

**UNIVERSITÄTSKLINIKUM HAMBURG-EPPENDORF**

**Aus dem Institut für Anatomie I – Zelluläre Neurobiologie  
des Zentrums für experimentelle Medizin**

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

**Einfluss neuronaler Aktivität auf die Expression von  
Synaptopodin in hippocampalen dendritischen Spines**

**Dissertation**

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin  
an der Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg.

vorgelegt von:

Jan Gerhard Labitzke  
aus Cuxhaven

Hamburg 2009

**Angenommen von der Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg am:**

**10.11.2009**

**Veröffentlicht mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg.**

**Prüfungsausschuss, der/die Vorsitzende: Prof. Dr. Gabriele M. Rune**

**Prüfungsausschuss, zweite/r Gutachter/in: Prof. Dr. Eckart Förster**

**Prüfungsausschuss, dritte/r Gutachter/in: PD Dr. Stefan Kindler**

## **Inhaltsverzeichnis**

<b>I</b>	<b>Abkürzungsverzeichnis</b>	<b>6</b>
<b>II</b>	<b>Einleitung</b>	<b>10</b>
<b>II.1</b>	<b>Einführung</b>	<b>10</b>
II.1.1	Struktureller Aufbau von Synapsen im ZNS	10
II.1.2	Struktur und Funktion dendritischer Spines	11
II.1.3	Aufbau des Spineapparats und seine Funktion	12
<b>II.2</b>	<b>Neurotransmitter im ZNS: Funktionen und Rezeptoren</b>	<b>12</b>
II.2.1	Neurotransmitter und Erregungsübertragung	12
II.2.2	Exzitatorische Neurotransmitter und ihre Rezeptoren	13
II.2.3	Inhibitorische Neurotransmitter und ihre Rezeptoren	15
<b>II.3</b>	<b>Estrogensynthese im Hippocampus: Funktionen und Regulationsmechanismen</b>	<b>16</b>
II.3.1	Aufbau und Funktion des Hippocampus	16
II.3.2	Die Aromatase: Enzym der Estrogensynthese	17
II.3.3	Auswirkungen der Aromataseaktivität auf die Spinogenese	18
II.3.4	Regulationsmechanismen der Aromatase	19
<b>II.4</b>	<b>Synaptopodin: Ein Aktin-assoziiertes Protein in Neuronen und Podozyten</b>	<b>20</b>
II.4.1	Molekularer Aufbau von Synaptopodin	20
II.4.2	Synaptopodin im Telenzephalon	21
<b>II.5</b>	<b>Fragestellung</b>	<b>22</b>
<b>III</b>	<b>Material und Methoden</b>	<b>23</b>
<b>III.1</b>	<b>Material</b>	<b>23</b>
III.1.1	Arbeitsmaterialien, Geräte und Software	23
III.1.2	Chemikalien	25
III.1.3	Lösungen	26
<b>III.2</b>	<b>Methoden</b>	<b>27</b>
III.2.1	Präparation der Hippocampi aus der Ratte	27
III.2.2	Hippocampale Dispersionskultur	28
III.2.3	Stimulation und Inhibition	29

III.2.4	Fixierung der Dispersionskultur	30
III.2.5	Immunocytochemie der Dispersionskulturen	30
III.2.6	Bildanalyse	31
III.2.7	Statistik	31
III.2.8	Quantitative Estrogenmessung im Kulturmedium – Radioimmunoassay	32
<b>IV</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>33</b>
<b>IV.1</b>	<b>Der Synaptopodin-Antikörper</b>	<b>33</b>
<b>IV.2</b>	<b>Synaptopodinexpression in hippocampalen Dispersionskulturen unter exzitatorischen Neurotransmittern im Langzeitversuch</b>	<b>34</b>
IV.2.1	Expressionsniveau unter NMDA	34
IV.2.2	Expressionsniveau unter Kainat	35
IV.2.3	Expressionsniveau unter AMPA	36
IV.2.4	Exemplarische Fotos	37
<b>IV.3</b>	<b>Synaptopodinexpression in hippocampalen Dispersionskulturen unter dem inhibitorischen Neurotransmitter GABA im Langzeitversuch</b>	<b>38</b>
IV.3.1	Expressionsniveau unter GABA	38
<b>IV.4</b>	<b>Synaptopodinexpression in hippocampalen Dispersionskulturen unter in- und inhibitorischen Neurotransmittern im Kurzzeitversuch</b>	<b>39</b>
IV.4.1	Expressionsniveau unter NMDA, MK 801 und Tetrodotoxin	39
IV.4.2	„Rescue“ der NMDA-vermittelten Herunterregulation durch Testosteron	40
IV.4.3	Expressionsniveau unter Letrozol und Estradiol	41
<b>IV.5</b>	<b>Estradiolmessung im Kulturmedium mittels Radioimmunoassay</b>	<b>42</b>
<b>V</b>	<b>Diskussion</b>	<b>43</b>
V.1	Methodische Überlegungen	44
V.2	Estradiol und Neurone	44
V.3	Synaptopodin als Parameter für den Spineapparat	44
V.4	Estradiol und Letrozol vermindern Synaptopodinimmunoreaktivität	45
V.5	Der genomische Estrogenrezeptor- $\beta$ reguliert die Expression von Synaptopodin	48
V.6	Calcium-Kinetik im dendritischen Spine	49
V.7	Durch NMDA verursachter $Ca^{2+}$ -Release führt im Kurzzeitversuch zu Verminderung der Synaptopodinimmunoreaktivität	50

V.8	Tetrodotoxin und der NMDA-Rezeptorantagonist (MK801) erhöhen im Kurzzeitversuch die Synaptopodinimmunoreaktivität	51
V.9	LTP – Molekulare Mechanismen	52
V.10	NMDA im Langzeitversuch hat dosisabhängige Effekte und führt zu einer erhöhten Expression von Synaptopodin	55
V.11	AMPA im Langzeitversuch hat dosisabhängige Effekte auf die Synaptopodinexpression	58
V.12	Aktivierung der Aromatase zeigt „Rescue“-Effekt	58
V.13	Neuronale Aktivität hat im Langzeitversuch keinen Einfluss auf den Estradiolgehalt im Kulturmedium	59
V.14	Bedeutung der Ergebnisse für die Klinik	59
<b>VI</b>	<b>Zusammenfassung</b>	<b>61</b>
<b>VII</b>	<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>63</b>
<b>VIII</b>	<b>Danksagung</b>	<b>77</b>
<b>IX</b>	<b>Eidesstattliche Versicherung</b>	<b>78</b>

## I Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
AK	Antikörper
AMPA	$\alpha$ -Amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazol-propionsäure
ANOVA	analysis of variance (Varianzanalyse)
Aufl.	Auflage
bFGF	basic fibroblast growth factor
BSA	bovine serume albumin
bzw.	beziehungsweise
°C	Grad Celsius
ca.	<i>circa</i>
Ca <sup>2+</sup>	Calcium
CA	<i>Cornu ammonis</i>
CaMK / CaMKII	Ca <sup>2+</sup> /calmodulin-dependent protein kinases
CICR	calcium induced calcium release
CO <sub>2</sub>	Kohlenstoffdioxid
CREB	cAMP response element-binding protein
CY3	Indocarbocyanin 3
d	Tage
DAG	Diacylglycerol
DAPI	4',6-Diamidino-2-Phenylindol
DNA	deoxyribonucleic acid (Desoxyribonukleinsäure)
d.h.	das heißt
DPN	Diarylpropionitril

EPSP	exzitatorisches postsynaptisches Potential
et al.	<i>et alii</i> (und andere)
ER	endoplasmatisches Retikulum
ER $\alpha$	Estrogenrezeptor- $\alpha$
ER $\beta$	Estrogenrezeptor- $\beta$
GABA	$\gamma$ -Aminobuttersäure
h	hour/hours (Stunde/Stunden)
HCl	Salzsäure
IP3	Inositol 1,4,5-triphosphate
IP3-R	Inositol 1,4,5-triphosphate-Rezeptor
IPSP	inhibitorisches postsynaptisches Potential
K <sup>+</sup>	Kalium
kDA	Kilodalton
l	Liter
LSM	laser scanning microscope
LTP	long-term potentiation
LTD	long-term depression
L-VDCC	L voltage-dependent calcium channels
M	Molar
MAP2	microtubule-associated protein 2
min	Minute/Minuten
ml	Milliliter
$\mu$ l	Microliter
$\mu$ m	Mikrometer
mGluR	metabotroper Glutamatrezeptor
mm	Millimeter

mM	Millimol
mol	Mol (1 Mol = 6,023 * 10 <sup>23</sup> Moleküle)
mRNA	messenger-ribonucleic acid
mV	Millivolt
n	Anzahl
nm	Nanometer
nM	Nanomol
NaOH	Natriumhydroxid
Na <sup>+</sup>	Natrium
NMDA	N-Methyl-D-Aspartat
NMDA-R	N-Methyl-D-Aspartat-Rezeptor
p	Signifikanzniveau
PBS	phosphate buffered saline
pH	pH-Wert, Maß für die Aktivität von Protonen einer wässrigen Lösung
PIP <sub>2</sub>	Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat
PKC	Proteinkinase C
PKA	Proteinkinase A
PLC	Phospholipase C
PPT	Propylpyrazole Triol
PMCA	plasma membrane calcium ATPase
PSD	postsynaptische Dichte
RIA	Radioimmunoassay
Ry-R	Ryanodin-Rezeptor
s.	siehe
S.	Seite

SEM	standard error of the mean
SER	smooth endoplasmatic reticulum
SERCA	Sarcoplasmic/endoplasmic reticulum calcium ATPase
s.o.	siehe oben
SPSS	Statistical Packages for the Social Sciences
TTX	Tetrodotoxin
U	Umdrehungen
UKE	Universitätsklinikum Eppendorf
VSCC	voltage sensitive calcium channels
ZNS	Zentrales Nervensystem
z.B.	zum Beispiel

## II Einleitung

### II.1 Einführung

Das Gehirn ist das komplexeste Organ des Menschen. Seine zahlreichen Funktionen ermöglichen uns, unsere Umgebung wahrzunehmen, mit ihr zu interagieren und uns ihr anzupassen. Die vielfältigen Funktionen des Gehirns reichen von der Initiation einer einfachen Bewegung, sensorischer Wahrnehmung bis hin zu Lernen und Gedächtnis und der vielleicht prominentesten: dem Denken. Unser geringes Wissen über die Mechanismen der genannten Funktionen steht in Kontrast zu dem, was wir über andere Organe an Wissen erworben haben. Die Erforschung von Lernprozessen und Gedächtnis ist für viele Wissenschaftler der interessanteste Teil der Hirnforschung. Durch die Möglichkeit, Erfahrungen und Ereignisse der Vergangenheit zu speichern und bei Bedarf wieder abzurufen, hat der Mensch einen entscheidenden Vorteil: er kann mit seiner Umwelt differenziert interagieren. Es wird wohl kaum einen einzigen Mechanismus geben, der alle Formen von Gedächtnis erklärt, dennoch könnte die Synapse, als Schaltstelle zwischen den Neuronen, hierfür ein wichtiges Korrelat auf zellulärer Ebene sein. Ein konkreter Hinweis hierfür ist die Fähigkeit von chemischen Synapsen ihre Effizienz der Übertragung zu ändern, unterzugehen oder neu zu entstehen. Man spricht hierbei von synaptischer Plastizität. Bei geschätzten 100-500 Billionen synaptischen Kontakten im menschlichen Gehirn, ist es von größtem Interesse der Forschung die lokalen Faktoren und Interaktionen zwischen den Schaltstellen besser zu verstehen, da dies in Zukunft auch klinische Konsequenzen bei der Behandlung von Erkrankungen wie der Epilepsie oder dem Morbus Alzheimer haben könnte.

#### II.1.1 Struktureller Aufbau von Synapsen im ZNS

Bei Synapsen handelt es sich um Kontaktstellen zwischen Nervenzellen bzw. Nervenzellen und anderen Zellen. An ihnen findet die Erregungsübertragung vom Axon einer Nervenzelle zum Dendriten, bzw. dem Soma einer anderen Nervenzelle statt. Die Klassifizierung von Synapsen kann auf verschiedene Arten erfolgen: Zum einen gibt es die phylogenetisch ältere elektrische Synapse, die zwei Zellen elektrotonisch koppelt. Im Vergleich zur chemischen Synapse ist ihre Anzahl im Gehirn jedoch eher gering. Die

strukturellen Komponenten der interneuronalen, chemischen Synapse sind die präsynaptische Membran, die sich am Ende eines Axons findet, die mit Transmittern gefüllten Vesikel im Zytoplasma des Axonendes, der synaptische Spalt und die postsynaptische Membran. Bei Eintreffen eines Aktionspotentials am Axonende, werden die Botenstoffe einiger Vesikel durch Exozytose in den synaptischen Spalt entleert. Per Diffusion gelangen die Botenstoffe an die Rezeptoren der postsynaptischen Membran und können eine Impulsübertragung auslösen.

Weitere Klassifizierungen von chemischen Synapsen lassen sich durch die Position des Axonendes am postsynaptischen Neuron (axodendritisch, axosomatisch und axoaxonal), die Funktion (exzitatorisch und inhibitorisch) und den verwendeten Transmitter (glutamaterg, gabaerg, serotonerg) vornehmen (Lüllmann-Rauch, 2003). Morphologisch finden sich Hinweise auf die Funktion von Synapsen: der postsynaptische elektronendichte Anteil (ein Komplex aus Rezeptormolekülen und Elementen des Membranskeletts) von exzitatorischen Synapsen ist oft breiter als der präsynaptische (Gray-Typ-I, asymmetrischer Typ). Inhibitorische Synapsen hingegen haben oft ähnlich breite prä- und postsynaptische Verdichtungen (Gray-Typ-II, symmetrischer Typ). Bei den von Gray 1959 als Typ-I bezeichneten Synapsen handelt es sich häufig um axodendritische Kontakte. Auf der Ebene des Dendriten bilden zu ca. 90% so genannte dendritische Spines die postsynaptische Struktur (Harris und Kater 1994). Hierbei handelt es sich um Ausstülpungen der Zellmembran („Dornen“), die erstmals 1891 von Cajal beschrieben wurden. Bei den Gray-Typ-II Synapsen handelt es sich meist um axosomale oder proximale axodendritische Kontaktstellen.

### II.1.2 Struktur und Funktion dendritischer Spines

Die Dendriten vieler Neurone sind dicht mit oben genannten dendritischen Spines besetzt. Spines finden sich gelegentlich jedoch auch an Zellkörpern oder an Axonhügeln. Die Einteilung von Spines erfolgt durch deren vielfältige Morphologie, die sich in Gruppen zusammenfassen lässt: Dünn („thin“), kurz und dick („stubby“), pilzförmig („mushroom“) oder verzweigt („branched“) sind hierbei die wesentlichen Merkmale zur Beschreibung. Spines haben eine Länge von etwa 1-3  $\mu\text{m}$  und lassen sich einteilen in Kopf (Volumen: 0,001-1  $\mu\text{m}^3$ ) und einen dünnen Hals (Durchmesser:  $<0,1 \mu\text{m}$ ), der den Spine mit dem Dendriten verbindet (Harris und Kater, 1994; Sorra und

Harris, 2000; Nimchinsky et al., 2002). Im Kopf des Spines findet sich eine ca. 30 nm breite Verdickung, die der elektronendichten post-synaptic density entspricht (PSD). Hierbei handelt es sich um einen Komplex aus verschiedenen Rezeptormolekülen, Teilen des Membranskeletts zur Verankerung von Rezeptoren, Second Messenger Molekülen und weiteren Proteinen, die an der Signaltransduktion beteiligt sind (Ziff, 1997; Walikonis et al., 2000; Kennedy, 2000). Das Zytoskelett, das die PSD verankert, besteht aus Aktin. Während es durch zahlreiche Verzweigungen den Spinekopf zum großen Teil füllt, ist es am Spinehals längs orientiert und stellt somit die Verbindung zwischen Spine und Neuron her (Fifkova, 1982). Dieses Aktin-Zytoskelett ist besonders wichtig für die Motilität von Spines (Fischer, 1998).

### II.1.3 Aufbau des Spineapparats und seine Funktion

Etwa die Hälfte aller Spines enthalten Teile des glatten endoplasmatischen Retikulums (SER) (Spacek und Harris, 1997). Hierbei gibt es zwei verschieden differenzierte Ausprägungen des SER. Es kann in Form von einzelnen Tubuli auftreten oder als eigenständige Organelle: dem Spineapparat. Der Spineapparat besteht im Wesentlichen aus zwei strukturellen Elementen, nämlich aus übereinander gestapelten Schichten von SER und elektronendichten Platten (Gray, 1959). Während sich der Spineapparat insgesamt nur bei ca. 20% aller Spines findet, ist er bei den reifen, adulten pilzförmigen Spines zu >80% vorhanden. Dies führte zu der Annahme, dass der Spineapparat eine wichtige Rolle für die synaptische Plastizität spielen könnte (Spacek und Harris, 1997). Die Aufgaben des Spineapparats liegen wahrscheinlich in der Calciumspeicherung und -regulation (Vlachos et al., 2009).

## II.2 Neurotransmitter im ZNS: Funktionen und Rezeptoren

### II.2.1 Neurotransmitter und Erregungsübertragung

Der Effekt von Neurotransmittern bei der Erregungsübertragung wird entscheidend durch die Eigenschaften der Zielstrukturen mitbestimmt. Die wichtigsten Komponenten der Zielstrukturen sind Neurotransmitter-Rezeptoren, Membrankanäle und Second-Messenger-Systeme, die durch verschiedene Mechanismen interagieren. Diese verändern letztlich das Membranpotential und dadurch Metabolismus und Expression

von Genen der Zielzellen, was eine Änderung der Aktivitätsmuster der Zellen bedingt. Da die Zellmembran für Ionen selektiv durchlässig ist, ist das Zellinnere in Ruhe negativ im Vergleich zum Extrazellulärraum geladen. Je nach Neuronentyp beträgt dieses Ruhemembranpotential ca. -70 mV. Der Einstrom von positiv geladenen Ionen ( $\text{Na}^+$  und  $\text{Ca}^{2+}$ ) an der postsynaptischen Membran hat eine Depolarisation zur Folge, bei der es sich um ein exzitatorisches postsynaptisches Potential (EPSP) handelt. Durch eine Summation von Depolarisationen kann das Schwellenpotential überschritten werden. Hierdurch entstehen Aktionspotentiale, die über das Axon weitergeleitet werden und wiederum andere Zellen erreichen können (Benninghoff und Drenckhahn, 2004a).

### II.2.2 Exzitatorische Neurotransmitter und ihre Rezeptoren

Der wichtigste exzitatorische Neurotransmitter im ZNS ist die Aminosäure L-Glutamat, die ihre Effekte über vier verschiedene Gruppen von Glutamatrezeptoren vermittelt. An der postsynaptischen Membran von glutamatergen Synapsen ist die Dichte dieser Rezeptoren besonders hoch. Innerhalb der vier Hauptgruppen können die Rezeptoren nochmals in G-Protein gekoppelte (metabotrope) Rezeptoren und liganden-regulierte Ionenkanäle (ionotrope Rezeptoren) eingeteilt werden (Benninghoff und Drenckhahn, 2004a).

Die ionotropen Glutamat-Rezeptoren haben vier oder fünf Untereinheiten und werden in drei Gruppen eingeteilt: NMDA-, AMPA- und Kainat-Rezeptoren, die sich im Aufbau, ihrer Sequenz der Untereinheiten und ihrer spezifischen Bindungs-, Aktivierungs- und Leitungseigenschaften unterscheiden (McLennan, 1983; Jonas, 1993). Ihr Name wurde abgeleitet von ihrem relativ spezifischen Agonisten: NMDA steht für N-Methyl-D-Aspartat.

Der NMDA-Rezeptor besteht aus vier Untereinheiten und benötigt zur Aktivierung nicht nur seinen Liganden Glutamat bzw. NMDA sondern auch eine Vordepolarisation, da er bei Ruhemembranpotential durch ein extrazelluläres Magnesium-Ion blockiert ist (Mayer und Westbrook, 1987). Er hat im Vergleich zum AMPA- und Kainat-Rezeptor eine ungewöhnlich hohe Leitfähigkeit für Calcium-Ionen, während seine Leitfähigkeit für Natrium- und Kalium-Ionen ähnlich ist (Cull-Candy, 2001).

AMPA steht für  $\alpha$ -Amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazol-propionsäure, wobei es sich um den spezifischen Agonisten des AMPA-Rezeptors handelt. AMPA-Rezeptoren

bestehen ebenfalls aus vier Untereinheiten, haben aber im Vergleich zu NMDA-Rezeptoren eine viel schnellere Kinetik, d.h. die Zeit zwischen Bindung des Agonisten und Öffnung des Kanals ist viel kürzer als bei NMDA-Rezeptoren. Ebenso ist die Gesamtöffnungszeit des AMPA-Rezeptors deutlich geringer (Collingridge und Lester, 1989). Ihre häufige Koexistenz mit NMDA-Rezeptoren wird dadurch erklärt, dass die für die Öffnung der NMDA-Rezeptoren nötige Depolarisation zur Lösung des Magnesium-Blocks durch die schnellen AMPA-Rezeptoren erst ermöglicht wird (Lin und Talman, 2002). Die dritte Gruppe der ionotropen Glutamaterezeptoren wird spezifisch durch Kainat, die deproteinierte Form der Kainsäure, aktiviert. Über den Kainat-Rezeptor ist von den drei ionotropen Rezeptoren am wenigsten bekannt. Von der Struktur und den Ionenleitfähigkeiten ist er dem AMPA-Rezeptor ähnlich, funktionell wird angenommen, dass er eine Rolle für die Initiierung von LTP sowie auch LTD im Zusammenspiel mit den AMPA- und NMDA-Rezeptoren einnimmt (Jane et al., 2009; Oren et al., 2009)

Metabotrope Glutamaterezeptoren sind G-Protein gekoppelte Rezeptoren mit sieben Transmembrandomänen, die sich aufgrund ihrer konvergierenden bzw. divergierenden strukturellen, pharmakologischen Eigenschaften und ihrer intrazellulären Signaltransduktion in drei Gruppen einteilen lassen (Nakanishi et al., 1994).

Die erste Gruppe dieser metabotropen Rezeptoren aktiviert die Phospholipase C (PLC). Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat (PIP<sub>2</sub>) wird durch die PLC in zwei unterschiedliche Second-Messenger gespalten: Inositoltriphosphat (IP<sub>3</sub>) und Diacylglycerol (DAG). IP<sub>3</sub> erhöht die Calciumkonzentration in der Zelle durch Freisetzung von Ca<sup>2+</sup>-Ionen aus intrazellulären Calciumspeichern und dem endoplasmatischen Retikulum (ER). DAG erhöht die Aktivität der Proteinkinase C (PKC), die wiederum Membrankanäle und verschiedene Enzyme phosphoryliert. Die Gruppen zwei und drei der metabotropen Glutamaterezeptoren hemmen die Adenylatzyklase und erhöhen damit die Leitfähigkeiten von K<sup>+</sup>-Ionen (Conn und Pin, 1997; Schoepp und Conn, 1993).

Metabotrope Rezeptoren haben langsamere Effekte auf die Zelle als die oben beschriebenen ionotropen Rezeptoren. Die Begriffe Exzitation und Inhibition lassen sich auf sie nicht vollständig anwenden, da ionotrope Rezeptoren auch metabotrope Effekte nach sich ziehen können: z.B. kann ein Calcium-Einstrom bestimmte Enzyme aktivieren. Umgekehrt wird durch metabotrope Effekte die Leitfähigkeit der Membran

für Ionen verändert. Als Beispiel hierfür sei die Phosphorylierung von Membrankanälen genannt (Stefani et al., 1996; Davies et al., 1995; Libri et al., 1997).

Metabotrope und ionotrope Glutamat-Rezeptoren spielen beide eine wichtige Rolle für die Bildung von LTP und ermöglichen uns damit eine langfristige und differenzierte Informationsverarbeitung (Lynch, 2004).

### II.2.3 Inhibitorische Neurotransmitter und ihre Rezeptoren

Die Hyperpolarisierung einer postsynaptischen Membran verhindert die Ausbildung eines Aktionspotentials. Dies geschieht durch Neurotransmitter, die direkt oder indirekt Chlorid- oder Kaliumionenkanäle öffnen und dadurch ein inhibitorisches postsynaptisches Potential (IPSP) auslösen. Der wichtigste inhibitorische Neurotransmitter im Gehirn ist GABA während im Rückenmark auch Glycin eine wichtige Rolle spielt (Fort et al., 1980; van den Pol und Gorcs, 1988). Bei GABA handelt es sich um  $\gamma$ -Aminobuttersäure dessen Zielstrukturen wieder iono- und metabotrope Rezeptoren sind. Zu den ionotropen Rezeptoren zählen der GABA<sub>A</sub>- und der GABA<sub>C</sub>-Rezeptor während der GABA<sub>B</sub>-Rezeptor wiederum metabotrop ist. Bei dem GABA<sub>A</sub>-Rezeptor handelt es sich um einen ligandenaktivierten Ionenkanal, der aus fünf verschiedenen Untereinheiten aufgebaut ist. Er ist bei Aktivierung durchlässig für Chlorid- und Bikarbonationen, was eine Hyperpolarisierung zur Folge hat und ein Aktionspotential verhindert (Hill und Bowery, 1981; Bowery, 1989; Barnard et al., 1998). Interessant ist, dass dieser Rezeptor neben der Bindungsstelle für GABA auch über andere Bindungsstellen für Benzodiazepine, Barbiturate und Steroide, die den Rezeptor modulieren verfügt (Sivilotti und Nistri, 1991). Die Aktivität dieses Rezeptors muss im Gehirn sehr fein reguliert werden, denn zu viel Inhibition kann zu Bewusstlosigkeit und Koma führen während zu wenig Inhibition die Wahrscheinlichkeit eines epileptischen Anfalls erhöht (Dichter, 1989; Macdonald, 1989). Dies könnte die zahlreichen modulierenden Agonisten am GABA-Rezeptor erklären.

Der GABA<sub>C</sub>-Rezeptor wird von der „International Union of Pharmacology“ nicht als eigenständiger Rezeptortyp anerkannt (Barnard et al., 1998). Er unterscheidet sich vom GABA<sub>A</sub>-Rezeptor jedoch durch seine Insensitivität gegenüber Benzodiazepinen, Barbituraten und Steroiden und in seiner etwas langsameren Kinetik. Strukturell sind sie wahrscheinlich identisch (Drew et al., 1984). Der GABA<sub>B</sub>-Rezeptor ist metabotrop und

führt bei seiner Aktivierung über Second Messenger zu einer Aktivierung von Kalium-Kanälen und so zu einem IPSP (Bowery, 1989; Hill und Bowery, 1981). Präsynaptisch kann dieser Rezeptor wohl auch ligandengesteuerte Calcium-Kanäle verschließen (Chen und van den Pol, 1998; Takahashi et al., 1998).

### **II.3 Estrogensynthese im Hippocampus: Funktionen und Regulationsmechanismen**

#### II.3.1 Aufbau und Funktion des Hippocampus

Der Hippocampus gehört zum limbischen System und ist evolutionär eine der ältesten Strukturen des Gehirns. Während der Hippocampus beim Menschen die mediale Randzone des Temporallappens bildet, durchzieht er bei Nagern C-förmig beide Hemisphären von rostral nach kaudal (Amaral und Wittwer, 1989). Zum Hippocampus gehören der Gyrus dentatus, das Cornu ammonis und das Subiculum. Der Gyrus dentatus ist die Eingangsstation des Hippocampus. Sein histologischer Aufbau ist dreischichtig. In der mittleren Schicht liegen die Hauptzellen des Gyrus dentatus, die Körnerzellen, dicht nebeneinander (Stratum granulare). Die Dendriten der glutamatergen Körnerzellen erreichen die Molekularschicht (Stratum moleculare), die sich wiederum in eine innere- und eine äußere Schicht einteilen lässt (Benninghoff und Drenckhahn, 2004b).

Das Cornu ammonis lässt sich transversal in vier Sektoren einteilen (CA1-CA4, von Cornu ammonis) (Lorente de No, 1934). Anatomisch und funktionell von Bedeutung sind jedoch nur die CA1- und die CA3-Struktur. Ähnlich wie der Gyrus dentatus besitzt auch das Cornu ammonis eine zellreiche mittlere Schicht, in der sich die Pyramidenzellen finden. Die Pyramidenzellen bilden beim Menschen eine zweigeteilte Schicht (Stratum profundum und Stratum superficiale). Die glutamatergen Pyramidenzellen erstrecken ihre Dendriten radial nach innen und außen. Das Stratum radiatum und das Stratum lacunosum-moleculare liegen der Pyramidenzellschicht außen an, während das Stratum oriens innen liegt.

Das Subiculum ist das Übergangsfeld vom archicorticalen, dreischichtigen Hippocampus zum sechsschichtigen Neocortex und wird von einigen Autoren nicht mehr zur Hippocampusformation dazugezählt. In allen Schichten sind lokale Interneurone vertreten (Benninghoff und Drenckhahn, 2004b).

Im Hippocampus fließen sensorische Informationen verschiedener Systeme ein, die verarbeitet und an den Kortex weitergeleitet werden. Neurochirurgen beobachteten 1957, dass eine beidseitige Hippocampuserweiterung zwecks Epilepsitherapie bei den Patienten zu einer anterograden Amnesie führte (Scoville und Milner, 1957). Da weit zurückliegende Erinnerungen auch bei fehlenden Hippocampi erhalten bleiben, kamen Forscher zu der Annahme, dass der Hippocampus Erinnerungen generiert, während die Speicherung in verschiedenen Teilen der Großhirnrinde erfolgt. Neuere Studien zeigen jedoch, dass eine ausgedehnte Hippocampuserweiterung auch ältere Erinnerungen beeinträchtigt (Gilboa, 2006; Sutherland, 2001; Clark, 2002). Bei Tieren hat der Hippocampus eine wichtige Funktion für die räumliche Orientierung (Morris, 1982), die auch bei Menschen nachgewiesen werden konnte: Eine Studie bei Taxifahrern in London zeigte eine signifikante Volumenzunahme des Hippocampus gegenüber der Kontrollgruppe (Maguire et al., 1997). Ein weiterer interessanter Aspekt am Hippocampus ist die Fähigkeit zur Neurogenese im Gyrus dentatus, die 1965 von Altman bei glutamatergen Körnerzellen von Ratten entdeckt wurde. Hiermit wurde das Dogma gebrochen, dass bei der Geburt alle Neuronen vorhanden sind. Verschiedene Erkrankungen, bei denen der Hippocampus eine Rolle spielt, machen diese Struktur auch für die medizinische Forschung interessant. So zeigen sich z.B. bei Demenzerkrankungen frühe Veränderungen in der Hippocampusformation, die per Magnetresonanztomographie detektiert werden können (Hampel et al., 1998).

### II.3.2 Die Aromatase: Enzym der Estrogensynthese

Bei der Aromatase handelt es sich um ein Enzym der Cytochrom P450 Familie. Sie aromatisiert Androgene zu Estrogenen und transformiert damit auch Testosteron zu Estradiol. Das Enzym ist im endoplasmatischen Retikulum der Zelle lokalisiert und in vielen verschiedenen Geweben zu finden. Besonders interessant war die Entdeckung der Aromatase in hippocampalen Neuronen auf mRNA-Ebene (Abdelgadir et al., 1994; Wehrenberg et al., 2001) und auf Protein-Ebene (Sanghera et al., 1991; Garcia-Segura et al., 1999). Prange-Kiel et al. konnten 2003 erstmals zeigen, dass die Aromatase im Hippocampus auch tatsächlich aktiv ist. Sie fanden eine beträchtliche Estrogenabgabe von hippocampalen Neuronen *in vitro* (Prange-Kiel et al., 2003). Dieser Befund wurde von Hojo und Mitarbeitern bestätigt (Hojo, 2004; Mukai, 2006). Für die Funktionalität der Aromatase im Hippocampus spricht die Konzentration von Estradiol in

hippocampalen Gewebe, die mit 1 nM höher ist als im Blut (Mukai, 2006). Dies wirft die Frage auf, welche Funktionen und Vorteile die lokale *de novo* Produktion von Steroiden bietet. So konnte z.B. nachgewiesen werden, dass durch Estradiol Behandlung die Langzeit-Depression (long-term depression, LTD) in der CA1- und CA3-Region sowie im Gyrus dentatus kurzfristig zunimmt (Mukai, 2006). Außerdem nahm die Dichte von dünnen Spines zwei Stunden nach Applikation von 1 nM Estradiol bei Pyramidenzellen im „akuten Slice“ signifikant zu. Dies führt wiederum zu der Annahme, dass Estradiol und die Aromatase eine entscheidende Rolle für die synaptische Plastizität haben (Mukai, 2006).

### II.3.3 Auswirkungen der Aromataseaktivität auf die Spinogenese

Die Bildung von Synapsen ist ein höchst komplizierter Prozess, der nicht mit der Geburt abgeschlossen ist, sondern das ganze Leben über stattfindet. Während lange Zeit die präsynaptische Seite im Mittelpunkt der Forschung stand, werden nun auch mehr die postsynaptischen Strukturen erforscht, die lange als passive Elemente der Synapse unterschätzt wurden. Viele Studien sprechen mittlerweile dafür, dass es sich bei dendritischen Spines um höchst motile Elemente handelt, die eine entscheidende Rolle für die Entstehung von Synapsen spielen könnten (Fischer, 1998; Dailey und Smith, 1996). Aus diesem Grund ist die Spinogenese besonders interessant und soll hier kurz diskutiert werden. Es wird angenommen, dass Filopodien Vorgänger von Spines sind. Bei Filopodien handelt es sich um dünne, motile Zellmembranausstülpungen, die wahrscheinlich aktiv Kontakt zu Axonen suchen (Ziv und Smith, 1996).

Bei erfolgter Kontaktaufnahme werden verschiedene Prozesse in Gang gesetzt, um die prä- und postsynaptischen Strukturen zu stabilisieren und weiter reifen zu lassen (Zhang und Benson, 2000; Okabe et al., 2001). Es besteht wohl auch die Möglichkeit, dass Spines direkt aus dem Dendriten auswachsen oder sich an Stellen entwickeln, an denen sich Filopodien zurückgebildet haben (Papa et al., 1995; Fiala et al., 1998). Im Rahmen dieser Arbeit ist es von besonderem Interesse, welche Rolle die endogene Estrogensynthese und damit die Aktivität der Aromatase für die Spinogenese spielt. Dass Estradiol die Spineformation beeinflusst, ist schon seit einiger Zeit bekannt (McEwen, 2002; Rune und Frotscher, 2005; Rune et al., 2006b). Kürzlich konnte eine Zunahme von Spines nach Behandlung mit Estradiol im sogenannten „akuten Slice“

gezeigt werden (Mukai, 2006; 2007). In anderen Studien konnte durch systemische Behandlung mit Estradiol bei ovariectomierten Mäusen ein spezifischer Anstieg von pilzförmigen Spines gezeigt werden (Wooley und McEwen, 1993). In hippocampalen Schnittkulturen der Ratte hingegen, ließ sich weder eine Zunahme von Spines noch eine Zunahme von Spinesynapsen nachweisen, weder mit hohen noch mit physiologischen Serumkonzentrationen von Estradiol (Kretz et al. 2004). Bei Inaktivierung der Aromatase durch spezifische Blocker konnte hingegen eine Abnahme von Spines und Spinesynapsen gezeigt werden (Kretz et al., 2004). Auf diesem Hintergrund erscheinen die im Hippocampus synthetisierten Estrogene wichtiger für Estrogen induzierte Plastizität, als die in den Gonaden produzierten Estrogene (Prange-Kiel et al., 2003; 2006; Kretz et al., 2004; Rune und Frotscher, 2005; Rune et al., 2006a) und rücken die Regulationsmechanismen der Aromatase in den Fokus der Forschung.

### II.3.4 Regulationsmechanismen der Aromatase

Die Aktivität der Aromatase wird durch verschiedene Mechanismen reguliert, die sich prinzipiell in langsam und schnell wirkend einteilen lassen. Zu den längerfristigen Mechanismen gehört die Regulation auf genomischer Ebene. Verschiedene Steroide binden an intrazelluläre Rezeptoren, die in aktiviertem Zustand wiederum die Gentranskription regulieren und damit die Aktivität der Aromatase verändern (Harada et al., 1992; Roselli, 1985). Der Zeitraum für diese Regulierung der Aktivität bewegt sich im Rahmen von Stunden bis Tagen. In neueren Studien ließ sich jedoch eine viel schnellere Aktivitätsänderung der Aromatase nachweisen, die nicht auf genomischer Ebene stattfinden kann. Eine verminderte Aktivität der Aromatase trat innerhalb von Minuten auf, wenn verschiedene Faktoren eine Phosphorylierung der Aromatase begünstigten (Balthazart et al., 2003). Die Phosphorylierung war primär  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängig und umfasste mehrere Proteinkinasen einschließlich Proteinkinase-C (PKC) und wahrscheinlich auch Proteinkinase-A (PKA) und CaMK. Hierzu muss gesagt werden, dass im Gegensatz zu den meisten anderen Enzymen die Aromatase in phosphoryliertem Zustand weniger aktiv ist. Die Faktoren, die eine Phosphorylierung begünstigten sind ATP,  $\text{Ca}^{2+}$  und  $\text{Mg}^{2+}$ . Die Verminderung der Aktivität der Aromatase ließ sich durch Inhibitoren der Proteinkinase A und C wieder aufheben. Interessanterweise haben auch exzitatorische Neurotransmitter eine durch Phosphorylierung vermittelte herabregulierende Funktion auf die Aromatase (Balthazart et al., 2003). Die Vermutung

hierbei ist, dass durch die Transmitter (NMDA, AMPA und Kainat) die intrazelluläre Calciumkonzentration verändert wird, Calcium-abhängige Kinasen stimuliert werden, und hierdurch die Wahrscheinlichkeit einer Phosphorylierung der Aromatase verändert wird. Interessant ist dabei die Frage, ob das Calcium von extrazellulär in die Zelle gelangt oder von intrazellulären Speichern freigesetzt wird. Das glatte endoplasmatische Retikulum wie auch der Spineapparat stehen hierbei als mögliche intrazelluläre  $\text{Ca}^{2+}$ -Speicher im Interesse der Forschung (Bardo, 2006), wobei das  $\text{Ca}^{2+}$  des Spineapparats mit hoher Wahrscheinlichkeit durch einen  $\text{Ca}^{2+}$ -induzierten  $\text{Ca}^{2+}$ -Release freigesetzt wird (Emptage et al., 1999).

### **II.4 Synaptopodin: Ein Aktin-assoziiertes Protein in Neuronen und Podozyten**

#### II.4.1 Molekularer Aufbau von Synaptopodin

Das Protein Synaptopodin wurde erstmals 1997 von Mundel et al. beschrieben. Es wurde als Aktin-assoziiertes Protein in Podozyten der Niere entdeckt. Außerdem konnte es auch in dendritischen Spines von telencephalen Synapsen detektiert werden (Mundel et al., 1997a). In der ersten molekularen Charakterisierung fand sich ein prolinreiches Polypeptid mit einer berechneten molekularen Masse von 73,7 kDA und einem isoelektrischen Punkt von 9,38. Der molekulare Vergleich der Sequenz zwischen Mensch und Maus ergab eine 84%ige Übereinstimmung auf Proteinebene. Im Western-Blot fand sich ein molekulares Gewicht von 100 kDA, das damals durch posttranslationale Modifikationen und den hohen Prolingehalt von Synaptopodin erklärt, was eine hohe Mobilität im Gel verursachen könnte (Mundel et al., 1997a). Inzwischen wurde festgestellt, dass das offene Leseraster in der ersten molekularen Charakterisierung nicht vollständig war. Mittlerweile ist bekannt, dass es in der Maus drei Splicevarianten der mRNA von Synaptopodin gibt (Synpo-short, Synpo-long und Synpo-T) Synpo-short wird in Neuronen exprimiert, die anderen beiden Varianten ausschließlich in der Niere (Asanuma et al., 2005). Durch den hohen Anteil an Prolin (20%), der relativ gleichmäßig über das Protein verteilt ist, wird eine gestreckte dreidimensionale Struktur von Synaptopodin angenommen. Die Bildung von globulären Domänen lässt sich ausschließen. Des Weiteren hat Synaptopodin mehrere Phosphorylierungsstellen und zwei PPXY-Motive (P=Prolin, Y=Tyrosin und X=beliebige Aminosäure) (Mundel et al., 1997a). Diese Motive ermöglichen Interaktionen

zwischen Proteinen mit einem hohen Prolingehalt und den WW-Domänen (Proteindomänen mit hoher Bindungsaffinität zu Prolin) ihrer Bindungspartner (Einbound und Sudol, 1996). Unter anderem finden sich diese WW-Domänen in Proteinen des postsynaptischen Zytoskeletts (Bork und Sudol, 1994). Es besteht also die Möglichkeit, dass Synaptopodin Interaktionen zwischen Aktin und verschiedenen Proteinen des dendritischen Zytoskeletts vermittelt (Mundel et al., 1997b). Die Verteilung von Synaptopodin in der postsynaptischen Dichte und in dendritischen Spines ist interessanterweise identisch zu der Verteilung von Aktin in Spines (Mundel et al., 1997a; Matus et al., 1982). Die Expression von Synaptopodin beschränkt sich auf das Telenzephalon und die Niere (Mundel et al., 1997a).

### II.4.2 Synaptopodin im Telenzephalon

Synaptopodin wird in verschiedenen Strukturen des Telenzephalon exprimiert. Hierzu gehören der Bulbus olfactorius, der cerebrale Cortex, das Striatum und der Hippocampus. Das Protein findet sich nach Angaben seiner Erstbeschreiber (Mundel et al., 1997a) ausschließlich in der postsynaptischen Dichte (PSD) und dendritischen Spines. Außerhalb des Telenzephalon ließ sich Synaptopodin nicht detektieren. *In situ* Hybridisierung zeigte, dass sich die mRNA von Synaptopodin, im Gegenteil zu anderen dendritischen Proteinen wie MAP2 (Garner et al., 1988), nur in Somata von Neuronen, jedoch nicht in Dendriten findet (Mundel et al., 1997a).

Durch elektronenmikroskopische Analysen konnte gezeigt werden, dass sich Synaptopodin hauptsächlich im Spinehals befindet und dort mit dem Spineapparat assoziiert ist (Deller, 2000). Die Verknüpfung von Synaptopodin und dem Spineapparat wurde durch Experimente mit Synaptopodin-knockout-Mäusen gezeigt. Das Protein scheint essentiell für die Bildung von Spineapparaten zu sein, da in den Spines der Synaptopodin-knockout-Mäuse kein Spineapparat nachgewiesen werden konnte. Außerdem wiesen diese Mäuse ein schlechteres Ortsgedächtnis auf als die Kontrollgruppe und zeigten eine Reduktion hippocampaler LTP (Deller et al., 2003).

### **II.5 Fragestellung**

Synaptopodin scheint, aufgrund der gegenwärtigen Datenlage, ein wichtiges Protein für die synaptische Plastizität im menschlichen Telenzephalon zu sein. Ziel der vorliegenden Arbeit ist es herauszufinden, ob sich seine Expression in Dispersionskulturen hippocampaler Neurone bei neuronaler Aktivität verändert.

Dabei soll auch geklärt werden, ob die Aktivität der Aromatase in diese Prozesse involviert sein könnte und ob es Anhaltspunkte dafür gibt, dass die Aromatase, wie im präfrontalen Kortex bei Wachteln gezeigt, durch die Freisetzung von Calcium reguliert wird.

### III Material und Methoden

#### III.1 Material

##### III.1.1 Arbeitsmaterialien, Geräte und Software

Aluminiumfolie	Lager UKE
Brutschrank WTC	Binder
Cutfix Surgical Disposable Scalpell, Skalpell	Braun
Deckgläser, 24x32mm	Marienfeld
Ep TIPS Standard, verschiedene Größen	Eppendorf AG
Excel 2003 (Software)	Microsoft
Falcon Cell Strainer, 40µm Nylon	Becton Dickinson Labware
Falcon Tubes, 50ml und 15ml	Becton Dickinson Labware
Falcon Tissue Culture Plate, 24 well	Becton Dickinson Labware
Handschuhe	Kimberly-Clark
Heidemannspatel	Aesculap
Hettrich Zentrifuge EBA1R	Hettrich
Hettrich Zentrifuge Universal 32R	Hettrich
Instrumentenkasten	Merck
Mikroskop: Axiovert 25	Zeiss
Mikroskop: Axioskop 2, HBO100, MC80, EBQ100	Zeiss
Mikroskop: Axiovert100, HBO50, MC100, MBG52ac	Zeiss
Mikroskopische Deckgläser, rund, Ø12mm	Assistent
Neubauer Zählkammer, Tiefe 0,1mm, 0,0025mm <sup>2</sup>	Brand Germany

Openlab 3.1.5 (Software)	Improvision
Parafilm M	Pechiney Plastic Packaging
Pasteurpipetten, 25cm	Merck
Pinzette nach Dumount	Merck
Phasenkontrastmikroskop	Leitz
Pipetten, verschiedene Volumina	Gilson
Reaktiongefäße, 1,5ml	EppendorfAG
Schere	Aesculap DE
SPSS für Windows (Software)	SPSS GmbH Software
Sicherheitswerkbank, Klasse 2	Heraeus
Tissue Culture Dishes, 35x10mm	Becton Dio
Vortex-Genie 2	Scientific Industries
Waage	Sartorius
Wasserbad mit Schüttler	GFL
Windows 2000 (Software)	Microsoft
Windows XP (Software)	Microsoft
Word 2003 (Software)	Microsoft
Zellstofftücher	Wepa
Zentrifuge Universal 32R und EBA1R	Hettrich

#### III.1.2 Chemikalien

17 $\beta$ -Estradiol	Sigma
Albumin, Bovine, BSA, A7906	Sigma
Alexa Flour 488, polyklonal	Invitrogen
AMPA	Sigma-Aldrich
Aqua ad iniectabilia, 1Liter	Baxter Deutschland
B27 Supplement	Gibco
Barrycidal 36, Desinfektionsmittel	Helmut Schröder
Cholesterol	Sigma
Cy3, monoklonal, goat anti mouse	Jackson Immuno Research
DAKO, fluorescence free mounting medium	DAKO
DAPI, 4',6-Diamidino-2-phenylindol	Sigma-Aldrich
Ethanol, 70% und 96%	Apotheke UKE
Femara „Letrozol“	Novartis
Formaldehydlösung 37%	Merck
GABA	Sigma
Kainat	Sigma
L-Glutamin, 200mM	Sigma
MAP2, polyklonal, Host: rabbit	Chemicon
MK801	Sigma
Neurobasal A Medium	Gibco
Neurobasal A Medium ohne Phenolrot	Gibco
NMDA	Sigma
PBS Tablets	Gibco
Penicillin/Streptomycin	Gibco

Poly-d-Lysin	Sigma
Synaptopodin, monoklonal, Host: mouse	Progen Biotechnik
Tetrodotoxin	Sigma
Trypsin/EDTA, L 2163	Biochrom

#### III.1.3 Lösungen

##### **bFGF:**

- 5mM Tris in Aqua dest. gelöst, pH=7,6, sterilfiltern
- 50µl bFGF in 1000µl Tris-Lösung lösen, vortexen und aliquotieren
- bei -25°C lagern

##### **Beschichtung der Kulturplatten:**

- 600µl Poly-d-Lysin (0,1mg/ml Aqua dest.) pro Kavität
- 12h inkubieren
- abpipettieren und mit Neurobasal A spülen (mit Phenolrotzusatz)
- mindestens 2h trocknen lassen

##### **BSA:**

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

##### **Fixierung:**

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

#### **Kulturmedium für Dispersionkulturen:**

- 50ml Neurobasal A
- 500µl B27
- 125µl L-Glutamin (200mM)
- 500µl Penicillin/Streptomycin

#### **PBS:**

- 8g NaCl
- 0,2g KaCl
- 1,44 Dinatriumhydrogenphosphat
- 0,2 g Kaliumhydrogenphosphat
- 1 l Aqua dest.
- pH= 7,4 bei Raumtemperatur

### **III.2 Methoden**

#### III.2.1 Präparation der Hippocampi aus der Ratte

Die Präparation der Hippocampi erfolgte unter „semisterilen“ Bedingungen. In den Experimenten wurden ausschließlich 5 Tage alte Ratten des Zuchtstammes WISTAR verwendet. Die Experimente fanden unter Berücksichtigung der gesetzlichen Bestimmungen statt.

Die Ratten wurden mit einer Schere dekapitiert, anschließend wurde die Haut des Schädeldaches entfernt. Das Schädeldach selber wurde mittels einer geraden Schere eröffnet, danach konnten die beiden noch knorpeligen Schädeldachhälften mit einer Pinzette zur Seite geklappt werden, um den nötigen Raum für die schadlose Herausnahme des Gehirns zu schaffen. Das Gehirn wurde mittels eines Heidemannspatels entfernt und auf einen mit PBS getränkten Schwamm gelegt.

Das Kleinhirn wurde mit einem Skalpell entfernt und durch einen weiteren median-sagittalen Schnitt erfolgte die Trennung der beiden Hemisphären. Aus den beiden Hemisphären wurde jeweils der Hippocampus mit einem Heidemannspatel

„herausgeschält“. Die Hippocampi wurden danach sofort auf eisgekühltes PBS gelegt, um den Zelluntergang bis zur weiteren Verarbeitung zu minimieren.

#### III.2.2 Hippocampale Dispersionskultur

Die Präparation der Dispersionskulturen aus hippocampalen Neuronen wurde mit einigen Modifikationen (Prange-Kiel et al., 2003) nach der Methode von Brewer (1997) durchgeführt.

Einen Tag vor der Präparation der Hippocampi wurde in einer 24er Zellkulturplatte jede Kavität mit einem Glasplättchen bestückt. Pro Kavität wurde dann 600µl Poly-d-Lysin hinzugegeben und nach einer Stunde wieder abgesaugt. Daraufhin wurden die Glasplättchen mit Neurobasal A gespült, abgesaugt und bei Raumtemperatur in der Sicherheitswerkbank zum Trocknen abgestellt.

Die entnommenen Hippocampi wurden unter möglichst sterilen Bedingungen weiter aufbereitet. Es erfolgte eine mehrmalige Spülung mit PBS, die dazu diente, nicht-hippocampales Gewebe und Erythrozyten zu entfernen. Mittels einer Klinge wurden die Hippocampi grob zerkleinert. Der entstandene „Zellbrei“ wurde mit 25 ml PBS in ein 50ml Falconröhrchen überführt. Diese Zellsuspension wurde dann 10 Minuten bei 4°C mit 5000 U/min zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, während das Zellpellet mit Trypsin (500µl pro präpariertes Gehirn) für 2,5 Minuten unter Schütteln in einem Wasserbad (37°C) angedaut wurde. Der Verdau wurde mit 25 ml Neurobasal A geblockt. Die entstandene Zellsuspension wurde nun mit dem Neurobasal A über ein 40µm Zellsieb gegeben. Hierbei wurden größere unverdaute Bestandteile der Zellsuspension zurückgehalten. Daraufhin wurde zwei weitere Male bei 4°C mit 5000 U/min für 5 Minuten zentrifugiert und der Überstand jeweils verworfen. Vor der zweiten Zentrifugation als auch in der weiteren Verarbeitung der Zellkultur wurde nur noch phenolrotfreies Neurobasal A verwendet. Nach dem wiederholten Verwerfen des Überstandes wurde eine definierte Menge Neurobasal A in das Falconröhrchen hinzugegeben und die Zellzahl mittels einer Neubauer Zellzählkammer bestimmt. Dieser Schritt wurde besonders sorgfältig ausgeführt, da die gleichmäßige Dichte der Zellen pro Kavität wichtig für die weiteren Experimente war. In den Experimenten wurde immer mit einer Zelldichte von 100.000 Zellen/ml gearbeitet. Die Zellen müssen

vor der Umsetzung in die Zellkulturplatten gründlich resuspendiert werden, um diesem Idealwert nahezukommen.

Jeweils 1 ml der Zellsuspension wurden auf die mit Poly-d-Lysin beschichteten Glasplättchen gegeben. Die Zellkulturplatte wurde danach für eine Stunde in einen Brutschrank bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> gestellt. In dieser Zeit sedimentierten die Zellen und hafteten an den beschichteten Glasplättchen.

Nach einer Stunde wurden die Glasplättchen in eine neue Zellkulturplatte überführt und pro Kavität 1 ml Kulturmedium für Dispersionskulturen 37°C (s.o.) hinzugegeben. Der erste Wechsel des Kulturmediums erfolgte 24 Stunden später und dann alle 48 Stunden. Das Kulturmedium wurde für die Estradiol-Messung durch RIA gesammelt und bei -25°C eingefroren. Nach viertägiger Vorkultur wurden die Zellen mit den verschiedenen Substanzen stimuliert bzw. inhibiert.

#### III.2.3 Stimulation und Inhibition

Beim Standardprotokoll wurde nach viertägiger Vorkultur insgesamt drei Mal im Abstand von 48 Stunden stimuliert bzw. inhibiert. Um den Einfluss neuronaler Aktivität auf die Expression von Synaptopodin zu untersuchen wurde jeweils mit NMDA, Kainat oder AMPA in verschiedenen Konzentrationen stimuliert (10<sup>-3</sup>M, 10<sup>-5</sup>M, 10<sup>-7</sup>M und 10<sup>-8</sup>M). Um mögliche Effekte bei geringerer neuronaler Aktivität zu detektieren, wurden die Kulturen mit GABA in Konzentrationen von 10<sup>-3</sup>M bis 10<sup>-12</sup>M inhibiert. In weiteren Experimenten wurde jeweils auch mit Estradiol, Testosteron, Cholesterol und MK801 in verschiedenen Konzentrationen (10<sup>-5</sup>M, 10<sup>-7</sup>M und 10<sup>-8</sup>M) stimuliert.

Die Kulturen ohne Behandlung lieferten das Kontrollniveau für die Auswertung. Hierdurch wurden Unterschiede durch Behandlungen interpretierbar und wiederholbar.

Oben beschriebenes entspricht dem Standardprotokoll. Einige Experimente wurden jedoch als Kurzzeitstimulation durchgeführt, d.h. dass die Kulturen erst eine halbe Stunde vor der Fixierung (nach 11 Tagen Vorkultur) stimuliert wurden. Der Wechsel des Kulturmediums fand wie beim Standardprotokoll statt. Für die 30-minütige Stimulation wurden die Kulturen wieder in den Brutschrank gestellt und nach Ablauf der Zeit direkt fixiert.

#### III.2.4 Fixierung der Dispersionskultur

Für die Fixierung der Dispersionskultur wurde Formaldehyd (3,7% ) in PBS genutzt. Das Kulturmedium wurde aus den Kavitäten entnommen, gesammelt und zuerst für 5 Minuten durch PBS ersetzt. Danach wurde das PBS abgesaugt und mit der 3,7%igen Formaldehydlösung für 10 Minuten fixiert. Daraufhin wurde jede Kavität drei Mal für jeweils 5 Minuten mit PBS gespült. Es erfolgte ein Verschluss der Zellkulturplatte mit Parafilm. Hiernach konnten die Platten bis zu 3 Monaten zur weiteren Behandlung bei 4°C gelagert werden.

#### III.2.5 Immuncytochemie der Dispersionskulturen

Die bei 4°C im Kühlschrank gelagerten Kulturen wurden zuerst mit PBS 3x5 Minuten gespült und anschließend bei Raumtemperatur mit 3%igem BSA in PBS blockiert, um unspezifische Immunreaktionen zu unterbinden. Hierzu wurde jeweils 500 ml für 30 Minuten in jede Kavität gegeben.

Als Primärantikörper wurden bei den Experimenten Synaptopodin (monoklonal) unverdünnt eingesetzt und MAP2 (polyklonal) im Verhältnis 1:700. Hierbei wurde der MAP2-AK im Synaptopodin-AK verdünnt. Die beschichteten Glasplättchen wurden mit einer Nadel und einer Pinzette aus den Kavitäten entnommen und auf einen Objektträger gegeben. Die Objektträger mit den Glasplättchen wurden in einer feuchten Kammer positioniert. Danach wurde auf jedes Glasplättchen 50 µl der gelösten Primärantikörper gegeben. Es folgte eine 12stündige Inkubation bei 4°C im Kühlschrank.

Nach 12 Stunden wurden die Primärantikörper entfernt und die Plättchen wieder in eine 24er Zellkulturplatte mit Hilfe einer Pinzette umgesetzt. Die Kulturen wurden dann wieder drei Mal für 5 Minuten mit PBS gespült, um den Primärantikörper möglichst restlos auszuwaschen. Nach dem Spülen wurde der Sekundärantikörper unter Abdunkelung des Raumes hinzugegeben. Hierbei handelte es sich um einen Cy3-markierten Antikörper (monoklonal) im Verhältnis 1:350, sowie Alexa Fluor-488 (polyklonal) im Verhältnis 1:500. Jeweils 300ml der verdünnten Antikörper wurde in eine Kavität gegeben. Die Inkubationszeit betrug eine Stunde bei Raumtemperatur. Nach einer Stunde wurde der Sekundärantikörper entfernt und wiederum 3 mal für 5 Minuten mit PBS gespült.

Hiernach erfolgte die Kernfärbung mit DAPI. In jede Kavität wurde 300µl für 3 Minuten unter abgedunkelten Lichtverhältnissen gegeben.

Nach einem letzten Spülvorgang (wieder 3x5 Minuten mit PBS) wurden die Plättchen aus den Kavitäten entnommen und auf einen Objektträger gelegt. Sie wurden mit einigen Tropfen DAKO (fluoreszenzfreies Eindeckmedium) versehen und mit einem Deckglas eingedeckt.

Die bestückten Objektträger wurden in einer Mappe zum Trocknen gelagert. Die Lagerung fand wiederum bei 4°C im Kühlschrank statt.

#### III.2.6 Bildanalyse

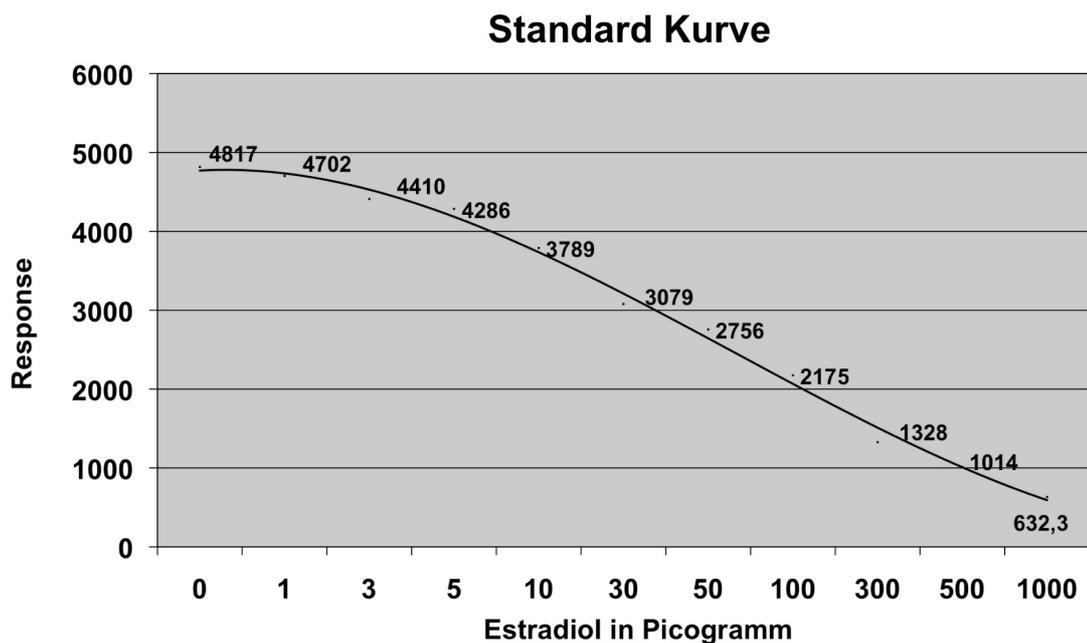
Zur quantitativen Auswertung und Dokumentation der behandelten Kulturen wurde ein Laser Scanning Microscope 4.1 (LSM) eingesetzt. Die Kulturen wurden damit umgehend nach dem letzten Schritt der Immunocytochemie fotografiert. Die Auswahl der MAP2-positiven Zellen erfolgte per Zufall. Die unbehandelten Zellen wurden als Kontrolle benutzt, d.h. dass die Einstellungen am Mikroskop so optimiert wurden, dass ein Intensitätsunterschied der behandelten Kulturen in jedem Falle gemessen werden konnte. Diese digitalen Fotos wurden dann mit einer speziellen Software analysiert (Openlab 3.1, Improvision, Coventry, UK). Für jede Behandlung wurden insgesamt 60 Zellen analysiert, wobei von drei verschiedenen Objektträgern je 20 fotografiert wurden. Die Intensität wurde im Soma der ausgewählten Zellen gemessen. Der „relative staining index“ ergab sich aus der Multiplikation der berechneten Fläche (Anzahl der Pixel) und der Intensität derselben (gemessener Wert auf einer Grauskala).

#### III.2.7 Statistik

Die gemessenen Gruppen wurden mit SPSS auf signifikante Unterschiede geprüft. Hierzu wurde ANOVA (analysis of variance) genutzt, gefolgt von einem *post-hoc* Test nach Dunnett.

#### III.2.8 Quantitative Estrogen-Bestimmung mittels Radioimmunoassay (RIA)

Auf Grund seiner hohen Empfindlichkeit und Spezifität ermöglicht der RIA einen 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 jeweils mindestens 8 ml Kulturmedium einer Gruppe von Dispersionkulturen gesammelt und sofort eingefroren. An drei Tagen (Tag 6, 8 und 11) des Kulturzeitraumes von 11 Tagen, wurde das Medium der stimulierten sowie der unstimulierten Kontrolle aufgefangen. Die Proben wurden fortlaufend nummeriert und in einem Blindversuch mittels Radioimmunoassay ausgewertet. Um eine Standardkurve zu erstellen, wurde unbehandeltes Kulturmedium verwendet. Durch stufenweise Erhöhung der  $17\beta$ -Estradiol Konzentration (X-Achse) konnte mit Hilfe des Radioimmunoassays ein Responsewert (Y-Achse) ermittelt werden. Diese Standardkurve diente als Grundlage für die weiteren Messungen.



**Abb. 1** : Standardkurve als Grundlage für die weiteren quantitativen Estrogenwertbestimmungen.

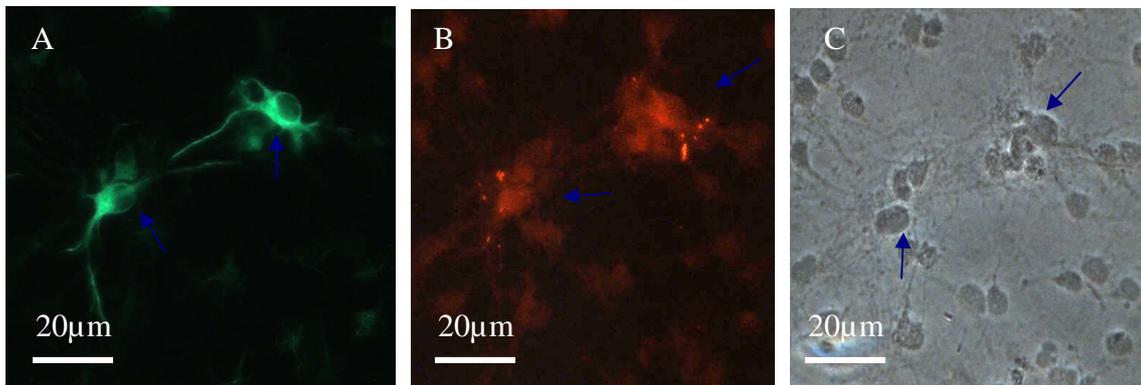
Von jeder Probe wurden 5 ml Medium getrocknet und mit 250 $\mu$ l Peptid-Puffer versetzt. Mit Hilfe einer SEP-PAK C<sub>18</sub> Säule wurde dem Medium  $17\beta$ -Estradiol entzogen und mit Methanol versetzt, um es anschließend im RIA zu quantifizieren. Der RIA wurde unter Verwendung des Standardprotokolls durchgeführt und mit einem Gamma Counter analysiert.

## IV Ergebnisse

### IV.1 Der Synaptopodin-Antikörper

Der verwendete Synaptopodin-Antikörper erkennt das Protein, das sich anhand unserer Ergebnisse in den Dendriten als auch im Soma befindet. Man erkennt den Unterschied zwischen den MAP2-positiven Pyramidalneuronen des Hippocampus (blaue Pfeile) und den restlichen Zellen der gemischten Kultur. Bei den dichten roten Punkten in den Dendriten der beiden MAP2-positiven Neurone handelt es sich wahrscheinlich um Spine-Apparate (Abb. 2B).

Bei den schwächer angefärbten Neuronen handelt es sich um Körnerzellen, die aufgrund ihrer verbleibenden Teilungsfähigkeit weniger MAP2 haben.



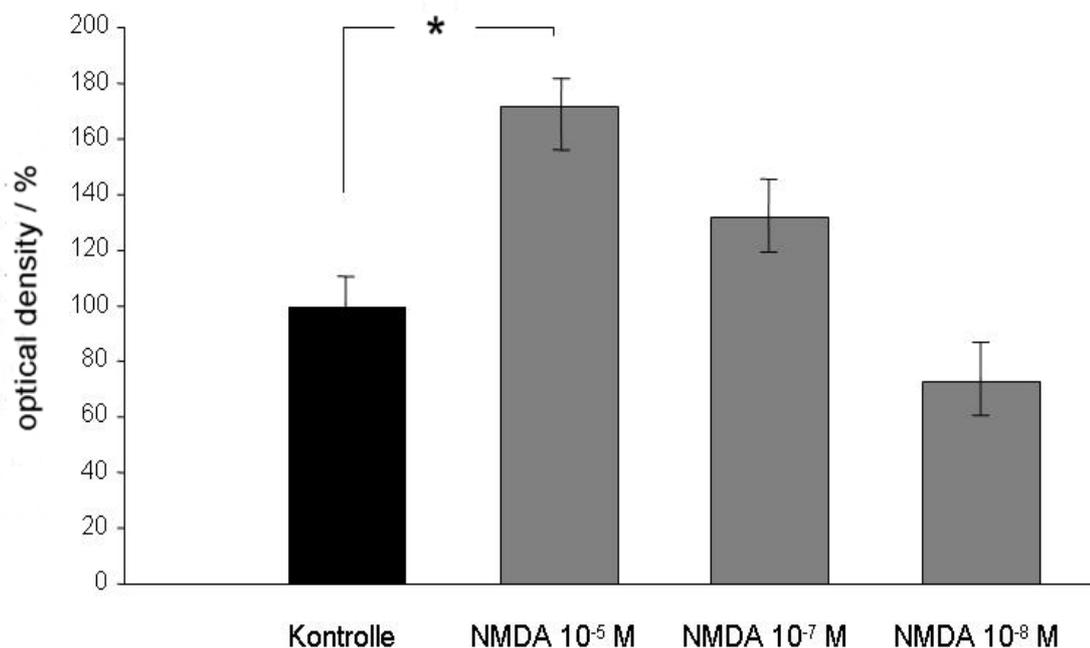
**Abb. 2 :** MAP2- (A) und Synaptopodin-Signale (B) zweier Pyramidalneurone (blaue Pfeile) einer unbehandelten Dispersionskultur. (C): Dieselbe Kultur im Phasenkontrastmikroskop.

## IV.2 Synaptopodinexpression in hippocampalen Dispersionskulturen unter exzitatorischen Neurotransmittern im Langzeitversuch

### IV.2.1 Expressionsniveau unter NMDA

In dieser Auswertung wurde der „staining index“ als Maß für die Synaptopodinexpression an per Zufall ausgewählten MAP-2 positiven Neuronen bestimmt. Der gesamte „staining index“ aller gemessenen Zellen  $n$ , wurde durch die Anzahl  $n$  aller gemessenen Zellen dividiert. Es ergibt sich ein Mittelwert, der zur besseren Überschaubarkeit auf Prozente berechnet wurde. Die nach dem „Langzeitprotokoll“ behandelten Kulturen, wurden nach 7 Tagen Stimulation fixiert.

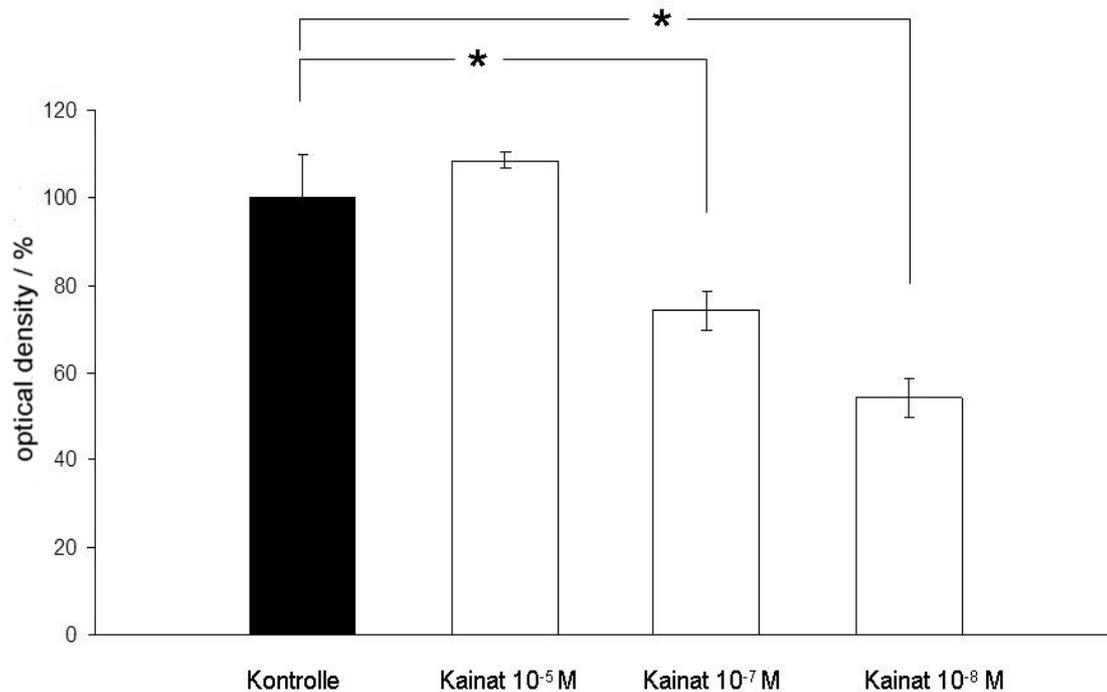
Es findet sich eine dosisabhängige Regulation von Synaptopodin durch NMDA, wobei hohe Dosen zu einer Herauf- und niedrige Dosen zu einer Herabregulation führen. Signifikant auf einem Niveau von  $p \leq 0,05$  ist jedoch nur die Heraufregulation der Synaptopodinexpression bei einer NMDA-Dosis von  $10^{-5}M$ . Die eingezeichneten Standardabweichungen sind alle „standard error of the mean“ (SEM).



**Abb. 3** : Auswertung der Immunocytochemie mit Anti-Synaptopodin in hippocampalen Dispersionskulturen nach Langzeitbehandlung mit NMDA  $10^{-5}M$ ,  $10^{-7}M$  und  $10^{-8}M$ . Dargestellt sind Mittelwert  $\pm$  SEM ( $n= 60$  je Gruppe). Der Stern weist auf signifikante Unterschiede hin (\*  $p \leq 0,05$ ).

### IV.2.2 Expressionsniveau unter Kainat

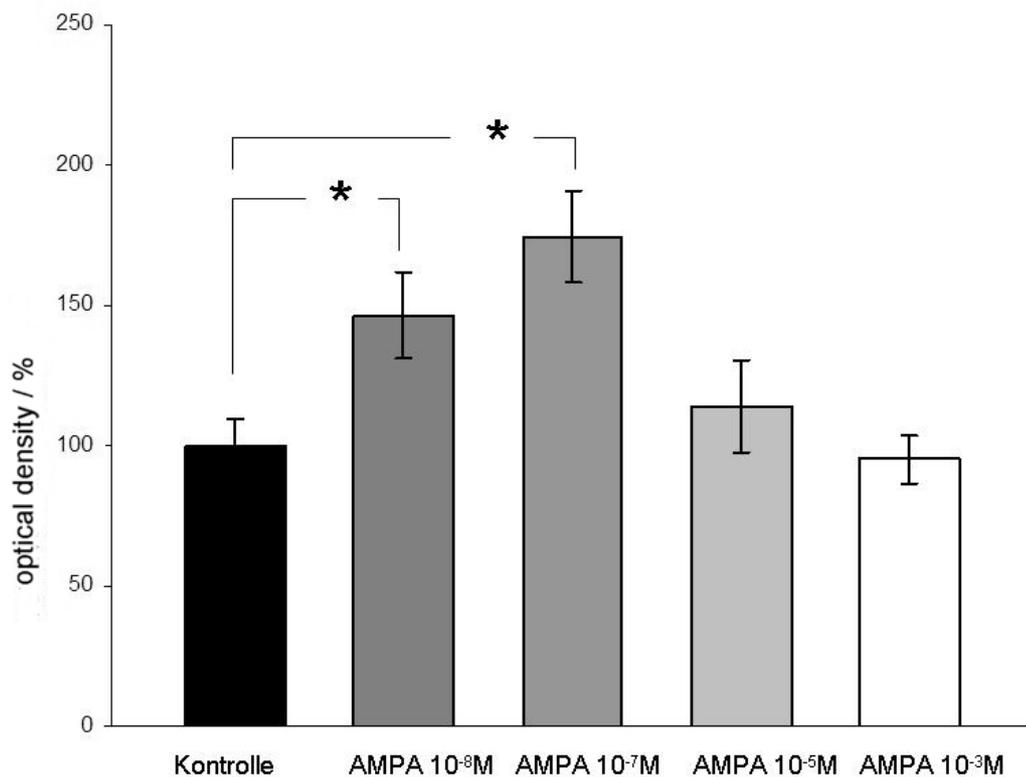
Das gleiche Muster findet sich auch wieder bei dem ebenfalls exzitatorischen Transmitter Kainat. Allerdings führen hier die niedrigeren Dosen  $10^{-7}\text{M}$  und  $10^{-8}\text{M}$  zu einer signifikanten Herabregulation von Synaptopodin.



**Abb. 4** : Auswertung der Immuncytochemie mit Anti-Synaptopodin in hippocampalen Dispersionskulturen nach Behandlung mit Kainat  $10^{-5}\text{M}$ ,  $10^{-7}\text{M}$  und  $10^{-8}\text{M}$ . Dargestellt sind Mittelwert  $\pm$  SEM (n= 60 je Gruppe). Die Sterne weisen auf signifikante Unterschiede hin (\*  $p \leq 0,05$ ).

IV.2.3 Expressionsniveau unter AMPA

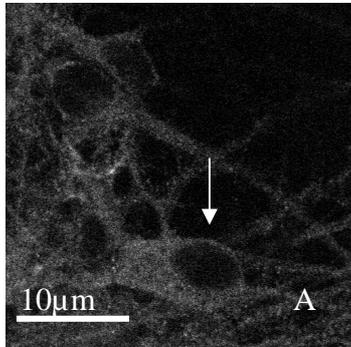
Bei der Verwendung von AMPA als Neurotransmitter zeigte sich ein dosisabhängiger umgekehrt U-förmiger Zusammenhang des Expressionsniveaus von Synaptopodin. Signifikant erhöht war die Synaptopodinexpression bei den niedrigeren Dosen mit  $10^{-7}\text{M}$  und  $10^{-8}\text{M}$  für  $p \leq 0,05$ .



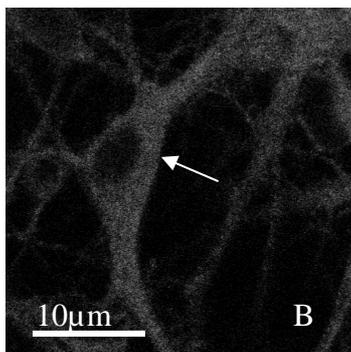
**Abb. 5 :** Auswertung der Immuncytochemie mit Anti-Synaptopodin in hippocampalen Dispersionskulturen nach Behandlung mit  $10^{-3}\text{M}$ ,  $10^{-5}\text{M}$ ,  $10^{-7}\text{M}$  und  $10^{-8}\text{M}$ . Dargestellt sind Mittelwert  $\pm$  SEM (n= 60 je Gruppe). Die Sterne weisen auf signifikante Unterschiede hin (\*  $p \leq 0,05$ ).

### IV.2.4 Exemplarische Fotos

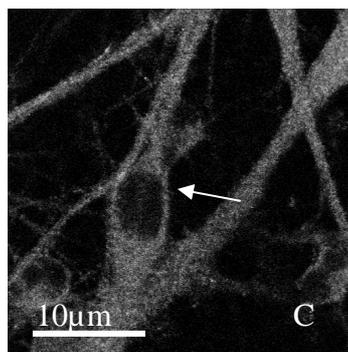
Um zu zeigen wie deutlich die Unterschiede der Expression sind, wurden exemplarisch Fotos ausgewählt, denen man mit bloßem Auge die Herab- und Heraufregulation der Synaptopodinsignale entnehmen kann.



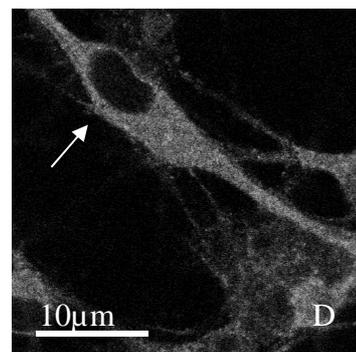
Kontrolle



NMDA  $10^{-8}$ M



NMDA  $10^{-7}$ M



NMDA  $10^{-5}$ M

**Abb. 6 :** Synaptopodinsignale von Pyramidalneuronen (weißer Pfeil) in hippocampalen Dispersionskulturen nach Behandlung mit NMDA ( $10^{-5}$ M [D],  $10^{-7}$ M [C],  $10^{-8}$  M [B]) und unbehandelte Kontrolle [A].

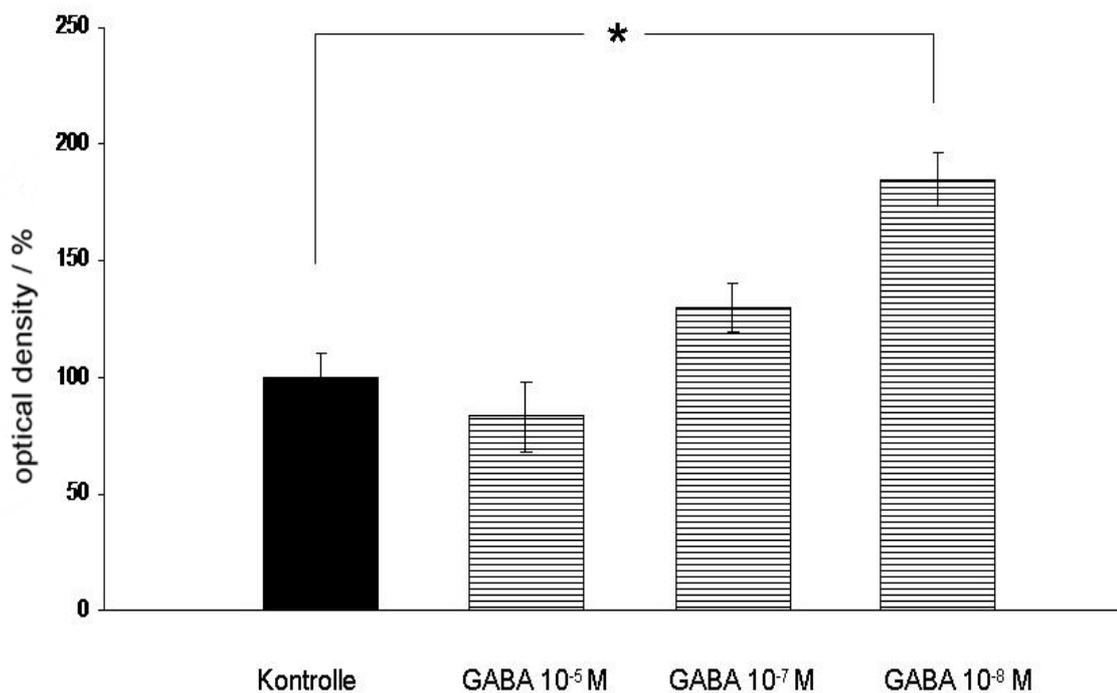
Der weiße Pfeil markiert das MAP2-positive Neuron, das per Bildanalyse gemessen wurde. Die Intensität der Helligkeit repräsentiert die gemessene Expression von Synaptopodin in der Bildanalyse mit dem Laser Scanning Microscope 4.1 (LSM).

Deutlich zu sehen ist die ansteigende Intensität und damit Expression von Synaptopodin bei der Dosiserhöhung von NMDA gegenüber der Kontrolle.

### IV.3 Synaptopodinexpression in hippocampalen Dispersionskulturen unter dem inhibitorischen Neurotransmitter GABA im Langzeitversuch

#### IV.3.1 Expressionsniveau unter GABA

Die bisherigen Ergebnisse sprechen dafür, dass die Synaptopodinexpression von pharmakologisch induzierter neuronaler Aktivität abhängt. Im folgenden Experiment sollte überprüft werden, ob sich die Synaptopodinexpression auch bei verminderter neuronaler Aktivität ändert. Es ergibt sich wiederum ein dosisabhängiger Zusammenhang des Expressionsniveaus, jedoch führen hier niedrige Dosen zu einer Heraufregulation und hohe Dosen zu einer Herabregulation von Synaptopodin, also genau umgekehrt zu den Ergebnissen, die mit NMDA und Kainat erzielt wurde. Statistisch signifikant ist hier eine Dosis von  $10^{-8}$ M ( $p \leq 0,05$ ).

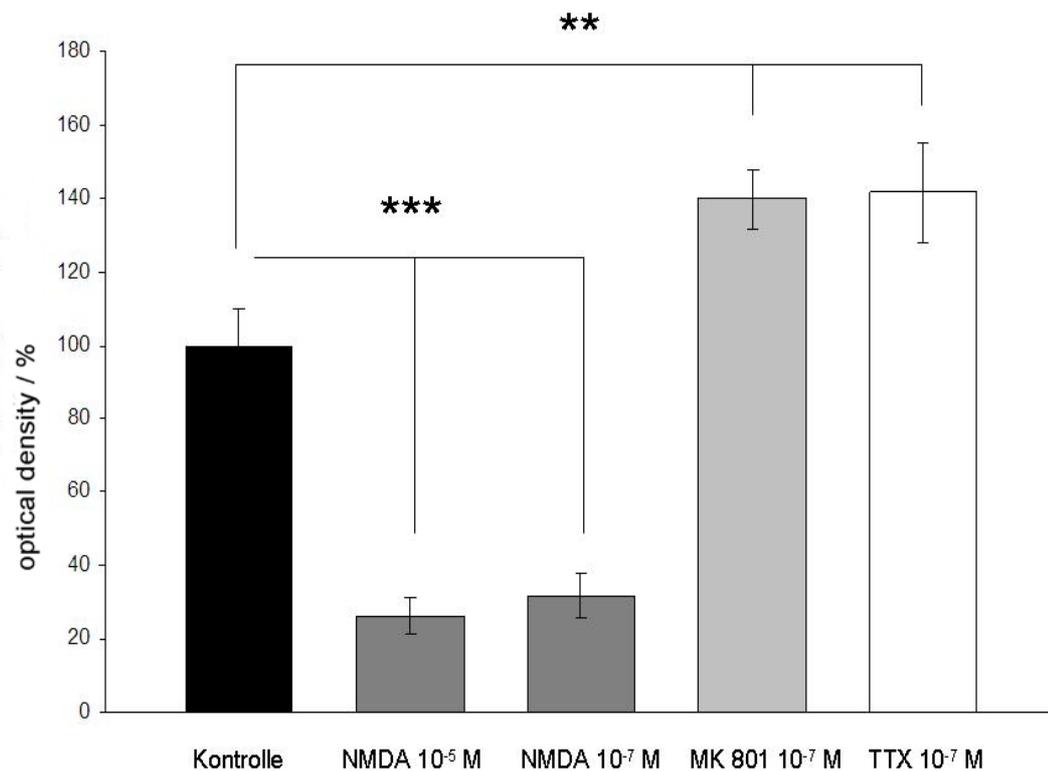


**Abb. 7 :** Auswertung der Immuncytochemie mit Anti-Synaptopodin in hippocampalen Dispersionskulturen nach Behandlung mit GABA  $10^{-5}$ M,  $10^{-7}$ M und  $10^{-8}$ M. Dargestellt sind Mittelwert  $\pm$  SEM ( $n= 60$  je Gruppe). Der Stern weist auf signifikante Unterschiede hin (\*  $p \leq 0,05$ ).

#### IV.4 Synaptopodinexpression in hippocampalen Dispersionskulturen unter in- und exhibitorischen Neurotransmittern im Kurzzeitversuch

##### IV.4.1 Expressionsniveau unter NMDA, MK 801 und Tetrodotoxin

Bei der Kurzzeitstimulation (30 Minuten) ergaben sich andere Ergebnisse als bei der Langzeitstimulation. Die Herunterregulation von Synaptopodin war nun nicht mehr dosisabhängig, sondern identisch zwischen verschiedenen Dosen (s. Abb. 8). Die Behandlung mit Tetrodotoxin, das neuronale Aktivität reduziert, und MK 801, einem NMDA-Rezeptor Blocker, führte umgekehrt zu einer Hochregulation der Synaptopodinexpression in den Dispersionskulturen.



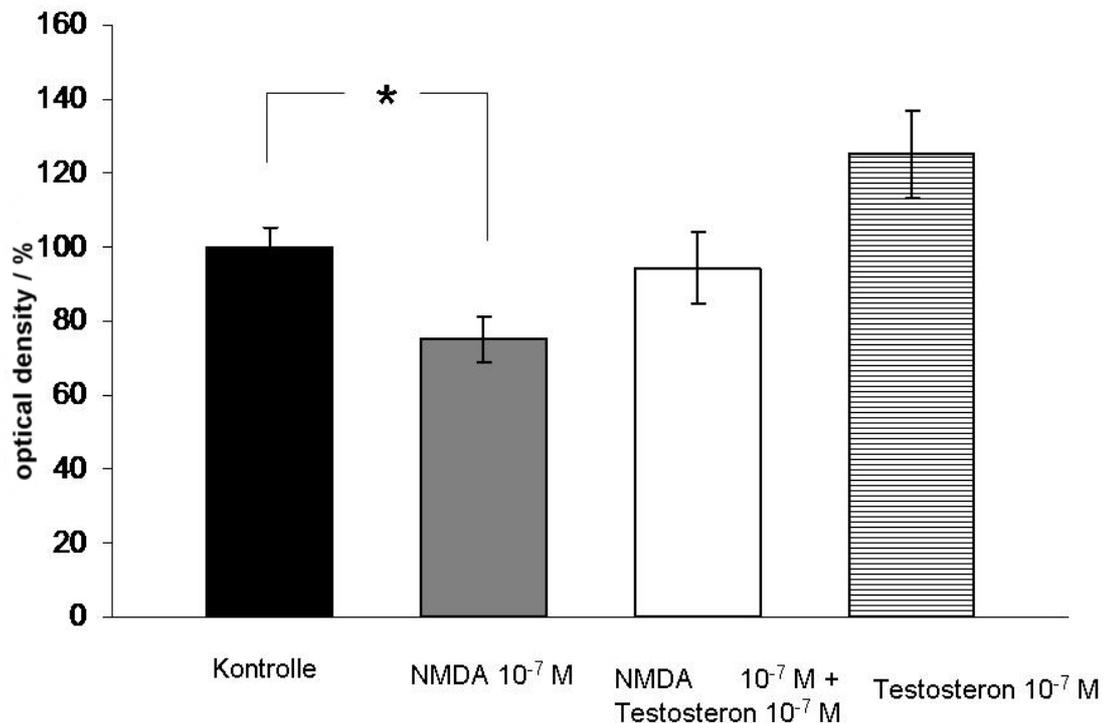
**Abb. 8** : Auswertung der Immuncytochemie mit Anti-Synaptopodin in hippocampalen Dispersionskulturen nach Kurzzeitbehandlung (30 Minuten) mit NMDA 10<sup>-5</sup>M und 10<sup>-7</sup>M, MK801 10<sup>-7</sup>M und TTX 10<sup>-7</sup>M .

Dargestellt sind Mittelwert  $\pm$  SEM (n= 60 je Gruppe). Die Sterne weisen auf signifikante Unterschiede hin (\*\* p  $\leq$  0,01 ; \*\*\* p  $\leq$  0,001).

## IV.4.2 „Rescue“ der NMDA-vermittelten Herunterregulation durch Testosteron

Um der Frage nachzugehen, ob die Aromatase in die Herunterregulation von Synaptopodin nach glutamatergen Input involviert ist, haben wir Rescue-Experimente durchgeführt. Da wir aus vorausgegangenen Experimenten wussten, dass eine  $\text{Ca}^{2+}$ -Freisetzung aus internen Speichern nach glutamaterger Stimulation die Aromatase inhibiert (Balthazart et al., 2003), haben wir durch gleichzeitige Gabe von NMDA und Testosteron versucht, die Herunterregulation nach NMDA wieder aufzuheben, da Testosteron die Aromatase durch erhöhtes Substratangebot aktiviert (Fester et al., 2009).

Bei diesem Experiment fand sich ein statistisch signifikanter Unterschied nur zwischen der Kontrollgruppe und NMDA nach 30 Minuten Stimulation (s. Abb. 9 ). Nach gleichzeitiger Gabe von NMDA plus Testosteron war die Expression auf Kontrollniveau. Testosteron alleine hatte keinen Effekt.



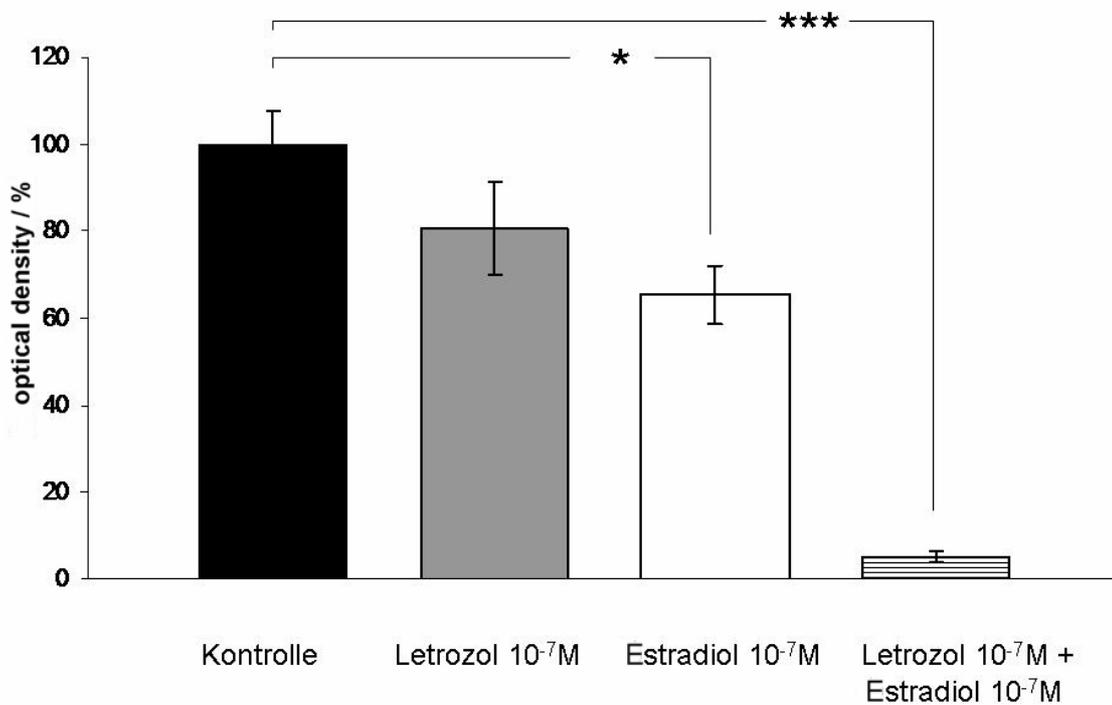
**Abb. 9** : Auswertung der Immunocytochemie mit Anti-Synaptopodin in hippocampalen Dispersionskulturen nach Kurzzeitbehandlung (30 Minuten) mit NMDA  $10^{-5}$ M, NMDA  $10^{-7}$ M, Testosteron  $10^{-7}$ M und Testosteron  $10^{-7}$ M .

Dargestellt sind Mittelwert  $\pm$  SEM (n= 60 je Gruppe). Der Stern weist auf signifikante Unterschiede hin (\*\*  $p \leq 0,05$ ).

IV.4.3 Expressionsniveau unter Letrozol und Estradiol

Um die Rolle der Aromatase bei NMDA-induzierter Herunterregulation von Synaptopodin weiter zu untersuchen, haben wir den Aromatasehemmer Letrozol eingesetzt.

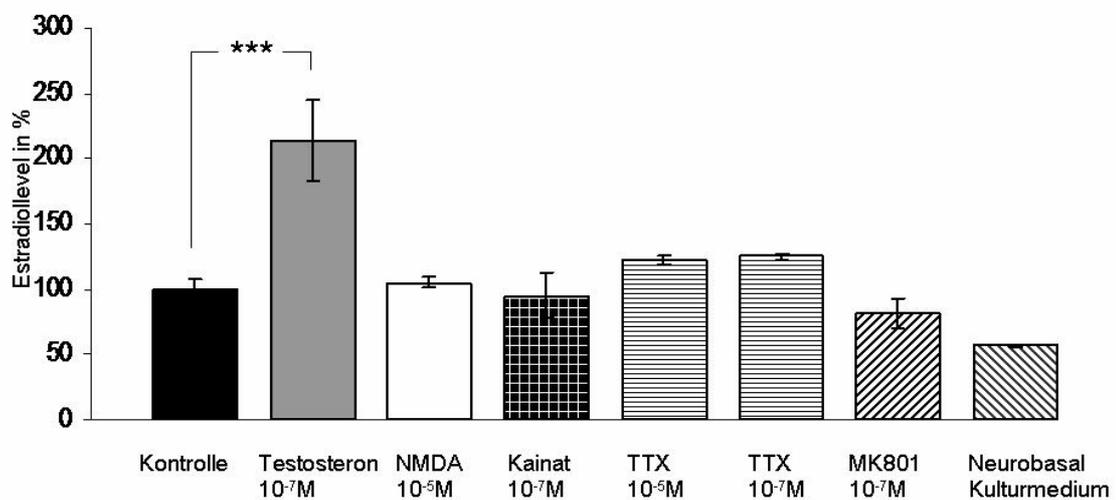
Bei der alleinigen Kurzzeitstimulation mit Letrozol, einem Aromatasehemmer, fand sich ein Unterschied zur Kontrollgruppe, der aber nicht signifikant war ( $p=0,201$ ). Erstaunlicherweise gab die Behandlung mit Estradiol eine signifikante Herunterregulation während die Kombination von Estradiol und Letrozol zu einer drastischeren Herabregulation führte, die für  $p \leq 0,001$  signifikant war.



**Abb. 10 :** Auswertung der Immuncytochemie mit Anti-Synaptopodin in hippocampalen Dispersionskulturen nach Kurzzeitbehandlung (30 Minuten) mit Letrozol  $10^{-7}M$  und Estradiol  $10^{-7}M$ . Dargestellt sind Mittelwert  $\pm$  SEM ( $n= 60$  je Gruppe). Die Sterne weisen auf signifikante Unterschiede hin (\*  $p \leq 0,05$  ; \*\*\*  $p \leq 0,001$ ).

#### IV.5 Estradiolmessung im Kulturmedium mittels Radioimmunoassay

Um der Frage nachzugehen, inwiefern sich die Aromataseaktivität auf den Estradiolgehalt des Kulturmediums auswirkt, wurde Estradiol im Langzeitversuch (Stimulation über 7 Tage) per Radioimmunoassay bestimmt. Ein signifikanter Unterschied zur Kontrollgruppe zeigte sich nur bei der Behandlung mit Testosteron.



**Abb. 11 :** Auswertung im Radioimmunoassay: Estradiolgehalt des nach Protokoll gepoolten Kulturmediums. Dargestellt sind Mittelwert  $\pm$  SEM (n= 5 je Gruppe). Die Sterne weisen auf signifikante Unterschiede hin (\*\*\*)  $p \leq 0,001$ .

## V Diskussion

In dieser Arbeit konnte erstmalig gezeigt werden, dass die Synaptopodinexpression in hippocampalen Dispersionskulturen durch glutamatergen Input reguliert wird. Es findet sich sogar eine Korrelation zwischen der Intensität des exzitatorischen Inputs und der Expression von Synaptopodin im Langzeitversuch, während sich im Kurzzeitversuch eine dosisunabhängige Herunterregulation der Synaptopodin-Immunoreaktivität findet. Ergänzend hierzu konnte gezeigt werden, dass die Inhibition eines glutamatergen Inputs gegenteilige Effekte hat, sowohl beim Lang- als auch beim Kurzzeitversuch.

Zusätzlich fanden sich Hinweise darauf, dass die Regulation von Synaptopodin auf den exzitatorischen Input durch die Aromatase vermittelt wird.

### V.1 Methodische Überlegungen

Ein Problem der Dispersionskulturen ist die Heterogenität der Zellausbeute in den einzelnen Wells. Es wurden zwar immer 100000 Zellen pro Well ausgesät, jedoch war das Wachstum innerhalb der Wells unterschiedlich. Ausgewählt wurden die Wells einer Behandlungsgruppe, die relativ dicht gewachsen waren und zahlreiche interneuronale Verbindungen aufwiesen. Hiermit wurde dieses Problem minimiert.

Ein weiteres Problem ist, dass Stimulantien verwendet wurden, die abhängig von der verwendeten Dosis zelltoxisch wirken, so z.B. Tetrodotoxin und NMDA. Bei NMDA ist das Wachstum der Zellen bei einer Dosis von  $10^{-3}$ M nur noch spärlich und die Auswertung dieser Dosis wurde deswegen nicht in diese Arbeit aufgenommen. Bei Tetrodotoxin gibt es ein ähnliches Problem bei der Diskussion der Ergebnisse, da nicht klar ist, ob der Effekt durch Inhibition der neuronalen Aktivität begründet ist, oder ob die Zellen innerhalb der 30-minütigen Stimulation schon Schaden nehmen.

Außerdem wurde aus praktischen Gründen nur unter „semisterilen“ Bedingungen gearbeitet, was immer die Gefahr einer Besiedelung der Zellkulturen mit Bakterien oder Pilzen mit sich bringt, die wiederum einen Einfluss auf das Wachstum der hippocampalen Neuronen haben könnten. Dieses Problem wurde jedoch durch mikroskopische Kontrollen und den Verwurf kontaminierter Kulturen minimiert.

## V.2 Estradiol und Neurone

Die *de novo* Synthese von Estradiol in Neuronen wirft viele Fragen auf, da bei der Entdeckung der Enzyme der Steroidgenese in Neuronen nicht klar war, wozu Neurone Estradiol selber produzieren. Auch die Aromatase, als letztes Enzym der Estrogensynthese, wurde in diesem Rahmen in Neuronen entdeckt (Abdelgadir et al., 1994; Wehrenberg et al., 2001; Sanghera et al., 1991; Garcia-Segura et al., 1999). Durch den Aromatasehemmer Letrozol konnte gezeigt werden, dass die Hemmung des Enzyms signifikante Veränderungen der Estradiollevel im Kulturmedium mit sich bringt (Prange-Kiel et al., 2003; Kretz et al., 2004). Im Rahmen der Arbeit von Kretz (2004) konnte ebenfalls gezeigt werden, dass die Inhibition der Estrogensynthese durch Verminderung der Aktivität der Aromatase in hippocampalen Kulturen die Dichte von Spines und Synapsen erniedrigt und synaptische Proteine herunterreguliert. Estradiol selber hatte in dieser Arbeit jedoch keinen signifikanten Effekt auf die Spines und Synapsen.

Eine andere neuere Arbeit zeigt einen ähnlichen Hinweis für die Funktion von Estradiol in Neuronen: bei der Inhibition der Aromatase in hippocampalen Slicekulturen konnte kein LTP mehr induziert werden (Glassmeier et al., 2008, in Revision). Anhand dessen lässt sich schlussfolgern, dass Estrogen einen entscheidenden Einfluss auf die synaptische Plastizität von Neuronen haben muss und deswegen unabhängig von den Gonaden im Hippocampus produziert wird. Hierbei ist auch interessant, dass für das im Hippocampus produzierte Estradiol ein auto- und parakriner Mechanismus für die Bildung von neuen Estrogenrezeptoren gefunden werden konnte (Prange-Kiel et al., 2003; 2006; Kretz et al., 2004; Fester et al., 2009), der die wichtige Rolle der *de novo* Synthese von Estradiol bestätigt.

## V.3 Synaptopodin als Parameter für den Spineapparat

Synaptopodin steht in enger Verbindung zum Spineapparat, dessen Funktionen noch nicht gesichert sind. Die Ausbildung dieses Spineapparates ist von Synaptopodin abhängig, so konnten in der Synaptopodin knock-out Maus keine Spineapparate mehr detektiert werden (Deller et al., 2003). Die Quantifizierung des in unseren Experimenten mit Antikörpern markierten Synaptopodins (durch konfokale Lasermikroskopie) kann dadurch letzten Endes als Parameter für den Spineapparat angesehen werden.

Im Gegensatz zu dem was über die Lokalisation von Synaptopodin in der Literatur beschrieben wird, können wir sagen, dass das Protein Synaptopodin sowohl in den Dendriten der Neurone als auch in den Somata von dissoziierten Neuronen zu finden ist. Dies konnte eindeutig gezeigt werden und widerspricht der Auffassung der Erstbeschreiber Mundel et al., dass nur die mRNA von Synaptopodin im Soma zu finden sei (Mundel et al., 1997a).

In weiteren Studien fanden sich Hinweise für die Bedeutung Synaptopodins in Bezug auf die synaptische Plastizität. So konnte gezeigt werden, dass die mRNA von Synaptopodin bei neuronaler Aktivität hochreguliert wird (Yamazaki et al., 2001). Dies soll später noch einmal in dieser Diskussion aufgegriffen werden. Auf zellulärer Ebene fanden sich für Synaptopodin Interaktionspartner am Zytoskelett, hierzu zählen das schon in der Einleitung erwähnte F-Aktin und  $\alpha$ -Aktinin, das eine Rolle für die Vernetzung von Aktinfilamenten spielt (Kremerskothen et al., 2005; Asanuma et al., 2005; 2006). Ein Hinweis darauf, dass morphologische Veränderungen die Bedeutung von Synaptopodin für die synaptische Plastizität erklären könnten. Okubo-Suzuki et al. konnten 2008 zeigen, dass Synaptopodin eine Rolle bei der Aufrechterhaltung der von neuronaler Aktivität abhängigen Vergrößerung dendritischer Spines hat. Während die Spinevergrößerung bei neuronaler Aktivität nur vorübergehend war, wurde sie durch eine vermehrte Expression von Synaptopodin permanent. Die alleinige vermehrte Expression von Synaptopodin hatte jedoch keinerlei Einfluss auf die Anzahl oder das Volumen von Spines (Okubo-Suzuki et al., 2008). In diesem Zusammenhang sei auf die Studien von Deller und Mitarbeitern verwiesen, die bei der Synaptopodin knock-out Maus eine verminderte Ausbildung von LTPs und Lerndefizite zeigen konnten (Deller et al., 2003; Jedlicka et al., 2008).

### **V.4 Estradiol und Letrozol vermindern Synaptopodinimmunoreaktivität**

In unserer Arbeitsgruppe sollte untersucht werden, ob es einen Zusammenhang der Effekte auf die Abnahme von Spines bei Inhibition der Estrogensynthese (Kretz et al., 2004) und dem Protein Synaptopodin geben könnte. Zu diesem Zweck wurde der Aromatasehemmer Letrozol, der zu einer Abnahme des intrazellulären Estradiols führt, eingesetzt. Des Weiteren wurde auch Estradiol selbst eingesetzt, da auch für Estrogen

gezeigt werden konnte, dass es eine kompetitive Produktinhibition an der Aromatase verursacht (Shimizu et al., 1993).

Der Aromatasehemmer Letrozol führt zu einer verminderten Immunoreaktivität von Synaptopodin nach einer Stimulation von 30 Minuten. Hierzu muss jedoch gesagt werden, dass sich in dieser Arbeit fortwährend eine Herunterregulation der Synaptopodin-Immunoreaktivität fand, die statistisch jedoch nicht signifikant war. Es ist jedoch innerhalb der Arbeitsgruppe mehrfach gelungen, den herunterregulierenden Effekt als signifikant darzustellen (Arbeitsgruppe Rune et al., bisher unveröffentlicht). Wir vermuten hier einen Zusammenhang zwischen der Expression genomischer Estrogenrezeptoren und dem Effekt auf Synaptopodin. Prange-Kiel et al. konnten 2003 zeigen, dass die Behandlung hippocampaler Dispersionskulturen mit Letrozol zu einer Heraufregulation des Estradiolrezeptors ER $\beta$  und zu einer Herunterregulation des ER $\alpha$  führt. Wir vermuten eine Regulation der Synthese von Synaptopodin über den ER $\beta$ , was jedoch in einem weiteren Kapitel diskutiert werden soll.

Interessanterweise findet sich auch eine signifikante Verminderung der Synaptopodin-Immunoreaktivität bei der 30-minütigen Behandlung mit Estradiol (s. Abb. 10). Dies steht erstmal im Widerspruch zu dem eben erwähnten Erklärungsmodell, da für nicht an Globuline gebundenes Estradiol eine freie Membrangängigkeit postuliert wird. Hiermit würde ein erhöhter intrazellulärer Estradiolgehalt erzeugt und dadurch würden wir anhand des obigen Modells eher eine Heraufregulation von Synaptopodin erwarten. Es gibt jedoch verschiedene Hinweise darauf, dass Estradiol eine Calciumfreisetzung zur Folge hat, die vermutlich über N-Typ spannungsabhängige Ca<sup>2+</sup>-Kanäle, den Ryanodinrezeptor und den IP3-Rezeptor erfolgen (Zhao et al., 2005).

In neueren Studien wurden tatsächlich membranständige Proteine identifiziert, die an Estrogenrezeptoren gebunden sind und verschiedene Signalkaskaden auslösen oder als Transporter für Estrogene dienen. Eines dieser Proteine ist Striatin, das als membranständiger, molekularer Anker an ER $\alpha$  bindet und verschiedene Signalkaskaden auslöst die mit erhöhtem NO und Ca<sup>2+</sup> in vaskulären Endothelialzellen einhergehen (Lu et al., 2004). Erstmals gefunden und isoliert wurde dieses Protein jedoch in Rattenhirnsynaptosomen (Castets et al., 1996; Moqrich et al., 1998), was wiederum zu der Vermutung führt, dass es auch bei den in den Experimenten verwendeten hippocampalen Dispersionskulturen eine Rolle spielen könnte. Ein weiteres Protein, welches den Estradiolgehalt der Zelle reguliert, ist Megalin. Entgegen der gängigen

Lehrbuchmeinung, die passive Diffusion für freie Estrogene fordert, konnte eine endozytäre Aufnahme für an Globuline gebundene Estrogene mittels dieses Proteines nachgewiesen werden (Hammes et al., 2005). Als intrazellulärer Vertreter wurde auch ein G-Protein gekoppelter (GPR30) Estrogenrezeptor beschrieben, der membranständig im endoplasmatischen Retikulum lokalisiert ist. Nach Stimulation aktiviert er eine intrazelluläre, calciumabhängige Signalkaskade und erhöht schließlich die intrazelluläre Calciumkonzentration (Revankar et al., 2005; Funakoshi et al., 2006). Aufgrund dieser Entdeckungen von membranständigen Rezeptoren bzw. Transportern, die die Estrogenhomöostase und über Signalkaskaden das  $\text{Ca}^{2+}$ -Signaling der Zelle beeinflussen, vermuten wir wiederum aufgrund unserer Ergebnisse, dass Estradiol einen schnellen  $\text{Ca}^{2+}$ -Release in der Zelle verursacht, der wiederum durch Phosphorylierung der Aromatase deren Aktivität vermindern könnte.

In der Studie von Kretz (2004) fand sich jedoch keine signifikante Veränderung der Spinedichte und Synapsen nach Behandlung mit Estradiol. Dies würden wir erwarten, da Synaptopodin uns als Parameter für den Spineapparat dient, der in immerhin 80% der reifen Spines vorhanden ist. Eine Erklärung hierfür ist, dass Estrogene auch an die aktive Seite des Aromatase P-450 Komplexes binden und sie kompetitiv inhibieren (Shimizu et al., 1993). Dies wäre als Mechanismus der negativen Rückkopplung zu verstehen, der wiederum dazu dient, dass Estrogene ihre eigene Synthese regulieren können. Es gibt also die Möglichkeit der Aromatasehemmung durch Estradiol selbst. Man könnte also von einem Gleichgewicht sprechen, dass trotz externer Estradiolgabe dafür sorgt, dass keine signifikante intrazelluläre Erhöhung erfolgt. Dadurch würde die Herunterregulation von  $\text{Er}\alpha$  ebenfalls wegfallen und der Effekt auf die Spinedichte bliebe aus. Außerdem wurde Estradiol im Rahmen dieser Arbeit nur im Kurzzeitversuch angewendet und es ist nicht klar, wieviel davon in 30 Minuten überhaupt in die Zelle diffundieren kann. Unsere Arbeitsgruppe vermutet, dass der Effekt von Estradiol in diesem Versuch durch einen  $\text{Ca}^{2+}$ -Release membranständiger Rezeptoren funktioniert, da die Ergebnisse auch mit an bovines Serumalbumin gebundenes Estradiol reproduziert werden konnten (Arbeitsgruppe Rune et al., bisher unveröffentlicht). Somit musste auch die anfängliche Hypothese unserer Arbeitsgruppe, nämlich dass Estradiol bei gleichzeitiger Gabe mit Letrozol einen „Rescue“-Effekt auf Synaptopodin haben könnte, verworfen werden. In den Experimenten fand sich kein „Rescue“-Zusammenhang, sondern ein auffällig starker additiver Effekt, der sich durch oben genannte

Mechanismen erklären lässt. Die Aromatase, die ja schon durch Letrozol gehemmt ist, wird nun durch den von Estradiol ausgelösten  $\text{Ca}^{2+}$ -Release phosphoryliert und damit noch stärker in ihrer Aktivität gemindert. Die Folge hiervon ist eine weitere Erniedrigung von Estradiol und eine Hochregulierung des ER $\beta$ , der in unserem Modell den Effekt auf die Synaptopodinsynthese vermittelt.

### **V.5 Der genomische Estrogenrezeptor- $\beta$ reguliert die Expression von Synaptopodin**

Bei den Estrogenrezeptoren ER $\alpha$  und ER $\beta$  handelt es sich um ligandenaktivierte Transkriptionsfaktoren. Prange-Kiel et al. konnten 2003 zeigen, dass die beiden Estrogenrezeptoren in Abhängigkeit von der Aromataseaktivität exprimiert werden. Der ER $\alpha$  wurde durch Inhibition der Aromatase durch Letrozol herunterreguliert, während der ER $\beta$  heraufreguliert wurde. Für die Behandlung mit Estradiol fanden sich gegenteilige Effekte. In weiteren Experimenten konnte in unserer Arbeitsgruppe auch gezeigt werden, dass NMDA den ER $\alpha$  ebenfalls herunterreguliert (Prange-Kiel, bisher unveröffentlicht). Dies ist interessant, da die bisherigen Daten zeigen, dass die Expression von den Estrogenrezeptoren- $\alpha$  und - $\beta$  immer entgegengesetzt verläuft und wir annehmen, dass es sich hierbei um ein balanciertes System handelt. Die Heraufregulation des ER $\beta$  nach NMDA steht jedoch noch aus.

Aufgrund dieser Ergebnisse wurden in unserer Arbeitsgruppe zwei weitere Experimente durchgeführt, die zeigen sollten, ob die Synaptopodinsynthese an die Expression der Estrogenrezeptoren gekoppelt ist. Für den spezifischen ER $\alpha$ -Agonisten PPT fand sich keine Beeinflussung der Synaptopodinsynthese, während der ER $\beta$ -Agonist DPN Synaptopodin herunterreguliert (Arbeitsgruppe Rune et al., bisher unveröffentlicht). Unsere Vermutung ist also, dass der ER $\beta$  Synaptopodin reguliert.

Um diese Ergebnisse abzusichern wurde in der Arbeitsgruppe auch geprüft, ob es einen „Rescue“-Effekt bei gleichzeitiger Stimulation mit ICI 182,780, einem Antagonisten an membranständigen und zytosolischen Estrogenrezeptoren, gibt. Die gleichzeitige Stimulation mit NMDA und ICI brachte die NMDA-abhängige Synaptopodinerunterregulation auf Kontrollniveau. ICI selbst hatte keinen Effekt (Ossig, 2009, Med. Dissertationen). Dieses Ergebniss bestätigt die Vermutung, dass Synaptopodin durch Estrogenrezeptoren reguliert wird.

Der vermutete Effekt von NMDA auf die Expression von ER $\beta$  lässt sich wiederum durch die Regulation der Aromatase erklären. Die Aktivität der Aromatase wird durch NMDA verringert, da  $Ca^{2+}$ -Influx und CICR zu einer Phosphorylierung der Aromatase führen, die sie inaktiviert. Dies wäre also dem Effekt von Letrozol gleichzusetzen, für den Prange-Kiel et al. 2003 schon zeigen konnten, dass hierdurch der ER $\beta$  heraufreguliert wird.

Die Synthese von Synaptopodin scheint also tatsächlich an den ER $\beta$  gekoppelt zu sein. Dass die Aromatase die Synthese eines Proteins reguliert, ist jedoch durchaus erstaunlich. Noch komplexer wird diese Modell, wenn man berücksichtigt, dass dieses Enzym durch  $Ca^{2+}$  reguliert wird.

### V.6 Calcium-Kinetik im dendritischen Spine

Bei all den vermuteten Effekten, die unserer Auffassung nach  $Ca^{2+}$ -vermittelt im dendritischen Spine stattfinden, bleibt es nicht aus, sich die Wege zu vergegenwärtigen, die für  $Ca^{2+}$  in Spines eine Rolle spielen könnten. Das  $Ca^{2+}$ -Signaling im dendritischen Spine ist ein höchst komplexer Vorgang mit zahlreichen Faktoren, die sich auch gegenseitig beeinflussen. Ein besonderes Augenmerk soll dabei auf die Kompartimentierung von  $Ca^{2+}$  und damit den Spineapparat gelegt werden, dem bei den Überlegungen unserer Arbeitsgruppe entscheidende Funktionen zukommen.

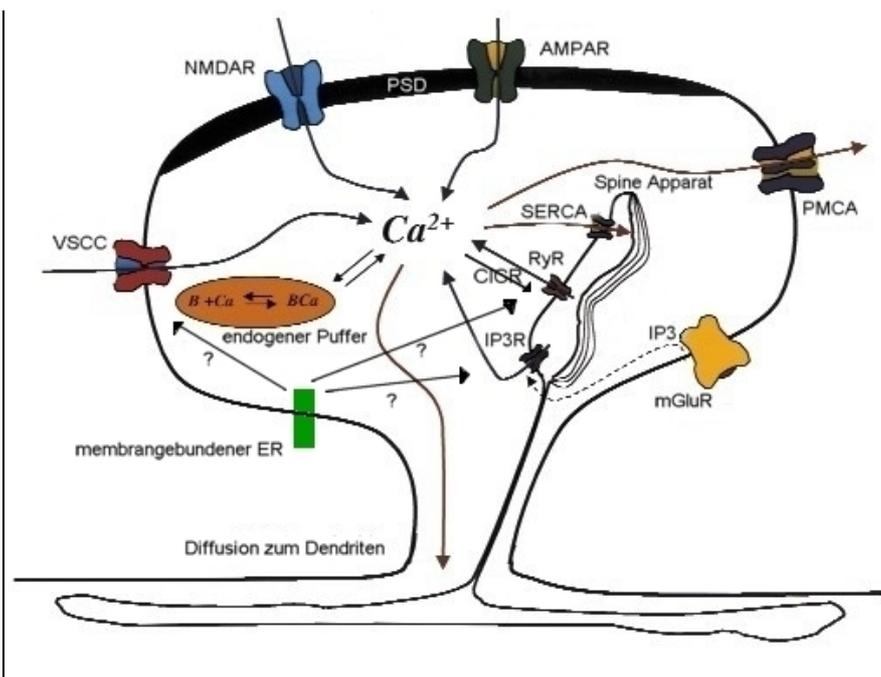


Abb. 12 : Modell eines Spines und seiner  $Ca^{2+}$ -Kinetik (Quelle: Yuste et al., 2000)

Die Schemazeichnung (s. Abb. 12) illustriert, wie vielfältig die Mechanismen sind, die die  $\text{Ca}^{2+}$ -Kinetik beeinflussen. Von extrazellulär kann  $\text{Ca}^{2+}$  über den NMDA-Rezeptor, spannungsabhängige  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanäle (VSCC) oder  $\text{Ca}^{2+}$ -permeable AMPA-Rezeptoren in die Zelle gelangen.  $\text{Ca}^{2+}$  kann auch durch intrazelluläre Speicher freigegeben werden und zwar durch Ryanodin-Rezeptor abhängige Mechanismen ( $\text{Ca}^{2+}$ -vermittelte  $\text{Ca}^{2+}$ -Freisetzung über den Ryanodin-Rezeptor, was im Folgenden noch diskutiert werden soll) oder nach der Aktivierung von metabotropen Glutamat-Rezeptoren über den IP3-Rezeptor. Im Cytoplasma kann  $\text{Ca}^{2+}$  an Puffer binden, die die Form des  $\text{Ca}^{2+}$ -Transienten ändern. Allerdings ist über diese Puffer wenig bekannt. Wege aus dem Spine hinaus führen über die Plasmamembran  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase (PMCA) oder per Diffusion zum Dendriten. Eine weitere Möglichkeit ist die Aufnahme in intrazelluläre Speicher durch SERCA-Pumpen. In grün dargestellt unsere Vermutung eines membranständigen Estrogenrezeptors, der an verschiedenen Stellen in die  $\text{Ca}^{2+}$ -Kinetik des Spines eingreifen könnte (Yuste et al., 2000).

Die Mechanismen des intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Release durch Estradiol sind nicht hinreichend bekannt, allerdings gibt es durch die Studie von Zhao (2005) schon Hinweise auf drei Rezeptoren, die wahrscheinlich beteiligt sind (VSCC, RyR und IP3-R). Wenn dieser vermutete  $\text{Ca}^{2+}$ -Release ursächlich für die Herunterregulation der Synaptopodin-Immunoreaktivität sein sollte, müsste sich dieser Effekt auch mit Substanzen nachweisen lassen, die gesichert einen  $\text{Ca}^{2+}$ -Release verursachen. Anhand dieser Überlegungen wurde in unseren Experimenten NMDA eingesetzt. Bei der NMDA-Rezeptoraktivierung ist gesichert, dass es zu einem  $\text{Ca}^{2+}$ -Influx von extrazellulär kommt. Eine neuere Erkenntnis ist jedoch, dass es nach der Aktivierung von NMDA-Rezeptoren auch zu einer  $\text{Ca}^{2+}$ -induzierten  $\text{Ca}^{2+}$ -Freisetzung (CICR) aus internen Speichern im dendritischen Spine kommt (Emptage et al., 1999)

### **V.7 Durch NMDA verursachter $\text{Ca}^{2+}$ -Release führt im Kurzzeitversuch zu Verminderung der Synaptopodinimmunoreaktivität**

In den Experimenten dieser Arbeit zeigte sich nach 30-minütiger Behandlung eine dosisunabhängige Verminderung der Synaptopodin-Immunoreaktivität. Die Verknüpfung zu oben erwähntem Erklärungsmodell findet sich in der Studie von Balthazart et al. 2003, in der gezeigt wurde, dass ein durch exzitatorische

Neurotransmitter ausgelöster  $\text{Ca}^{2+}$ -Release die Aktivität der Aromatase im präfrontalen Kortex von Wachteln herunterreguliert (Balthazart et al., 2003). Hiervon ausgehend werden unsere Überlegungen dadurch gestützt, dass bei der Behandlung mit Letrozol und der pharmakologischen Aktivierung von NMDA-Rezeptoren die Aromatase in ihrer Aktivität herunterreguliert wird. Dies geschieht unserer Ansicht nach wie oben beschrieben, durch  $\text{Ca}^{2+}$ -Influx und die damit verbundene Inaktivierung der Aromatase durch Phosphorylierung. Der weitere Weg führt über den Estrogenrezeptor ER $\beta$  und wurde ebenfalls schon beschrieben.

Diskussionswürdig an dieser Stelle sind jedoch die in ihrer Ausprägung deutlich unterschiedliche Abnahme der Synaptopodinsynthese im Kurzzeitversuch nach NMDA-Behandlung. Die in Abb. 9 dargestellte Herunterregulation von Synaptopodin ist für  $p \leq 0,05$  signifikant, während sie in einem Folgeexperiment (s. Abb. 10) für  $p \leq 0,001$  signifikant ist. Dies ist durchaus kritisch zu sehen, da die Wiederholung des Experiments prinzipiell ein anderes Ergebnis liefert, auch wenn die Synaptopodinsynthese in beiden Fällen abnimmt. Wir erklären uns diese Unterschiede durch die Heterogenität in der Zellausbeute und die nur befriedigende Genauigkeit im Auswertungsprozess.

### **V.8 Tetrodotoxin und der NMDA-Rezeptorantagonist (MK801) erhöhen im Kurzzeitversuch die Synaptopodinimmunoreaktivität**

Es wurde versucht, ob sich auch ein gegenteiliger Effekt und damit eine Hochregulation von Synaptopodin auslösen ließe, wenn man die Aktivierung von NMDA-Rezeptoren bzw. die Ausbildung von Aktionspotentialen der Zelle vermindert. Dies gelang uns mit einem NMDA-Rezeptorantagonisten (MK801) und Tetrodotoxin (TTX), einem Blocker von spannungsaktivierten Natriumkanälen, bei denen sich nach 30-minütiger Behandlung eine Hochregulation der Synaptopodin-Immunoreaktivität fand. Dies ließe sich im Gegenzug dadurch erklären, dass nach der Behandlung mit MK801 und TTX weniger Potentiale in den Neuronen ausgebildet werden, es zu weniger  $\text{Ca}^{2+}$ -Influx und CICR kommt und damit eine höhere Aktivität der Aromatase erfolgt, die wiederum einen erhöhten intrazellulären Estradiolgehalt der Zelle zur Folge hat und über ER $\beta$  Synaptopodin hochreguliert.

## V.9 LTP – Molekulare Mechanismen

Bei den bisher diskutierten Ergebnissen fand die Stimulation der Dispersionskulturen nur für 30 Minuten statt. Es ist also ausgeschlossen, dass sich die bisherigen Ergebnisse auf Proteinbiosynthese zurückführen lassen. Genau hier war der Ansatzpunkt für das folgende Experiment: Inwiefern verändert sich die Expression von Synaptopodin, wenn man den Zeitraum der Stimulation über mehrere Tage ansetzt und damit auch die Effekte der Proteinbiosynthese mit einbezieht. Spätestens an dieser Stelle muss man sich für die Interpretation der Ergebnisse mit dem Begriff der Langzeitpotenzierung (LTP) auseinandersetzen und darüberhinaus auch inwiefern man eine pharmakologische NMDA-Rezeptor Aktivierung mit eben dieser Langzeitpotenzierung gleichsetzen kann.

Der Begriff der Langzeitpotenzierung gilt als Grundlage für die Speicherung von Gedächtnisinhalten und beruht letzten Endes auf einer Veränderung der Effizienz synaptischer Verbindungen, strukturellen Modifikationen und der Bildung neuer Synapsen. Erstmals beobachtet wurde dieser Effekt am *Gyrus dentatus*. Hierbei fand sich bei wiederholter Gabe von elektrischen Stimuli eine synaptische Potenzierung (Bliss et al., 1973). Zu der „klassischen“ Form des postsynaptisch induzierten, NMDA-abhängigen Form des LTP, das für die CA3-CA1 Region im Hippocampus gefunden wurde, fanden sich jedoch auch NMDA-Rezeptor unabhängige Formen (Nicoll und Schmitz, 2005)

Es gibt mit Sicherheit keinen einheitlichen Mechanismus, der eine LTP zur Folge hat, jedoch lässt sich dieses Phänomen anhand der molekularen Mechanismen und des Zeitrahmens, der für die Ausbildung erforderlich ist, einteilen. Seit längerem hat sich die Einteilung in Late-LTP (L-LTP, Proteinsynthese abhängiger, Stunden *in vitro* und Tage oder Wochen *in vivo* dauernder Prozess) und Early-LTP (E-LTP, Proteinsynthese unabhängiger Prozess, induziert durch eine Episode eines konditionierten Stimulus) durchgesetzt. Was dieser Einteilung auf molekularer Ebene zu Grunde liegt, ist jedoch bis heute nicht gänzlich geklärt. Jedoch gibt es Vermutungen, die zu einer weiteren Einteilung führten, nämlich LTP1, LTP2 und LTP3.

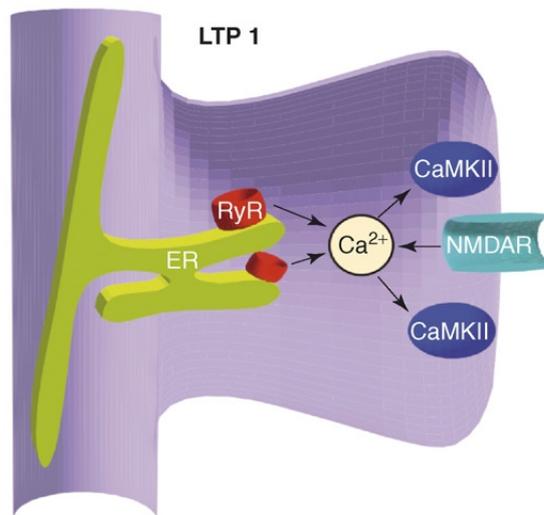


Abb. 13 : Molekulare Grundlage von LTP1 (Quelle: Raymond, 2007)

Beim LTP1 erfolgt nach NMDA-Rezeptoraktivierung ein Ca<sup>2+</sup>-Influx, der über den Ryanodin-Rezeptor wiederum zum Ca<sup>2+</sup>-Release aus dem endoplasmatischen Retikulum führt. Die kurzfristige Änderung des cytosolischen Ca<sup>2+</sup>-Gehalts bewirkt eine Aktivitätsveränderung verschiedener Proteinkinasen (hier dargestellt: CaMKII), die durch Phosphorylierung posttranslationale Proteinmodifikation betreiben. Diese Form des LTP dient als molekulare Grundlage für die Interpretationen der Kurzzeitstimulationen im Rahmen dieser Doktorarbeit. Sie ist proteinsyntheseunabhängig und gleichbedeutend zum E-LTP (Raymond, 2007).

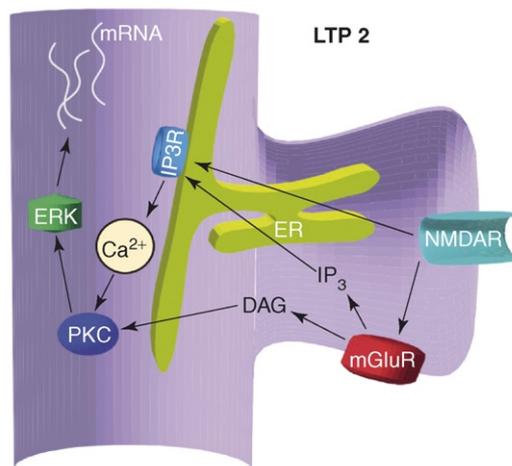
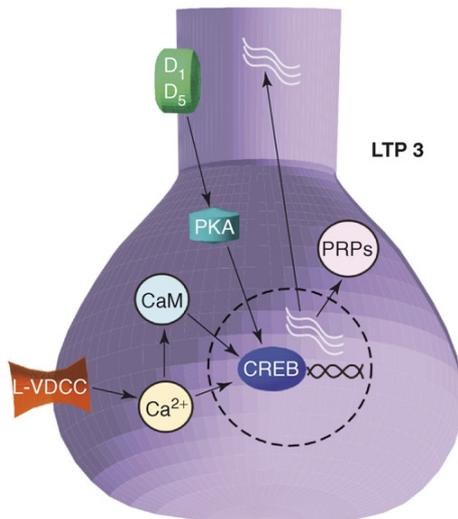


Abb. 14 : Molekulare Grundlage von LTP2 (Quelle: Raymond, 2007)

Das LTP2 benötigt neben der NMDA-Rezeptor Aktivierung auch die Aktivierung metabotroper Glutamatrezeptoren, da der IP3-Rezeptor in die Kaskade involviert ist. Diese Form ist abhängig von Proteinsynthese aber unabhängig von Gentranskription. Die Proteinsynthese muss daher an vorbestehender mRNA erfolgen (s. Abb. 14) (Raymond, 2007).



**Abb. 15** : Molekulare Grundlage von LTP3 (Quelle: Raymond, 2007)

Das LTP3 beruht auf Gentranskription und Proteinsynthese, angeregt durch die Aktivierung spannungsabhängiger Ca<sup>2+</sup>-Kanäle (hier: L-VDCC). Der erhöhte intrazelluläre Ca<sup>2+</sup>-Gehalt oder der Ca<sup>2+</sup>-Calmodulin Komplex (hier: CaM) verursacht über CREB die Transkription von Genen (Raymond, 2007). In diesem Zusammenhang muss allerdings geklärt werden, inwiefern man diese Modelle der LTP, die durch thetanische elektrische Reizung erforscht wurden, mit der pharmakologischen NMDA-Rezeptoraktivierung gleichsetzen kann. Bei hippocampaler Langzeitpotenzierung handelt es sich um eine persistierende Erhöhung von synaptischer Transmission, induziert durch kurze afferente und hochfrequente Stimulation (Bliss et al., 1973). Allgemein akzeptiert in der gängigen Literatur ist, dass die postsynaptische Erhöhung der Ca<sup>2+</sup>-Konzentration durch NMDA-Rezeptoraktivierung, während oder nach thetanischer Reizung, ein notwendiger Schritt für die Ausbildung von homosynaptischen LTP in hippocampalen CA1-Neuronen ist (Bliss et al., 1993). Des Weiteren kann die Schwelle zur Ausbildung aktivitätsabhängiger LTP in CA1-Neuronen durch die Aktivierung metabotroper Glutamatrezeptoren herabgesetzt werden

(Behnisch et al., 1993). In einer neueren Studie konnte gezeigt werden, dass ein chemisches LTP in CA1-Neuronen bei gleichzeitiger Aktivierung von metabotropen- und NMDA-Glutamatrezeptoren induzierbar ist (Fujii et al., 2004). Da unsere Kulturmedien auch Glutamat enthalten, gehen wir davon aus, dass die NMDA-Stimulation eine pharmakologische Langzeitpotenzierung induzieren könnte.

### **V.10 NMDA im Langzeitversuch hat dosisabhängige Effekte und führt zu einer erhöhten Expression von Synaptopodin**

Im Unterschied zur Kurzzeitbehandlung findet sich nun bei der Behandlung mit NMDA ein dosisabhängiger Effekt, wobei hohe Dosen die Synaptopodin-Immunoreaktivität erhöhen und niedrigere Dosen sie vermindern (s. Abb. 3). Das gleiche Muster ergab sich auch mit Kainat (s. Abb. 4). Die Ergebnisse überraschen vorerst, da sich im Kurzzeitversuch über 30 Minuten kein dosisabhängiger Effekt fand. Sie lassen sich jedoch mit weiteren Überlegungen erklären und auch in jüngste Studien einordnen.

Die erste Frage, die sich unserer Arbeitsgruppe zu diesen dosisabhängigen Ergebnissen stellte, war der Ursprung des  $\text{Ca}^{2+}$ , das unserer Auffassung nach für eine Phosphorylierung und Aktivitätsverminderung der Aromatase sorgt. Es sollte geklärt werden, ob es sich um extrazelluläres  $\text{Ca}^{2+}$  handelt oder ob es möglicherweise intrazelluläre  $\text{Ca}^{2+}$ -Speicher sind, die vielleicht sogar  $\text{Ca}^{2+}$ -vermittelt weiteres  $\text{Ca}^{2+}$  freisetzen. Hierzu wurde extrazelluläres  $\text{Ca}^{2+}$  mittels EDTA im Kulturmedium abgepuffert. Nach Pufferung des extrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$  fand sich in unserer Arbeitsgruppe die identische Herunterregulation der Synaptopodin-Immunoreaktivität wie ohne EDTA, während EDTA keinen eigenen Effekt hat (Ossig, 2009, Med. Dissertationen). Dies führt zu der Annahme, dass die internen  $\text{Ca}^{2+}$ -Speicher im dendritischen Spine die Effekte vermitteln und nicht das extrazelluläre  $\text{Ca}^{2+}$ . In diesem Zusammenhang rückte der Spineapparat, der schon seit längerem als  $\text{Ca}^{2+}$ -Speicher des dendritischen Spines gehandelt wird (Fifkova et al., 1983; Vlachos et al., 2009) in den Vordergrund. Unabhängig von diesen neuen Erkenntnissen waren die dosisabhängigen Effekte noch nicht erklärt. Bei der Erklärung zur dosisabhängigen Regulation stand die Betrachtung der intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Speicher wiederum im Vordergrund, die nach dem Versuch mit EDTA mit höchster Wahrscheinlichkeit in der Kette der Signaltransduktion stehen. Es wurde angenommen, dass eine längere Stimulation der Dispersionskulturen

mit einer niedrigen Dosis von NMDA oder Kainat einen vergleichbaren Effekt wie eine kurze Stimulation mit einer höheren Dosis hat. Dies konnte auch bestätigt werden, da sich bei der Langzeitstimulation mit  $10^{-8}$ M NMDA bzw. Kainat eine Herunterregulation von Synaptopodin fand, ähnlich der Kurzzeitstimulation mit höherer Dosis. Soweit konnte also unser Erklärungsmodell, das schon im Rahmen der Kurzzeitstimulation beschrieben wurde auch hier angewendet werden. Bei der höheren Dosis und der Hochregulation von Synaptopodin ging dies jedoch nicht mehr. Die Überlegung hierzu war, dass durch die andauernde Stimulation mit einer unphysiologisch hohen Dosis die intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Speicher entleert werden und dadurch keine Rolle mehr bei der  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängigen Phosphorylierung und damit der Herunterregulation der Aktivität der Aromatase spielen. Durch die folgende, erhöhte Aromataseaktivität, würde Synaptopodin wieder ER $\beta$  vermittelt hochreguliert. Einschränkend muss hier jedoch gesagt werden, dass die Dosis mit  $10^{-5}$ M schon zelltoxisch sein kann und dieses Ergebnis kritisch gesehen werden muss.

Die hier vorgestellten Ergebnisse zur NMDA-Rezeptor abhängigen Expression von Synaptopodin decken sich mit einer Studie von Yamazaki et al. (2001). Dort fand sich, nach NMDA-induzierter Langzeitpotenzierung, ein erhöhter Gehalt von Synaptopodin mRNA im Soma erstmalig nach 75 Minuten. Außerdem fanden Yamazaki et al. eine positive Korrelation zwischen der Persistenz der Langzeitpotenzierung und der Synaptopodin-mRNA Induktion. Dies lässt sich sehr gut auf die hier gefundene dosisabhängige Hochregulation der Synaptopodin-Immunoreaktivität übertragen: Eine höhere Dosis von NMDA hat eine intensivere und länger andauernde Langzeitpotenzierung zur Folge, die wiederum positiv mit der Synaptopodinsynthese korreliert. Die Ergebnisse der Yamazaki Studie auf mRNA wurden im Rahmen dieser Arbeit im Prinzip auf Proteinbasis bestätigt. Eine erhöhte Synaptopodinsynthese nach Induzierung von LTP fanden auch Fukazawa et al. (2003), dort jedoch durch Hochfrequenzstimulation und nicht durch pharmakologische NMDA-Rezeptoraktivierung wie im Rahmen dieser Arbeit.

In einer jüngsten Studie wurde ebenfalls gezeigt, dass Synaptopodin erst in der späten Phase der Langzeit-Potenzierung (L-LTP) hochreguliert wird (Okubo-Suzuki et al., 2008), also in der Proteinsynthese-abhängigen Phase (LTP3). Wir vermuten also, dass es sich bei unseren Langzeitstimulationen mit NMDA um Ergebnisse handelt, die mit dem

LTP3 korrelieren, während die Kurzzeitstimulationen mit dem LTP2 korrelieren und durch posttranslationale Proteinmodifikationen zu erklären sind.

Bei der Proteinsynthese-abhängigen LTP3 scheint der Modifikation des Zytoskeletts eine wichtige Rolle zuzukommen. Bei Induktion von LTP3 wurde nicht nur eine Hochregulation von Synaptopodin gefunden sondern auch eine Hochregulation von F-Aktin (Fukazawa et al., 2003). Dies ist besonders interessant, da im ZNS Synaptopodin und Aktin oft kolokalisiert in Spines und an der postsynaptischen Dichte (PSD) auftreten (Matus et al., 1982). Außerdem verfügt Synaptopodin über zwei Bindungsstellen für Aktin und eine Bindungsstelle für  $\alpha$ -Aktinin (Kremerskothen et al., 2005). Bei der Ausschaltung der Aktinpolymerisierung konnte kein LTP3 mehr induziert werden (Fukazawa et al., 2003).

In der Studie von Okubu-Suzuki (2008) konnte auch gezeigt werden, dass bei einer pharmakologischen Aktivierung von NMDA-Rezeptoren das Spinevolumen nur dann dauerhaft zunimmt, wenn die Neuronen auch Synaptopodin „überexprimieren“. Zusammenfassend nehmen wir an, dass Synaptopodin an der Ausbildung der Proteinsynthese-abhängigen LTP3 maßgeblich beteiligt ist. Die Art und Weise ist hierbei jedoch unklar und Gegenstand der Forschung.

Ebenso wie bei den Experimenten zur Kurzzeitstimulation wurde nun versucht, welche Ergebnisse sich bei einer Verminderung von Aktionspotentialen der Neurone finden würden. Die Synaptopodin-Immunoreaktivität der mit GABA behandelten Dispersionskulturen war ebenfalls dosisabhängig, jedoch führten niedrige Dosen zu einer Hochregulation, während höhere Dosen keinen signifikanten Unterschied zeigten. Die Erklärung hierzu ist wohl die unter GABA verminderte Ausbildung von Aktionspotentialen der Neurone, die einen geringeren  $\text{Ca}^{2+}$ -Release zur Folge hat. Die Aromataseaktivität ist hierdurch höher und der Syntheseweg für Synaptopodin über Estradiol und ER $\beta$  aktiv. Dass hier auch eine Dosisabhängigkeit besteht, könnte daran liegen, dass die unphysiologisch hohe Dosis von  $10^{-5}\text{M}$  weitere hemmende Effekte auf die Zellen hat, die die Synthese wieder auf Kontrollniveau bringen.

### **V.11 AMPA im Langzeitversuch hat dosisabhängige Effekte auf die Synaptopodinexpression**

Die Ergebnisse der Stimulation mit AMPA zeigen einen umgekehrt U-förmigen Zusammenhang zwischen Dosis und Synaptopodinexpression. Dieses Ergebnis interpretieren wir auf der Grundlage der unterschiedlichen Kinetik des AMPA-Rezeptors im Vergleich zum NMDA-Rezeptor und seiner Wechselwirkung mit demselben. Der AMPA-Rezeptor hat eine schnellere Kinetik als der NMDA-Rezeptor und koaktiviert diesen durch Lösung des Magnesium-Blocks. Bei der Stimulation mit den geringeren Dosen  $10^{-8}\text{M}$  und  $10^{-7}\text{M}$  vermuten wir, dass Synaptopodin durch Zunahme pharmakologisch induzierter neuronaler Aktivität hochreguliert wird, während wir vermuten, dass bei höheren Dosen die Koaktivierung des NMDA-Rezeptors überwiegt und das Ergebnis einer geringen NMDA-Rezeptoraktivierung entsprechen könnte (s. Abb. 3: NMDA  $10^{-8}\text{M}$ ). Dies ist jedoch als spekulativ einzuordnen, auch weil der AMPA-Rezeptor noch nicht gänzlich verstanden ist und Gegenstand der Forschung bleibt. Gerade weil jedoch für den AMPA-Rezeptor bisher kein CICR nachgewiesen ist, vermuten wir hier die unterschiedliche Wirkung auf die Synaptopodinexpression über die Koaktivierung des NMDA-Rezeptors.

### **V.12 Aktivierung der Aromatase zeigt „Rescue“-Effekt**

Wenn die Vermutung stimmt, dass die Aktivität der Aromatase tatsächlich die Vermittlerrolle zwischen  $\text{Ca}^{2+}$ -Transienten und Synaptopodinsynthese einnimmt, sollte es bei gleichzeitiger Inhibition und Stimulation der Aromatase auch einen „Rescue“-Effekt geben, der sich wiederum in der Immunoreaktivität von Synaptopodin abzeichnen müsste. Es konnte gezeigt werden, dass Testosteron als Substrat der Aromatase einen stimulierenden Effekt auf die Aromatase hat, da sich in Kulturmedien der mit Testosteron behandelten Gruppen höhere Estradiolgehalte fanden (s. Abb. 11) (Fester et al., 2009).

Genau dies konnte in der Kurzzeitstimulation verifiziert werden: Die durch NMDA reduzierte Aktivität der Aromatase und dadurch verminderte Immunoreaktivität von Synaptopodin, konnte durch gleichzeitige Behandlung mit Testosteron vollkommen

aufgehoben werden. Dieses Experiment ist ein guter Hinweis darauf, dass der Aromatase die genannte Vermittlungsrolle zukommen könnte.

### **V.13 Neuronale Aktivität hat im Langzeitversuch keinen Einfluss auf den Estradiolgehalt im Kulturmedium**

In den behandelten Kulturmedien fand sich weder bei vermehrter- noch bei verminderter neuronaler Aktivität ein signifikanter Unterschied des Estradiolgehalts. Nach unseren Erwartungen hätte nach NMDA-Behandlung der Estradiolgehalt abnehmen sollen, da die Aromataseaktivität durch CICR abnimmt. Jedoch stellt sich beim Langzeitversuch bei dem gepoolten Kulturmedium vermutlich ein Gleichgewicht ein, dass in unseren Auswertungen sehr exakt reproduzierbar war. Außerdem ist zu berücksichtigen, dass wir bei der hohen NMDA-Dosis ( $10^{-5}\text{M}$ ) im Langzeitversuch ohnehin von einer Entleerung der  $\text{Ca}^{2+}$ -Speicher ausgehen, was wiederum eine Steigerung der Aromataseaktivität bewirkt und den Estradiolgehalt auf Kontrollniveau anheben könnte. Dieses Experiment sollte unbedingt im Kurzzeitversuch über 30 Minuten durchgeführt werden. Im Langzeitversuch und mit dem an drei Zeitpunkten gepoolten Medium lässt sich nur bei Testosteron, dem Substrat der Aromatase, ein erhöhtes Estradiolniveau nachweisen, dass durch die nachgewiesene Substrataktivierung zu erklären ist (Fester et al., 2009).

### **V.14 Bedeutung der Ergebnisse für die Klinik**

Die Grundlagenforschung, die im Rahmen dieser Arbeit betrieben wurde, ist notwendig, um zukünftige Strategien zu entwickeln, verschiedene Krankheiten zu behandeln. Im Mittelpunkt steht hierbei der Morbus Alzheimer. Diese Krankheit ist neuropathologisch gekennzeichnet durch einen Verlust von Neuronen und Synapsen im cerebralen Kortex. Biochemisch handelt es sich um ein Problem der Proteinablagerung und Bildung von Neurofibrillenbündeln: Bei Alzheimer Patienten findet sich eine Anhäufung des abnorm gefalteten Amyloid- $\beta$  Proteins (Hashimoto et al., 2003) und des Tau-Proteins, dass zu Fibrillen aggregiert, wenn es stark phosphoryliert ist (Alonso et al., 2001). Diese pathologischen Korrelate werden neuerdings im Zusammenhang mit einer veränderten Calciumregulation im Neuron gesehen, insbesondere mit Veränderungen an den Calcium-Pumpen am endoplasmatischen Retikulum, die die Produktion des Amyloid- $\beta$ -

Proteins beeinflussen (Green et al., 2008). Calcium-Antagonisten zeigten bisher allerdings keine Wirksamkeit bei Alzheimer Patienten (Rosenberg et al., 2008). Trotzdem ist es von höchstem Interesse diese Calcium-abhängigen Prozesse weiter zu verstehen, um eine wirksame Behandlung von Alzheimer-Patienten zu ermöglichen.

Mittlerweile konnte in epidemiologischen Studien auch gezeigt werden, dass eine postmenopausale Estrogensubstitutionstherapie das Risiko für Frauen an Alzheimer zu erkranken signifikant reduziert (Henderson, 2006). Der protektive Effekt basiert hierbei auf einer Estrogen-induzierten Sekretion von Interleukin-10 aus Mikroglia-Zellen (Combarros et al., 2008). Unterstützend zu diesem Ergebnis konnte im Gehirn von Alzheimer-Patientinnen auch eine Herunterregulation der Aromataseexpression nachgewiesen werden (Yue et al., 2005; Ishunina et al., 2007), dem Schlüsselenzym der Estrogensynthese.

## VI Zusammenfassung

Der Spineapparat ist ein intrazelluläres Organell, das in 80% der reifen Spines vorhanden ist und aus gestapelten Schichten glatten endoplasmatischen Retikulums und elektronendichten Platten besteht. Seine wahrscheinliche Funktion ist die Kompartimentierung und Freisetzung von Calcium. Synaptopodin ist wiederum ein Aktin-assoziiertes Protein, das eng mit dem Spineapparat in Verbindung steht und als Parameter für denselben genutzt werden kann.

In der vorliegenden Arbeit wurde der Einfluss von neuronaler Aktivität auf die Expression von Synaptopodin untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass Estradiol zu einer Herunterregulation der Synaptopodinexpression führt, die wahrscheinlich durch die Freisetzung von intrazellulärem Calcium gesteuert wird und durch membranständige Rezeptoren ausgelöst wird. Um diese These zu überprüfen, wurden die Kulturen mit exzitatorischen Neurotransmittern (NMDA und Kainat), die gesichert eine Calciumfreisetzung zur Folge haben, behandelt. Die Untersuchungen zeigten eine dosisunabhängige Herunterregulation im Kurzzeitversuch und eine dosisabhängige Herauf- bzw. Herunterregulation im Langzeitversuch. Geringere Dosen führten zu erniedrigter und höhere Dosen zu vermehrter Synaptopodinexpression im Langzeitversuch. Bei der Stimulation mit GABA, einem inhibitorischen Transmitter, fand sich das Verhältnis von Dosis zu Synaptopodinexpression genau umgekehrt.

Als Vermittler im Signalweg fand sich die Aromatase, die durch Calcium-induzierte Phosphorylierung inaktiv wird und über verminderte Estradiolproduktion eine Herunterregulation der Synthese von Synaptopodin verursacht. Diese verminderte Synthese wird über den ER $\beta$  reguliert. Bei der gemeinsamen Stimulation mit NMDA und Testosteron, dem Substrat der Aromatase, fand sich keine Herunterregulation der Synaptopodinexpression. Synaptopodin hat verschiedene Verbindungen zum Aktinzytoskelett und wirkt sich, bei verringerter Synthese, destabilisierend auf dasselbige aus. Dies führt zu einer verminderten Fähigkeit, Langzeitpotenzierungen auszubilden.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass die Calciumhomöostase des Spines einen entscheidenden Einfluss auf die synaptische Plastizität hat. Die durch Calcium regulierte Aromatase und Estradiol sind notwendig für die Synthese von Synaptopodin, das

wiederum eine entscheidende Funktion dafür hat, dass Langzeitpotenzierungen stattfinden können.

## VII Literaturverzeichnis

Abdelgadir SE, Resko JA, Ojeda SR, Lephart ED, McPhaul MJ, Roselli CE (1994) Androgens regulate aromatase cytochrome P450 messenger ribonucleic acid in rat brain. *Endocrinology* 135: 395-401.

Alonso A, Zaidi T, Novak M, Grundke-Iqbal I, Iqbal K (2001) Hyperphosphorylation induces self-assembly of tau into tangles of paired helical filaments/straight filaments. *PNAS* 98: 6923-8.

Altman J, Das GD (1965) Autoradiographic and histologic evidence of postnatal neurogenesis in rats. *J Comp Neurol* 124: 319-335.

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, Oh J, Giardino L, Chabanis S, Faul C, Reiser J, Mundel P (2005) Synaptopodin regulates the actin-bundling activity of  $\alpha$ -actinin in an isoform-specific manner. *J Clin Invest* 115: 1188–1198.

Asanuma K, Yanagida-Asanuma E, Faul C, Tomino Y, Kim K, Mundel P (2006) Synaptopodin orchestrates actin organization and cell motility via regulation of RhoA signalling. *Nat Cell Biol* 8: 485–491.

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

Bardo S, Cavazzini MG, Emptage N (2006) The role of the endoplasmic reticulum  $Ca^{2+}$  store in the plasticity of central neurons. *Trends Pharmacol Sci* 27: 78-84.

Barnard EA, Skolnick P, Olsen RW, Mohler H, Sieghart W, Biggio G, Braestrup C, Bateson AN and Langer SZ (1998) International Union of Pharmacology. XV. Subtypes of gamma-aminobutyric acidA receptors: classification on the basis of subunit structure and receptor function. *Pharmacol Rev* 50: 291–313.

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.

Behnisch T, Reymann KG (1993) Co-activation of metabotropic glutamate and N-methyl-D-aspartate receptors is involved in mechanisms of long-term potentiation maintenance in rat hippocampal CA1 neurons. *Neuroscience* 54:37-47.

Benninghoff A, Drenckhahn D (2004a) Aufl. 16 Anatomie Band 1. Makroskopische Anatomie, Histologie, Embryologie, Zellbiologie. Urban & Fischer bei Elsevier S. 182-187

Benninghoff A, Drenckhahn D (2004b) Aufl. 16 Anatomie Band 2. Makroskopische Anatomie, Histologie, Embryologie, Zellbiologie. Urban & Fischer bei Elsevier S.506-509

Bliss TV, Collingridge GL (1993) A synaptic model of memory: Longterm potentiation in the hippocampus. *Nature* 361: 31–39.

Bliss TV, Gardner-Medwin AR (1973) Long-lasting potentiation of synaptic transmission in the dentate area of the unanaesthetized rabbit following stimulation of the perforant path. *J Physiol* 232: 357-74.

Bork P, Sudol M (1994) The WW domain: a signalling site in dystrophin? *Trends Biochem Sci* 19 :531-3

Bowery N (1989) GABAB receptors and their significance in mammalian pharmacology. *Trends Pharmacol Sci* 10:401-407.

Brewer GJ (1997) Isolation and culture of adult rat hippocampal neurons. *J Neurosci Methods* 71: 143-55.

Cajal SRY (1891) On the structure of the cerebral cortex in certain mammals. *La Cellule* 7:125–176.

Castets F, Bartoli M, Barnier JV, Baillat G, Salin P, Moqrich A, Bourgeois JP, Denizot F, Rougon G, Calothy G, Monneron A (1996) A novel calmodulin-binding protein, belonging to the WD-repeat family, is localized in dendrites of a subset of CNS neurons. *J Cell Biol* 134: 1051-62.

Chen G, van den Pol AN (1998) Presynaptic GABAB autoreceptor modulation of P/Q-type calcium channels and GABA release in rat suprachiasmatic nucleus neurons. *J Neurosci* 18:1913-22.

Clark RE, Broadbent NJ, Zola SM and Squire LR (2002) Anterograde amnesia and temporally graded retrograde amnesia for a nonspatial memory task after lesions of hippocampus and subiculum. *J Neurosci* 22: 4663-4669.

Collingridge GL, Lester RA (1989) Excitatory amino acid receptors in the vertebrate central nervous system. *Pharmacol Rev* 41:143-210.

Combarros O, Sánchez-Juan P, Riancho JA, Mateo I, Rodríguez-Rodríguez E, Infante J, García-Gorostiaga I, Vázquez-Higuera JL, Berciano J (2008) Aromatase and interleukin-10 genetic variants interactively modulate Alzheimer's disease risk.

Conn PJ, Pin JP (1997) Pharmacology and functions of metabotropic glutamate receptors. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 37:205-37.

Cull-Candy S, Brickley S and Farrant M (2001) NMDA receptor subunits: diversity, development and disease. *Curr Opin Neurobiol* 11: 327-335.

Dailey ME, Smith SJ (1996) The dynamics of dendritic structure in developing hippocampal slices. *J Neurosci* 16: 2983-2994.

Davies CH, Clarke VR, Jane DE, Collingridge GL (1995) Pharmacology of postsynaptic metabotropic glutamate receptors in rat hippocampal CA1 pyramidal neurones. *Br J Pharmacol* 116:1859-69.

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: 10494-10499.

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.

Dichter MA (1989) Cellular mechanisms of epilepsy and potential new treatment strategies. *Epilepsia* 30:3-12.

Drew CA, Johnston GA, Weatherby RP (1984) Bicuculline-insensitive GABA receptors: studies on the binding of (-)-baclofen to rat cerebellar membranes. *Neurosci Lett* 52: 317-321.

Einbound A, Sudol M (1996) Towards prediction of cognate complexes between the WW domain and proline-rich ligands. *FEBS Lett* 384: 1-8.

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.

Fester L, Zhou L, Bütow A, Huber C, von Lossow R, Prange-Kiel J, Jarry H, Rune GM (2009) Cholesterol-promoted synaptogenesis requires the conversion of cholesterol to estradiol in the hippocampus. *Hippocampus* 19:692-705.

Fiala JC, Feinberg M, Popov V, Harris KM (1998) Synaptogenesis via dendritic filopodia in developing hippocampal area CA1. *J Neurosci* 18: 8900-8911.

Fifkova E, Delay RJ (1982) Cytoplasmic actin in neuronal processes as a possible mediator of synaptic plasticity. *J Cell Biol* 95: 345-350.

Fifkova E, Markham JA, Delay RJ (1983) Calcium in the spine apparatus of dendritic spines in the dentate molecular layer. *Brain Res* 266:163–168.

Fischer M, Kaech S, Knutti D, Matus A (1998) Rapid actin-based plasticity in dendritic spines. *Neuron* 20: 847-845.

Fort P, Luppi PH, Wenthold R, Jouvét M (1980) Neurones immunoreactifs - la glycine dans le bulbe rachidien du chat. *CR Seances Acad Sci* 311 205-212.

Fujii S, Sasaki H, Mikoshiba K, Kuroda Y, Yamazaki Y, Mostafa Taufiq A, Kato H (2004) A chemical LTP induced by co-activation of metabotropic and N-methyl-D-aspartate glutamate receptors in hippocampal CA1 neurons. *Brain Res* 999:20-8.

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: 447–460.

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, Wozniak A, Azcoitia I, Rodriguez JR, Hutchison RE, Hutchison JB (1999) Aromatase expression by astrocytes after brain injury: implications for local estrogen formation in brain repair. *Neuroscience* 89: 567-578.

Garner CC, Tucker RP, Matus A (1988) Selective localization of messenger RNA for cytoskeletal protein MAP2 in dendrites. *Nature* 336: 674-677.

Gilboa A, Winocur G, Rosenbaum RS, Poreh A, Gao F, Black SE, Westmacott R, Moscovitch M (2006) Hippocampal contributions to recollection in retrograde and anterograde amnesia. *Hippocampus* 11: 966-980.

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

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

Green KN, LaFerla FM (2008) Linking calcium to Abeta and Alzheimer's disease. *Neuron* 59:190-4.

Hammes A, Andreassen TK, Spoelgen R, Raila J, Hubner N, Schulz H, Metzger J, Schweigert FJ, Lippa PB, Nykjaer A, Willnow TE (2005) Role of endocytosis in cellular uptake of sex steroids. *Cell* 122:751-62.

Hempel H, Teipel SJ, Alexander GE, Horwitz B, Teichberg D, Schapiro MB, Rapoport SI (1998) Corpus callosum atrophy is a possible indicator of region- and cell type-specific neuronal degeneration in Alzheimer disease: a magnetic resonance imaging analysis. *Arch Neurol* 55: 193-198.

Harada N, Yamada K, Foidart A, Balthazart J (1992) Regulation of aromatase cytochrome P-450 (estrogen synthetase) transcripts in the quail brain by testosterone. *Mol Brain Res* 15: 19-26.

Harris KM, Kater SB (1994) Dendritic spines: cellular specialisations imparting both stability and flexibility to synaptic function. *Annu Rev Neurosci* 17: 341-371.

Hashimoto M, Rockenstein E, Crews L, Masliah E (2003) Role of protein aggregation in mitochondrial dysfunction and neurodegeneration in Alzheimer's and Parkinson's diseases. *Neuromolecular Med* 4:21-36.

Henderson VW (2006) Estrogen-containing hormone therapy and Alzheimer's disease risk: understanding discrepant inferences from observational and experimental research. *Neuroscience* 138:1031–1039.

Hill DR, Bowery NG (1981) 3Hbaclofen and 3H-GABA bind to bicuculline-insensitive GABA B sites in rat brain. *Nature* 290:149-52.

Hojo Y, Hattori TA, Enami T, Furukawa A, Suzuki K, Ishii HT, 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 P45017a and P450 aromatase localized in neurons. *Proc Natl Acad Sci* 101: 865-870.

Ishunina TA, Fischer DF, Swaab DF (2007) Estrogen receptor  $\alpha$  and its splice variants in the hippocampus in aging and Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging* 28:1670–1681.

Jane DE, Lodge D, Collingridge GL (2009) Kainate receptors: pharmacology, function and therapeutic potential *Neuropharmacology* 56:90-113.

Jedlicka P, Vlachos A, Schwarzacher SW, Deller T. (2008). A role for the spine apparatus in LTP and spatial learning. *Behav Brain Res* 192:12–19.

Jonas P (1993) Glutamate receptors in the central nervous system. *Ann NY Acad Sci* 707:126-35.

Kennedy MB (2000) Signal-processing machines at the postsynaptic density. *Science* 290: 750-754.

Kremerskothen J, Frotscher M (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: 5913-21.

Libri V, Constanti A, Zibetti M, Postlethwaite M (1997) Metabotropic glutamate receptor subtypes mediating slow inward tail current (IADP) induction and inhibition of synaptic transmission in olfactory cortical neurones. *Br J Pharmacol* 120:1083-95.

Lin LH, Talman WT (2002) Coexistence of NMDA and AMPA receptor subunits with nNOS in the nucleus tractus solitarii of rat. *Journal of Chemical Neuroanatomy* 24:287-296.

Lorente de No (1934) Studies on the structure of the cerebral cortex. II. Continuation of the study of ammonic system. *Journal für Psychologie und Neurologie* 46:113-77.

Lu Q, Pallas DC, Surks HK, Baur WE, Mendelsohn ME, Karas RH (2004) Striatin assembles a membrane signaling complex necessary for rapid, nongenomic activation of endothelial NO synthase by estrogen receptor alpha. *Proc Natl Acad Sci* 101: 17126–31.

Lüllmann-Rauch (2003) 1. Aufl., *Histologie*. Thieme Verlag, S. 151-155.

Lynch MA (2004) Long-term potentiation and memory. *Physiol Rev* 84: 87-136.

Macdonald RL (1989) Antiepileptic drug actions. *Epilepsia* 30:19-38.

Maguire EA, Frackowiak RS, Frith CD (1997) Recalling routes around london: activation of the right hippocampus in taxi drivers. *J Neurosci* 17:7103-10.

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* 79: 7590-1594.

Mayer ML, Westbrook GL (1987) The physiology of excitatory amino acids in the vertebrate central nervous system. *Prog Neurobiol* 198728:197-276.

McEwen B (2002) Estrogen actions throughout the brain. *Recent Prog Horm Res* 57: 357-384.

McLennan H (1983) Receptors for the excitatory amino acids in the mammalian central nervous system. *Prog Neurobiol* 20:251-71.

Moqrich A, Mattei MG, Bartoli M, Rakitina T, Baillat G, Monneron A, Castets F (1998) Cloning of human striatin cDNA (STRN), gene mapping to 2p22-p21, and preferential expression in brain. *Genomics* 51: 136-9.

Morris RG, Garrud P, Rawlins JN, O'Keefe J (1982) Place navigation impaired in rats with hippocampal lesions. *Nature* 297: 681-683.

Mukai H, Tsurugizawa T, Ogiue-Ikeda M, Murakami G, Hojo Y, Ishii H, Kimoto T, Kawato S (2006) Local neurosteroid production in the hippocampus: influence on synaptic plasticity of memory. *Neuroendocrinology* 84: 255-263.

Mukai H, Tsurugizawa T, Murakami G, Kominami S, Ishii H, Ogiue-Ikeda M, Takata N, Tanabe N, Furukawa A, Hojo Y, Ooishi Y, Morrison JH, Janssen WG, Rose JA, Chambon P, Kato S, Izumi S, Yamazaki T, Kimoto T, Kawato S (2007) Rapid modulation of long-term depression and spinogenesis via synaptic estrogen receptors in hippocampal principal neurons. *J Neurochem* 100: 950-967.

Mundel P, Heid HW, Mundel TM, Kruger M, Reiser J, Kriz W (1997a) Synaptopodin: an actin-associated protein in telencephalic dendrites and renal podocytes. *J Cell Biol* 139: 193-204.

Mundel P, Reiser J, Zuniga Mejia Borja A, Pavenstadt H, Davidson GR, Kriz W, Zeller R (1997b) Rearrangements of the cytoskeleton and cell contacts induce process formation during differentiation of conditionally immortalized mouse podocyte cell lines. *Exp Cell Res* 236: 248-258.

Nakanishi S, Masu M, Bessho Y, Nakajima Y, Hayashi Y, Shigemoto R (1994) Molecular diversity of glutamate receptors and their physiological functions. *EXS* 71:71-80.

Nicoll RA, Schmitz D (2005) Synaptic plasticity at hippocampal mossy fibre synapses. *Nat Rev Neurosci* 6:863-76.

Nimchinsky EA, Sabatini BL, Svoboda K (2002) Structure and function of dendritic spines. *Annu Rev Physiol* 64: 313-353.

Okabe S, Miwa A, Okado H (2001) Spine formation and correlated assembly of presynaptic and postsynaptic molecules. *J Neurosci* 21: 6105-6114.

Okubo-Suzuki, Daisuke Okada, Mariko Sekiguchi, Karo Inokuchi (2008) Synaptopodin maintains the neural activity-dependent enlargement of dendritic spines in hippocampal neurons *Mol Cell Neurosci* 38:266-76.

Oren I, Nissen W, Kullmann DM, Somogyi P, Lamsa KP (2009) Role of ionotropic glutamate receptors in long-term potentiation in rat hippocampal CA1 oriens-lacunosum moleculare interneurons. *J Neurosci* 29:939-50.

Ossig C (2009) Der Einfluss der Calciumhomöostase in hippocampalen Neuronen auf die Synaptopodinexpression dendritischer Spines. Med. Dissertation. Universität Hamburg.

Papa M, Bundman MC, Greenberger V, Segal M (1995) Morphological analysis of dendritic spine development in primary cultures of hippocampal neurons. *J Neurosci* 15: 1-11.

van den Pol AN, Gorcs T (1988) Glycine and glycine receptor immunoreactivity in brain and spinal cord. *J Neurosci* 8:472-492.

Prange-Kiel J, Wehrenberg U, Jarry H, Rune GM (2003) Para/autocrine regulation of estrogen receptor in hippocampal neurons. *Hippocampus* 13: 184-192.

Prange-Kiel J, Rune GM (2006) Direct and indirect effects of estrogen on rat hippocampus. *Neuroscience* 138:765-772.

Raymond CR (2007) LTP forms 1, 2 and 3: different mechanisms for the "long" in long-term potentiation. *Trends Neurosci* 30:167-75.

Revankar CM, Cimino DF, Sklar LA, Arterburn JB, Prossnitz ER (2005) A transmembrane intracellular estrogen receptor mediates rapid cell signaling. *Science* 307:1625-30.

Roselli CE, Horton LE, Resko JA (1985) Distribution and regulation of aromatase activity in the rat hypothalamus and limbic system. *Endocrinology* 117: 2471-2477.

Rosenberg PB, Mielke MM, Tschanz J, Cook L, Corcoran C, Hayden KM, Norton M, Rabins PV, Green RC, Welsh-Bohmer KA, Breitner JC, Munger R, Lyketsos CG (2008) Effects of cardiovascular medications on rate of functional decline in Alzheimer disease. *Am J Geriatr Psychiatry* 16:883-92.

Rune GM, Frotscher M (2005) Neurosteroid synthesis in the hippocampus: role in synaptic plasticity. *Neuroscience* 136: 833-842.

Rune GM, Lohse C, Prange-Kiel J, Fester L, Frotscher M (2006a) Synaptic plasticity in the hippocampus: effects of estrogen from the gonads or hippocampus? *Neurochem Rev* 31: 145-55.

Rune GM., von Schassen C, Fester L, Prange-Kiel J (2006b) Oestrogen synthesis in the hippocampus: Role in axon outgrowth. *J Neuroendocrinology* 18: 847-856.

Sanghera MK, Simpson ER, McPhaul MJ, Kozlowski G, Conley AJ, Lephart ED (1991) Immunocytochemical distribution of aromatase cytochrome P450 in the rat brain using peptide-generated polyclonal antibodies. *Endocrinology* 129: 2834-2844.

Schoepp DD, Conn PJ (1993) Metabotropic glutamate receptors in brain function and pathology. *Trends Pharmacol Sci* 11:13-20.

Scoville WB and Milner B (1957) Loss of recent memory after bilateral hippocampal lesions. *J Neuropsychiatry Clin Neurosci* 12: 103113.

Shimizu Y, Yarborough C, Osawa Y (1993) Competitive product inhibition of aromatase by natural estrogens. *J Steroid Biochem Mol Bio* 144: 651-6.

Sivilotti L, Nistri A (1991) GABA receptor mechanism in the central nervous system. *Prog Neurobiol.* 36:35-92.

Sorra KE, Harris KM (2000) Overview on the structure, composition, function, development and plasticity of hippocampal dendritic spines. *Hippocampus* 10:501-511.

Spacek J, Harris KM (1997) Three-dimensional organization of smooth endoplasmatic reticulum in hippocampal CA1 dendrites and dendritic spines of the immature and mature rat. *J Neurosci* 17:190-203.

Stefani A, Pisani A, Mercuri NB, Calabresi P (1996) The modulation of calcium currents by the activation of mGluRs. Functional implications. *Mol Neurobiol* 13:81-95.

Sutherland RJ, Weisend MP, Mumby D, Astur RS, Hanlon FM, Koerner A, Thomas MJ, Wu Y, Moses SN, Cole C, Hamilton DA and Hoelsing JM (2001) Retrograde amnesia after hippocampal damage: recent vs. remote memories in two tasks. *Hippocampus* 11: 27-42.

Takahashi T, Kajikawa Y, Tsujimoto T (1998) G-Protein-coupled modulation of presynaptic calcium currents and transmitter release by a GABAB receptor. *J Neurosci* 18:3138-46.

Vlachos A, Korkotian E, Schonfeld E, Copanaki E, Deller T, Segal M (2009) Synaptopodin regulates plasticity of dendritic spines in hippocampal neurons. *J Neurosci* 28: 1017-1033.

Walikonis RS, Jensen ON, Mann M, Provance Jr DM, Mercer JA, Kennedy MB (2000) Identifications of proteins in the postsynaptic density fraction by mass spectrometry. *J Neurosci* 20: 4069-4080.

Wehrenberg U, Prange-Kiel J, Rune GM (2001) Steroidogenic factor-1 expression in marmoset and rat hippocampus: co-localisation with StAR and aromatase. *Journal of Neurochemistry* 76: 1879-1886.

Woolley CS, McEwen BS (1993) Roles of estradiol and progesterone in regulation of hippocampal dendritic spine density during the estrous cycle in the rat. *J Comp Neuro* 336:293-306.

Yamazaki M (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.

Yue X, Lu M, Lancaster T, Cao P, Honda S, Staufenbiel M, Harada N, Zhong Z, Shen Y, Li R (2005) Brain estrogen deficiency accelerates Ab plaque formation in an Alzheimer's disease animal model. *Proc Natl Acad Sci USA* 102:19198–19203.

Zhang W, Benson DL (2000) Development and molecular organization of dendritic spines and their synapses. *Hippocampus* 10: 512-26.

Zhao X, MacBride MM, Peterson BR, Pfaff DW, Vasudevan N (2005) Calcium flux in neuroblastoma cells is a coupling mechanism between non-genomic and genomic modes of estrogens. *Neuroendocrinology* 81: 174-82.

Ziff EB (1997) Enlightening the postsynaptic density. *Neuron* 19: 1163-1174.

Ziv NE, Smith SJ (1996) Evidence for a role of dendritic filopodia in synaptogenesis and spine formation. *Neuron* 17: 91-102.

## **VIII Danksagung**

An erster Stelle möchte ich mich bei meiner Doktormutter Frau Prof. Dr. med. Rune für die Überlassung des spannenden Themas und insbesondere für die stets unkomplizierte und aufschlussreiche fachliche Unterstützung während der Arbeit bedanken.

Weiterhin möchte ich mich bei meinem Betreuer Dr. Lars Fester bedanken, der mich in die Laborarbeit einwies und immer ein offenes Ohr für die Probleme der Arbeit hatte.

Ein besonderer Dank gilt Helga Herbort, die mich mit viel Geduld bei der Arbeit im Labor unterstützte.

Meinen Mitdoktoranden Christiana Ossig, Corinna Voets, Jan-Simon Lanowski, Theresa Bernard und Thomas Kornek danke ich für die tolle Zeit inner- und außerhalb des Labors.

## **IX Eidesstattliche Versicherung**

Ich versichere ausdrücklich, dass ich die Arbeit selbständig 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: \_\_\_\_\_  
Jan Labitzke