiency on brain function. Implications for the treatment of postmenopausal women. *Postgrad Med Spec No*: 11-16.

McEwen B. (2001) Estrogens effects on the brain: multiple sites and molecular mechanisms. *J Appl Physiol* 91: 2785-2801.

McEwen B. (2004) Estrogen alters hippocampal dendritic spine shape and enhances synaptic protein immunoreactivity and spatial memory in female mice. *Proc Natl Acad Sci* 101: 2185-2190.

Meyer T. (1991) Cell signalling by second messenger waves. *Cell* 64: 675-8.

Mukai H., Takata N., Ishii HT., Tanabe N., Hojo J, Furukawa A., Kimoto T., Kawato S. (2006) Hippocampal synthesis of estrogens and androgens which are paracrine modulators of synaptic plasticity: *Synaptocrinology. Neurosci* 138: 757-64.

- Muller D., Toni N., Buchs PA. (2000) Spine changes associated with long term potentiation. *Hippocampus* 10: 596-674.
- Mundel P., Heid HW., Mundel TM., Krüger M., Reiser J., Kriz W. (1997) Synaptopodin: an actin associated protein in telencephalic dendrites and renal podocytes. *J Cell Biol* 139: 193-204.
- Murphy DD., Segal M. (1996) Regulation of dendritic spine density in cultured rat hippocampal neurons by steroid hormones. *J Neurosci* 16: 4059-68.
- Murphy DD., Cole NB., Segal M. (1998) Brain-derived neurotrophic factor mediates estradiol-induced dendritic spine formation in hippocampal neurons. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95: 11412-7.
- Naftolin F., Ryan KJ., Petro Z. (1971) Aromatization of androstenedione by limbic system tissue from human foetuses. *J Endocrinol* 51: 795-6.
- Naftolin F., Ryan KJ. (1975) The metabolism of androgens in central neuroendocrine tissues. *J Steroid Biochem* 6: 993-7.
- Naftolin F., Horvath TL., Jakab RL., Leranthe C., Harada N., Balthazart J. (1996) Aromatase immunoreactivity in axon terminals of the vertebrate brain. An immunocytochemical study on quail, rat, monkey and human tissues. *Neuroendocrinology* 63: 149-55.
- Naftolin F., Leranthe C., Horvath TL., Garcia-Segura LM. (1996) Potential neuronal mechanisms of estrogen actions in synaptogenesis and synaptic plasticity. *Cell Mol Neurobiol* 16: 213-23.
- Nelson EJ., Li CC., Bangalore R., Benson T., Kass RS., Hinkle PM. (1994) Inhibition of L-type calcium-channel activity by thapsigargin and 2,5-t-butylhydroquinone, but not by cyclopiazonic acid. *J Biochem* 302: 147-54.
- Nilsson S., Gustafsson JA. (2002) Biological role of estrogen and estrogen receptors. *Crit Rev Biochem Mol Biol* 37: 1-28.
- Nimchinsky EA., Sabatini BL., Svoboda K. (2002) Structure and function of dendritic spines. *Annu Rev Physiol* 64: 313-353.
- Oertner TG., Matus A. (2005) Calcium regulation of actin dynamics in dendritic spines. *Cell Calcium* 37: 477-82.
- Okubo-Suzuki R., Okada D., Sekiguchi M., Inokuchi K. (2008) Synaptopodin maintains the neural activity-dependent enlargement of dendritic spines in hippocampal neurons. *Mol Cell Neurosci* 38: 266-76.
- Osborn KD., Zaidi A., Mandal A., Urbauer RJ., Johnson CK. (2004) Single-molecule dynamics of the calcium-dependent activation of plasma-membrane Ca<sup>2+</sup>-ATPase by calmodulin. *J Biophys* 87: 1892-9.

- Ossig C. (2009) Der Einfluss der Calciumhomöostase in hippocampalen Neuronen auf die Synaptopodinexpression dendritischen Spines. Med. Dissertation. Universität Hamburg.
- Papa M., Segal M. (1996) Morphological plasticity in dendritic spines of cultured hippocampal neurons. *Neurosci* 71: 1005-11.
- Papez JW. (1995) A proposed mechanism of emotion. 1937. *J Neuropsychiatry Clin Neurosci* 7: 103-12.
- Peters A., Kaiserman-Abramof IR. (1970) The small pyramidal neuron of the rat cerebral cortex. The perikaryon, dendrites and spines. *Am J Anat* 127: 321-55.
- Pozzo-Miller LD., Inoue T., Murphy DD. (1999) Estradiol increases spine density and NMDA-dependent  $Ca^{2+}$  transients in spines of CA1 pyramidal neurons from hippocampal slices. *J Neurophysiol* 81: 1404-11.
- Prange-Kiel J., Rune GM., Zwirner M., Wallwiener D., Kiesel L. (2001) Regulation of estrogen receptor alpha and progesterone receptor (isoform A and B) expression in cultured human endometrial cells. *Exp Clin Endocrinol Diabetes* 109: 231-7.
- Prange-Kiel J. (2003) Para/Autocrine Regulation of Estrogen Receptors in Hippocampal Neurons. *Hippocampus* 13: 226-234.
- Prange-Kiel J., Fester L., Zhou L., Lauke H., Carrétero J., Rune GM. (2006) Inhibition of hippocampal estrogen synthesis causes region-specific downregulation of synaptic protein expression in hippocampal neurons. *Hippocampus* 16: 464-71.
- Prange-Kiel J., Rune GM. (2006) Direct and Indirect effects of estrogen on rat hippocampus. *Neurosci* 138: 765-772.
- Querfurth HW., Selkoe DJ. (1994) Calcium ionophore increases amyloid beta peptide production by cultured cells. *Biochem* 33: 4550-61.
- Qui J., Bosch MA., Tobias SC., Grandy DK., Scanlan TS., Ronnekleiv OK., Kelly MJ. (2003) Rapid signalling of estrogen in hypothalamic neurons involves a novel G-protein-coupled estrogen receptor that activates protein kinase C. *J Neurosci* 23: 9529-40.
- Racca C., Stephenson FA., Streit P., Roberts JD., Somogyi P. (2000) NMDA receptor content of synapses in stratum of the hippocampal CA1 area. *J Neurosci* 20: 2512-2522.
- Ramón y Cajal S. (1911) *Histologie du Systeme Nerveux de l'Homme et des Vertebretes*, Vols. 1 and 2. A. Maloine.
- Revankar CM., Cimino DF., Sklar LA., Arterburn JB., Prossnitz ER. (2005). A transmembrane intracellular estrogen receptor mediates rapid cell signalling. *Science* 307: 1625-30.

- Roth SU., Sommer C., Mundel P., Kiessling M. (2001) Expression of synaptopodin, an actin-associated protein, in the rat hippocampus after limbic epilepsy. *Brain Pathology* 11: 169-18.
- Rune GM., Frotscher M. (2002) Estrogen up-regulates estrogen receptor  $\alpha$  and synaptophysin in slice cultures of rat hippocampus. *Neurosci* 113: 167-175.
- Rune GM., Lohse C., Prange-Kiel J., Fester L., Frotscher M. (2006) Synaptic plasticity in the hippocampus: Effects of estrogen from the gonads or hippocampus. *Neurochem Res* 31: 145-155.
- Rune GM., Frotscher M. (2005) Neurosteroid synthesis in the hippocampus: Role in synaptic plasticity. *Neurosci* 136: 833-842.
- Rune GM., von Schassen C., Fester L., Prange-Kiel J. (2006) Oestrogen synthesis in the hippocampus: Role in axon outgrowth. *J Neuroendocrinol* 18: 847-856.
- Rusakov DA., Davies HA., Harrison E., Diana G., Richter-Levin G., Bliss TV., Stewart MG. (1997) Ultrastructural synaptic correlates of spatial learning in rat hippocampus. *Neurosci* 80: 69-77.
- Ryan J., Scali J., Carriere I., Ritchie K., Ancelin ML. (2008) Hormonal treatment, mild cognitive impairment and Alzheimer's disease. *Int Psychogeriatr* 20: 47-56.
- Sabatini BL., Oertner TG., Svoboda K. (2002) The life cycle of  $\text{Ca}^{2+}$  ions in dendritic spines. *Neuron* 33: 439-52.
- Saito M., Benson EP., Saito M., Rosenberg A. (1987) Metabolism of cholesterol and triacylglycerol in cultured chick neuronal cells, glial cells, and fibroblasts: accumulation of esterified cholesterol in serum-free culture. *J Neurosci Res* 18: 319-25.
- Schulz PE. (1997) Long-term potentiation involves increases in the probability of neurotransmitter release. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94: 5888-93.
- Segal M., Murphy D. (2001) Estradiol induces formation of dendritic spines in hippocampal neurons: functional correlates. *Horm Behav* 40: 156-9.
- Segal M. (2005) Dendritic spines and long term-plasticity. *Nat Rev Neurosci* 6: 277-284.
- Shimizu Y., Yarborough C., Osawa Y. (1993). Competitive product inhibition of aromatase by natural estrogens. *J Steroid Biochem Mol Biol* 44: 651-6.
- Singh M., Sumien N., Kyser C., Simpkins JW. (2008) Estrogens and progesterone as neuroprotectants: what animal models teach us? *Front Biosci* 13: 1083-9.
- Slotkin TA., Whitmore WL., Barnes GA., Krishnan KR., Blazer DG., Knight DL., Nemeroff CB. (1989) Reduced inhibitory effect of migraine on radiolabeled serotonin uptake into platelets in geriatric depression. *Biol Psychiatry* 25: 687-91.

- Smith CC., McMahon LL. (2005) Estrogen-induced increase in the magnitude of long-term potentiation occurs only when the ratio of NMDA transmission to AMPA transmission is increased. *J Neurosci* 25: 7780-91.
- Spacek J. (1985) Three-dimensional analysis of dendritic spines. II. Spine apparatus and other cytoplasmic components. *Anat Embryol (Berl)* 171: 235-243.
- Spacek J., Harris KM. (1997) Three-dimensional organization of smooth endoplasmic reticulum in hippocampal CA1 dendrites and dendritic spines of the immature and mature rat. *J. Neurosci* 17: 190-203.
- Stahl WL., Eakin TJ., Owens JW. Jr, Breininger JF., Filuk PE., Anderson WR. (1992) Plasma membrane Ca(2+)-ATPase isoforms: distribution of mRNAs in rat brain by in situ hybridization. *Brain Res Mol Brain Res* 16: 223-31.
- Steward O., Schuman EM. (2001) Protein synthesis at synaptic sites on dendrites. *Annu Rev Neurosci* 24: 299-325.
- Strehler EE., Zacharias DA. (2001) Role of alternative splicing in generating isoform diversity among plasma membrane calcium pumps. *Physiol Rev* 81: 21-50.
- Sugawara T., Holt JA., Kiriakidou M., Strauss JF. 3rd. (1996) Steroidogenic factor 1-dependent promoter activity of the human steroidogenic acute regulatory protein (StAR) gene. *Biochem* 35: 9052-9.
- Suzuki S., Brown CM., Wise PM. (2006) Mechanisms of neuroprotection by estrogen. *Endocrine* 29: 209-15.
- Svoboda K., Mainen ZF. (1999) Synaptic [Ca<sup>2+</sup>]: intracellular stores spill their guts. *Neuron* 22: 427-30.
- Sytnyk V., Leshchyn'ska I., Dityatev A., Schachner M. (2004) Trans-golgi network delivery of synaptic proteins in synaptogenesis. *J Cell Sci* 117: 381-388.
- Takemura H., Hughes AR., Thastrup O., Putney JW. Jr (1989) Activation of calcium entry by the tumor promoter thapsigargin in parotid acinar cells. Evidence that an intracellular calcium pool and not an inositol phosphate regulates calcium fluxes at the plasma membrane. *J Biol Chem* 264: 12266-71.
- Thastrup O., Cullen PJ., Drøbak BK., Hanley MR., Dawson AP. (1990) Thapsigargin, a tumor promoter, discharges intracellular Ca<sup>2+</sup> stores by specific inhibition of the endoplasmic reticulum Ca<sup>2+</sup>(+)-ATPase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87: 2466-70.
- Viskorf A. (2003) Serotonin-induziertes Kalzium-Signal in Lymphozyten von Patienten mit Morbus Alzheimer. Med. Dissertation. Universität München.
- von Schassen C., Fester L., Prange-Kiel J., Lohse C., Huber C., Böttner M., Rune GM. (2006) Oestrogen synthesis in the hippocampus: role in axon outgrowth. *J Neuroendocrinol* 18: 847-56.

- Wanigasekara Y., Keast JR. (2006) Nerve growth factor, glial cell line-derived neurotrophic factor and neurturin prevent semaphorin 3A-mediated growth cone collapse in adult sensory neurons. *Neurosci* 142: 369-79.
- Wehrenberg U., Rune GM. (2001) Steroidogenic factor-1 expression in marmoset and rat hippocampus: co-localization with StAR and aromatase. *J Neurochem* 76: 1879-1886.
- Woolley CS., Gould E., Frankfurt M., McEwen BS. (1990) Naturally occurring fluctuation in dendritic spine density on adult hippocampal pyramidal neurons. *J Neurosci* 10: 4035-9.
- Wyszynski M. (1998) Differential regional expression and ultrastructural localization of alpha-actinin-2, a putative NMDA receptor anchoring protein, in rat brain. *J Neurosci* 18: 1383-1392.
- Yamawaki S., Kagaya A., Okamoto Y., Shimizu M., Nishida A., Uchitomi Y. (1996) Enhanced calcium response to serotonin in platelets from patients with affective disorders. *J Psych Neurosci* 21: 321-4.
- Yamazaki M., Matsuo R., Fukazawa Y., Ozawa F., Inokuchi K. (2001) Regulated expression of an actin-associated protein, synaptopodin, during long-term potentiation. *J Neurochem* 79: 192-199.
- Yuste R., Majewska A., Holthoff K. (2000) From form to function: calcium compartmentalization in dendritic spines. *Nat Neurosci* 3: 653-9.
- Zacharias DA., DeMarco SJ., Strehler EE. (1997) mRNA expression of the four isoforms of the human plasma membrane Ca(2+)-ATPase in the human hippocampus. *Brain Res Mol Brain Res* 45: 173-6.
- Zamani MR., Desmond NL., Levy WB. (2000) Estradiol modulates long-term synaptic depression in female rat hippocampus. *J Neurophysiol* 84: 1800-8.
- Zhao L., Brinton RD. (2005) 17 $\beta$ -estradiol induces Ca<sup>2+</sup> influx, dendritic and nuclear Ca<sup>2+</sup> rise and subsequent cyclic amp response element-binding protein activation in hippocampal neurons: a potential initiation mechanism for estrogen neurotrophism. *Neurosci* 132: 299-311.

## 9 Danksagung

Zum Abschluss meiner Arbeit möchte ich mich als erstes bei meiner Doktormutter Frau Prof. Dr. Rune bedanken, die durch Überlassung des spannenden Themas, sowie durch ihre interessanten Anregungen diese Doktorarbeit erst ermöglicht hat.

Besonderer Dank gilt meinem Betreuer Lars Fester, der mich geduldig in die praktischen Tätigkeiten eingewiesen und mir bei Problemen immer mit Rat und Tat zur Seite stand.

Auch möchte ich mich ganz herzlich bei Helga Herbort bedanken, die mich durch ihre langjährige Erfahrung und generelle Hilfsbereitschaft im Labor unterstützt hat.

Mein Dank gilt aber nicht nur diesen Personen, sondern dem gesamten Team der Anatomie I, da sie es durch ihre positive und herzliche Stimmung geschafft haben, dass ich mich jederzeit in diesem Institut sehr wohl gefühlt habe.

Weiterhin möchte ich mich bei meinen Freundinnen Nicola Beck, Alwine Corman, Sandra Daniel, Christina Haane, Jasmin Haneke, Victoria Myburgh, Christiana Ossig, Janina Siering und Svenia Willmann sowohl für die emotionale Unterstützung, als auch für die vielen Korrekturvorschläge bedanken, sowie bei Henrik Bläute und Benedikt Franke für die großartige Hilfe beim Formatieren.

Meinen Mitdoktoranden danke ich für eine tolle Zeit mit vielen geselligen Abenden und gegenseitiger Motivation.

Zu ganz besonderem Dank bin ich meiner Familie und meinem Freund verpflichtet, die mich durch aufbauende Worte auch durch die schweren Zeiten dieser Arbeit getragen und mich bedingungslos unterstützt haben.

*Allen, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben, möchte ich an dieser Stelle*

*herzlich Danken*

## 10 Lebenslauf

### Persönliche Daten

Name Corinna Voets  
Geburtsdatum 02.11.1982  
Geburtstort Düsseldorf

### Schulbildung

1989 – 2002  
Grundschule & Gymnasium, Düsseldorf  
○ Abitur, Note: 1,8

### Hochschulausbildung

2002 – 2009  
09 / 2004  
Universitätsklinikum Hamburg Eppendorf  
Studium der Humanmedizin  
○ Physikum, Gesamtnote: 1,6

### Famulaturen/Hospitation

07 / 2005 – 08 / 2005 Radiologie, UKE, Hamburg  
08 / 2005 – 09 / 2005 Dr. R. Bläute, Orthopädie/ Sportmedizin, Duisburg  
07 / 2006 – 08 / 2006 Hospital der MS Astoria, Nassau  
04 / 2007 – 05 / 2007 Dr. A. Fischer, Anästhesie, Nörten-Hardenberg  
07/ 2007 Urologie, UKE, Hamburg  
08/ 2008 Urologie, Klinikum Eilbek, Hamburg  
09/ 2008 Gynäkologie, Elim Diakonie-Klinikum, Hamburg

### Univ. Wahlfach

01 / 2006 – 04 / 2006 Anästhesie, UKE, Hamburg

### Praktisches Jahr

08 / 2007 – 09 / 2007  
10 / 2007 – 11 / 2007  
12 / 2007 – 01 / 2008  
02 / 2008 – 03 / 2008  
04 / 2008 – 08 / 2008  
**Innere Medizin:** UKE, Hamburg  
**Innere Medizin:** Kapstadt, Südafrika  
**Chirurgie:** Luzern, Schweiz  
**Chirurgie:** Klinikum Eilbek, Hamburg  
**Wahl:** Anästhesie, UKE, Hamburg

## **11 Eidesstattliche Versicherung**

Ich versichere ausdrücklich, dass ich die Arbeit selbstständig und ohne fremde Hilfe verfasst, andere als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel nicht benutzt und die aus den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen einzeln nach Ausgabe (Auflage und Jahr des Erscheinens), Band und Seite des benutzten Werkes kenntlich gemacht habe.

Ferner versichere ich, dass ich die Dissertation bisher nicht einem Fachvertreter an einer anderen Hochschule zur Überprüfung vorgelegt oder mich anderweitig um Zulassung zur Promotion beworben habe.

Unterschrift: \_\_\_\_\_  
Corinna Voets